

**T.C.  
BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**MISIR (*Zea mays* L.) VE MISIR PASI (*Puccinia sorghi*  
Schw.) İNTERAKSİYONUNDA EKSPRESYONU  
DEĞİŞİM GÖSTEREN mRNA'LARIN  
TANIMLANMASI, SEKANS KARAKTERİZASYONU VE  
İNTERAKSİYONDA ROLLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nevzat PARLAK**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali SÜDÜPAK**

**Yozgat 2014**



**T.C.  
BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**MISIR (*Zea mays* L.) VE MISIR PASI (*Puccinia sorghi*  
Schw.) İNTERAKSİYONUNDA EKSPRESYONU  
DEĞİŞİM GÖSTEREN mRNA'LARIN  
TANIMLANMASI, SEKANS KARAKTERİZASYONU VE  
İNTERAKSİYONDA ROLLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nevzat PARLAK**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali SÜDÜPAK**

**Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2012 FBE/15 kodu ile desteklenmiştir.**

**Yozgat 2014**

T.C.  
BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAYI

Enstitümüzün Biyoloji Anabilim Dalı 70110310003 numaralı öğrencisi Nevzat Parlak'ın hazırladığı "Mısır (*Zea mays* L.) ve Mısır Pası (*Puccinia sorghi* Schw.) İnteraksiyonunda Ekspresyonu Değişim Gösteren mRNA'ların Tanımlanması, Sekans Karakterizasyonu ve İnteraksiyonda Rollerinin Değerlendirilmesi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezi ile ilgili TEZ SAVUNMA SINAVI, Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği uyarınca 25/10/2014 Salı günü saat 13:00'te yapılmış, tezin onayına OY BİRLİĞİYLE karar verilmiştir.

Başkan : Doç.Dr. Ümit BUDAK



Üye : Yrd. Doç.Dr. Mehmet Ali SÜDÜPAK



Üye : Yrd. Doç.Dr. Fahriye ERCAN



ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 18 / 12 / 2014 tarih ve 39 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Doç.Dr. Mustafa ÇETİN  
Bozok Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1. Bitki-Patojen İntraksiyonlarının Genetiği ve Moleküler Biyolojisi.....	2
2.1.1. Bitkilerin Patojenlere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	5
2.1.1.1. Pasif Savunma, Yapısal ve Kimyasal Engeller.....	6
2.1.1.2. Aktif (İndüklenen) Savunmalar Hipersensitif Reaksiyon, Yapısal ve Kimyasal Bariyerler.....	6
2.1.1.3. Pas Patojenlerinin Konukçuya Penetrasyonları ve Gerçekleşen Olaylar.....	9
2.1.1.4. Bitki-Patojen İnteraksiyonunda Sinyal İletimi ve Konukçu Direncinin Aktivasyonu.....	12
2.1.1.5. Bitki-Patojen İnteraksiyonlarının Çalışılmasında Kullanılan Stratejiler.....	21
2.2. Mısır ve Mısır Pasınının Biyolojisi.....	26
2.3. Mısır ve Mısır Pası İnteraksiyonu ile İlgili Çalışmalar.....	28
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>29</b>
3.1. cDNA-AFLP, Selektif Amplifikasyon-PCR.....	29
3.2. Selektif Amplifikasyon Ürünlerinin Denatüre Edici-PAGE Seperasyonu.....	30
3.3. cDNA-AFLP Etiketlerinin Re-Amplifikasyonu ve Pürifikasyonu.....	31
3.4. Etiketlerin Klonlanması ve Klonların Koloni-PCR ile Karakterizasyonu.....	32

3.5. Alkali-Liz Metoduyla <i>E. coli</i> (JM107) Hücrelerinden Plazmid DNA İzolasyonu.....	34
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
4.1. Bitki Savunması ile İlgili Proteinleri Kodlayan mRNA Sekanslarına Benzerlik Gösteren Etiketler.....	35
<b>5. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRMELERİ.....</b>	<b>39</b>
5.1. Mısır Pası Direnç Geni <i>Rp1</i> ve <i>Rp3</i> Sekans Benzeri Olan Etiketler.....	39
5.2. Potasyum Transport Proteinini Kodlayan Sekanslara Benzerliği Olan Etiketler.....	40
5.3. Protein Sentezi, Katlanması ve Yıkımı ile İlgili Proteinleri Kodlayan mRNA Sekanslarına Benzerliği Olan Etiketler.....	41
5.4. Transkripsiyon Faktörü Sekansların Benzeri Olan Etiketler.....	41
5.5. AC/GG-A17 Moleküler Şeperon Sekans Benzeri Etiketler.....	42
5.6. Pasif Savunma ile İlgili Etiketler.....	43
5.7. Aktif Savunma Yapılarını Oluşturan Ürün Sekansı Benzeri Olan Etiketle ...	44
5.8. Hipotetik Proteinlere Sekans Benzerliği Olan Etiketler.....	44
5.9. AC/CT-A16 Etiket Serine/Threonine Kinase Protein Sekans Benzeridir.....	45
5.10. AC/TG-A4 Etiket Thioredoxin H Tipi mRNA'nın Sekans Benzeridir.....	45
5.11. AC/GG-A7 Etiket <i>Zea mays</i> Klon 1561202 Fotosistem 1 Reaksiyon Merkezi Alt Birim XI mRNA Sekans Benzeridir.....	46
5.12. Sonuçların İnteraksiyondaki Rollerinin Değerlendirmesi.....	46
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>54</b>

**MISIR (*Zea mays* L.) VE MISIR PASI (*Puccinia sorghi* Schw.)  
İTERAKSİYONUNDA EKSPRESYONU DEĞİŞİM GÖSTEREN  
mRNA'LARIN TANIMLANMASI, SEKANS  
KARAKTERİZASYONU VE İTERAKSİYONDA ROLLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nevzat PARLAK**

**Bozok Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**2014; Sayfa: 54**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali SÜDÜPAK**

**ÖZET**

Bu çalışmada, modifiye cDNA-AFLP tekniği kullanılarak, mısır (*Zea mays*) ve mısır pası (*Puccinia sorghi*) interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren 100 cDNA-AFLP fragmenti tanımlanmış, bunlar klonlanarak 68 tanesinin değerlendirilebilir sekansı elde edilmiştir. Sekansların gen bankası taramaları yapılarak en yakın benzerleri belirlenmiştir. Etiketlerden iki tanesi *Rp3* pas direnç geni sekansına benzer iken birisi de pas orijinli transkript benzerleri olarak bulunmuştur. Sekansı yapılan diğer etiketlerin 12'si fotosentez, hücre metabolizması ve madde taşımada, beş tanesi protein sentezi, katlanması ve yıkımında, dokuzu sinyal iletimi, redoks durumu ve transkripsiyonel düzenlemede, geriye kalan 39 etiket sekansında yapısal, hipotetik ve karakterize edilmemiş proteinleri ve diğer stres ile ilgili mesajları kodlayan mRNA'ların benzerleri oldukları bulunmuştur. Genel olarak bilinen fonksiyonlarla assosiyasyon olan bu etiketlerin bitki-mikrop interaksiyonunda rol oynadıkları görülmektedir. Bu sonuçların önemli verim kayıplarına neden olan mısır pasına direncin karakterizasyonuna, mısır ve mısır pası interaksiyonunda gerçekleşen olayların moleküler detaylarının ortaya çıkarılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Mısır, mısır pası, bitki-fungus interaksiyonu, cDNA-AFLP

**IDENTIFICATION, SEQUENCE CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF THE ROLES mRNAs, EXPRESSION OF WHICH ARE MODULATED IN THE INTERACTION BETWEEN MAIZE (*Zea mays* L.) AND COMMON MAIZE RUST (*Puccinia sorghi* Schw.)**

**Nevzat PARLAK**

**Bozok University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Master of Science Thesis**

**2014; Page: 54**

**Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet Ali SÜDÜPAK**

**ABSTRACT**

In this study, using a modified cDNA-AFLP technique, 100 cDNA-AFLP fragments, expressions of which are modified in corn (*Zea mays*) and corn rust (*Puccinia sorghi*) interaction, have been identified. They were cloned, sequenced, and 68 of which yielded clear sequencing results. The closest sequence similars of these sequences were determined by screening Genebank database. Two of these tags appeared to be similar to the *Rp3* sequence, while one tag appeared to be similar to a rust originated transcript. 12 of the remaining tags were found to be similar to the genes encoding protein functioning in photosynthesis, cell metabolism and transport, five tags were found to be similar to the sequences encoding functions protein synthesis, folding and catabolism. The nine tag sequences were found to be similar to the sequences encoding functions signal transduction, redox status and transcriptional regulation, and the remaining 39 tag sequences were identified as similars of mRNA sequences encoding structural, hypothetic and uncharacterized proteins and other stress-related messages. Overall, the majority of tags which were found to be associated with known functions, appear to play a role in plant-microbe interactions. The results are expected to shed some light on characterization of resistance to common corn rust, the molecular details of the interaction occurring between corn and the common corn rust, which causes significant damages to the corn production.

**Keywords:** Corn, common corn rust, plant-fungus interaction, cDNA-AFLP



## TEŞEKKÜR

‘‘Mısır (*Zea mays* L.) ve Mısır Pası (*Puccinia sorghi* Schw.) İnteraksiyonunda Ekspresyonu Değişim Gösteren mRNA’ların Tanımlanması, Sekans Karakterizasyonu ve İnteraksiyonda Rollerinin Değerlendirilmesi’’ adlı yüksek lisans tezimi tamamlamamda yardımcı olan biyoloji bölümü hocalarıma teşekkür ediyorum.

## TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 2.1</b> Bitki Direnç Genlerinin Başlıca Sınıfları.....	17
<b>Tablo 4.1</b> Çalışılan cDNA-AFLP Etiketlerinin Genbankası Taramalarında Mısırdaki Sekans Benzerliği Bulunan mRNA'lar.....	36

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Gene Karşı Gen İnteraksiyonunda Alternatif Durumlar.....	3
Şekil 2.2 Bitkilerde Pasif ve Aktif Savunma Mekanizmaları.....	5
Şekil 2.3 Hipersensitif Reaksiyonda Gözlenen Apoptosis Değişimleri.....	7
Şekil 2.4 Bitkilerde Sistemik Direnç Mekanizmaları.....	8
Şekil 2.5 Penetrasyon Mekanizmaları.....	10
Şekil 2.6 Haustoryum-Konukçu Hücre Ara Yüzü Yapısı.....	12
Şekil 2.7 Konukçu-Patojen İnteraksiyonunda Reseptör-Ligand Modeli Sinyal İletimi.....	12
Şekil 2.8 Guard Hipotezinin Bir Şematik Gösterimi .....	13
Şekil 2.9 Patojen Elisitörlerin Tanınmasıyla Tetiklenen Sinyal İletim Yolları.....	14
Şekil 2.10 Bitkilerde Hastalık Direnci Gen Ürünlerinin Yapısı ve Bitki Hücrelerinde Varsayılan Konumları.....	18
Şekil 2.11 Patojenlere Yanıtta G Proteinlerinin Rolü.....	19
Şekil 2.12 Tanımlanan cDNA-AFLP protokolü akış şeması.....	25
Şekil 2.13 Pas Hastalığına Neden Olan Mısır Pasının Hayat Döngüsü.....	27
Şekil 5.1 AC/GG-A6 Etiketinin Ekspresyonel Değişimini Gösteren Tarama Jel Fotoğrafı.....	39
Şekil 5.2 Pas İnokulasyonu Yapılan AC/CC-A1 Etiketinin Ekspresyon Değişimi Tarama Jel Fotoğrafı.....	40
Şekil 5.3 AC/CC-A10 ve AC/CC-A9 Etiketlerinin Tarama Jel Fotoğrafı.....	40
Şekil 5.4 DnaJ Proteinin Sekans Benzeri AC/GG-A17 Etiketinin Tarama Jel Fotoğrafı.....	43
Şekil 5.5 Pas Transkripti AC/GG-A2 Etiketine Ait Sekans Jel Fotoğrafı.....	44
Şekil 5.6 AC/CT-A16 Etiketi Tarama Jelinde Ekspresyon Değişimi.....	45
Şekil 5.7 AC/GG-A7 Etiketinin Sekans Jel Fotoğrafı.....	46

## KISALTMALAR LİSTESİ

ABA	: Absisik Asit
AAT <sub>1,2,3</sub>	: Aminoasit Transport Proteinleri
AP2	: Apetala 2 Transkripsiyon Faktörü
bHLH	: Bazik Heliks-Loop-Heliks (Transkripsiyon Faktörü)
cDNA-AFLP	: Amplifiye Edilmiş Komplementer DNA Fragment Uzunluk Polimorfizimi (Complementer DNA -Amplified Fragment Length Polymorphism)
CC-NB-LRR	: Koiled Koil - Nükleotid Bağlanma Bölgesi - Lösince Zengin Tekrarlar (Coiled Coil, Nucleotide-Binding Site, Leucine Rich Repeats)
COP9	: Fotomorfogenez 9 (Constitutive Photomorphogenes)
<i>Csp6I</i>	: Restriksiyon Enzimi
ddH <sub>2</sub> O	: Double Distile Su
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
DDRT-PCR	: Differential Display Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction
EDS1	: Artırılmış Hastalık Duyarlılığı (Enhanced Disease Susceptibility1)
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ET	: Etilen
HRGP	: Hidroksiprolince Zengin Glikoprotein
HR	: Hipersensitif Reaksiyon
HSP	: Sıcaklık Şoku Proteini (Heat-Shock Protein)
ISR	: İndüklenen Sistemik Direnç (Induced Systemic Resistance)
JA	: Jasmonik Asit
LB	: Luria-Bertoni
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NDR1	: Irk Spesifik Olmayan Hastalık Direnci 1 (Non-Race Specific Disease Resistance)

NLS	: Nüklear Lokalizasyon Sinyal
NPR1	: PR1'i Ekspres Etmeyen Protein (Non-Expressor of PR1)
NO	: Nitrik Oksit
PA	: Fosfoditik Asit
PAD4	: Fitoaleksin defektif 4 (Phytoalexin Deficient 4)
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PAMP	: Patojenle Assosiye Moleküler Motifler
PCD	: Programlı Hücre Ölümü (Programmed Cell Death)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGIPs	: Poligalakturonaz İnhibitör Proteinler
PLC	: Fosfolipaz C
pmol	: Pikomol
PR	: Patojenezle İlişkili Protein (Pathogenesis-Related)
PRP	: Prolince Zengin Protein
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
<i>Rp1</i>	: Mısır Pasına Direnç Geni 1
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı (Revolution Per Minute)
RAR1	: Required For <i>Mla12</i> Resistance 1
<i>RPP</i> <sub>8,13</sub>	: <i>Recognition Peronospora Parasitica 8 ve 13 (Arabidopsis thaliana</i> 'da Direnç Genleri)
SA	: Salisilik Asit
SAR	: Sistemik Kazanılmış Direnç (Systemic Acquired Resistance)
SCF	: Sitosolik Kulin F-Box Proteini
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SGT1	: Ubikuitin ligaz 1
<i>TaqI</i>	: Restriksiyon Enzimi
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TEMED	: <i>N,N,N',N'</i> -Tetra Methyl Ethylene Diamine
TDF	: Transkript Derived Fragment
TGA-bZIP	: TGA Motifli Bazik Lösin Fermuarı
TMV	: Tütün Mozaik Virüsü
WRKY	: WRKY Transkripsiyon Faktörü
ZM	: <i>Zea mays</i>

## 1. GİRİŞ

Bitkiler, patojen saldırıları gibi biyotik streslere önceden oluşturulmuş yapısal engeller ve indüklenen direnç mekanizmaları ile karşı koymaktadır. Bitkinin yaprak yüzeyinde bulunan mum, kütikula, tüyler, stomaların büyüklüğü, açık veya kapalı kalma süreleri ve bitkide önceden üretilmiş hazır antimikrobiyal bileşikler patojen saldırılarına karşı bitkinin yapısal direnç mekanizmasını oluşturur. Patojenin bu engelleri aşip enfeksiyon oluşturması halinde, bitkinin enfekte olan hücrelerinde hipersensitif reaksiyon (HR) şeklinde erken bir lokal savunma yanıtı ortaya çıkmaktadır. HR ile enfeksiyon bölgesindeki hücrelerin yapı ve fizyolojilerinde görülen modifikasyonlar ve konukçu organizmada programlı hücre ölümüyle enfeksiyon bölgesinde patojen büyümesi ve yayılması engellenmektedir. HR'ı takiben veya birlikte, bitkide sistemik kazanılmış direnç (SAR) ile indüklenmiş sistemik direnç (ISR) ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyonun gerçekleştiği bölge ile bitkinin kalan kısmı arasında sinyal iletimi başlatılmakta, geniş bir patojen spektrumuna dirençte rol oynayan SAR ile bitkide sistemik ve genel bir direnç oluşmaktadır. SAR benzeri sistemik bir direnç olan ISR ise virulent patojenlere karşı bitkilerde koruma sağlamaktadır. Sonuç olarak, bitkilerde yapısal ve indüklenbilir direnç oluşumunda enfeksiyon bölgesinde patojen tanınması ve sinyal iletimi rol oynamakta, HR ile birlikte veya takiben sistemik genel bir savunmayla bitkiler patojenlere karşı koymaktadırlar [1]. Patojen enfeksiyonunun hastalık oluşturması ise bu direnç mekanizmalarının aşılmasıyla gerçekleşmektedir.

Virüs, bakteri ve fungus gibi patojenlerin, özellikle kültür bitkilerinde neden olduğu hastalıkların önemli verim kayıplarına yol açması, son yıllarda, bitki patojenleriyle konukçuları arasındaki interaksyonun moleküler biyolojisi ve genom düzeyinde ekspresyon değişimlerinin karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmaların sayısında artış göstermesine neden olmuştur. Bu çalışma, mısır (*Zea mays* L.) ve mısır pası (*Puccinia sorghi* Schw.) arasındaki interaksyonda ekspresyonu değişim gösteren genlerin modifiye cDNA-AFLP tekniğiyle tanımlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon profili değişim gösteren mRNA etiketlerinin bir bölümünün karakterizasyonu yapılmış ve bunların interaksyonla ilgileri değerlendirilmiştir.

