



Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

ISSN 1012-2354

Cilt (Volume): 28, Sayı (Issue): 5, Eylül/September-2012

<http://fbe.erciyes.edu.tr/>



***Phytophthora capsici* Leon. ile enfekte edilen duyarlı ve dayanıklı biber genotiplerinin köklerinde antioksidatif tepkiler ve lipid peroksidasyonu**

Esra KOÇ, A. Sülün ÜSTÜN

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100, Tandoğan/ ANKARA

ÖZET

Phytophthora capsici'ye dayanıklılıkları farklı olan üç biber genotipi [dayanıklı PM-702, duyarlı Kahramanmaraş-Acı (KM-Acı) ve Demre-8] peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesini, fenolik bileşikler ve bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA (malondialdehit)'yi analiz etmek için farklı zoospor konsantrasyonları (10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor/ml) ile inokule edilmiştir. Enfeksiyondan sonra altıncı günde biber genotiplerinin köklerinde zoospor konsantrasyonlarına bağlı olarak peroksidaz aktivitesinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. İnokule edilen dayanıklı PM-702 genotipinde peroksidaz aktivitesi artmış ve kontrol gruplarındaki en yüksek peroksidaz aktivitesi dayanıklı PM-702 genotipinde saptanmıştır ($P<0.01$). PM-702 ve KM-Acı biber genotiplerinde inokulum konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak fenolik bileşikler artış gösterirken, Demre-8 genotipinde ise azalmıştır ($P<0.01$). Üç biber genotipi MDA içeriği bakımından karşılaştırıldığında Demre-8 genotipindeki MDA miktarının PM-702 ve KM-Acı genotiplerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.01$).

Anahtar Kelimeler:
Antioksidan,
biber,
fenolik,
MDA,
peroksidaz,
P.capsici

Antioxidative Reactions and Lipid Peroxidation in Roots of Susceptible and Resistant Pepper Genotypes infected with *Phytophthora capsici* Leon.

ABSTRACT

Three pepper genotypes (resistant PM-702, susceptible Kahramanmaraş- Hot (KM-Hot) and Demre-8) with, different resistance to *Phytophthora capsici* were inoculated with different concentration of zoospores (10^2 , 10^3 and 10^4 zoospore/ml) to analyze of peroxidase (EC 1.11.1.7) activity, phenolic compounds and MDA (Malondialdehyde) which is a product of lipid peroxidation. Samples were collected from the roots of three pepper genotypes on the 6th days after infection. Important differences were observed in peroxidase activity with respect to zoospore concentration and type of pepper genotypes. Activity of peroxidase was increased in inoculated roots of resistant PM-702 genotype and the highest peroxidase activity in non-infected (control) roots was recorded in resistant genotype PM-702. Although, phenolic compounds were increased in PM-702 and KM-Hot in relation to inoculum concentrations. It was decreased in Demre-8 genotype. When all three pepper genotypes were compared in terms of MDA content on roots. Amount of MDA in the roots of DEM-8 genotype was significantly higher than those of PM-702 and KM-Hot genotypes ($P<0.01$).

Key Words:
Antioxidant,
pepper,
phenolic,
MDA,
peroxidase,
P.capsici

1. Giriş

Dünyanın birçok ülkesinde biber yetiştirilen alanlarda büyük ekonomik zararlara yol açan en önemli hastalık etmenlerinden biri kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan *Phytophthora capsici* Leon. (*P. capsici*)'dur. Hastalık biber yetiştirilen hemen hemen bütün alanlarda görülür ve görüldüğü yıllarda önemli ürün kayıplarına neden olur. *P. capsici* Türkiye'de biber yetiştiriciliği yapılan Marmara, Ege, Akdeniz, Karadeniz ve Güneydoğu bölgelerinde de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır [1]. Dünyada ilk kez biberler üzerinde New Mexico'da görülmüş olan bu fungus daha sonraki yıllarda geniş bir konukçu dizisine sahip olmuştur [2].

Fungus toprakta doğal olarak bulunur, aşırı toprak nemi, sıcaklık ve nemli hava koşullarının olduğu zamanlarda bitki gelişiminin her devresinde bitkileri enfekte edebilmektedir [2]. Uygun ekolojik şartlarda, toprak sulama suyu içinde etmenin bolca oluşan sporangialarından serbest bırakılan zoosporlar biber fidelerini köklerinden enfekte ederken, fidenin kök kısmından itibaren kuruyarak ölmesine neden olmaktadır. Bu enfeksiyonlar genellikle yağışlı mevsimlerde sulama suyu veya yağmur sularının biriktiği iyi drene edilmemiş yerlerde daha çok görülür [3]. Bu hastalığın yoğun olarak görüldüğü tarlalarda ürün almak bazen imkansız olmaktadır. Hastalığın görüldüğü diğer ülkelerde, ileri dönemlerde olgun meyvelere bulaştığında yine üründe büyük miktarlarda kalite ve kantite kayıplarına neden olmaktadır [3].