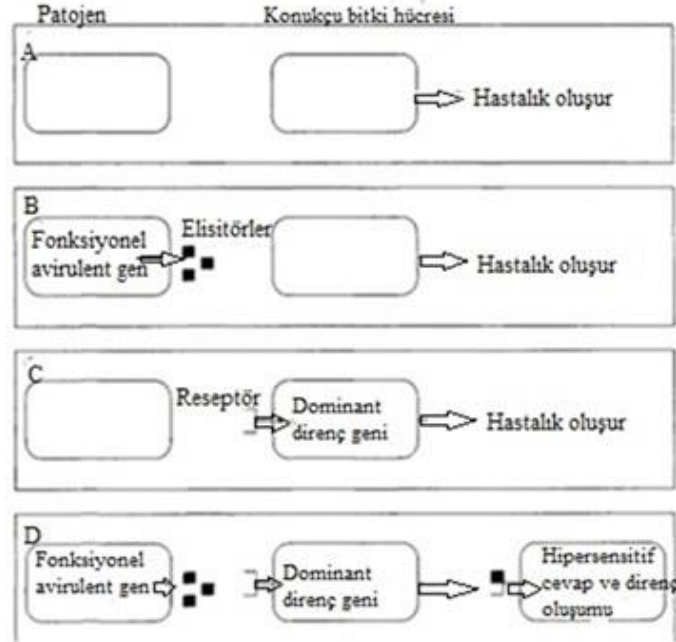
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bitki-Patojen İnteraksiyonlarının Genetiği ve Moleküler Biyolojisi

Bitkiler genel olarak geniş mikrobiyal yelpazelere dirençli olup sadece özelleşmiş organizmalar ve onların virulent ırkları bitkilerde hastalık oluşturabilmektedir. Patojenlere karşı bitki savunması, anatomik ve fizyolojik özelliklerden, bitki yapısında önceden sentezlenip biriktirilen (antimikrobiyal) maddelere, patojen karşılaşmasıyla indüklenen lokal ve sistemik direnç yanıtlarına kadar geniş bir yelpazede değişiklik göstermektedir. Sadece virulent hastalık etmenleri bu savunma bariyerlerini geçerek hastalık oluşturabilmektedir. Örtüşen savunma katmanları olarak bunları düşündüğümüzde, fiziksel ve kimyasal bariyerleri geçen patojenler, muhtemelen en son aşamada hücrel savunma mekanizmasını aktive ederek konukçu direncini ortaya çıkarmakta ve indüklenen hücrel ve sistemik yanıtla patojen gelişimi engellenmektedir. Söz konusu direncin genetik temeli büyük ölçüde karakterize edilmiş ve oluşumu sıklıkla patojen genotipine bağlı olarak gerçekleşmektedir.

Bitkiler ve patojenleri arasındaki interaksiyonlar genel ve spesifik mekanizmaların rol oynadığı kompleks bir olaydır. Bitki patojenleriyle konukçuları arasında interaksiyon, gene-karşı-gen teorik modeli ile ırk spesifik olarak tanımlanmaktadır [2]. Buna göre patojendeki her bir avirulent (*Avr*) gene karşılık konukçuda bir direnç (*R*) geninin olduğu varsayılır ve bitkideki belirli bir direnç geni ürünü belirli bir patojene direnç sağlamaktadır. Bir patojen potansiyel bir konukçu ile karşılaştığında hastalık oluşturabilirse bu patojen virulent, konukçu da duyarlı olarak tanımlanır. Bu ilişkiye de uyumlu ilişki denir. Patojen potansiyel bir konukçuyu enfekte ettiğinde konukçunun savunma mekanizmasını hızlı bir şekilde uyarıp bu savunma tarafından gelişmesi engelleniyor ve hastalık yapamıyorsa bu patojene avirulent, konukçuya dirençli ve bu ilişkiye de uyumsuz ilişki denir. Uyumluluk ve uyumsuzluk durumları gene-karşı-gen teorisinin bileşenleridir. Teoriye göre *Avr* genler, *R* genleri tarafından tanımlanan ve reseptörlere bağlanan ligandlar sentezler veya sentezlenmesinden sorumludurlar. Patojen orijinli bir avirülans sinyal molekülü, karşılığı olan direnç gen ürünü tarafından tanındığında bitkide direnç yanıtı tetiklenmektedir (Şekil 2.1)

[3, 4]. Bu şekilde tanımlanan yaklaşık 70 adet bitki-patojen çifti moleküler olarak çalışılmıştır [5]. İnteraksiyona giren avirülans genlerinden bazılarının moleküler seviyede karakterize edildiği çalışmalar mevcuttur [6-9].



Şekil 2.1 Gene karşı gen interaksiyonunda alternatif durumlar [10]

Konukçunun genotipinde direnç (*R*) geninin varlığı veya yokluğu, patojenin oluşturduğu hastalığa karşı dirençli veya duyarlı oluşunu belirler. Patojenlerin oluşturduğu hastalıklara karşı konukçuda dirençlilik sağlayan *R* genleri genellikle dominant kalıtım gösterdiğinden, bitkilerde dirençlilik duyarlılığa dominanttır. Patojenlerde virülansın genellikle resesif ve avirülansın dominant olması, konukçu direncini belirlemede, her dominant gen için patojende karşılığı dominant bir avirülans (*Avr*) genin varlığı patosistemlerde tespit edilen genel bir durumdur. Bazı bitki-patojen interaksiyonlarında direnç genleri resesif kalıtım göstermektedir. Örneğin arpada, *Blumeria graminis*'in (DC.) Speer neden olduğu külleme hastalığına direnç sağlayan *Hvmlo*, pirinçte yanık hastalığına karşı direnç sağlayan *xa13*, *Arabidopsis*'te *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.'a karşı direnç gösteren *RRS1-R* geni resesif kalıtım gösterir [10]. Arpa ve domateste membran transport proteinlerinin sentezinden sorumlu *mlo* genlerinde fonksiyon kaybı, külleme mantarına karşı resesif mutantlar oluşturmaktadır [11].

Bir bitkinin genomunda birden fazla direnç geni bulunabilir. Her bir direnç geni bir



patojenin farklı ırklarına direnç sağlayabilir. Buna direnç geni spesifitesi denir. Örneğin; mısır *Rp1* lokusunda 14, keten genomunda 30 farklı pas direnci spesifitesi tespit edilmiştir [12]. Direnç genlerinde sıkça görülen bu polimorfizmden dolayı bitki populasyonları farklı direnç spesifiteleri içeren genotiplerden oluşur. Bitki populasyonundaki farklı direnç genleri kullanılarak patojen populasyonundaki farklı genotipleri veya fizyolojik ırkları ayırmak mümkündür.

Dominant kalıtıma sahip bitkideki *R* ve patojendeki *Avr* genlerinde fonksiyon kaybı veya karşılıklı spesifite değişimine neden olan mutasyonlar, patojen virülansı veya konukçu duyarlılığı interaksiyon fenotipiyle sonuçlanmaktadır. Örnek olarak, mısır *Rp1* allelerindeki mayotik rekombinasyon sonucu obligat biyotrofik fungal patojen olan mısır pasının (*Puccinia sorghi*) bazı ırklarına karşı duyarlılık oluşabilmektedir. Mısır genomu *Rp1* bölgesindeki mısır pası spesifik direnç genlerinin mayotik instabilite gösterdiğine dair çalışmalardan birinde; *Rp1* allelerinde görülen instabilite mekanizmasının eşit olmayan crossing-over olduğunu gösteren ve instabilitede gen dönüşümünün de rolü olduğuna dair bulgular rapor edilmektedir [13]. Bu şekilde karşılıklı spesifite değişimine neden olan mutasyonlarla patojenlerin *Avr* genleri ve bitkilerin *R* genlerinin populasyonlardaki varlıkları korunmaktadır.

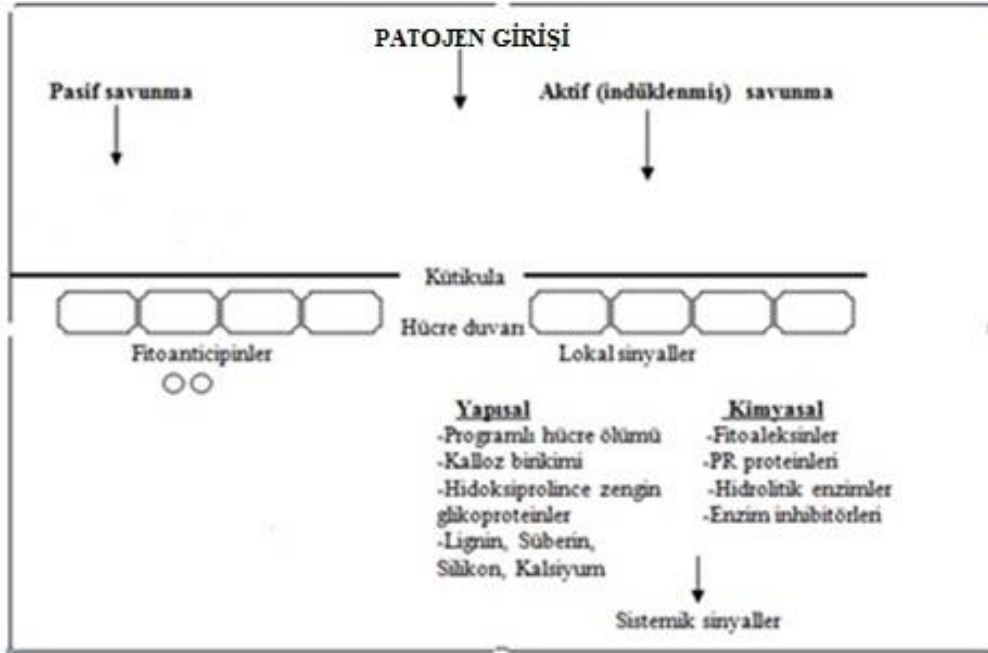
Bitkilerde hastalık direnci sağlayan *R* genlerinin evrimi, hem bitki hem de patojeni içeren dinamik bir süreçtir [10]. Genel olarak silahlanma yarışı diye tanımlanan süreçte patojen *avr* genin mutasyonu ile ortaya çıkan virulent ırklara karşı bitkide yeni direnç spesifitlerinin kromozom segmentlerinde kümelenmiş direnç genleri klastırlarında rekombinasyon ve mutasyonlarla ortaya çıktığı modellenmeleri yapılmaktadır [14].

Bitki-patojen interaksiyonlarında her iki organizmada bir dizi genin transkripsiyonel olarak aktive veya repres olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [15–21]. Son yıllarda, bitki-patojen interaksiyonları gibi biyotik stres durumlarında transkripsiyonel olarak aktive veya repres olan mesajların ve genom genelinde değişimlerinin karakterizasyonları için karşılaştırmalı hibridizasyon teknikleri ve çıkarımsal teknikler geliştirilmiştir [22-24]. Bu çalışmada modifiye cDNA-AFLP tekniğiyle mısır ve mısır pası interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren mRNA molekülleri tanımlanmıştır.

### 2.1.1. Bitkilerin Patojenlere Karşı Direnç Mekanizmaları

Genel olarak bitkilerin patojenlere direncinde iki düzey ayırt edilmektedir. Bunlar, konukçu olmama direnci ve konukçu direncidir. Konukçu olmama direnci bir tür veya cinsin tamamının belirli patojenlere dirençli olması durumudur. Örneğin; patatesten yaprak yanıklığı hastalığı yapan *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary buğdayda enfeksiyon oluşturamaz. Konukçu direnci ise özelleşmiş patojen ırklarına karşı gösterilen dirençtir. Örneğin; buğdayın sarı pas (*Puccinia striiformis* Westend.) tarafından enfekte olması, buğdayda, sarı pasın belirli ırklarına karşı direnç sağlar.

Patojenlerin konukçuyu enfekte etmek için bitkilerdeki direnç mekanizmalarını aşması gerekir. Bitkilerdeki direnç mekanizmaları pasif (temel) ve aktif (indüklenen) olarak iki kategoriye ayrılabilir (Şekil 2.2). Pasif mekanizmaları yaprak yüzeyindeki mum, kütikula, tüyler, önceden oluşturulmuş antimikrobiyal kimyasal bileşikler oluşturur ve bu yapılar mikrobiyal saldırıya karşı ilk savunma engelleridir. Bu engellerin aşılması durumunda ise bitkilerin HR ile lokal bitki hücresi ölümü, bitkinin hücre duvarını güçlendirme, yapısal savunmadan sorumlu genlerinin aktivasyonu, ek antimikrobiyal madde biyosentezi, hidrolitik enzimler ve diğer savunma ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu gibi aktif savunma mekanizmaları devreye girecektir [10].



Şekil 2.2 Bitkilerde pasif ve aktif savunma mekanizmaları [10]

### **2.1.1.1. Pasif Savunma, Yapısal ve Kimyasal Engeller**

Bitkiler, patojen saldırılarına karşı iki pasif savunma stratejisine sahiptir. Birinci strateji patojen saldırılarına karşı hazır bulunan bazı yapısal engellerdir. Bunların en önemlisi ilk pasif bariyer olan yaprak ve meyve üzerindeki mumsu kütikula tabakasıdır. Ana maddesi kütin olan kütikula su tutmaz ve mantar spor çimlenmesini engeller. Yaprak yüzeyinde bulunan mum, kütikula ve tüyler, stomaların büyüklüğü ve açık-kapalı kalma süresi, kütikula ile benzer bir işleve sahip somatik kök sınır hücreleri her an savunma için aktif durumdadırlar. İkinci savunma stratejisini kimyasal engeller oluşturur. Bunlar patojenlerin önceden oluşturulmuş inhibitörleri olmasına göre fitoantisipinler veya fitoaleksinler olarak sınıflandırılmıştır. Fitoaleksinler ve fitoantisipinler mikroorganizmalara maruz kalan bitkiler tarafından sentezlenen düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal bileşiklerdir. Antimikrobiyal bileşikler sekonder metabolitlerin farklı bir dizisini içerir ve bunlar genellikle geniş bir patojen spektrumuna karşı etkilidir. Birçok antimikrobiyal bileşik inaktif olarak bitki hücrelerinde tecrit edilir veya özel veziküller halinde sentezlenip biriktirilerek enfeksiyon bölgesine iletilir. Buna örnek deoksiantosinidin oluşmasıdır [25].

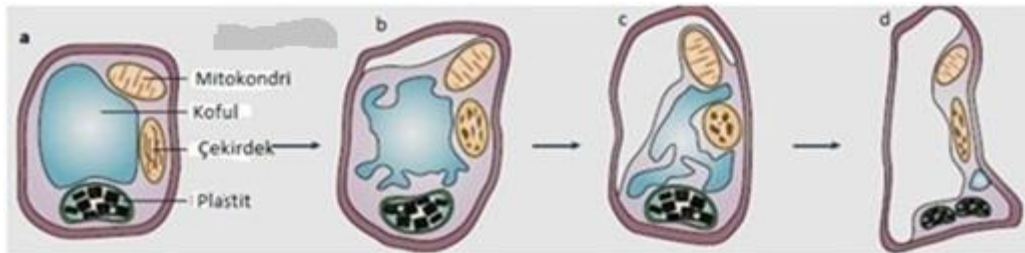
Patojenlerin bu kimyasal savunmaya karşı ilk stratejileri, çimlenip bitki dokularına penetre olana dek beklemektir. Patojenlerin hastalık oluşturabilmesi için sağlıklı bitkiler içinde görülen bu hazır antimikrobiyal bileşikler ve poligalakturonaz inhibitör proteinlerin (PGIPs) ve hücre duvarını parçalayan enzim inhibitörleri gibi kimyasal engellerin üstesinden gelmeleri gerekir. Bazı patojen mantarların bu antimikrobiyal bileşikleri parçalama (hidrolitik) enzimleri vardır ve patojenin bu enzimi üretme yeteneği konukçuya göre belirlenir. Enzimatik hidroliz yoluyla fitoaleksin ve fitoantisipinlerin detoksifiye edilmesi ile açığa çıkan parçalanma ürünleri, bitki savunma tepkilerinin bastırılması ile sonuçlanacak bir sinyal iletim mekanizmasına neden olur [10].

### **2.1.1.2. Aktif (İndüklenen) Savunmalar, Hipersensitif Reaksiyon, Yapısal ve Kimyasal Bariyerler**

Patojenlerin konukçuya teması ile aktive olan sinyal iletim yolları bitkiler için önemli savunma yanıtlarıdır. Bazı bitkilerde savunma indüksiyonu patojenin yaprak yüzeyine teması ile bazılarında patojenin yaprak dokusuna penetrasyonu ile gerçekleşmektedir. İndüksiyon spesifik olmayan elisitörlere tepki olarak

gerçekleşebilir. Spesifik elisitörlere tepki olan savunma mekanizması, klasik gen- için-gen direnci modeliyle açıklanmaktadır. Bitkilerin indüklenen savunma yanıtlarını, genel olarak, hipersensitif reaksiyon (HR), sistemik kazanılmış direnç (SAR), indüklenen sistemik direnç (ISR), bazı kimyasal maddelerin (ROI, NO, vb.) sentezlenmesi ile patojenin bitkiye temas yüzeyinde sitoplâzma birikimi ve çekirdek hareketliliği oluşturmaktadır.

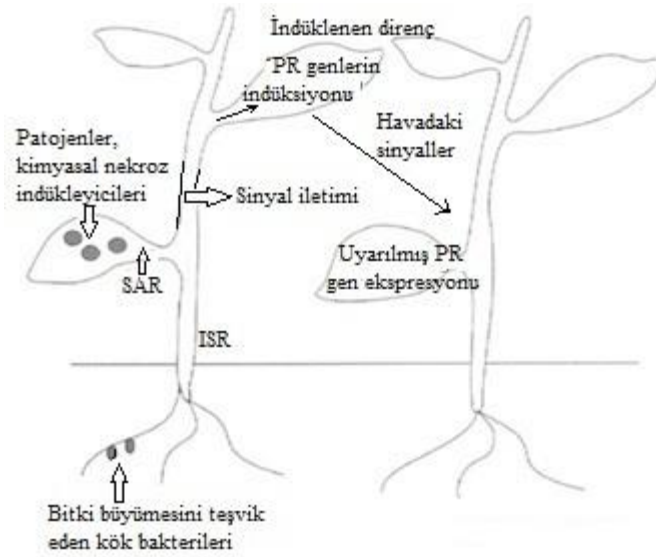
Patojen saldırılarına maruz kalan bitkilerin savunmasında, erken lokal savunma yanıtı ve takiben aktive olan sistemik yanıtlar rol oynamaktadır. Patojen saldırılarına karşı bitkilerin en görünür tepkilerden biri, hipersensitif reaksiyon (HR) ile enfeksiyon bölgesinde programlı hücre ölümü (PCD) olarak gerçekleşmektedir [26]. Erken lokal bir savunma yanıtı olan hipersensitif reaksiyon PCD ile enfeksiyon bölgesinde patojen büyümesini, yayılmasını ve hastalık gelişimini engeller ve özellikle obligat biyotrof patojenlere karşı etkin bir savunma oluşturur. Ölen hücrelerdeki membran tomurcuklanması, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu HR ile ortaya çıkan tipik PCD olayları arasındadır (Şekil 2.3). Bu savunma, besinini canlı hücrelerden sağlayan obligat biyotrofik patojenlerin girişini ve patojenin kaybettiği konak doku miktarını sınırlamak için gerçekleştirilen koordine bir mekanizmadır [10].



**Şekil 2.3** Hipersensitif reaksiyonda gözlenen apoptosis değişimleri, a-d, [27]

Hipersensitif reaksiyonu takiben, bitki genelinde direncin oluşumunu sağlayan sistemik sinyallerle sistemik kazanılmış direnç (SAR) ve indüklenen sistemik direnç (ISR) oluşturulmaktadır. Sistemik bir sinyal olarak savunmada rol oynayan çok sayıda protein kodlayan genin aktivasyonu ile ortaya çıkan sistemik kazanılmış direnç, salisilik asit (SA) ile birlikte hormon olarak değerlendirilen jasmonik asit (JA), etilen (ET) ve absisik asit (ABA) ile beraber veya ayrı olarak fonksiyonel

olmaktadırlar. Patojenlerin geniş bir spektrumuna immüniteyi veya yükseltilmiş seviyede direnç oluşumunu sağlayan SAR tipi indüksiyon birçok bakteriyel, fungal ve viral patojenlerin fasulye, domates, *Arabidopsis* ve kabakgiller gibi birçok bitki ile interaksiyonunda görülmüştür. Ancak SAR tüm patojenlere karşı etkili değildir. SAR benzeri indüklenmiş sistemik direnç (ISR), normalde virulent patojenlere karşı koruma sağlar. ISR indüksiyonu bitki patojenlerinden çok bitkide büyümeyi teşvik eden kök bakterilerince aktive edilir (Şekil 2.4). Bu savunma aynı zamanda SAR'ın etkisiz olduğu hastalıklara karşı bir koruma sağlamaktadır.



**Şekil 2.4** Bitkilerde sistemik direnç mekanizmaları (SAR ve ISR), [10]

Son on yılda elde edilen bilgilere göre bitki ve savunma indüksiyonu içinde sistemik sinyallere ek olarak, komşu bitkiler ile iletişim de savunma genlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Direncin indüksiyonu için üretilen uçucu sinyaller komşu bitkilere iletilir (Şekil 2.4). Örneğin böcek ve patojenlerce istila edilmiş bitkilerde metil jasmonat ve metil salisilat gibi uçucu sinyallerin üretildiği, en azından savunma gen ekspresyonunu indüklediği laboratuvar deneyleri ile gösterilmiştir. Tütün mozaik virüsü (TMV) ile enfekte tütün bitkilerinin *N* direnç geni ekspresyonu olan serbest metil salisilat, bitişik bitkilerde hastalıklara karşı direnci artırmıştır.

Bitkilerde bir dizi indüklenebilir yapısal savunma daha vardır. Bunlardan biri hücre iskeleti tabanlı olup temas yüzeyinde gelişen patojeni algılamayı içeren ve penetrasyonunu önceden savuşturmayı amaçlayan savunmadır. Bu savunmanın esası

patojenin temas yüzeyinde sitoplâzma birikimi ve mikrotübül iskeletin sağladığı çekirdek hareketliliğidir. Potansiyel işgale hazırlık olarak osmotin ve kitinaz gibi bitki hücre savunma proteinlerinin katılımı ile aktin filamentleri sabitleştirilmiştir. Patojen istilası ve girişine karşı ek bir bariyer oluşturmak için hidroksiprolince zengin glikoproteinlerin (HRGP) birikimi ile hücre duvarlarının içyüzeyi üzerinde papilla olarak adlandırılan appozisyonların oluşumu, kalloz ( $\beta$ -1,3 glukanpolimeri), lignin ve süberin gibi fenolik bileşiklerle, silisyum ve kalsiyum gibi minerallerden oluşan çapraz bağlı savunma yapıları oluşur. Bu savunmalar bitki yaralanması ile indüklenir. İkinci tip indüklenen yapısal savunma, peroksidaz enzimlerin direnç sağlayan iki çözümlü proteinin (HRGP ve PRP) çapraz bağlanmasına aracılık ederek hücre duvarını güçlendirmesidir. Böylece patojenezle ilgili protein ailesi (PR-9) belirli peroksidazların ve çeşitli (mantar) elisitörlerin bitki hücrelerinin savunma ifadesini indüklediği gösterilmiştir.

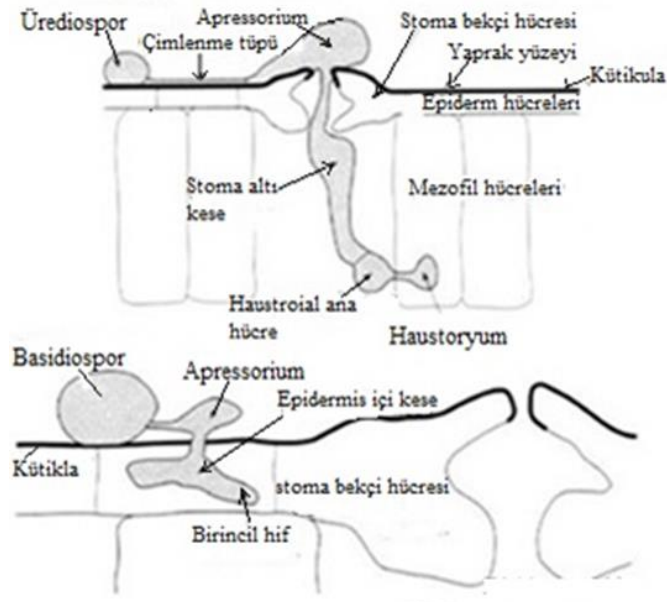
Bitki-patojen interaksiyonunda gen ekspresyonu ve protein sentezinden önce reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROI) birikmesi, nitrik oksit (NO) üretimi ve fosforilasyon kaskadları gibi bazı iyonların üretilmesi söz konusudur. Bu sinyal mekanizmaları da bitkiler için önemli savunma yanıtlarıdır.

İndüklenebilir direnç mekanizmaları patojenlere karşı bitkilerin savunmasında büyük önem taşımaktadır. Konukçu olmayan bitkilerde mikropların spesifik olmayan elisitörleri direnç indüksiyonu için yeterli olabilir. Konukçu bitkilerde patojenin doğuştan gelen savunma yanıtlarından kaçmasına ve enfeksiyon geliştirmesine karşı belirli elisitörlerini tanımak üzere belirli direnç (*R*) genlerinin evrimleştiği kabul edilmektedir. Bitkide patojenin belirli elisitörlerini tanıma direnci, tek tek etkileri kolayca tespit edilebilir bir veya birkaç gen (vertikal direnç) ya da küçük ilave etkileri olan çok sayıda genle (horizontal direnç) kalıtılmaktadır. Herhangi bir direnç geni-avirülans geni kombinasyonu için fonksiyonel genlerin varlığına veya yokluğuna göre farklı sonuçlar (duyarlılık veya direnç) ortaya çıkar. Patojen enfeksiyonu tarafından uyarılmadığı ve doku-spesifik olmadığı hallerde bitki direnç genlerinin konstitütif ekspresyonları ancak düşük bir seviyede gerçekleşebilir [10].

### **2.1.1.3. Pas Patojenlerinin Konukçuya Penetrasyonu ve Gerçekleşen Olaylar**

Bitki yüzeyini kaplayan mumsu kütikula genellikle hidrofobiktir. Su damlacıklarını

ve içerdikleri mikropları uzaklaştırır. Patojen sporları bitki kütiküler yüzeyine hidrofobik etkileşimlerle bağlanır. Pas urediosporları yüzeyinde bulunan dikenler, bu ilk temas halinde söz konusu yapışmaya yardımcıdır. Pas sporlarının salgıladığı esteraz ve kutinazların etkinliği sonucunda sporlar ile hidrofobik yüzeyler arasında yapışkan yastıklar oluşturabilir. Ayrıca, nem varlığında spordan salınan musilaj gibi yapışkan maddelerde güçlü bir yapışma sağlar. Spor çimlenmesi sırasında su ve düşük molekül ağırlıklı besin gibi çevresel faktörlerin indüksiyon için gerekli moleküler mekanizmaları oluşturduğu bilinmesine karşın, *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter ve *Saccharomyces cerevisiae* Meyen gibi model mantarlar dışında, bitki patojen mantarlar için ayrıntılı bir çalışma yoktur. Pas sporu uygun bir bitki bulup yapıştıktan ve çimlendikten sonra besin elde etmek için stoma açıklıklarından bitkisel dokulara penetre olur. Çoğu pas aseksüel urediospor aşamasında sadece stomalar aracılığıyla penetre olurken, basidiosporlar doğrudan penetre olmak için epidermisi kullanmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Penetrasyon mekanizmaları [10]

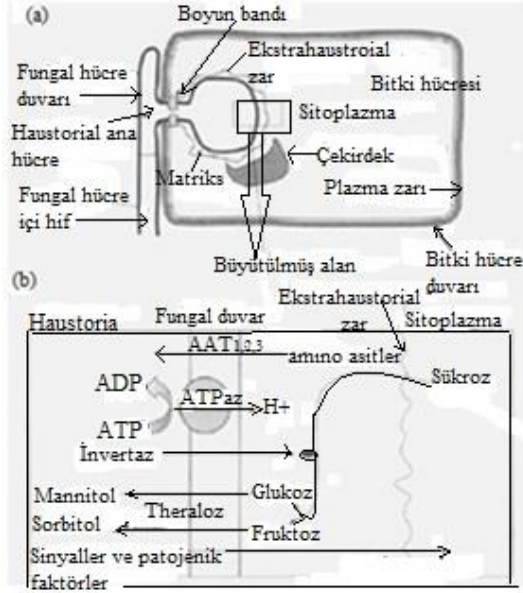
Birçok pas kısa bir süre çimlenmenin ardından yaprak yüzeyi boyunca çimlenme tüpünün büyümesi ve hifal ucun farklılaşması ile apressorium olarak bilinen bir şişlik oluşturur. Yaprak boyunca büyüyen çimlenme tüpünün yüzeye bağlanması için daha fazla musilaj sentezlenir. Apressorium olgunlaşmasından sonra çimlenme tüpü

alt yüzeyinden dar bir hifal iplik bitkinin üst epidermisi veya doğal deliklerinden yaprak içine doğru büyür. Çimlenme tüpünün epidermisten girişinde mekanik kuvvet ve enzimatik çözünmenin kombine etkileri dâhilinde olduğu kabul edilmektedir. Bitki yüzeylerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin (hidrofobluğu, yüzey sertliği, kimyasal bileşimi, kütin monomerler ve mumsu polar lipidler) appressorium gelişimine neden olduğuna dair artan kanıtlar vardır. *Puccinia sorghi* gibi hayat döngüsünde farklı sporlar üreten ve farklı konukçulara sahip paslarda konukçuya penetrasyon, şekil 2.5 de şematize edildiği gibi ürediosporların çiğ damlası nemiyle çimlenmesini takiben stoma açıklıkları üzerinde oluşturulan appressorium yapısında ortaya çıkarılan yüksek turgor basıncıyla gerçekleşmektedir. Bitki dokularına penetrasyonda çimlenme tüplerinin apikalinde biriken veziküllerin, hücre duvarı öncüllerinin besin kaynağını oluşturduğu bilinmektedir. Apoplastta sükröz, heksoz ve amino asitlerin konsantrasyonları hızlı bir pas büyümesi için elverişli olmadığından *Cladosporium fulvum* Cooke gibi bazı mantarlar kendi işgalci hifleri yoluyla yeterli besin elde ederken, birçok biyotrofik pas besin açısından zengin bitki hücreleri içine penetre olan ve besin alımını artırmak için tasarlanmış haustoryum olarak bilinen özel beslenme yapıları oluştururlar. Penetrasyon haustoryum ana hücrelerinin oluşturduğu haustoryumların (emeçler) mezofil hücrelerinde gelişimi ile tamamlanmış olur.

Haustoryumlar interaksyonda bitki-fungus arasında sinyal ve metabolit transferinin gerçekleştiği ara yüzler olarak fonksiyonel olmaktadır (Şekil 2.6-a) [28]. Bitki hücresinden ekstra-haustoryal matrikse sukroz, aminoasit gibi metabolitler salgılanır. Bunlardan sukroz, fungus tarafından sentezlenip bu alana salgılanan bir enzim (invertaz) ile glukoz ve fruktoza ayrılarak haustoryuma transport edilmekte ve sorbitol, mannitol, trehaloz gibi fungus depo sakkaritlerine dönüştürülmektedir (Şekil 2.6-b). Konukçu-pas uyumlu interaksyonda enfekte olmuş bitkilerden izole edilen haustoria üzerinde yapılan çalışmalar haustoryumların sadece konukçudan metabolit alımını gerçekleştiren yapılar olmadıklarını göstermektedir. Haustoryuma metabolit taşınmasından sorumlu bazı gen ürünlerinin yanı sıra metallothionins gibi anti-stres fonksiyonu genlerin rollerinin de haustoryumların görevleriyle ilişkili oldukları maya analizleriyle teyit edilmiştir [10]. Ayrıca uyumlu interaksyonda bitkideki spesifik bazı polipeptidlerin fungusa patojen avirulans ürünlerinin bitkiye transferinde, sinyal



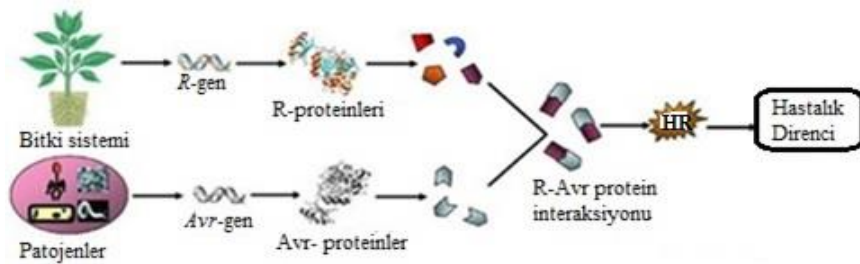
iletiminde ve konukçu savunmasının supresyonunda haustoryumların rol aldığına dair bazı bilgiler mevcuttur [28]. Uyumsuz interaksyonda ise patojen penetrasyonu veya gelişiminin bir aşamasında konukçu savunması indüklenmekte, HR ile veya HR'dan bağımsız olarak, patojen büyümesi sınırlandırılarak direnç oluşmaktadır.



**Şekil 2.6** Haustoryum-konukçu hücre ara yüzü yapısı (a) ve ara yüzde gerçekleşen bazı olaylar (b) [10]

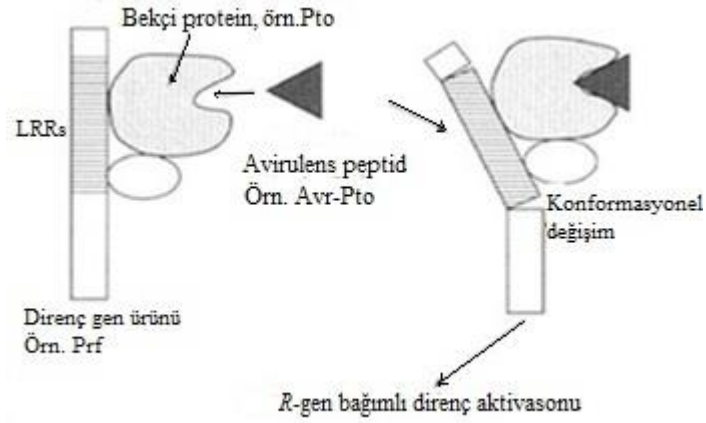
#### 2.1.1.4. Bitki-Patojen İnteraksiyonunda Sinyal İletimi ve Konukçu Direncinin Aktivasyonu

Fungus-bitki interaksyonlarında hem konukçu hem de patojen genomundan ekspresyon değişimleri genel olarak görülen bir durumdur. Konukçunun patojeni tanıması ve konukçu direncinin aktive edilmesi reseptör-ligand modelinde olduğu gibi direkt olabilir. Reseptör-ligand modeli sinyal iletimi, *R* gen ürününün *Avr* genin ürünü (elisitör) ile doğrudan etkileşiminin sonucu direnç yanıtı oluşumunu öngörür (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7** Konukçu-patojen interaksyonunda reseptör-ligand modeli sinyal iletimi [29]

Konukçunun patojeni tanınması ve konukçu direncinin aktive edilmesi, Guard Hipoteziyle tanımlandığı gibi indirekte olabilmektedir. Bu modelin bir örneği; Avr-Pto (guard) tarafından hedeflenen Pto (guardee) konak savunmasının genel bir bileşenidir. Avr-Pto'nun konukçu proteini ile interaksiyonu R gen ürününü (Prf) aktive ederek konukçu direncini indüklemektedir (Şekil 2.8). Prf/Pto veya Avr-Pto olmadığında ise virulans ortaya çıkmaktadır.



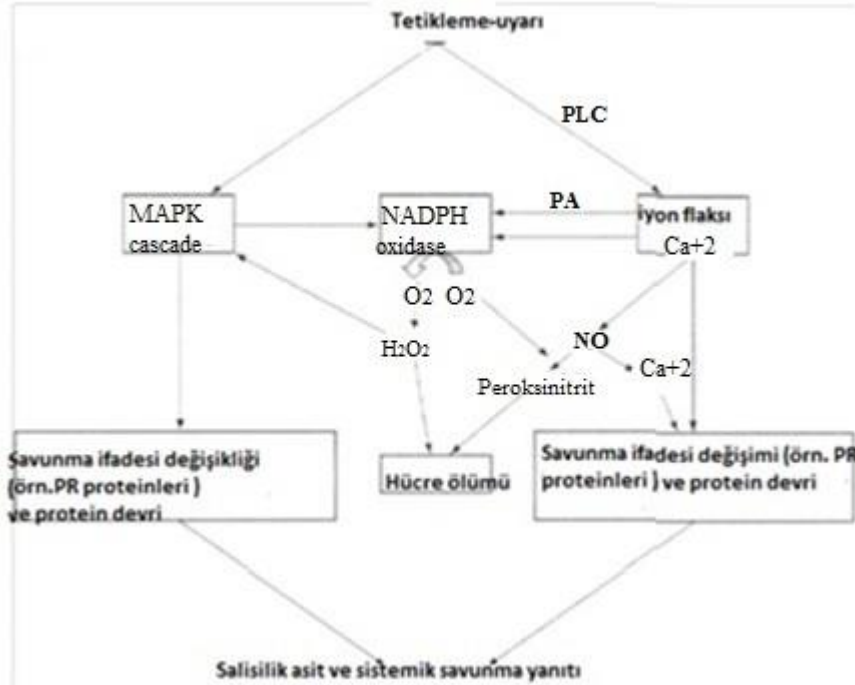
**Şekil 2.8** Guard Hipotezinin bir şematik gösterimi [10]

Bu interaksiyonun diğer bir örneği *Arabidopsis* ve bakteriyel patojenleri arasında sıklıkla rastlanan RPS5 proteininin (guard) aktivasyonudur. *Arabidopsis* protein kinaz proteini PBS1'in (guardee) bir sistein proteaz olan AvrPbB kesimiyle gerçekleşmektedir. Bitkilerde patojen algılanması, takiben gerçekleşen sinyal iletimi ve savunma yanıtı aktivasyonunda memeli savunma sistemlerindeki benzer "Patojenle Assosiyasyon Moleküler Patternlar-PAMPs" kullanılmaktadır. Bazı patosistemlerde (ör. Keten L<sup>6</sup>, *Arabidopsis* RPP5 direnç proteinleri) bitkiler ve hayvanlar arasında paralellikler olduğuna ilişkin bulgular mevcuttur [30].