Kök boğazı yanıklığı etmeni *P. capsici* bir toprak fungusu olduğundan, hastaliksız tohum ve fide kullanmak, iyi drenajlı toprak koşullarını hazırlamak, ekim şekline dikkat etmek gibi kültürel önlemlerin yanı sıra kimyasal yönden mücadelede etkinlik sınırlı olmaktadır [4, 5, 6]. Bunun yanı sıra, insan ve çevre sağlığı açısından da kimyasal yoldan mücadelenin oluşturduğu zararlar söz konusudur. Ayrıca bu yolların pahalı olması ve uygulama güçlüğü de ayrı bir sorun yaratmaktadır [7]. Ekonomik öneme sahip olan biber bitkisinin en önemli hastalık etmenlerinden biri olan *P. capsici* bitkinin yaşamını, verimini ve kalitesini etkilemektedir. Dolayısıyla üretici ve ülke ekonomisi zarar görmektedir. Bu zararları en aza indirmek için, fungus, biberde meydana getirdiği kök boğazı çürüklüğü ve biber bitkisinin bu hastalık etmeninden nasıl korunabileceği hakkında yeterli bilgiye sahip olmak gerekmektedir. Ayrıca biberde yapılan çalışmalar biber kök boğazı hastalığına karşı ilaçlı mücadelenin pek etkili olmadığını da göstermiştir. Etmene karşı bazı kimyasallar geliştirilmesine rağmen, etmenin toprak kaynaklı oluşu ekonomik anlamda kimyasal savaşı olanaksızlaştırdığı gibi kültürel önlemlerle de hastalıkla başarılı bir mücadele yapılamamaktadır. Tarımda zararlı organizmalara karşı koruma amaçlı kullanılan kimyasal maddeler ve ilaçlar hem bitkinin çeşitli organlarında serbest radikallerin oluşum hızını artırmakta hem de ürünün kalitesini düşürmekte ve ürünün maliyetini artırmaktadır [8]. İnsan sağlığına da olumsuz etki yapmakta ve çevre kirliliğine de neden olmaktadır.

Biber ıslahı çalışmalarını yürütenler ise, her türlü agronomik şartta, her çeşit *P. capsici* izolatına dayanıklı, biber kültürü elde etmeyi başaramamışlardır [9]. Bu başarısızlıkta poligenik dayanıklılık, çevreye bağlı değişimler rol oynarken, ıslah programlarında kullanılan kültürleri elde etme konusunda da yoğun araştırmalar gerekmektedir.

Bitkiler çeşitli ajanlar (virulent-avirulent patojenler, nonpatojenler, hücre duvar fragmanetleri, bitki ekstratları, sentetik kimyasallar vs.) sonucunda lokal ve sistemik direnç meydana getirmektedir. Direnç ise bu ajanlar yani direnç uyarıcılar ile meydana gelen ve uzun süreli geniş bir spektrumdur. Uygulanan birçok yöntemle hastalıkların sadece %20 ile %85 arasında kontrolünün gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Patojene karşı kullanılan fungusitlere karşı patojenin dayanıklılığının artması, çevre kirliliğine neden olması ve insan sağlığı üzerindeki kaygılar ayrı bir sorun olarak görülmektedir [10]. Bu yüzden bitki-patojen interaksyonlarının belirlenmesi, dayanıklı çeşitler oluşturulmasına ve hastalıkların kontrol edilmesiyle ilgili yeni stratejilerin geliştirilmesine kadar nasıl bir direnç meydana geldiğinin belirlenmesi ve ekonomik olarak önemli olan bitki türlerinde hastalık direncinin artırılması önem kazanmaktadır. Günümüzde bitkinin kendi direnç mekanizmalarının kullanılarak geniş-spektrumlu direnç sağlanması amacıyla doğal savunma sistemlerine olan ilgi giderek artmaktadır. Araştırmalar, elisitör moleküller, bitki-patojen interaksyonu sonucu olan sinyal moleküller, lokal ve sistemik direnç sırasında oluşan savunma molekülleri üzerine odaklanmıştır.

İnsan ve hayvanlarda olduğu gibi bitkilerin de zararlıların saldırılarından kendilerini korumak için çeşitli savunma sistemlerine sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar bitkideki morfolojik engeller ve bazı biyokimyasal olaylar arasında değişen bir dizi faktördür. Bitkilerdeki biyokimyasal olaylardan sonra sentezlenen sekonder metabolitler, bitki-zararlı ilişkilerinde önemli rol oynarlar. Bunların en önemlileri arasında alkaloidler, glikozidler, fenoller, terpenoidler, taninler ve saponinler olduğu belirtilmiştir. Tarımda bu maddeler, zararlılara karşı yüzyıllardan beri doğrudan veya dolaylı olarak da kullanılmaktadır [11]. Bir bitkide hastalık oluşturabilen bir etmene karşı bitkinin temel savunma mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmalar son yıllarda oldukça fazlalaşmıştır [8, 12, 13].

Hastalığa karşı dayanıklı çeşit geliştirmek ve yetiştiricilikte kullanmak, sağlık ve çevre yönünden uzun sürede katma değeri en yüksek olan mücadele yöntemidir. Ayrıca hastalık nedeniyle meydana gelen ürün kaybının önlenmesi, ekonomik kazancın artışı da sağlayabilecektir. *P. capsici* etmenine karşı dayanıklı biber çeşitlerinin geliştirilmesi, bu hastalığa karşı en iyi mücadele yöntemi olarak görülmektedir. Dolayısıyla patojenle mücadelede doğal olan savunma yollarının bilinmesi ve kullanılması önem kazanmaktadır. Savunmada biyokimyasal mekanizmalarda birçok antioksidan molekül görev almaktadır. Bu moleküllerden olan peroksidaz ve fenolik bileşiklerin patojene karşı en erken cevap olmaları bu moleküllerin ne kadar yaşamsal bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Peroksidazın, lokal ve sistemik direnç için anahtar bileşik olarak kabul edilmesi, H₂O₂'in yıkılmasında alternatif diğer bir yol olduğunun tahmin edilmesi [12], bitki savunma enzimleri arasında hücre yapısını güçlendiren savunma bariyerlerinin oluşumuna katkıda bulunan oksidatif fenollerin oluşumunu katalizlemede görev aldığı düşünülmesi [14], patojen saldırısı süresince ROS metabolizmasına katılmaları [15], bir sekonder metabolit olan fenoliklerin fungi toksik madde olmaları, patojen enfeksiyonlarına cevapta en belirgin cevaplardan biri olarak görülmesi [16] bu iki antioksidanın önemini artırmaktadır.

Bu çalışmadaki amaç, kök boğazı yanıklığı etmenine dayanıklı ve duyarlı olarak tanımlanmış üç biber çeşidinde, hastalık etmeni olan *P. capsici*'nin belirli zoospor konsantrasyonlarında (10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1}) ve belirli zamanda (6. günde) meydana gelecek olan enfeksiyon sonucunda oluşan oksidatif hasara karşı biber fidelerinin köklerinde antioksidanların (peroksidaz ve fenolik bileşikler) ve bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA (Malondialdehit)'nin miktarlarında ne tür değişimler oluşacağını belirlemek, hastalıklı ve hastaliksız biber bitkileri arasındaki antioksidanların aktivitelerindeki farklılıkların incelenmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitkisel materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak *Phytophthora capsici* etmenine dayanıklı PM 702 (CM 334), duyarlı Kahramanmaraş Acı (KM-Acı) ve Demre-8 biber (*Capsicum annuum* L.) çeşitleri kullanılmıştır. PM 702 (Criollo de Morales 334=CM334) 50-60 cm boyunda büyük ve mat yeşil yapraklı, gövdeleri tüylü, koni şeklinde küçük, açık yeşil, etli ve çok acı meyvelere sahip bir çeşittir. PM 702 (CM 334) Fransa Montfavet sebze ıslahı araştırma istasyonundan sağlanmıştır. Kahramanmaraş - Acı Antalya Sebzeçilik Araştırma Enstitüsünde seleksiyon yolu ile elde edilmiş meyveleri konik yapılı, ince etli, acı biber çeşididir. Demre-8 meyveleri 20-25 cm uzunluğunda, parlak koyu yeşil renkli, tatlı ve konik bir biber çeşididir.

2.2. Bitkilerin yetiştirilmesi

Üç biber çeşidinin tohumları % 0.75 sodyum hipoklorürde 1-2 dakika bekletildikten sonra steril su ile yıkanıp içinde %70'lik etanol bulunan beherlerde 5'er dakika bekletilmiş ve litresinde 1-2 damla Tween-20 bulunan steril su ile iyice yıkanmıştır [17]. Yıkanan tohumlar 5'er ml steril su ile ıslatılmış 9 cm çapındaki cam petrilere yerleştirilmiştir. Tohumlar 3 gün 25°C'de su alarak şişmeleri sağlanmıştır.

Daha sonra içlerinde elenmiş bahçe toprağı-elenmiş yanmış ahır gübresi-ince kum (1:1:1) bulunan 15x75x12 cm ebatlarındaki saksılarda aralarında 5cm aralık olacak şekilde hazırlanmış yuvalara üç gün şişmeye bırakılan tohumlardan 3'er adet bırakılarak ekim yapılmıştır.

Gün aşırı sulanarak çimlenmeye bırakılmış fidelikler 2-3 yapraklı devreye geldiklerinde içlerinde eşit büyüme gösterenler seçilmiş ve her yuvada bir fide olacak şekilde saksılarda seyreltme yapılmıştır. İki aylık yetiştirme süresince iki defa % 0.15'lik NPK gübresi (N:P:K 20:20:20, Dow Kimya) sulama suyu olarak verilmiştir. Yaklaşık iki aylık süre sonunda fideler 5-6 yapraklı devreye erişince örnekler alınmıştır.

2.3. *Phytophthora capsici* Leon. - 22 izolatı

Prof. Dr. Salih Maden (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) tarafından sağlanan ve biberlerde kök boğazı yanıklığı etmeni olan *P. capsici*, saf kültür izolatı (*P.capsici* - 22) V₈ eğik agar ortamında saklanarak gerekli olduğu zaman bir aylık stok kültür, zoospor süspansiyonunu elde etmede kullanılmıştır.