Patojen elisitörlerin bitki direnç gen ürünlerince algılanmasını takiben meydana gelen erken savunma yanıtları; protein kinazların (örneğin MAPKinazlar) aktivasyonu, kalsiyum ve diğer iyonların akışı, reaktif oksijen türleri (ROS), nitrik oksit (NO), salisilik asit (SA) üretimi ve patojenez ile ilişkili (PR) proteinleri gen ekspresyonunda gerçekleşen değişiklikler olarak özetlenebilir (Şekil 2.9). NO, ROI ve SA ile birlikte sinyal iletim yolları arasında kompleks sinerjik interaksiyonlar ve savunma yanıtlarının amplifikasyonu ile HR oluşmaktadır [31]. Ancak, konukçu

direncinde HR rolü açık olmakla birlikte bazı durumlarda HR'ın konukçu direncinden ayrılabilir olduğu (konukçu direncinde HR'nin direkt rolü olmadığı) gösterilmiştir. Örneğin; patates X virüsü (PVX) ile CC-NB-LRR tip *Rx* genine sahip patates genotipleri arasında interaksyonda HR görülmez [32].

Patojen elisitörlerin uyardığı savunma yanıtı ile ilgili en hızlı ve ölçülebilir değişiklik, plazma zarından geçici iyon flaksıdır ( $Ca^{+2}$  ve  $H^+$  inflaksı,  $K^+$  ve  $Cl^-$  efflaksı). Patojen elisitörlerinin algılanması, sinyal iletim yollarında etkili olan G proteinleri aktivasyonuna ve iyon flaksında değişimlere yol açar. Protein fosforilasyonu ile plazma zarı iyon kanallarının açılması sitosolik  $Ca^{+2}$  seviyesini yükseltmektedir [30].  $Ca^{+2}$  seviyesinin yükselmesi ayrıca ROI üretimi, oksidatif bürst ve nitrik oksit (NO) üretiminin düzenlenmesi gibi savunma yanıtlarının aktivasyonu sağlanmakta ve sonuçta HR ile patojen yayılması sınırlandırılmaktadır (Şekil 2.9). Patojen algısını takiben oluşan erken lokal savunma yanıtlarından (HR) sonra indüklenen direnç genlerinin ekspresyonuyla birlikte sistemik (SAR ve ISR) genel dirençler ortaya çıkmaktadır.



**Şekil 2.9** Patojen elisitörlerin tanınmasıyla tetiklenen sinyal iletim yolları PLC, fosfolipaz C; PA, fosfoditik asit; NO, nitrik oksit [10]

**Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi (ROI):** Patojenlerin penetrasyonu bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROI) sentezini ve programlanmış hücre ölümü gibi aktif savunmaları harekete geçiren nedenlerden biridir. Konukçu hücrelerde üretilen ROI'ların HR, SAR gelişimi ve fitoaleksinler gibi antifungal kimyasal maddelerin birikmesi gibi çeşitli konukçu hücre savunma tepkilerini tetiklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bitki-patojen interaksyonları sırasında  $H_2O_2$  sentezinde artış olur. Bitki savunmasında etkili olan reaktif oksijen ürünleri arasında olan  $H_2O_2$  ve öteki aktif oksijen bileşikleri bitkinin savunma sistemini uyarıcı etkide bulunmaktadır. HR öncesinde hızlı bir şekilde birikimi gerçekleşen ROI bileşikleri, patojen için doğrudan toksik olabildiği gibi, hücre duvarı bileşenlerinin oksidatif krosslink ile kapatılması ve güçlendirilmesiyle birlikte aşağı kanat savunma yanıtlarının da aktivasyonu sağlanmaktadır. Peroksidaz enzimlerin hücre duvarın güçlendirilmesinde önemli rolü vardır. Bu savunmayı bastırmak için, bazı fungal patojenlerin bitkiye, metabolitlerini ve proteinlerini aktif olarak aktardıkları görülmektedir [10]. Avirüent patojen ırklarıyla sentezi tetiklenen ROI'ların bir fonksiyonu HR ile lokalize hücre ölümüdür [32]. Dirençli genotiplerde nekrotik lezyonlar halinde enfekte olan hücrelerin ölümü olan HR ile patojen yayılması sınırlandırılmaktadır.

Patojen enfeksiyonu ile bitkide ortaya çıkan ilk savunma yanıtlarından biriside, süperoksit ( $O_2^-$ ) ile  $H_2O_2$  sentezinden oluşan oksidatif patlamadır (oksidatif börs). NADPH oksidaz kompleksi ve apoplastta bulunan peroksidazlar aracılığıyla sentezlenen oksidatif patlamanın protein dönüşümünü düzenleyen rolü olduğu kabul edilmektedir [33]. Örneğin arpada, ökaryotik çinko bağlayıcı proteinlerle sekans benzerliğine sahip RAR1 proteinin sentezinde oksidatif patlamanın ilgisi olduğu görülmektedir [10]. Şekil 2.9'da verilen bu bitki savunma yollarının pek çok memeli sistemlerinde paralellik gösterdiği tespit edilmiştir.

**Nitrik Oksit (NO) Sentezi:** Nitrik oksit, aktif savunma yanıtların oluşumunda fonksiyonel olan bir sinyal moleküldür. HR sırasında seviyesi yükselen NO, PR protein ekspresyonunu indüklemekte ve enfeksiyon bölgesinde SA seviyesi pozitif düzenlenme göstermektedir (Şekil 2.9).

**MAP Kinazlar (MAPK):** Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde iletiminde

protein fosforilasyonu ile aktive olan enzimlerdir. MAP kinazlar (MAPK) bitki hastalık direnci için önemli bir sinyal yolu oluşturmaktadır. HR oluşumundaki (NADPH oksidaz aracılığı ile) katkıları, MAP kinazların bitki direncinde rol oynadıklarını göstermektedir (Şekil 2.9). MAP kinaz sinyal kaskadı *Arabidopsis*'te doğal savunma yanıtı bileşeni olarak belirlenmiştir. Spesifik MAPKKK, MAPKK ve MAPK proteinlerinin, WRKY tipi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla *PAL*, *PR-1* ve *PR-5* gibi savunmayla ilgili genlerin aktivasyonu ile sonuçlanan sinyal kaskadlarıyla alakalı oldukları belirlenmiştir [10].

**Direnç Proteinleri:** Flor'un (1956) gene-karşı-gen teorisine göre, bitkilerin hastalıklara karşı savunması için patojendeki her bir *Avr* gene karşı konukçuda bir direnç (*R*) geni gereklidir. *R* genleri ve kodladıkları proteinler bitki savunma mekanizmasının ana unsurlarını oluşturmaktadır. Bir enfeksiyon durumunda, reseptör-ligand modeline göre, patojenin *Avr* gen ürünlerine karşı indüklenen bitki *R* geni proteinlerinin bitkilerdeki savunma mekanizmalarının aktivasyonuna aracılık ettikleri görülmektedir. *R* proteinlerinin konukçu bitki savunmasının indüksiyonunu sağlamasını  $Ca^{+2}$  iyonu akışı,  $O_2^-$  ve NO sentezindeki artış ve lokal bitki hücre ölümü (PCD) ile ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur [8]. Bitki *R* proteinlerini sahip oldukları domainler ve biyokimyasal fonksiyonlarına bakarak üç grupta toplamak mümkündür (Tablo 2.1). Direnç genlerinin patojen saldırılarında eksprese olan direnç proteinlerde bulunan başlıca domainler lösince zengin tekrarlar (LRRs), nükleotid bağlayıcı bölge (NBS), Toll/Interlökin-1 Reseptör (TIR), koiled coil (CC), WRKY transkripsiyon faktörleridir.

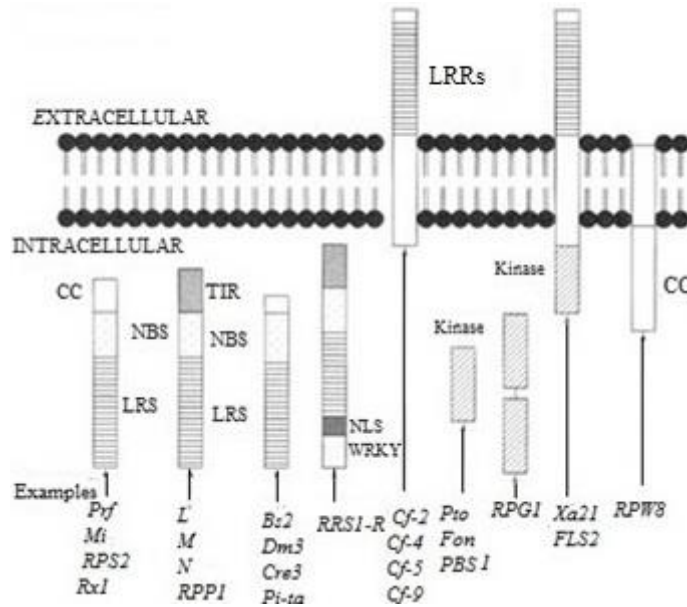
Lösince zengin tekrarlar (LRRs), düzenli aralıklarla lösine veya diğer bir hidrofobik amino asidin (24 aa) içinde bulunduğu motiflerdir (Şekil 2.10). LRRs'ın protein-protein interaksiyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bitki direnç proteinlerinin patojen orijinli elisitör veya efektörlerle interaksiyonda ve glikoprotein ligandları, enzim inhibitörlerini (örn. domuz RNaz inhibitörü) veya enzimleri tanımda fonksiyonel oldukları kabul edilmektedir [12]. Direnç geninin kodladığı bir protein motifi olan nükleotid bağlayıcı bölge (NBS), bir nükleotid bağlama P-kementi ile merkezden uzak konumlu iki kinaz (kinaz 2, kinaz 3) domain içerir (Şekil 2.10). Direnç genlerindeki NBS domainleri ve apoptosis proteinlerle arasındaki benzerlik

dolayısıyla bitki savunmasında bu domainlerin rolleri olduğu kabul edilmektedir. TIR (Toll/İnterlökin-1 Reseptör; *Drosophila melanogaster* Meigen'in toll proteini ve insanda, kuş ve diğer hayvanlardaki interleukin-1 reseptör proteini) domainine sahip proteinler konukçu/çevre ara yüzlerinde eksprese olmakta ve konukçu savunmasında rol oynayan reseptör proteinler olarak aktivasyonları PAMPs ile gerçekleşmektedir. CC (koiled coil, lösün fermuar) domeini *RPM1*, *RPP8*, *Rx1*, *Mi* ve *Prf* gibi direnç genleri proteinlerinde bulunan amino asit motifleridir (Şekil 2.10). Direnç geni fonksiyonundaki rolleri henüz belli değil ama bunların birçok *R* gen ile kodlanmış intermembran proteinlerdeki varlıklarından dolayı protein dimerizasyonunda rol oynadıkları bilinmektedir [10].

**Tablo 2.1** Bitki direnç genlerinin başlıca sınıfları ve kodladığı proteinlerde bulunan yapısal motifler. LRR-Lösün zengin tekrarlar, eLRR-extracelluler LRR, NBS-nükleotit bağlayıcı site, TIR-Toll/İnterlökin-1 reseptörleri, CC-Sarmal bobin, TM-Transmembran domeini, KIN-Kinaz [34]

Sınıfı	Konukçu	<i>R</i> geni	Kodladığı proteindeki yapısal motifler	Direnç patojen sağladığı	Referans
I	Tütün	<i>N</i>	TIR-NBS-LRR	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Whithame et al., 1994
	Keten	<i>L6</i>	TIR-NBS-LRR	<i>Melampsora lini</i>	Lawrence et al., 1995
	<i>Arabidopsis</i>	<i>RPP5</i>	TIR-NBS-LRR	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	Parker et al., 1997
	<i>Arabidopsis</i>	<i>RPS2</i>	CC-NBS-LRR	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Bent et al., 1994 Mindrinos et al., 1994
	Patates	<i>Rx1</i>	CC-NBS-LRR	<i>Potato virus X</i>	Bendehmane et al., 1999
	Çeltik	<i>Xa1</i>	NBS-LRR	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	Yoshimura et al., 1998
	Mısır	<i>Rp1-D</i>	NBS-LRR	<i>Puccinia sorghi</i>	Collins et al., 1999
II	<i>Arabidopsis</i>	<i>RPP27</i>	eLRR-TM	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	Tör et al., 2004
	Domates	<i>Cf9</i>	eLRR-TM	<i>Cladosporium fulvum</i>	Jones et al., 1994
	Çeltik	<i>Xa21</i>	eLRR-TM-KIN	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	Song et al., 1995
III	Domates	<i>Pto</i>	KIN	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Martin et al., 1993
	<i>Arabidopsis</i>	<i>RPW8</i>	TM-CC	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	Xiao et al., 2001
	Çeltik	<i>Xa27</i>	TM-TM	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i>	Gu et al., 2006
	Arpa	<i>MLO</i>	TM-TM-TM...	<i>Erysiphe graminis f.sp. hordei</i>	Buscges et al., 1997

Bitkilerin doğal ortamlarında maruz kaldıkları abiyotik ve biyotik streslere karşı yanıtların düzenlenmesinde WRKY transkripsiyon faktörleri (TFs) önemli rol oynar. Bitkilerde transkripsiyonel düzenleyici olarak savunma, yaralanma, senesens ve bitki büyüme ve gelişmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin geniş bir protein ailesi olan WRKY, modüle ağ sinyal iletiminin bütünleşmiş yapısal parçalarını oluşturmaktadırlar (Şekil 2.10). Bu ailenin üyeleri yüksek oranda korunmuş WRKYGQK amino asit dizisi ve bir çinko parmağı motifi içeren, WRKY alanı belirlenmiş, en az bir korunmuş DNA'ya bağlanan bölge içerir [35]. Tek bir WRKY transkripsiyon faktörü farklı fenotipte birçok sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Wei ve arkadaşları (2012) mısır (B73) genomunda WRKY ailesi proteinlerini kodlayan 119 adet gen (*Zm WRKY 1-119*) tespit etmişlerdir [36].

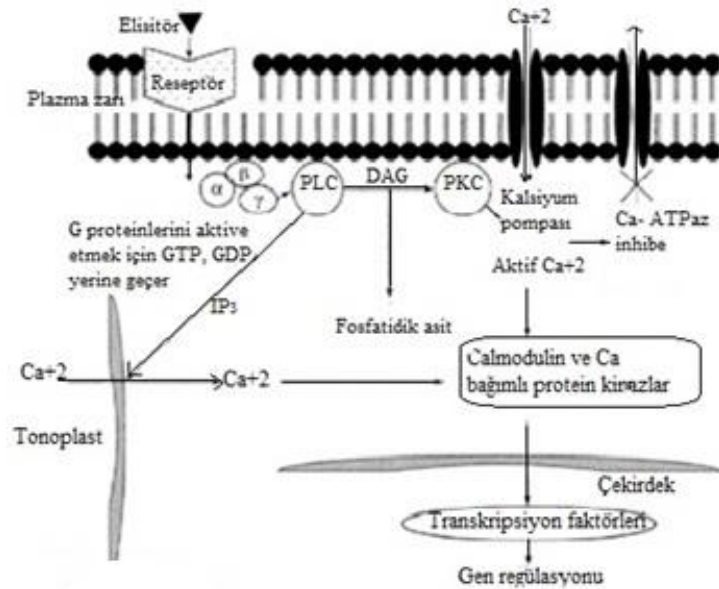


**Şekil 2.10** Bitkilerde hastalık direnci gen ürünlerinin yapısı ve bitki hücrelerinde varsayılan konumları (proteinlerin amino grup uç üst kısmındadır). NBS, LRR, CC, TIR, NLS ve WRKY [10]

**PR Proteinler (Pathogenesis-Related Protein):** Patojen enfeksiyonu durumunda bitkilerde patojenez ile ilgili çeşitli proteinler (PR) indüklenir. Patojeniz ile ilgili proteinler bitkinin yapısal savunmasını güçlendirir. 14 grupta toplanan PR proteinlerin çoğunun biyokimyasal rolleri tespit edilmiştir. Örneğin, farklı yüzeylerde kendi özel aktivitelerine göre sınıflandırılan kitinazlar (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) mantar hücre duvarındaki kitini hidrolize etmektedir. PR-7 grubundaki glukanaazlar, proteinazlar ve RNazlar, bakteri ve oomycete karşı etkinliğe sahip olan

hidrolitik enzimler, PR-10 virüslere karşı benzer rollere sahiptirler. Bazı PR proteinleri patojenite faktörleri ile mücadele için üretilmektedir (örn. böcek ve mikrobiyal proteaz enzimlerini inhibe eden PR-6 proteazı gibi). Bitkilerdeki salisilik asit, PR proteinlerin üretimini uyararak patojenlere karşı dirençte rol oynar. PR proteinleri sistemik dirençte bir işaret olarak kabul edilirler ve in vitro ortamda fitoaleksinler gibi antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahiptirler [37]. PR protein olarak sınıflandırılmayan poligalakturonaz inhibitörü proteinler (PGIPs) sağlıklı bitkiler içinde patojen işgaline karşı etkili bir savunma sunmaktadır. Hücre duvarını parçalayan enzimlerin inhibitörleri olan PGIPs dikotiledon bitkiler ile soğan ve pırasa gibi pektin bakımından zengin monokotiledon bitkilerde yaygındır. Fasulye ile *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cavara arasındaki interaksyonda hızlı ve yoğun bir şekilde PGIPs biriktiği gösterilmiştir. PGIPs ve bazı bitkilerin hastalık direnç genleri arasındaki yapısal benzerlikler aralarında evrimsel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir [10].

**G-proteinleri:** G-proteinleri protein kinaz içeren bir dizi sinyal yolunun önemli yukarı kanat bileşenleridir. Membran reseptörlerden hücre içi hedef enzimlere bilginin iletiminden rol oynayan moleküllerdir. Her bir G proteini adenilat siklaz, iyon kanalları ve fosfolipazlar gibi membrana bağlı R sinyal iletim moleküllerini kontrol eder (Şekil 2.11). Çevresel sinyallerin transmembran reseptörleri ile algısı ve hücre içinde heterotrimerik G proteinleri ile etkileşimi zar yapılarında değişikliklere,



Şekil 2.11. Patojenlere yanıtta G proteinlerinin rolü [10]



plazma zarı iyon kanallarının açılmasına, sitozolde  $Ca^{+2}$  seviyesini yükselmesine, lokal ve sistemik savunma yanıtlarının aktivasyonuna yol açmaktadır [30]. G proteinlerinin ayrıca funguslarda eşleşme, patojenite ve virülans gibi birçok temel olayı düzenledikleri de bilinmektedir.