2.4. *P. capsici* Leon. - 22 zoospor süspansiyonunun hazırlanması

Phytophthora capsici zoospor süspansiyonu Ward vd.'ne göre hazırlanmıştır [18]. Spor konsantrasyonu sayımı yapmak için hareketli olan zoosporların hareketi %3'lük laktofenollü anilin mavisi ile durdurulduktan sonra hemositometre ile sayımı yapılmıştır [19]. İstenilen inokulum konsantrasyonu (10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor/ml) steril distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.5. Bitki inokulasyonu

Sera şartlarında yetiştirilmiş 5-6 yapraklı fideler toplandıktan sonra kökleri çeşme suyu ile yıkanarak 1-2 dk. % 0.75'lik sodyum hipoklorürde bekletilerek dezenfekte edilmiştir. Daha sonra 1lt'sinde 1-2 damla tween 20 bulunan steril damıtık su ile yıkanmıştır. Her beş fide bir demet olacak şekilde kök boğazları bir hizaya getirilip kökten 3-4 cm yukarisından alüminyum folyo ile sarılarak demetler yapılmıştır. Kök uçları keskin bir bıçakla 1-2 cm kesilmiştir [1]. Diğer yandan her bir uygulama için içlerinde 400'er ml steril tam Hoagland çözeltisi bulunan 500 ml kapasitedeki steril cam kavanozlardan 3'er adet hazırlanmıştır. Ağzı geniş olan bu cam kavanozların her birinde 30'ar adet fide olacak şekilde 6'şar tane demet bırakılmıştır. Bu durumda bitkiler ağzı alüminyum folyo ile kapatılmış sadece bitki demetlerinin sığıdığı açıklık bulunan cam kavanozlar içindeki demetlerin etrafına pamuk sarılarak desteklendikten sonra, değişen ortam koşullarına uyum sağlaması için 3 gün 22±3°C, % 60 nem, 14 saat ışık periyoduna ayarlanmış bitki yetiştirme odasına bırakılmışlardır. Her bir biber çeşidi için kontrol ve 3 farklı konsantrasyonda (10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1}) hazırlanmış 12'şer adet cam kavanoz hazırlanmıştır.

İnokulasyon işlemi için stok zoospor süspansiyonundan seyreltilerek hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki (10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1}) zoospor süspansiyonlarından 250 ml'lik beherlere 100'er ml, kontrol fideler için ise 100'er ml steril su konulmuştur. Her bir çeşit için ayrı hazırlanmış zoospor süspansiyonu içeren beherlerde hazırlanan demetler bir saat bekletildikten sonra içlerinde Hoagland besin çözeltisi bulunan cam kavanozların içine yeniden yerleştirilmiştir. Aynı koşullar altında hasta ve kontrol fidelerinden tesadüfi bloklar deneme deseni modeline göre 6. günde rastgele örnekler alınmıştır. Alınan örneklerin kökleri ayrılarak hemen sıvı azottan (Oksan Ltd. Şti) geçirilmiştir. Daha sonra naylon poşetlere konup etiketlenmiş ve analize kadar -70 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.6. Peroksidaz (POD: EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz enzim ekstraksiyonu Zheng vd' e göre belirlenmiştir [20]. Taze örnek 2 mmol/L EDTA, %1 PVP ve 1 mmol/L PMSF içeren pH'ı 7.0 olan 100 mmol/L KH₂PO₄ tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenat 12000g ve +4°C'de santrifüjlenmiştir. Alınan süpernatant analize kadar -20°C'de saklanmıştır. Peroksidaz aktivitesi Lin ve Kao'ya göre belirlenmiştir [21]. 20 mmol/L guaiacol, 10 mmol/L KH₂PO₄ (pH 7.0), 40 mmol/L H₂O₂ ve 100 µL enzim ekstraktı içeren reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon H₂O₂'in eklenmesiyle başlatılmıştır. 470 nm'de absorbandsdaki artış 1 dakika boyunca spektrofotometrede kaydedilmiştir.

Peroksidaz aktivitesi tetraguicacool'un ekstinksiyon katsayısı ($26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır. Peroksidaz aktivitesinin bir ünitesi (U) oda sıcaklığında 1 dakikada 1 µmol tetraguicacool'un oluşumu için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır ve sonuçlar g taze ağırlık başına verilmiştir.

2.7. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde Folin ciocaltaeu yöntemi kullanılmıştır [22]. Taze örnek %80 metanol ile homojenize edilmiştir. 100µl ekstrakt seyreltilmiş Folin ciocaltaeu ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu çözeltiye 750 µl sodyum bikarbonat çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 90 dak. inkübe edilmiştir. 765nm'de absorbandsdaki değişim spektrofotometrede kaydedilmiştir. Fenolik bileşik miktarı gallik asit standardı kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar gr taze ağırlık başına verilmiştir.

2.8. MDA (Malondialdehit) analizi

MDA analizi Heath ve Packer' e göre belirlenmiştir [23]. Taze örnek % 1 TCA ile homojenize edildikten sonra elde edilen ekstrakta % 20 TCA ve % 0.5 TBA içeren çözelti ilave edilmiştir. 95°C'de 30 dak. su banyosunda inkübe edilmiş, 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okuma yapılmıştır. MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı ($155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

2.9. İstatistik analiz

Peroksidaz, fenolik ve MDA özellikleri tesadüf parselleri deneme tertibinde 3x4 faktöriyel düzende varyans analizi tekniği ile Minitab 16 istatistik paket programında değerlendirilmiştir. Varyans analizlerinde çeşit faktörünün PM-702, DEM-8 ve KM-Acı olmak üzere 3 seviyesi, konsantrasyon faktörünün ise kontrol, 10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} olmak üzere 4 seviyesi dikkate alınmıştır. Grup varyanslarının homojenliği Levene Testi ile kontrol edilmiştir. Farklı ortalamaların belirlenmesinde %5 önem düzeyinde yapılan Tukey Testi kullanılmıştır. Tukey testleri MSTAT-C programı ile yapılmıştır.

3. Bulgular

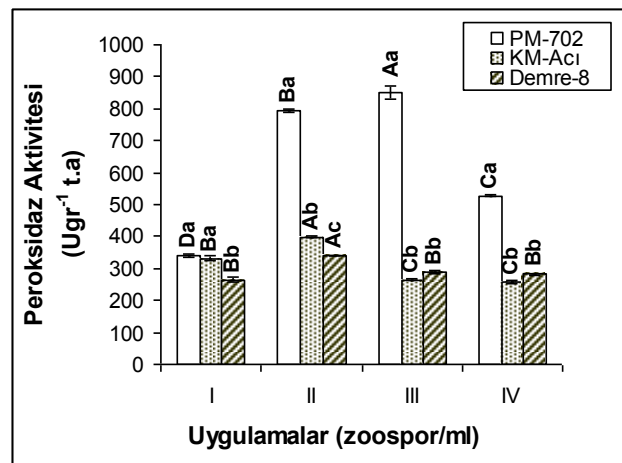
Yapılan varyans analizleri sonucunda üç özellik için de çeşit x konsantrasyon interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Buna uygun olarak yapılan Tukey Testi sonuçları ortalamaların yanında harfli gösterim olarak belirtilmiştir. Büyük harf aynı çeşit biberde (PM-702, KM-Acı, Demre-8) uygulamalar (10^2 , 10^3 , 10^4 zoospor/ml) arası, küçük harf ise aynı uygulamalarda çeşitler arasındaki farklılıkları temsil etmektedir.

Her üç biber genotipi kök peroksidaz aktivitesi özelliği bakımından karşılaştırıldığında (Şekil 1), PM-702 genotipine ait kontrol fidelerin köklerinde 6.gündeki peroksidaz aktivitesinin, KM-Acı ve Demre-8 çeşitlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.01$). PM-702 fidelerinde 10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} konsantrasyonu ile enfekte edilen fidelerin köklerinde enfeksiyonu takiben 6.günde meydana gelen peroksidaz aktivitesi kontrollerine göre artmıştır ($P<0.01$) (Şekil 1). KM-Acı fidelerinin köklerinde 10^2 zoospor ml^{-1} konsantrasyonu ile enfeksiyon sonucunda

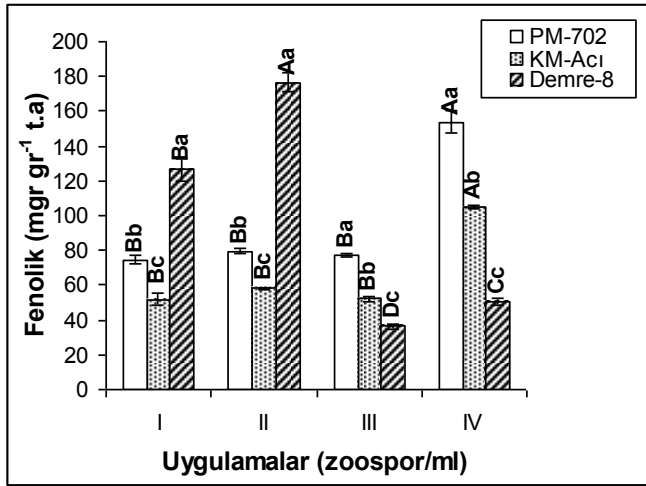
peroksidaz aktivitesi kontrollerine göre artarken, 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} konsantrasyonunda peroksidaz aktivitesi azalmıştır ($P<0.01$). Demre-8 fidelerinin köklerinde ise yine 10^2 zoospor ml^{-1} konsantrasyonu ile enfeksiyon sonucunda peroksidaz aktivitesi kontrollerine göre artarken, 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir ($P<0.01$) (Şekil 1). *P. capsici*'ye duyarlı genotipler KM-Acı ve Demre-8'de yüksek inokulum konsantrasyonlarına (10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1}) bağlı olarak enzim aktivitesinde azalma tespit edilirken, dayanıklı genotip PM-702 'de ise kontrole göre yüksek inokulum konsantrasyonlarında artış belirlenmiştir ($P<0.01$) (Şekil 1). Enfeksiyonu takiben 6. günde 10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} uygulamasında üç biber çeşidinin köklerindeki enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında en fazla enzim aktivitesi dayanıklı PM-702 genotipinde belirlenmiştir ($P<0.01$).