İndüklenen direnç genleri, EDS1 (enhanced disease susceptibility) ve NDR1 (non-race specific disease resistance) gibi çoklu sinyal iletim yollarıyla fonksiyonel olmaktadır. Örneğin *Arabidopsis*'te çoğu CC-NBS-LRR ve TIR-NBS-LRR tipi R proteinleri NDR1 ve/veya EDS1 yolunu kullandıkları anlaşılmaktadır. Bu iki sinyal iletim yolundan farklı olarak spesifik *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. izolatlarına dirençte rol oynayan RPP8 proteini SA ile interaksiyona girerek EDS1 ve NDR1 bulunmayan genotiplerde bitki direncini indüklemektedir. Patojen enfeksiyonlarıyla seviyesi artan SA, mobil bir sinyal olarak hem lokal hem de sistemik direncin potansiyel indükleyicisidir. SA, sistemik kazanılmış direnç oluşumunda doğrudan, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda dolaylı rolü olan önemli bir bileşiktir. SA degraşyonu görülen transgenik bitkilerde patojen duyarlılığı atmaktadır. *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire gibi bazı patojen enfeksiyonlarında görülen nekrotik lezyonlar, transgenik bitkiler içerisinde, ancak SA ilavesi ile meydana gelir. SAR oluşumunda etilen, jasmonik asit (JA) ve absisik asit (ABA) gibi hormonlar da etkili olmaktadır. SA aynı zamanda EDS1 ve interaksiyona girdiği PAD4 ekspresyonunu da indükleyerek bir pozitif feedback kementi oluşturmaktadır. SAR oluşumu direnç genlerinin ekspresyon değişimlerini de kontrol etmektedir. SAR ile indüklenen NPR1 (Non-expressor of PR1) proteini TGA-bZIP ailesi transkripsiyon faktörün aktivasyonunda, diğer transkripsiyon faktörleri de (WRKY, AP2 domain taşıyan bZIP, myb ve çinko parmağı) HR yanıtın amplifikasyonu, SA, etilen, antimikrobiyal madde sentezi ve hücre duvarı lignifikasyonu ile savunma yanıtında rol oynamaktadır [10].

Bitki-patojen interaksiyonlarında protein-protein interaksiyonları çok önemlidir. Örneğin maya 2-hibrid sistemleri ile yapılan bir çalışmada, ökaryotik çinko bağlayıcı proteinlere sekans benzerliği gösteren RAR1 proteinin, ubiküitin ligaz kompleksi bileşeni SGT1 proteini ile (*Arabidopsis*'te *SGT1b* geni tarafından kodlanan SGT1 proteinine sekans benzeri) interaksiyona girerek bitki savunması sinyal iletiminde rol

alan proteinlerin katlanması, yıkımı veya ilgili protein devrinin düzenlenmesinde ve gen ifadesinde fonksiyonları olduğu tespit edilmiştir [10,38]. Sıcaklık şoku proteinleri olan şperonlar bitki-patojen ara yüzünde proteinlerin katlanması fonksiyonel biçimlerinin korunması ve proteinler arası interaksiyonda görev yapar.

#### **2.1.1.5. Bitki-Patojen İnteraksiyonlarının Çalışılmasında Kullanılan Stratejiler: Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Differensiyal Gösterimi (DDRT-PCR)**

Transkript profil analizi için ilk invitro teknik olan DDRT-PCR, 1992’de Liang ve Pardee tarafından geliştirilmiştir [39]. DDRT-PCR, mRNA moleküllerinin oligo-dT primeriyle revers transkripsiyonunu takiben aynı primerle bir rastgele primerin kullanıldığı PCR amplifikasyonlarında sentezlenen ürünlerin jel seperasyonu sonrasında, uygulama ve kontrollerin karşılaştırılmasıyla ekspresyonel değişimlerin değerlendirildiği bir tekniktir. Ökaryotik mRNA’nın diferanşıl gösterimi tekniği ilk kez 1992 yılında yayınlandığında, iki veya daha fazla hücre populasyonlarının veya dokularının diferanşıl gen ekspresyonlarının kıyaslanmasında hızlı ve güvenilir yöntem olarak gösterildi. Aslında bu metot, bir gösterimde transkripsiyonu yapılan genlerin sistematik olarak kıyaslandığı ve analiz edildiği ilk jel tabanlı metottur. Subtraktif ve diferanşıl hibridizasyon teknikleri ekspresyonel genlerin diferanşıl olarak belirlenmesine uyarlanmıştır. Başlangıçta radyoaktif nükleotidler ile yapılan floresan etiketli amplifikasyon primerlerinin müteakip kullanımları için daha güvenli çalışma şartları sağlanmıştır.

Diferanşıl gösterimi uygularken dikkat edilmesi gereken en kritik nokta RNA’nın kaynağı ve saflığıdır. Yüksek saflıkta DNaz uygulanmış total RNA -ki daha sonraki PCR için kalıp olarak kullanılır- ters transkripsiyon ve rastgele bir dekamer primer dizisi için kullanılır. Bu primer dizilerinin her birisi, bir reaksiyon tüpünde yüzden fazla cDNA fragmentleriyle, bütün cDNA’ların bir alt dizisini amplifiye edecektir. PCR etiketli nükleotid kullanılarak yapılır. PCR örneğinin bir bölümü denatüre edici jel elektroforeziyle ayrılarak, amplifiye cDNA örneği, autoradiyografik olarak görselleştirilir. Ekspresyonel değişim gösteren bandların jellerden toplanarak tekrar amplifiye edilmesi, klonlanması ve sekanslanmasıyla cDNA etiketleri karakterize edilir. Farklı kaynaklardan elde edilen mRNA’ların bir DNA sekans jeli üzerindeki reaksiyon ürünleri karşılaştırıldığında, kontrol ve

uygulamalar arasındaki gen ekspresyon farklılıkları belirlenebilmektedir. Diferanşıl gösterim, gelişim faktörlerine duyarlı ve ekspresyonları belirli hastalık durumlarıyla ilişkili genlerin tespiti ve izolasyonu gibi çeşitli alanlarda başarıyla kullanılmıştır. Buğdayda sarı pas hastalığına neden olan *Puccinia striiformis f sp tritici* Erikss. (virulent ve avirulent ırklarına) direnç mekanizmasında bulunan erken yanıt genleri DDRT-PCR teknikle tanımlanmıştır [40].

Diferanşıl gösterim, basitliği yanında yeterli primer kombinasyonları kullanıldığında neredeyse bütün mRNA'ları tespit edebilme imkânı sağlamaktadır. Küçük RNA miktarlarına ihtiyaç olduğundan diferanşıl ekranın kullanılması, RNA'nın sınırlı olduğu durumlarda bir avantaj olabilir. Üstelik diferanşıl olarak eksprese olan mesaj etiketlerinin yüksek kapsamalı gösterimi ve ilgili genlerin tanımlanıp izolasyonunu sağlamaktadır. Tek bir deneydeki yüzlerce farklı genin ekspresyon analizini sağlaması ve cDNA problemlerinin direkt kullanılabilirliği sebebiyle diferanşıl mRNA gösterimi, yeni genleri tanımlamada kullanılan uygun metodlardan biridir. Teknik basit, ucuz ve hızlıdır. Bu teknik belli dokuların gelişme dönemlerinde ve özel çevre şartlarında fonksiyonel olan genlerin klonlanmasında kullanılır. En önemli dezavantajı düşük tekrar edilebilirlik veya yüksek yanlış pozitifliktir. Diferanşıl bir ifadeyle ekspresyon gösteren birçok etiketin teyit reaksiyonlarında doğrulanmadığı rapor edilmektedir [23].

### **Mikroarray Teknolojisi**

Mikroarray (gençip) teknolojisi, mikroskop lamı gibi cam, plastik veya silikondan yapılmış katı bir yüzey üzerine cDNA veya oligonüklotitlerin sabitlenmesi ile elde edilen mikroarraylerin (mikrodiziler) kullanıldığı bir yöntemdir. Yüzeye bağlanan bu DNA fragmentleri (genellikle 20–100 nükleotid uzunluğunda) prob olarak tanımlanmıştır. Mikroarray teknolojisi, DNA'nın bir desteğe bağlanan bir gen ya da fragment ile prob hazırlanması şeklinde tanımlanabilecek "Southern Blotting" tekniğinden türetilmiştir. Mikroarray tekniğinin kullanımı ilk defa Shalon ve Schena (1995) tarafından gerçekleştirilmiştir [41].

DNA mikroarrayler geliştirilmesi ile gen ifade profilleri ve genom profili çalışmalarına tamamen farklı bir yaklaşım getirilmiştir. Mikroarraylerde gen ekspresyon farklılıklarını belirlemek için etiketli cDNA veya oligonükleotidler, DNA

ya da oligomer taşıyan dizilere hibridize edilir. cDNA'lar veya oligonükleotidleri etiketlemek için farklı fluorofor kullanıldığında, iki prob dizisine aynı anda uygulanır ve farklı dalga boylarında karşılaştırılabilir. 10 000 ve daha fazla genin ekspresyonu tek bir çip üzerinde analiz edilebilir. Oligonükleotitler, cDNA'lardan çok daha kısa problemler olduğu için hibridizasyon spesifitesi zayıftır. Bu teknikte dikkat edilmesi gereken husus, gen ekspresyonunun her zaman dinamik aralıkta ölçülmesi gerektiğidir. cDNA ve oligonükleotid dizilerinin hassasiyetine bağlı, doğrusal zaman aralığında bıraktıkları hibridizasyon sinyallerin yoğunluğuna göre, zayıf ya da bol miktarda eksprese olan genler analiz edilmektedir. Bu nedenle, ekspresyonel değişim gösteren genlerin doğru tespiti için tek tek optimizasyon adımları sağlamak gerekmektedir [42].

Bitkilerde ilk DNA mikroarray çalışması model bitki *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.'nın 48 cDNA parçasını içeren array ile yapılmıştır [43]. Daha sonra, çok sayıda (1443) *Arabidopsis* geni içeren cDNA mikroarrayi, çeşitli kültür bitkilerinin (mısır, çilek, pirinç, fasulye) farklı gelişim evrelerindeki doku ve organlarının farklı koşullardaki gen ekspresyon analizini yapmak için kullanılmıştır [23]. Avirulent patojen mantar *Alternaria brassicicola*'nın *Arabidopsis thaliana* enfeksiyonu sonucunda savunma ile ilgili genlerinin ekspresyonundaki değişimler seçilen 2375 cDNA mikroarray ile eş zamanlı olarak analiz edilmiştir [44]. Domates ve biberde leke hastalığının etmeni olan parazit bakteri *Xanthomonas vesicatoria*'nın (ex Doidge) Vauterin et al. enfeksiyonu sonrasında bitkilerde direnç yanıtıyla indüklenen ya da repres olan cDNA'ların büyük bir seti mikroarray analizi (ve subtraktif hibridizasyon) ile tespit edilmiştir. *Candidatus liberibacter* enfeksiyonuna yanıt olarak *Citrus* genomundan seçilmiş 14 genin (33000 prob kullanılarak) ekspresyon değişikliklerinin büyük ölçekli mikroarray analizinde, patojen ile indüklenen floem spesifik lektin PP2-benzeri protein transkripsiyonunda önemli bir birikim olduğu tespit edilmiştir [45]. Buğday kök boğazı çürüklüğü hastalığına neden olan *Fusarium pseudograminearum* O'Donnel et T. Aoki ve diğer *Fusarium* türlerinin enfeksiyonu sonunda oluşan konak yanıtını anlamak için mikroarray kullanarak buğday kök boğazı hücrelerinde gen ekspresyon değişiklikleri incelenmiştir [46]. Pirinçte yaprak yanıklığı hastalığına neden olan *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch' nın enfeksiyonuna karşı erken direnç yanıtında (sinyal iletimi ve sekonder metabolik

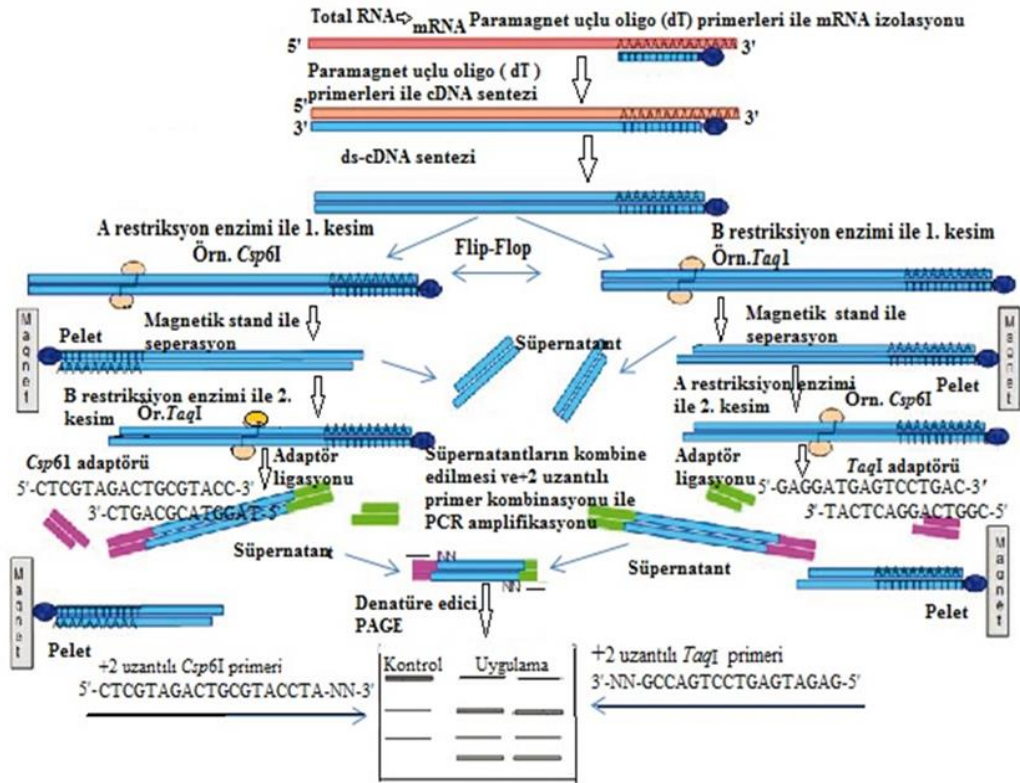
yolların açıklanması) WRKY transkripsiyon faktörlerinin kritik rolleri de mikroarray analizi ile gösterilmiştir [47].

Mikroarray analizlerinin başlıca avantajları paralel bir şekilde ekspresyon kalıplarını analiz etmek ve hibridizasyon sonuçlarının hemen yorumlanması yeteneğidir. Gen ifadesi modellerinin genel bir görüntüsünü elde etmek mümkündür. Kısa sürede ve pratik olarak çok sayıda (mayada 6000, mısırdaki 17000-18000) genin ekspresyon değişimini (tekrar edilebilirliği yüksek bir şekilde) ölçerek izlemek ve analizini yapmak mümkündür. Otomasyona dayalı bir sistem olduğu için insan kaynaklı hataların ortaya çıkma ihtimali oldukça düşüktür. Dezavantaj olarak; tüm deney düzeneği nükleik asit hibridizasyon yöntemine bağlıdır ve yüksek oranda benzerlik gösteren gen aileleri problem yaratabilir. Bu nedenle mikroarrayden elde edilen verilerin klasik gen ekspresyon analiz yöntemleriyle doğrulanması beklenmektedir. Ayrıca tüm mikroarray deneylerinin aynı hassasiyette olmayışı, ekspresyondaki küçük değişikliklerin analizde fark edilemeyecek boyutta olması, birbirinden farklı çipler kullanılarak yapılan deneylerin birbiriyle karşılaştırılmasında yaşanan zorluklar, optimizasyon ve standardizasyon sorunları ve herhangi bir deneyden elde edilen sonuçları her yönüyle değerlendirebilecek biyoinformatik programların henüz geliştirilememiş olması karşılaşılan sorunlardan bazılarıdır [48].

### **cDNA-AFLP**

cDNA-AFLP (Amplifiye Edilmiş Komplementer DNA Fragment Uzunluk Polimorfizmleri, Complementer DNA -Amplified Fragment Length Polymorphism), genom genelinde ekspresyon analizi için standart AFLP tekniğinin transkriptom analizine uyarlanan bir formudur [49]. AFLP tekniği, genomik DNA'nın total kesimiyle açığa çıkan restriksiyon fragmentlerinin PCR amplifikasyonu ile tespiti esasına dayanır. Ön bir sekans bilgisi gerektirmeyen ve bu nedenle tüm genomlara uygulanabilen transkriptom analiz tekniğidir. Yöntemin esası, mRNA popülasyonundan sentezlenen ds-cDNA moleküllerinin bir veya iki farklı restriksiyon enzimiyle kesiminden açığa çıkan mRNA temsilcisi etiketlerin adaptörlenip, 3' uçlarında selektif nükleotidlere sahip primer kombinasyonlarıyla alt setler halinde PCR amplifikasyonu ile ekspresyonu değişim gösteren mRNA'ların tanımlanmasıdır.

Tezimde karakterize edilen etiketler, Södüpak (2014) de tanımlanan ve Şekil 2.12’de akış şeması verilen, modifiye cDNA-AFLP prosedürü kullanılarak, mısır ve mısır pasında ekspresyonu değişim gösteren transkriptler olarak tanımlanmıştır [50]. Standart protokolda yapılan modifikasyonla, esas olarak tekniğin hedeflenen transkriptomu kapsama potansiyelinin artırılması amaçlanmıştır. Standart protokolden farklı olarak manyetik tanecikler (beads) üzerinde cDNA’ların iki dört kesen enzimle iki paralel deneyde resipkoral sıralı olarak kesimi gerçekleştirilmekte, paralel kesimlerin aynı reaksiyonlarından serbest kalan etiketler kombine edilerek cDNA-AFLP prosedüründe kullanılmaktadır. Prosedürde önce manyetik taneciklere bağlı oligo-d(T)lerle mRNA izolasyonu yapılır ve takiben cDNA ve ds-DNA sentezi gerçekleştirilir. Sonraki restriksiyon enzimi kesim manipülasyonları da manyetik tanecikler üzerinde gerçekleştirilir. cDNA manipülasyonlarının manyetik tanecikler üzerinde yapılması sıralı ve flip-flop kesimine izin verir. Sonunda cDNA türlerinin her birinden gelen tek mRNA etiketinin saflaştırılmasını kolaylaştırır ve ekspresyonel değişiklikleri ölçmek için kullanılır. Sıralı ve flip-flop kesimlerden elde edilen süpernatantlar adaptörlenerek PCR amplifikasyonu yapılır ve denatüre edici PAGE’de pas inokulasyonu sonucu mısırdaki ekspresyon değişimleri izlenir.



Şekil 2.12 Tanımlanan cDNA-AFLP protokolü akış şeması [50]

cDNA-AFLP nispeten kolay (DDRT-PCR gibi) mRNA diferanşil ekspresyon analiz yöntemidir. Bu yöntem aynı anda çok sayıda genin çeşitli iç ve dış etkenlerle oluşturulan yer ve zamana göre gen ekspresyon değişikliklerini tespit etme imkânı sağlar. Buğdayda çizgi (şerit) pası etmeni fungal patojenin (*Puccinia f striiformis. sp. tritici*) buğdayı enfeksiyon süreci ile ilişkili genlerin büyük ölçekli tanımlandığı transkriptom analizinde cDNA-AFLP kullanılmıştır [21]. Patatese özel bir depolama proteini olan patatini ve ikinci bir transkript olarak ADP-glükoz pirofosforilaz kodlayan, nişasta biyosentezi yolunda önemli bir genin ekspresyon analizi cDNA-AFLP ile çalışılmıştır [49]. *Cladosporium fulvum*'un domatesi enfekte etmesini takiben *Avr9* gen ürünlerinin domateste *Cf-9* gen ekspresyonunu indüklemesi sonucu, bitki bu patojen fungusun ırklarına karşı direnç kazanmıştır. Bu genlerden kaynaklanan savunma yanıtının tütün hücre kültüründe ekspresyonu hızla değişen transkriptlerin analizini göstermek için de cDNA-AFLP tekniği kullanılmıştır.

Diferanşil gösterim tekniğinin gelişmiş bir şekli olan cDNA-AFLP yöntemi kantitatif transkript profillemeye için etkin bir araçtır. cDNA-AFLP tüm genomlara uygulanabilen diğer yöntemlere göre nispeten basit, hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntemdir. Ancak pahalı bir yöntem olup laboratuvar ekipmanına gereksinim fazladır. Ayrıca cDNA-AFLP ve DDRT-PCR yöntemlerinin yüksek yanlış pozitif oranları ve transkriptom kapsama kaygıları gibi dezavantajları da vardır. cDNA fragmentleri üretmek için kullanılan kesim bölgelerinin eşit olmayan dağılımları cDNA-AFLP performansını olumsuz etkiler. Bazı transkriptlerin standart protokolde birden fazla fragmentle temsil edilmesi gereksiz çokluk oluştururken, tespit edilemeyen fragmentler ise analizin kapsamını daraltır [51].

## 2.2. Mısır ve Mısır Pasının Biyolojisi

### Mısır (*Zea mays* L.)

Taxonomi: Domain: Eukaryota Kingdom: Plantae Subkingdom: Viridiplantae  
Divisio: Tracheophyta Subdivisio: Magnoliophyta Class: Liliopsida Ordo: Poales  
Familia: Poaceae Subfamilia: Panicoideae Subfamilia: Andropogoneae Genus: *Zea*

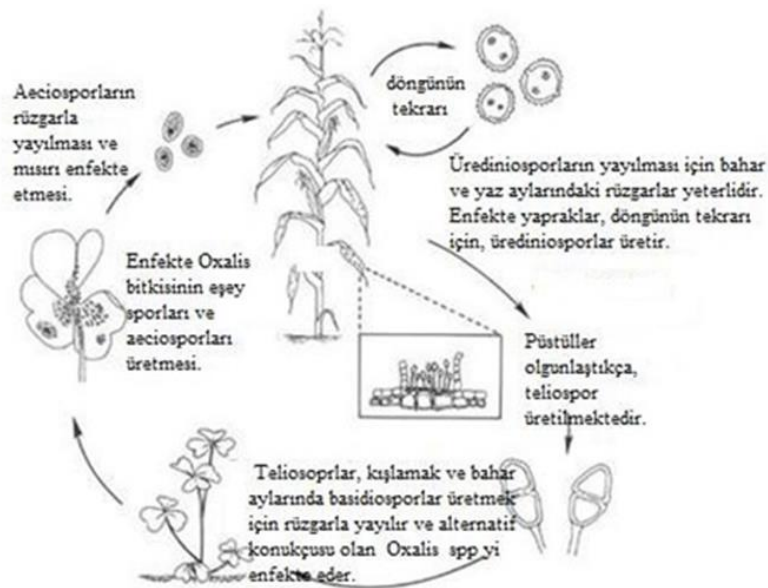
Buğdaygiller familyasından bir yıllık otsu ve monoik bir bitki olan mısır, gövde ucunda tepe püskülü erkek çiçekleri ve sapın orta kısmında yaprak koltuğunda dişi

çiçekleri bulundurur. Önce tepe püskülü çıkar ve hemen bir iki gün içinde aşağıdaki koçanların uçlarında dişi çiçeklerin stigmaları (püskül) görülür. Mısır dış döllek bir bitkidir. Rüzgârın yardımıyla tepe erkek organlarında oluşan milyonlarca polen tanesi koçanların uçlarındaki stigmalara düşerek tozlaşma gerçekleşir. Her bitkide 1-3 koçan bulunur. Danelerin olduğu bir koçanda 500-1000 tohum bulunabilir [52].

### **Mısır Pası** (*Puccinia sorghi* Schw.)

Taxonomi: Regnum: Fungi, Phylum: Basidiomycota, Class: Urediniomycetes, Ordo: Uredinales, Familia: Pucciniaceae, Genus: *Puccinia*

Bir obligat biyotrofik fungal patojen olan mısır pası, ılıman tropik ve subtropik bölgelerde çok görülür. Püstülü, güney pasına göre daha uzun ve kırmızımsı kahverengi renktedir. *Puccinia sorghi*'nin tam yaşam döngüsü beş farklı spor türü ve iki konak (mısır ve *Oxalis spp.*) içerir. Sporları; ara konakta (*Oxalis sp.*) enfekte olan teliosporlar, basidiosporlar, pycniosporlar, aeciosporlar ve ana konakta (mısır) enfekte olan ürediosporlardır. Kış aylarını bitki kalıntılarında geçiren teliosporlar ilkbaharda basidiosporları üretmek için çimlenir. Aecial aşamada *Oxalis* yapraklarının alt yüzeyinde görünen aeciosporlar, rüzgâr yoluyla mısır yapraklarını enfekte eder. Bu enfeksiyon, çok önemli bir spor tipi olan ürediosporları oluşturur. Mısır yapraklarında üretilen ürediosporların mısır yapraklarına penetrasyonu ile mısır pası yaşam döngüsünü tamamlar (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13** Pas hastalığına neden olan mısır pasının hayat döngüsü [53].



### 2.3. Mısır ve Mısır Pası İnteraksiyonu ile İlgili Çalışmalar

İlk klonlanan bitki direnç geni mısır *Hm1*'den sonra (1992), mısır pasına direnç oluşturan genlerin moleküler genetiği ve karakterizasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. 2011'de mısır genomu (B73) büyük ölçüde sekans edilmiş ve pas patojeni *Puccinia sorghi*'ye direncinin genetiği detaylı olarak çalışılmıştır. Mısır pasına direnç sağlayan lokuslardan biri olan *Rp1* kompleksi, pasın spesifik ırklarına direnç yanıtı oluşturan gen kopyaları taşımaktadır [54]. *Rp1* kompleksinde allel ve duplike kopyalar halinde en az 14 direnç spesifitesi tanımlanmıştır. *Rp1* lokusunda yüksek frekanslarda eşit olmayan krosingoverler ve gen dönüşümü gözlenmektedir. Eşit olmayan krosingoverler *Rp1-J* ve *Rp1-G* üyelerinde genetik instabilitenin birincil mekanizmasını oluşturmaktadır [13]. Sistemde ayrıca, patojene direnç gösteren genlerde (*Rp1*) mayotik rekombinasyonla yeni direnç spesifitelerini ortaya çıkışını rapor eden yayınlar bulunmaktadır [14]. *Rp1* kompleksi üyelerinden *Rp1-D*, Collins ve arkadaşları (1999) tarafından klonlanarak karakterize edilmiş, NBS-LRR motiflerine sahip direnç proteinlerini kodladıkları tespit edilmiştir [55]. Brown ve arkadaşları (2001) mısır genomu içindeki 33 bölgeden altısının mısır pasına kısmi direnç ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır [56]. Sun ve arkadaşlarının (2001) *Rp1-D* paralogları arasındaki sekans karşılaştırmaları rekombinasyon olaylarının eşit olmayan krosingover ile gerçekleştiğini göstermiştir [57]. Mısırdaki *Rp3* geni de mısır pasına neden olan *Puccinia sorghi*'ye karşı direnç sağlamaktadır [58]. Smith ve arkadaşları mısırdaki yeni direnç spesifitelerinin çoğunun *Rp1*'de eşit olmayan rekombinasyonlarla gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır [59].

İnteraksiyona giren organizmalarda ekspresyonu modüle edilen mesajların tanımlanması ve karakterizasyonu konukçu direnci, patojen virülansı ve avirülansının çalışılmasında önemi yadsınamaz unsurlardır. Mısır ve mısır pası arasındaki interaksiyonda ekspresyonu değişim gösteren genlerin modifiye cDNA-AFLP tekniğiyle tanımlanması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen sonuçların genel olarak bitki-patojen interaksiyonlarının karakterizasyonu çalışmalarına katkı sağlaması beklenmektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Mısır ve mısır pası interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren genlerin -mRNA moleküllerinin- modifiye cDNA-AFLP tekniğiyle tanımlanması amacıyla yapılan bu çalışmada *Puccinia sorghi*'nin T09 izolatu kullanılmıştır. T09 ile inokulasyonu yapılan dirençli *Rp-G* ve duyarlı A188 yapraklarından belirli zaman aralıklarında (6, 12, 18, 24, 36, 48, 96 saatleri) alınan örneklerin çalışıldığı TUBİTAK projesi materyalinde selektif amplifikasyon-PCR ve Şekil 2.12'de verilen prosedürün aşamaları gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. cDNA-AFLP, Selektif Amplifikasyon-PCR

##### Selektif amplifikasyon-PCR

Südüpak (2014) de verildiği gibi;

- 2 µL preamplifiye-seyreltilmiş kalıp DNA
- 0.5 µL (0.33 µM) *Csp6I* +2 primeri (10 µM)
- 0.5 µL (0.33 µM) *TaqI* +2 primeri (10 µM)
- 1.5 µL 10X PCR tamponu
- 1.5 µL (0.25 mM) 2 mM dNTP karışımı
- 0.9 µL (1.5 mM) 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.1 µL (0.5 U) *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, 5U/ µL)
- 8 µL ddH<sub>2</sub>O, Toplam 15 µL

##### Termocycler programı;

- 94 °C 30 sn kalıp DNA'nın denatürasyonu,
- Primer bağlanması; başlangıçta 65°C sıcaklıkta 30 sn, takip eden 12 döngü süresince sıcaklık her bir döngüde 0,7°C azaltılmıştır.
- 72 °C 1' PCR ile ekstensiyon, 94 °C 30 sn, 56 °C 30 sn, 72 °C 1' 23 döngüden oluşan bir PCR ve 72 °C'de 5'uç doldurma.

PCR reaksiyonlarına 2X sekans yükleme boyası (1:1) eklenerek 90°C de 4 dk denatürasyonu takiben -20°C'de soğutulmuş PCR-coolere örnekler transfer edildi ve PCR-coolerdaki örneklerden 5'er µl, sırasıyla aşağıdaki gibi hazırlanan % 6 lık denatüre edici PAGE'e yüklendi (Şekil 2.12).

### **3.2. Selektif Amplifikasyon Ürünlerinin Denatüre Edici-PAGE Seperasyonu**

#### **% 6'lık 0.5X TBE, 7M Üre Denatüre Edici Poliakrilamid Jel Hazırlanması ve Elektroforez**

Poliakrilamid jel, Südüpak (2013) de verildiği gibi, 50 ml olarak hazırlandı; 21g üre (7M, 50 mL), 10-15 mL ddH<sub>2</sub>O içinde mikrodalgada hafifçe ısıtılıp çözüldü. Üzerine sırası ile 5 mL 5X TBE ve 7,5 mL % 40 lık akrilamid-bis-akrilamid (19:1) eklendi. Jel dökmenin öncesinde solüsyona 600 µL %10'luk APS (0.1 gr/mL) ve 20 µL TEMED eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan jel solüsyonu 60 mL şırıngaya alındı ve hazır cam plakalar arasına hava kabarcığı oluşturmadan enjekte edilerek dolduruldu. Ağız kısmına tarak yerleştirilerek tarak üzerine ve kenarlara klampler takıldı. 5 dakika sonrada 5°lik bir eğimle 1 saat polimerizasyona bırakıldı.

#### **% 6'lık Denatüre Edici PAGE'de Koşturma, Elektroforez**

- Örnek yüklenecek tarağın yeri jel kalıntılarından temizlendi ve jel sandiviçi aparata yerleştirilip sıkma plaka ve vidaları simetrik şekilde sıkılarak sabitlendi.
- 0.5X TBE tamponundan üst çembere 750-800 mL, jel ağzından ~1 cm yüksekliğe kadar, alt çembere de 500-600 ml, jel tabanı 3-4 mm örtülünceye kadar dolduruldu.
- Tarak yerindeki ve jel altındaki hava kabarcıkları ve üre şırıngayla tampon basılarak uzaklaştırıldı. Bu işlem jel 75W güçte koşturularak 20' 50 °C'ye kadar ısınmasını takiben tekrarlandı.
- Tarak, jele uçları hafifçe girecek şekilde ve bir başı tam kenarla temas halinde yerleştirilerek vidalar tarak oynamayacak şekilde sıkıldı. Denatüre edilmiş örneklerden 5 µL sırası ile jele yüklendi.

%6'lık denatüre edici PAGE'de BFM ~25 nt, XC ~100 nt uzunlukta fragmentle komigrasyonla yürümektedir. 10' 75W'da ilk koşturmayı takiben tarak çıkarılarak jel 50 W, 50 °C'de 1,5-2 saat koşturuldu. XC (Xylen Cyanole) jel tabanına ~15 cm mesafeye gelince yürütme durduruldu ve jelin yerinde 15-20' oda sıcaklığına soğuması beklendi. Jelden tampon kalıntıları silindi ve aparattan çıkarılarak kulaklı plastik spatula yardımıyla kaldırılıp 1 litre %10'luk asetik asit içinde 20'-30' çalkalanarak fikse edilip Bassam 1991'e göre gümüş boyama yapıldı [60].

**Gümüş boyama :** %10'luk asetik asit içinde 30' fikse edilen jelin gümüş boyaması;

- Fikse edilen jel her seferinde 1 litre ultra safsu içinde çalkalanmak suretiyle ikişer dakikalık üç yıkama yapılmıştır.
- Takiben jel 2 litre AgNO<sub>3</sub> solüsyonu (1gr AgNO<sub>3</sub> ve 1.5 mL HCOH/L ddH<sub>2</sub>O içeren) içinde 30' çalkalanmak suretiyle doyurulmuş, çalkalama sırasında AgNO<sub>3</sub> solüsyonu tekrar kullanılmak üzere kabına hızlı bir şekilde aspire edilmiştir. 1 litre ddH<sub>2</sub>O ile 5 sn lik kısa bir yıkamayla jel yüzeyinden boyama solüsyonu uzaklaştırılmıştır.
- Geliştirme tepsisine transfer edilen jel, 2 litre 4 °C'ye soğutulmuş geliştirme solüsyonuyla bandlar belirginleşmeye başlayıncaya kadar çalkalanmıştır. Bandların iyice belirginleşmesini takiben geliştirme solüsyonu üzerine asetik asit solüsyonu dökülüp 5 dakikalık çalkalamayla gelişme durdurulmuştur. Her defasında 1 litre ddH<sub>2</sub>O içinde jelin çalkalandığı 2'şer dakikalık iki yıkama yapılmış ve jel kurutularak değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir [1].

### 3.3. cDNA-AFLP Etiketlerinin Re-Amplifikasyonu ve Pürifikasyonu

Reamplifikasyon-PCR; Südüpak (2013)de verildiği gibi, denatüre edici PAGE'de elektroforezi yapılan ve kurutulmuş jelden ekspresyonu değişim gösteren mesaj bandların kesilmeleri aşağıdaki gibidir;

- Kesilecek band üzerine 10 µLlik mikropipet ucuyla 4 µL ddH<sub>2</sub>O damlatılıp 1-2 dakika jelin hidrasyonu sağlandı.
- Aynı mikropipet ucuyla band örneği jel üzerinden soyularak 0.5 mL eppendorf tüpteki 75 µL ddH<sub>2</sub>O içine transfer edildi.
- 100 °C de 15' kaynatmayı takiben 4°C de bir gece bekletildi. Hazırlanan mateyalden 3 µL alınarak aşağıda içeriği verilen 25 µL lik PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.
  - 12.9 µL ddH<sub>2</sub>O
  - 2.5 µL NH<sub>4</sub><sup>+</sup> PCR tamponu (Fermentas)
  - 2.5 µL (0.2µM) 2 mM dNTP karışımı
  - 2.0 µL (2 mM) 25 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0.1µL (0.5 U) *Taq* DNA polimeraz (Fermentas, 5U/µL)
  - 1 µL (10 pmol, 0.4µM) *Csp6I* +2 primeri (10 µM)
  - 1 µL (10 pmol, 0.4µM) *TaqI* +2 primeri (10 µM)

- 3 µL elüt edilmiş DNA

PCR ürünlerine 5µL 6X agaroz jel yükleme boyası eklenerek % 2'lik 0.5X Tris Borat EDTA agaroz jelinde 10 V/cm voltajla separasyonlar yapıldı. Etidyum bromid içeren jellerde bandlar 312 nm UV transillüminatör üzerinde değerlendirilip fotoğraflandı. Elde edilen tek bandlara komşu band karışması durumunda, sekanslamada saflık için, jel pürifikasyonu yapılmalıdır. Pürifikasyon için bandlar jellerden steril bisturi uçlarıyla kesilerek 1.5 mL eppendorf tüplere alınmıştır. Jel dilimlerinden fragmentlerin elüsyonları Vivantis GF-1 Ambi-Clean elüsyon kiti ve silika kolonu veya bir agaroz elektroelüsyon gridinde gerçekleştirilmiştir. Elektroelüsyonla toplanan 0.5X TBE tamponundan DNA presipitasyonu 0.1 hacim 3 M Na-asetat ve 2-2.5 hacim % 96 < Etil alkol eklenerek yapılmıştır. 4°C de 15000xg de 15' santrifüjleme ve bir % 70'lik etil alkol yıkamasını takiben kurutulup 40-50 µL ddH<sub>2</sub>O ile çözülerek örnekler hazırlanmıştır

### **3.4. Etiketlerin Klonlanması ve Klonların Koloni-PCR ile Karakterizasyonu**

*TaqI* ve *Csp6I* adaptörleri ve T-AC primerinin kullanıldığı altı kombinasyonla (C-GG, C-CC, C-TG, C-AG, C-CT, C-CG) elde edilen yaklaşık 100 etiket klonlanmış ve sekanslatılmış, bunlardan 68 tanesinin değerlendirilebilir sekansı elde edilmiştir.