PM-702 fidelerinde 10^2 , 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} konsantrasyonu ile enfekte edilen fidelerin köklerinde enfeksiyonu takiben 6.günde meydana gelen fenolik bileşik miktarı kontrollerine göre artmıştır ($P<0.01$) (Şekil 2). PM-702 ve KM-Acı fidelerinin köklerinde artan inokulum konsantrasyonuna bağlı olarak fenolik bileşik miktarı artış göstermiştir ($P<0.01$). Demre-8 fidelerinin köklerinde ise 10^2 zoospor ml^{-1} konsantrasyonu ile enfeksiyon sonucunda fenolik bileşik miktarı kontrollerine göre artarken, 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} konsantrasyonlarında fenolik bileşik miktarında azalma tespit edilmiştir ($P<0.01$) (Şekil 2). *P. capsici*'ye duyarlı genotip Demre-8'de yüksek inokulum konsantrasyonlarına (10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1}) bağlı olarak fenolik bileşik miktarında azalma tespit edilirken, duyarlı KM-Acı ve dayanıklı genotip PM-702 'de ise artış belirlenmiştir ($P<0.01$) (Şekil 2).

Her üç biber genotipi MDA özelliği bakımından karşılaştırıldığında (Şekil 3), KM-Acı ve Demre-8 genotiplerine ait kontrol fidelerin köklerindeki 6. gündeki MDA miktarı, PM-702'den daha yüksek olduğu bulunmuştur ($P<0.01$). PM-702 fidelerinin köklerinde artan inokulum konsantrasyonuna bağlı olarak MDA miktarı azalmıştır ($P<0.01$). Demre-8 fidelerinin köklerinde fenolik bileşik miktarı ve peroksidaz enzim aktivitesinin en düşük olduğu 10^3 ve 10^4 zoospor ml^{-1} uygulamalarında, MDA miktarı kontrole göre belirgin bir şekilde artış göstermiştir ($P<0.01$) (Şekil 3). *P. capsici*'ye duyarlı genotip KM-Acı'da ise en yüksek MDA miktarı 10^3 zoospor ml^{-1} uygulamasında belirlenmiştir ($P<0.01$) (Şekil 3).



Şekil 1. *P. capsici* ile enfekte edilen biber genotiplerinde peroksidaz aktivitesi (I: Kontrol, II: 10^2 zoospor ml^{-1} , III: 10^3 zoospor ml^{-1} , IV: 10^4 zoospor ml^{-1}).



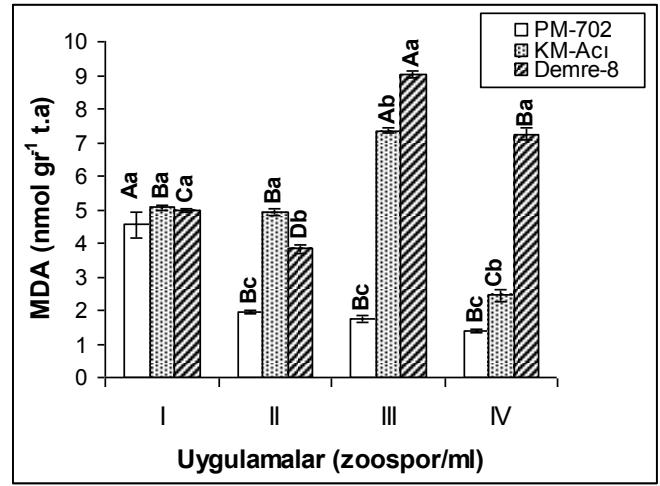
Şekil 2. *P.capsici* ile enfekte edilen biber genotiplerinde fenolik bileşik değişimi (I: Kontrol, II: 10² zoospor ml⁻¹, III: 10³ zoospor ml⁻¹, IV: 10⁴ zoospor ml⁻¹).

4. Tartışma ve Sonuç

Serbest radikallerin (ROS) bölgesel birikimi bitki dokusunda erken meydana gelen cevaplardan biri olarak kabul edilmekte büyük ihtimalle de hipersensitif cevap ve sistemik kazanılmış direncin uyarılmasında görev aldığı belirtilmektedir [24]. ROS oluşumu membran bütünlüğünün kaybına yol açan lipid peroksidasyonu ve doku nekrozuna neden olmaktadır. Diğer taraftan oksidatif hasarlara karşı bitki korumada antioksidan bir sistem gelişmektedir. Bu sistemle ROS üretimi ya baskılanır ya da daha önceden meydana gelen ROS'ler parçalanır [25]. Peroksidaz gibi antioksidan enzimler patojen saldırısı süresince ROS metabolizmasına katıldıkları için yaşamsal öneme sahip bir enzim olarak görülmektedir [15].

Patojenlere karşı geliştirilen savunma mekanizmalarından bir diğeri de fenolik bileşiklerdir. Patojen enfeksiyonlarına cevapta en belirgin cevaplardan biri fenolik bileşiklerin bölgesel sentezine yol açan fenilpropanoid metabolizmasındaki artıştır. Buna rağmen bu cevabın fonksiyonel önemi tamamiyle anlaşılamamıştır. Fakat patojenin yayılmasını engellemek amacıyla enfeksiyon bölgesinde fenolik polimerler ve lignin birikiminin artan fenolik bileşik sentezinin sonucu olabileceği belirtilmektedir [16]. Fenolik bileşikler bazı türlerde enfeksiyona cevap olarak biriktiği bilinmekte, dolayısıyla hastalıklara karşı dirençte önemli bir role sahip olmaktadır [26].