#### **Etiketlerin Klonlanması**

Südüpak (2013) deki gibi 10 µL ligasyon reaksiyonları kurulması;

- 4.8µL ddH<sub>2</sub>O
- 2 µL 5X DNA ligaz tamponu (Fermentas)
- 1 µL Linear T-vektör, (0.18 pmol uç, pTZ57 veya pUC18)
- 0.2 µL (1 U), T4 DNA ligaz (Fermentas)

Karışıma 2 µL PCR ürünü (~0.18 pmol uç) eklenerek 22 °C'de 1 saat veya 4°C'de bir gece inkübasyonla ligasyon gerçekleştirildi, karışımdan 2.5–3 µL transformasyonda kullanıldı.

#### **Kompetant Hücre Hazırlanması ve Plazmid DNA ile Transformasyonu**

Önceden hazırlanmış gecelik kültür inokülasyonda kullanılarak aşağıda verilen protokolle kompetant hücre hazırlanmıştır.

- 2 mL lik tüpe 630 µL LB transfer edilerek üzerine gecelik kültürden 70 µL eklendi

ve ağzı kapatılarak 250-300 rpm çalkalama ile ~3 saat büyütüldü. Kültür iki dakika buz üzerine transfer edildi. Ardından 4°C de 2' 10.000 xg de santrifüj edilip ve süpernatant döküldü. Hücre pelleti üzerine kültür hacminin yarısı kadar (350 µL) steril 50 mM CaCl<sub>2</sub> eklendi ve hafifçe vorteks edilmek suretiyle veya pipet edilmek suretiyle hücreler tamamen süspansiyon haline getirildi.

- Hücreler buz üzerinde 15'-20' bekletildi, takiben 4 °C de 2' santrifüj edildi ve supernatant döküldü. Hücre pelletine kültür hacminin 0.1'i kadar (70 µL) steril 50 mM CaCl<sub>2</sub> eklenerek tüpün tabanına vurmak suretiyle suspend olmaları sağlandı. Bu aşamada, kompetant hücre preparasyonları daha sonra kullanılacaksa, her birine 30 µL % 50 steril gliserol eklenerek -30 °C de donduruldu (% 15, hacim 100 µL).
- 70 µL kompetant hücre preperasyonu üzerine 3 µL ligasyon karışımından eklenerek tüp tabanına hafifçe vurularak karıştırıldı ve buz üzerinde 30' bekletilerek kompetant hücre yüzeylerine DNA-Ca<sup>+2</sup> komplekslerinin bağlanmaları sağlandı. Hücrelere 90 sn 42°C de sıcaklık şoku uygulanarak transformasyonları gerçekleştirildi. Takiben buz üzerine 2' transfer edildi, üzerlerine 500 µl (5X) antibiyotiksiz LB (Muller) eklenerek, 30 dakika 37° C de çalkalanmak suretiyle inkübe edilip hücrelerin normal büyüme rutinine dönmeleri sağlandı. 600 µL nin tamamı daha önceden 37 °C ye ısıtılmış LB amp+IPTG+X-gal petrisi üzerine yayılarak, 37°C de inkübasyonu yapılmıştır.

### **Koloni PCR ile Klonların Karakterizasyonu**

Südüpak (2013)de verildiği gibi 10 µL koloni PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Koloni durumunda steril kürdan veya uçla alınan görülebilir bir hücre kitlesi tüp tabanında 2 µL ddH<sub>2</sub>O içine karıştırıldı ve üzerine aşağıda hazırlanan karışımdan 8'er µL eklenerek münferit reaksiyonlar kuruldu. Gliserol stoğu veya sıvı kültür durumunda bunlardan 2 µL eklenerek reaksiyonlar hazırlandı.

- 4.84µL ddH<sub>2</sub>O
- 1 µL 10X PCR tamponu (Fermentas)
- 1µL(0.2µM) 2 mM dNTP karışımı
- 0.6 µL (2 mM) 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.25 µL *Csp6I* primeri (10 µM)
- 0.25 µL *TaqI* primeri (10 µM)
- 0.06 µL *Taq* DNA pol (5U/µL); Toplam: 8 µL

**Thermocycler programı:** 35 döngüden oluşan PCR için; 94°C’de 3sn başlangıç denatürasyonu sonrasında her biri 94 °C 20 sn denatürasyon, 55 °C’de 30 sn primer bağlanması (annealing), 72 °C 50 sn ekstensiyon ve 72 °C’de 5dk son uç doldurma ile amplifikasyonlar gerçekleştirildi. PCR ürünleri %2 lik 0,5X TBE agaroz jellerinde uygun DNA markırlarıyla (2 µL φX174 *Bsu*RI) birlikte 10V/cm voltajla yürütülerek fotoğraflandı ve değerlendirildi

### **3.5. Alkali-Liz Metoduyla *E. coli* (JM107) Hücrelerinden Plazmid DNA İzolasyonu**

Südopak ( 2013) de verildiği gibi;

- 15 mL kültür tüpü içinde 1.5-2 mL LB-amp inoküle edilerek sıvı kültür kuruldu ve 37 °C’de 250 rpm çalkalamayla bir gece büyütüldü.
- Gecelik kültür 5 dakika buz üzerinde tutularak 4 °C’de 2 dk 8.000xg’de santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
- Hücre pelleti üzerine 225 µL kadar SET tamponu eklenerek vorteks edilmek suretiyle, hücrelerin süspansiyon haline gelmeleri sağlandı. Süspansiyona 525 µL litik karışım eklenip döndürülerek karıştırıldı ve berrak lizat oluşumu sağlandı.
- Lizat 10 dakika buz üzerinde tutularak üzerine 375 µL 3M Na-asetat tamponu eklenerek karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Kromozomal DNA, proteinler ve diğer hücre parçaları, homojenat 5dk 4°C’de 12.000xg de santrifüj edilerek pellet edildi.
- Süpernatant yeni bir tüpe transfer edilerek üzerine 0.8-1x hacim soğuk izopropanol eklendi, 4-5 defa alt üst edilmek suretiyle karışması sağlandı. 15 dk 4 °C’de 15.000xg’de santrifuj edilerek pDNA’nın pellet olması sağlandı.
- Pellet %70’lik etanol ile yıkanarak kurutuldu. 70 µL ddH<sub>2</sub>O içinde çözümlenerek 4°C de muhafaza edildi.

## 4. BULGULAR

T-AC/C nin 6 kombinasyonu (C-AG, C-CC, C-CG, C-CT, C-GG, C-TG) *Csp6I* primerleriyle tespit edilen cDNA-AFLP etiketleri sekanslanması için özel hizmet alımı yapılan firmaya gönderilmiştir. Özel firma sekanslama sonuçlarını e-mail ile tarafımıza ulaştırmıştır. NCBI web tabanlı BLAST rutini kullanılarak, sekanslanan etiketlerin sekans benzerliği taramaları gerçekleştirilmiştir. Gen bankası nükleotid, eksprese olan sekanslar ve protein sekansları veri tabanında tanımlanan benzerlerinin en küçük e-değerlileri alınarak değerlendirilmiştir.

### 4.1. Bitki Savunması ile İlgili Proteinleri Kodlayan mRNA Sekanslarına Benzerlik Gösteren Etiketler

Yapılan sekans karakterizasyonları sonucunda tanımlanan 19 etiketin bitki savunması ile ilgili fonksiyonel ürünleri kodlayan mRNA sekanslarına benzerlik gösterdikleri bulunmuştur. Sekanslanan bu etiketlerin benzerlik gösterdikleri mRNA'lar ve bitki savunmasındaki rolleri aşağıda verilmiştir:

1. AC/GG-A6 ile AC/CC-A1 etiketlerinin mısır pası direnç geni proteinini kodlayan mRNA sekansına,
2. AC/CC-A10 etiketi, mısır potasyum ( $K^+$ ) transport proteinini (ZMK1) kodlayan mRNA sekansına,
3. AC/CC-A9 ile AC/CT-G11 etiketlerinin protein sentezi, katlanması ve yıkımı ile ilgili proteinleri kodlayan sekanslara,
4. AC/TG-G1, AC/AG-G15, AC/TG-A12 ve AC/CT-A1 transkripsiyon faktörü sekanslarına,
5. AC/GG-A17 nin *E. coli* sıcaklık şoku DnaJ proteini HSP40'ın sekansına,
6. AC/AG-A10 etiketinin ZM inbred B77'nin sekansına, AC/TG-A10 etiketinde ZM *HRGP* geninin sekansına,
7. AC/AG-A9 ile AC/AG-G14 etiketlerinin chorismat mutaz mRNA sekansına
8. AC/TG-A2 ile AC/TG-G4 etiketlerinin yaralama yanıtı mRNA sekanslarına
9. AC/GG-A2 etiketi *P.sorghii* peptidil-tRNA hidrolazın (PTH2) mRNA sekansına
10. AC/CT-A16 etiketi serine/threonine kinase protein sekansına
11. AC/TG-A4 etiketi thioredoxin H tipi mRNA sekansına benzerlik göstermektedir.



Tez çalışmamda sekanslanan etiketlerin benzerlik gösterdikleri mRNA'lar ve bunların bitki –patojen interaksyonundaki rolleri tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.1** Çalışılan cDNA-AFLP etiketlerinin Genbankası taramalarında mısırdaki sekans benzerliği bulunan mRNAlar

Sıra	TDF ID	Genbank (Acc. no)	Gen Bankası Sekans Benzeri (Genebank ID)	E-değeri
<b>Fotosentez, hücre metabolizması, transport</b>				
1	AC/GG-A7	EU956354.1	Z. mays klon 1561202 fotosistem I reaksiyon merkezi alt birim XI mRNA	9E <sup>-83</sup>
2	AC/CC-G11	EU963404.1	ZM klon 261966 fotosistem I reaksiyon merkezi alt birim IV A mRNA, complete cds	3E <sup>-22</sup>
3	AC/TG-A1	EU963441.1	ZM klon 262524 asil taşıyıcı protein mRNA	2E <sup>-136</sup>
4	AC/GG-A11	EU975063.1	ZM klon 466406 4-nitrophenylphosphatase mRNA	8E <sup>-52</sup>
5	AC/GG-A5	BT067700.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFc0127M18 mRNA, nitrilase 1	2E <sup>-95</sup>
6	AC/CC-G4	EU966588.1	ZM klon 295467 APRL5 - ZM adenosine 5'-phosphosulfatereductase-like mRNA	1E <sup>-49</sup>
7	AC/CC-A6	U44087.1	ZMbeta-D-glucosidase precursor (glu2) mRNA	6E <sup>-58</sup>
8	AC/AG-A14	BT067377.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFc0030N10 mRNA, ürün bilinmiyor.	5E <sup>-18</sup>
9	AC/AG-A10	AF348367.1	ZM inbred B77 beta-keto acyl reductase gene	1E <sup>-43</sup>
10	AC/AG-G14	EU963619.1	ZM klon 264809 chorismate mutase mRNA	3E <sup>-50</sup>
11	AC/AG-A9	EU963619.1	ZM klon 264809 chorismate mutase mRNA	3E <sup>-50</sup>
12	AC/CC-A10	Y07632.1	<i>Zea mays</i> mRNA for potassium channel (ZMK1 gene)	7E <sup>-47</sup>
13	AC/CG-G3	EU962752.1	ZM klon 245275 threonine endopeptidase mRNA	1E <sup>-54</sup>
<b>Protein sentezi, katlanması ve yıkımı</b>				
14	AC/AG-G16	EU955647.1	ZM klon 1540749 peptide chain release factor 2 Mrna	4E <sup>-33</sup>
15	AC/CC-A9	EU974403.1	ZM klon 448402 F-box protein mRNA	1E <sup>-39</sup>
16	AC/CT-G11	EU965008.1	ZM klon 283165 40S ribosomal protein S7 mRNA	5E <sup>-168</sup>
17	AC/GG-A17	EU963627.1	ZM klon 264931 ısı şok proteini DnaJ, N-terminal mRNA	7E <sup>-17</sup>
18	AC/TG-A11	EU959849.1	ZM klon 220151 ökaryotik translasyon başlatma faktörü 5A mRNA	6E <sup>-58</sup>
<b>Pas transkripti</b>				
19	AC/GG-A2	XM003307148.1	<i>P. graminis</i> CRL 75-36-700-3 peptidyl-tRNA hydrolase 2, mRNA	5E <sup>-12</sup>
<b>Hastalık direnci, sinyal iletimi, redoks durumu ve transkripsiyonal düzenleme</b>				
20	AC/GG-A6	AY574035.1	ZM pas direnci proteini <i>rp3-1</i> gen	6E <sup>-45</sup>

21	AC/CC-A1	AY574035.1	ZM pas direnci proteini <i>rp3-1</i> gen	1E <sup>-102</sup>
22	AC/TG-A4	EU957399.1	ZM klon 1590868 thioredoxin H-type 5 mRNA	3E <sup>-99</sup>
23	AC/CC-A8	EU963527.1	ZM klon 63787 ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyyme mRNA	3E <sup>-50</sup>
24	AC/CT-A16	DQ417753.1	ZM B73 serine/threonine kinase protein	1E <sup>-6</sup>
25	AC/TG-G1	XM 002460225	Sorghum bicolor hypothetical protein mRNA, hipotetik l�s�n zipper-ihativa eden protein benzeri	5E <sup>-21</sup>
26	AC/TG-A12	EU975275.1	ZM klon 486268 transcription factor Dp-1 mRNA	2E <sup>-33</sup>
27	AC/TG-A10	AJ131535.1	ZM HRGP gene, AC1503 line	2E <sup>-15</sup>
28	AC/AG-G15	NM001152803.1	ZM putative transcription factor (x1), mRNA	4E <sup>-39</sup>
29	AC/CT-A1	EU952992.1	ZM 1373658 transcription factor BTF3 mRNA, complete cds	8E <sup>-120</sup>
30	AC/CC-A19	EU966238.1	ZM klon 292773 glycine-rich protein A3 mRNA	2E <sup>-9</sup>
31	AC/CC-A15	EU968346.1	ZM klon 319283 metallothionein-like protein type 2 mRNA	1E <sup>-22</sup>
<b>Diğer stres ile ilgili mesajlar, yapısal proteinler ve gruplanmamış olanlar</b>				
32	AC/TG-G4	EU956477.1	ZM klon 1564201 yara duyarlı protein mRNA	3E <sup>-134</sup>
33	AC/TG-A2	EU956477.1	ZM klon 1564201 yara duyarlı protein mRNA	3E <sup>-134</sup>
34	AC/CG-G1	DQ078764.1	ZM klon Zmcoi6.7 soğuk ind�kylenebilir bilinmeyen mRNA	6E <sup>-100</sup>
35	AC/TG-A6	EU970858.1	ZM klon 352417 GRAM alanı içeren protein mRNA	1E <sup>-91</sup>
36	AC/CT-G6	EU964858.1	ZM clone 282139 PREG- benzeri protein mRNA	9E <sup>-67</sup>
37	AC/CC-G2	EU974377.1	ZM clone 447612 �inko bağlayıcı protein mRNA	3E <sup>-93</sup>
38	AC/CC-A3	NM001156148.1	ZM LOC100283246 (umc2207) mitokondriyal protein Őifreleyici n�kleer gen	2E <sup>-78</sup>
39	AC/CC-G3	EU963985.1	ZM klon 274813 beta peptidaz mitokondriyal işlem	1E <sup>-80</sup>
40	AC/CC-A4	EU963985.1	ZM klon 274813 beta peptidaz mitokondriyal işlem	2E <sup>-80</sup>
41	AC/CC-A18	NM001153830.1	ZM-düzenleyici alt birimi (LOC100280910), mRNA	5E <sup>-4</sup>
42	AC/CT-G1	BT065926	ZM full-length cDNA klon ZM_BFc0117N17 mRNA	8E <sup>-176</sup>
43	AC/CT-G4	DQ493646.1	ZM �eŐiti CML258 bz lokusu b�lge	3E <sup>-40</sup>
44	AC/TG-A5	BT035586.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0070M16 mRNA	1E <sup>-92</sup>
45	AC/TG-A7	BT070006.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0367E17 mRNA	3E <sup>-77</sup>
46	AC/CT-G10	BT061143.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0115G16 mRNA	6E <sup>-18</sup>
47	AC/CT-A3	EU956220.1	ZM klon 1559183 hipotetik protein mRNA, complete cds	9E <sup>-48</sup>
48	AC/CT-A11	-	<b>Sekans benzeri yok</b>	-

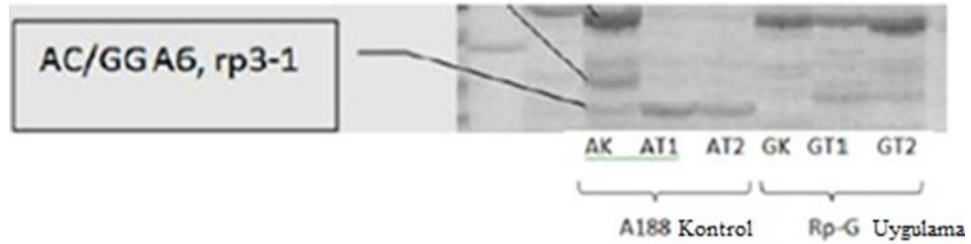
49	AC/CT-A15	BT037627.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0182N13 mRNA	2E <sup>-8</sup>
50	AC/CT-A2	EU950190.1	ZM klon 468811 mRNA sekans	1E <sup>-71</sup>
51	AC/CG-A3	EU941657.1	ZM klon 1468821 mRNA sekans	9E <sup>-90</sup>
52	AC/CT-G3	EU95806.1	ZM klon 1670877 hipotetik protein mRNA, complete cds	2E <sup>-62</sup>
53	AC/CT-G9	-	<b>Sekans benzeri yok</b>	-
54	AC/CT-A4	AY104010	ZM PCO105770 mRNA sekans	3E <sup>-06</sup>
55	AC/GG-A13	EU969568.1	ZM klon 332399 mRNA sekans	7E <sup>-26</sup>
56	AC/GG-A16	EU969568.1	ZM klon 332399 mRNA sekans	7E <sup>-26</sup>
57	AC/GG-A8	EU967434.1	ZM klon 303064 hipotetik protein mRNA	1E <sup>-76</sup>
58	AC/AG-G13	EU955845.1	ZM klon 1548722 hipotetik protein mRNA	7E <sup>-52</sup>
59	AC/AG-G17	AY107868.1	ZM PCO101151 mRNA sekans	1E <sup>-26</sup>
60	AC/CC-A11	-	<b>Sekans benzeri yok</b>	-
61	AC/CC-A13	BT063730	ZM full-length cDNA klon ZM_BFc0100L22 mRNA	3E <sup>-27</sup>
62	AC/CC-A16	EU963628.1	ZM klon 264963 mRNA sekans	1E <sup>-20</sup>
63	AC/CC-A17	BT042623.2	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0377K06 mRNA	5E <sup>-18</sup>
64	AC/CC-G1	EU941657.1	ZM klon 1468821 mRNA sekans	1E <sup>-137</sup>
65	AC/CC-G10	BT064836.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0199C05 mRNA	8E <sup>-41</sup>
66	AC/GG-A1	BT068155.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0066J15 mRNA	1E <sup>-81</sup>
67	AC/GG-A3	EU973742.1	ZM klon 407921 mRNA sekans	5E <sup>-80</sup>
68	AC/GG-A4	BT086809.1	ZM full-length cDNA klon ZM_BFb0361N13 mRNA	2E <sup>-50</sup>

## 5. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRMELERİ

Hazırlanan pas izolatına duyarlı A188 inbredi ve dirençli genotip *Rp1-G* de dört kesen *TaqI* ve *Csp6I* enzim kombinasyonu resiprokal sıralı kesimleriyle [50] hazırlanan kalıplarla gerçekleştirilen çalışmada 68 mRNA etiketi (TDF) tanımlanıp sekanslanarak, gen bankası benzerlik taraması bilgileri çerçevesinde söz konusu sekansların ilgili oldukları olaylar ve interaksiyondaki rolleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda mısır ve mısır pası interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren mRNA sekansları teyit için primerler düzenlenmemiş ancak aynı sekanslar için sekans benzerliği taramaları yapılmış ve söz konusu etiketlere ilişkin genlerin bitki patojen interaksiyolarındaki rolleri değerlendirilmiştir.