Günümüze kadar yapılan araştırmalar patojenlere karşı fenolik bileşiklerin hücre duvarını güçlendirmeye ve fungal büyümeyi inhibe etmeye yardımcı olduğunu göstermiştir. Ayrıca fenolik bileşikler doğada fungi toksik maddeler olarak bilinmektedir. Yao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bitkilerde fenolik bileşiklerin miktarındaki değişimlerin hastalığa karşı hassasiyetin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir [27]. Fungal patojenlerin enfeksiyon süresince salgıladıkları enzimler hücre duvarını parçalamaya yöneliktir. Çeşitli hücre duvarı bileşikleri fungal hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin aktivasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Hücre duvarına bağlı fenolik bileşikler ve proteinler fungal enzimleri inhibe etmektedir. Aslında hücre duvarının parçalanması ve hücre duvarının kuvvetlendirilmesi fungal patojen enfeksiyon süresince anahtar bir olay olarak görülmektedir [28].



Şekil 3. *P.capsici* ile enfekte edilen biber genotiplerinde MDA miktarı (I: Kontrol, II: 10² zoospor ml⁻¹, III: 10³ zoospor ml⁻¹, IV: 10⁴ zoospor ml⁻¹).

Capsicum annum'un dahil olduğu çeşitli bitkilerde peroksidaz aktivitesi ve fenolik bileşik miktarı arasında bir korelasyon olduğu da belirtilmektedir [29]. Çünkü peroksidaz enzimi patojenik ajanlara karşı savunma süresince bitki hücre duvarında fenolik oluşumunu uyarmaktadır. Gayosa vd. yaptıkları çalışmada inokulasyondan 7 gün sonra yaprak ve gövdelerde peroksidaz aktivitesindeki artışa paralel ve eşzamanlı olarak fenoliklerin miktarının da maksimum düzeye ulaştığını tespit etmişlerdir [30]. Çalışmamızda dayanıklı çeşit olan PM-702 çeşidinde kontrollerine göre peroksidaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde fenolik bileşiklerde kontrollerine göre artış göstermiştir. Hassas çeşit Demre-8'de ise sadece düşük inokulum konsantrasyonlarında enzim aktivite ve fenolik bileşik miktarı artışı saptanmıştır. Dolayısıyla *Capsicum annum*- *P. capsici* interaksyonunun oksidatif stres de önemli bir artışa neden olduğu, enzim aktivite ve fenolik bileşik miktarındaki artışların ise bu interaksiyonla bağlantılı olduğu söylenebilir.

Çalışmamızda hassas çeşitlerde yüksek inokulum konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ve fenolik bileşik miktarı azalma göstermiştir. Yapılan çalışmalarda hassas çeşitlerde fenolik bileşik içeriğinin enfeksiyondan sonra kontrollerine göre azaldığı saptanmıştır. Yani fenolik maddelerin tüketildiği belirlenmiştir. Fakat bu tüketimin hassas çeşitlerde dirençli çeşitlere göre daha fazla olduğu da tespit edilmiştir. Bu tüketimin patojenlerin yapısını bozmaya, parçalamaya yönelik bazı metabolitlerin salgılanmasına yönelik olabileceği tahmin edilmektedir [31]. Çünkü fenolikler hastalık direncinde gerekli olan pterokapan fitoaleksinler, hidroksisinnamik asit esterleri gibi maddelerin substratıdır. Diğer bir olasılık ise ROS'ların aşırı üretimi ve antioksidan savunmanın tüketimi ile hücrelerdeki oksidan - antioksidan dengesinin bozulması ve oksidatif stresin meydana gelmiş olmasıdır.

MDA konsantrasyonu oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonun bir indikatörü olarak kullanılmaktadır [32]. Çalışmamızda peroksidaz aktivitesi ve fenolik artışına paralel olarak özellikle dirençli PM-702 çeşidinde MDA miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Hassas çeşitlerde ise enzim aktivitesinin azaldığı inokulum konsantrasyonlarında MDA miktarının arttığı belirlenmiştir. Savunma süresince fenolik maddelerin görevi oksidatif hasara neden olan singlet oksijenin toksitesine karşı bitkiyi korumak ve lipid peroksidasyonunu

engellemektir. Çünkü singlet oksijen hücre membranındaki yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksidlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda da membrandaki lipidlerin yapısı bozulmaktadır. Dolayısıyla birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da genel olarak patojene karşı fenolik maddelerin sentezlenmesinin ve artmasının nedeni bu reaktif oksijen partiküllerinin etkilerini azaltmaya yönelik olabilir. Yapılan araştırmalar aynı türün çeşitleri arasında da farklılıklar olduğunu göstermiştir. Fungal uyarıcılar farklı noktalardaki yollar ile interaksiyona girmektedir [33], dolayısıyla da farklı konukçularda farklı savunma tepkileri oluşmaktadır. Oluşan bu farklı savunma tepkileri ise farklı genotiplere sahip olunmasına bağlanmaktadır. Bu farklılık aynı türün çeşitleri arasında ve strese duyarlı - dayanıklı olan çeşitler arasında yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir.

Bu çalışma farklı inokulum konsantrasyonlarına tabi tutulan biber bitkisinde *P. capsici*'nin meydana getirdiği kök boğazı yanıklığı hastalığının kontrolünde bitki savunma mekanizmalarının harekete geçtiğini gösteren veriler sunmaktadır. Peroksidaz aktivitesindeki değişimler ve fenolik bileşiklerin birikimi, hastalığa karşı oluşturulan bir savunma mekanizması olarak görülmektedir. Yani elde edilen sonuçlar *P. capsici*'nin oluşturduğu hastalık ile antioksidan sistem arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir.

5. Kaynaklar

- Abak, K. ve Pitrat, M., Biberlerde kök boğazı yanıklığı (*Phytophthora capsici* Leon.) hastalığına dayanıklılık üzerinde bir araştırma. A.Ü.Z.F. Yıllığı, 29 (2-3-4), 943-947, 1981
- Leonian, L. H., Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. Phytopathol., 12, 401-408, 1922.
- Anonim, Zirai Mücadele Teknik Talimatı, Sebze Hastalıkları, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları, 2 (435), Ankara, 1985.
- Çınar, A. ve Biçici, M., Control of *Phytophthora capsici* Leonian on the red peppers, J. Turk Phytopathol., 6 (3), 119-124, 1977.
- Yıldız, M. ve Delen, N., Some results of fungicide tests on *Phytophthora capsici* Leon. of pepper, J. Turk Phytopathol., 8(1), 29-39, 1979.
- Kim, Y.J., et al., Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *P. capsici*, Plant Dis., 73, 745-747, 1989.
- Üstün, A.S., Biberlerde kök boğazı yanıklığı (*Phytophthora capsici* Leon.) hastalığına dayanıklılığın nedenlerinin fizyolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 1990.
- Özcan, S., et al., Genetik mühendisliği ve uygulamaları. Bitki Biyoteknolojisi II, 20, 261-283pp, 2001.
- Palloix, A., et al., *Phytophthora* root rot pepper, influence of host genotype and pathogen strain on the inoculum density-disease severity relationships, Phytopathol., 123(1), 25-33, 1988.
- Walters, D., et al., Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors, Phytopathol., 95(12), 1368-1373, 2005.
- Güncan, A. ve Durmuşoğlu, E., Bitkisel kökenli doğal insektisitler üzerine bir değerlendirme, HASAD, 233, 26-32, 2004.
- He, C.Y., et al., Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*, Plant Pathol., 51, 225-230, 2002.
- Małolepsza, U. and Różalska, S., Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance. Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylorutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato, Plant Physiol. Biochem., 43(6), 623-635, 2005.
- Mohammadi, M. and Kazemi, H., Changes in peroxidase and polyphenol activity in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance, Plant Sci., 162, 491-498, 2002.
- Delledone, M., et al., Reactive oxygen intermediates modulates nitric oxide signalling in the hypersensitive disease-resistance response, Plant Physiol. Biochem., 40, 605-610, 2002.
- Smirnoff N., Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff N, editor. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell Publishing, 53-86, Oxford, 2005.
- Hahn, M.G., et al., Quantitative localization of phytoalexin glyceollin I in the relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, Plant Physiol., 77, 591-601, 1985.
- Ward, E.W.B. and Stoessl, A., Isolation of the phytoalexin capsidiol from pepper leaves and stems, 66th Annu. Meet. Am. Phytopat. Soc., 11-15, Vancouver, 1974.
- Harrigon, W.F. and Mccane, M.E., Laboratory methods in microbiology, recipes to stains, reagents and media. Academic Press, 258, London and Newyork, 1966.
- Zheng, H.Z., et al., Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*, J. Zhejiaing Univer. Sci. 6(8), 778-786, 2005.
- Lin, C.C. and Kao, C.H., Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings, Plant Soil, 230, 135-143, 2001.
- Singleton, V.L. et al., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent, Methods Enzymol., 152-178, 1965.
- Heath R.L. and Packer L., Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Arch Biochem. Biophys., 125, 189-198, 1968.
- Bolwell, G.P., et al., The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a tree component system, J. Exp. Bot., 53, 1367-1376, 2002.
- Torres, M.A., et al., Reactive oxygen species signalling in response to pathogen, Plant Physiol., 141, 373-378, 2006.
- Hahlbrock, K., et al., Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions, Proc. Natl. Acad. Sci., 14569-14576, 2003.
- Yao, K., et al., Creation of metabolism sink for tryptophan alters phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato *Phytophthora infestans*, Plant Cell, 7, 1787-1799, 1995.
- Vidhyasekaran, P., Fungal pathogenesis in Plants and Crops- Molecular Biology and Host defense mechanisms, 2nd ed., s. 307, India, 2007.

29. Candela, M.E., et al., Soluble phenolics acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*, Plant Pathol., 44, 116-123, 1995.
30. Gayosa, C., et al., Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon, Sci. Hortic., 102 (1), 1-13, 2004.
31. Ponmurugan, P. and Baby, U.I., Resistant and susceptible cultivars of tea in relation to Phomopsis disease, PINT Pathol. J., 6 (1), 91-94, 2007.
32. Fu, J., Huang B., Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress, Environ. Exp. Bot., 45, 105-114, 2001.
33. Heath, M.C., Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants, Ann. Bot., 80, 713-720, 1997.