### 5.1. Mısır Pası Direnç Geni *Rp1* ve *Rp3* Sekans Benzeri Olan Etiketler

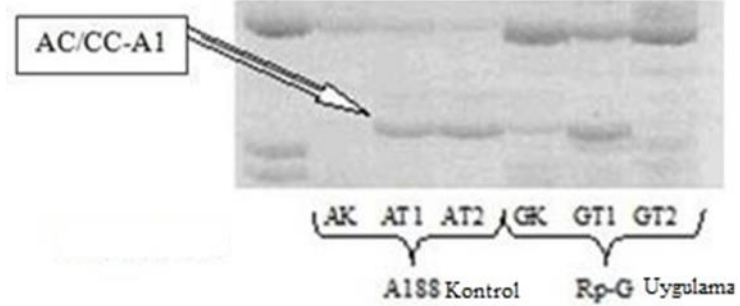
Yapılan sekans karakterizasyonları sonucunda, AC/GG-A6 ile AC/CC-A1 etiketlerinin direnç geni sekansına benzerlik gösterdikleri anlaşılmıştır. Duyarlı genotipte tanımlanan AC/GG-A6 etiketinin sekans benzerliği taraması, bu etiket sekansının mısır pası direnç geni *rp3* ile sekans benzeri olduğunu göstermektedir (Şekil 5.1).



**Şekil 5.1** AC/GG-A6 Etiketinin ekspresyonel değişimin gösteren tarama jel fotoğrafı (Kontrol A188 inbredi ile mısır pası AT1 ve AT2 inokülasyonunda)

AC/CC-A1 etiketi mısır pası direnç geni proteinini kodlayan mRNA sekansı ile benzerlik göstermektedir. Şekil 5.2’de tarama jeli fotoğrafı verilen bu etiketin, pas ile inokülasyonu sonucu orijine olduğu, kontrolde ekspresyonu yokken, T1 ve T2 de induksiyonu net bir şekilde görülmektedir. Dirençli genotipte (GK) ekspresyon görülmezken, uygulamada (GT1) induksiyon görülmesi bu etiketin direnç geni ile

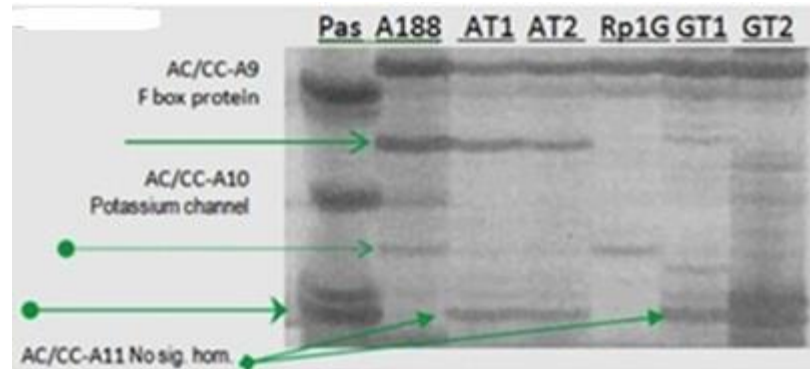
ilgisinin açığa çıkarılmasını gerektirmektedir. *Rp1* genleri için rapor edilen ekspresyon profilinden farklı görünmektedir.



**Şekil 5.2** Pas inokulasyonu yapılan AC/CC-A1 etiketinin ekspresyon değişimi tarama jel fotoğrafı

## 5.2. Potasyum Transport Proteinini Kodlayan Sekanslara Benzerliği Olan Etiketler

Şekil 5.3'de jel fotoğrafı verilen AC/CC-A10 etiketi, mısır potasyum ( $K^+$ ) transport proteinini (ZMK1) kodlayan mRNA sekansının benzeridir. Potasyumun ( $K^+$ ) membranlardan transportu potasyum kanalları ve sekonder potasyum transporter proteinlerle gerçekleşmektedir. Bu etiketin orijine olduğu genin kontrollerde ekspres olmakta, pas inokulasyonuyla hem dirençli hem duyarlı uygulama grubunda repres olmaktadır.



**Şekil 5.3** AC/CC-A10 ve AC/CC-A9 etiketlerinin tarama jel fotoğrafı (*Z.mays* potasyum kanalı ZMK1 proteinini kodlayan mRNA ve F-box protein kodlayan sekans benzeri, A188 duyarlı kontrol, G dirençli uygulama)

Dirençli ve duyarlı genotipte represyonun protein fosforilasyonu/defosforilasyonu gibi kanal proteini modifikasyonu ile değil de transkripsiyonel olarak gerçekleşmesi dikkate değer bir durumdur. Zira patojen inokulasyonunu takiben hücre içine  $Ca^{+2}$

inflaksı, hücre dışına K<sup>+</sup> efflaksı gibi tipik fizyolojik modülasyonları görülmekte, hücre içine potasyum alımında etkin olan bu kanal proteini ekspresyonunun represyonunu daha anlamlı hale getirmektedir [26, 61].

### **5.3. Protein Sentezi, Katlanması ve Yıkımı ile İlgili Proteinleri Kodlayan mRNA Sekanslarına Benzerliği Olan Etiketler**

Şekil 5.3'deki tarama jelinde tanımlanan AC/CC-A9 etiket bandı dirençli genotipte eksprese olmamakta, sadece duyarlı genotipte ekspres olmakta ve inokulasyonu takiben zamana bağlı represyon göstermektedir. Bu durum, HR yanıt şeklinde bir indüksiyon olmadığına göre, muhtemel ACIF 1 benzeri bir F-box proteini olduğunu düşündürmekte ve karakterize edilmesini gerektirmektedir. SCF kompleksleri ile assosiyel olan ACIF 1 (ACRE 189) proteini, tütünde ekspresyonu repres olunca, elisitörlerce tetiklenen HR supres olmaktadır [62]. Mısır genomunda sekansı karakterize edilmiş olan F-box proteini, yaklaşık 50 aa uzunlukta protein motifleri olup protein-protein interaksiyonunda rol oynamaktadır. F-box protein motifleri, SCF-ubikuitin ligaz kompleksinin (SkpI, Cullin, F-box) diğer bileşenlere bağlanmasına katkı sağlar. Ubikütilasyonla protein yıkımında rolü olan F-box proteinin, *Arabidopsis* bitkisinde bitki patojen savunma yanıtında (SAR ve ISR) fonksiyonel olduğu rapor edilmiştir [63, 64].

AC/CT-G11 etiketi *Z. mays* 40S ribozomal protein S7'yi kodlayan mRNA'nın sekans benzeridir. Ekspresyon profili analizi gerçekleştirilen bir dizi bitki-mikrop interaksiyonu çalışmasında [21], ribozomal protein L<sup>6</sup>'nın, uyumlu *Puccinia striiformis*-buğday interaksiyonunda repres olduğu rapor edilmektedir. Protein degradasyon aparatı gibi sentez aparatı bileşenleri ribozomal proteinlerin ekspresyon seviyelerinde muhtemelen interaksiyonla değişim gösterebilmekte ve bu bileşen bazen 28S rRNA molekülü de olabilmektedir [40].

### **5.4. Transkripsiyon Faktörü Sekansların Benzeri Olan Etiketler**

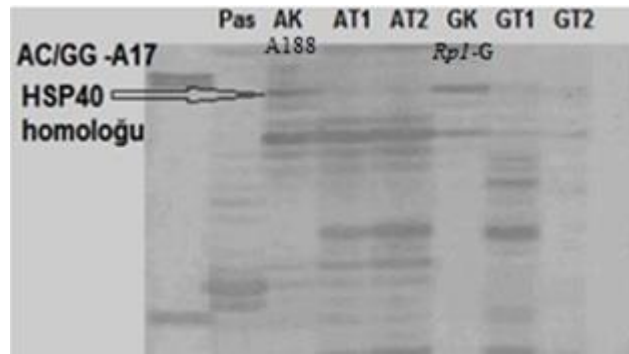
Bazik fermuar transkripsiyon faktörleri (bZIP ve bHLH) ışık, UV, yaralanma, salisilik asit (SA), absisik asit (ABA) ve patojen enfeksiyonu elisitörleri gibi etmenlerle ekspresyon gösteren genlerin promotörlerindeki G-box (CACGTG) ve TGA gibi motiflere bağlanarak fonksiyonel olurlar. Sadece T2 de ekspresyon

gösteren AC/AG-G15 etiketi, mısırdaki muhtemel transkripsiyon faktörü (x1) kodlayan mRNA sekansının benzeridir. AC/TG-A12 ve AC/CT-A1 etiketlerinin, kontrollerinde ekspresyon ve duyarlı genotipte pas inokülasyonu ile represyon görülmektedir. AC/TG-A12 etiketi transkripsiyon faktörü (Dp1) kodlayan mRNA sekansının ve AC/CT-A1 etiketi BTF3 transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'nın sekans benzeridir. AC/TG-G1 etiketi dirençli genotipte ekspresyon, pas inokülasyonu ile göreceli olarak induksiyon göstermektedir. Lysin fermuarı proteinine benzer hipotetik protein kodlayan mRNA sekans benzerliği olan AC/TG-G1 etiketinin dirençli genotipte ekspresyonu pas inokülasyonu ile indüklenmektedir. AC/AG-G15 etiket sekansında NM001152803.1 aksesyon nolu ZM transkripsiyon faktörü x1'in *F. pseudograminearum* inokülasyonu ile duyarlı buğdayda ekspresyonu değişim gösteren genlerin mikroarray analizinde, bHLH ekspresyonu indüklenirken *P. triticina* inokülasyonunda bu değişimin görülmediği rapor edilmiştir [46]. Mikorize inokülasyonunu takiben pirinçte bHLH, HLH, myb benzeri ve çinko parmağı tip transkripsiyon faktörlerinin interaksiyonunun makroarray analizinde indüklendiği rapor edilmektedir [65]. Bu durumda, patojen muhtemelen duyarlı genotipte ya bu faktörlerin rol oynadığı konukçu gen ekspresyonunu repres ederek büyüyüp hayat döngüsünü tamamlamakta veya patojen penetrasyonu ve büyümesine bağlı olarak konukçuda düzenleyici faktörlerin transkripsiyonu yeniden düzenlenmektedir. Dirençli genotipte birçok durumda patojen penetrasyonu ve büyümesi gen ekspresyonuna neden olmaktadır.

### **5.5. AC/GG-A17 Moleküler Şeperon Sekans Benzeri Etiketler**

Sıcaklık şoku proteinleri şeperonlar (heat-shock proteins, HSP), bitki savunmasıyla ilişkilendirilen proteinler olup bir dizi sinyal protein aktivitesinin düzenlenmesinde ve teşkilinde rol oynadıkları bilinmektedir. HSP'ler, bitki-patojen ara yüzünde proteinlerin katlanması, fonksiyonel biçimlerinin korunması ve proteinler arası interaksiyonda görev yaparlar. İşlevini tamamlayan proteinlerin ortadan kaldırılması ve degradasyonunda rolü olanların ekspresyonlarının modüle edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. HSP'ler haustoryumu çevreleyen alana salgılanmakta ve iki organizma ara yüzünde fonksiyonel olmaktadır. Bunlar öncelikle HSP70s ATPaz aktivitesini uyararak etki ederler. Bir şeperon üyesi HSP90 proteinin dimerize olarak

bağlandığı proteinlerin aktivitesinde artışa veya azalışa neden olduğu ileri sürülmekte [66] ve şperon izoformlarının susturulduğu tütün genotiplerinde test edilen tüm direnç yanıtlarının (NBS-LRR dahil) kaybolduğu bulguları rapor edilmektedir [31]. Çalışmamızda karakterize edilen etiketlerden AC/GG-A17 *E. coli* sıcaklık şoku DnaJ proteini HSP40'ın sekans benzeri gözükmektedir. Teyit edilmeyen bu etiketin tarama jelinde ekspresyon profili değişimi kontrolde ekspresyon, 6-24h ile 36-96h poollarında represyon şeklindedir (hem dirençli *RpI-G* hem duyarlı A188 uygulamalarında repres olmaktadır-Şekil 5.4).



**Şekil 5.4** DnaJ proteinin sekans benzeri AC/GG-A17 etiketinin tarama jel fotoğrafı (A188:duyarlı ırk- AK: kontrol, *RpI-G*: dirençli ırk- GK: uygulama)

Mısır ve güney mısır pası (*Puccinia polysora* Underw.) ile gerçekleştirilen bir mikroarray [67] çalışmasında şperon DnaJ11'in (ZM 16941.1) 2.2 kat fazla indüklendiği, putative 17.8 kDa sıcaklık şoku II proteinin (ZM 12517.1) ise 2.3 kat fazla repres olduğu rapor edilmektedir. Aynı gruptaki farklı genlerin ekspresyonlarında farklılıklar olabilir. Aynı genlerin benzer grup patojenlere yanıtta ekspresyonlarında tutarlılık görülmesi daha anlamlıdır.

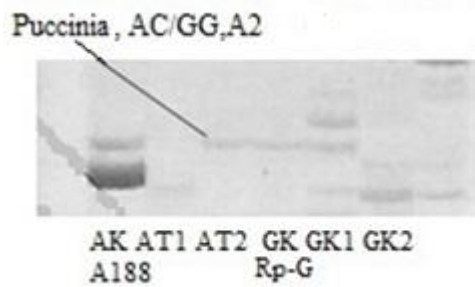
## 5.6. Pasif Savunma ile İlgili Etiketler

Patojen saldırılarına karşı bitkilerin ilk savunma yanıtı hazır bulundurulan bazı yapısal (pasif) engellerdir. Bunların en önemlisi ilk pasif bariyer olan yaprak ve meyve üzerindeki mumsu kütikula tabakasıdır. AC/AG-A10 etiket, kütikula biyosentezinde görev alan ZM inbred B77'nin sekans benzeri olup aynı ürün sekansına sahiptir. AC/TG-A10 etiketi ZM *HRGP* geninin sekans benzeridir. Bu gen, bitkilerin pasif savunma mekanizmaları için önemli olan hücre duvarı yapısal proteini, hidroksprolince zengin glikoproteini kodlamaktadır.



### 5.7. Aktif Savunma Yapılarını Oluşturan Ürün Sekansı Benzeri Olan Etiketler

AC/AG-A9 ile AC/AG-G14 sekans benzerlerine ait fonksiyonel bir ürün olan chorismat mutaz, geniş bir patojen spektrumuna dirençte rol oynayan sistemik kazanılmış direnç (SAR) oluşumunda, patojen enfeksiyonunu takiben üretilen ve tipik olarak patojenez ile ilgili (PR) proteinlerin ekspresyonuna aracılık etmekte görevli bir bileşik olan salisilik asit (SA) sentezinde rol oynamaktadır. Chorismat mutaz, tirozin ve fenilalanin biyosentez yolunda prefenat dehidrogenaz -korismat dönüşümünü katalize eder. Ayrıca AC/TG-A2 ve AC/TG-G4 etiketlerin sekans benzerlerine ait ürünlerin (DNaz ve RNaz) yara duyarlı enzimleriyle, AC/GG-A2 etiketine ait bir ürün peptidil-tRNA hidrolazın (PTH2) kimyasal savunma yapıları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Şekil 5.5’de verilen jel fotoğrafında sadece A188 de ekspresyon görülmektedir. *RpI-G*’de ekspresyon olmadığı için kontrol genomundan orijine olmuştur. Pas mesajının peptidil-tRNA hidrolaz (PTH2) ve protein sentezinde kritik rolü vardır. Peptidil-tRNA hidrolaz, peptid ve tRNA arasındaki ester bağı keserek, peptidil-tRNA dan tRNA’yı serbest bırakır. Hücrelerde peptidil-tRNA birikimi protein biyosentezinin durmasına neden olur [68].



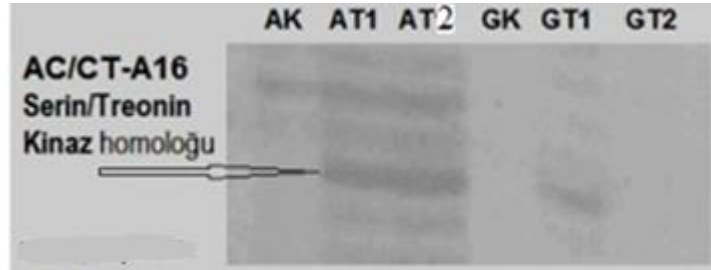
Şekil 5.5 Pas transkripti AC/GG-A2 etiketine ait sekans jel fotoğrafı (A188 duyarlı kontrol, GK dirençli uygulama)

### 5.8. Hipotetik Proteinlere Sekans Benzerliği Olan Etiketler

Sekansı tanımlanan bazı etiketlerin genbank sekans benzerliği taramalarında fonksiyonu bilinmeyen hipotetik proteinleri kodladıkları görülmüştür. Çalışmamızda sekansladığımız etiketlerden AC/GG-A8 ve AC/AG-G13 *Z. mays* hipotetik protein sekans benzeri olarak görünmektedir. AC/TG-G1 sekansında *Sorghum bicolor* (L.) Moench hipotetik proteini sentezleyen mRNA sekans benzeridir.

### 5.9. AC/CT-A16 Etiketi Serine/Threonine Kinase Protein Sekans Benzeridir

Serin/threonin protein kinazlar hücre içi sinyal iletiminde protein fosforilasyonu ile fonksiyonel olan enzimlerdir. Campos-Soriano ve arkadaşları mikorize inokülasyonu ile prinçte ekspresyonu değişim gösteren mesajların makroarray analizi çalışmasında MPK6'nın (2.9 kat) ve bir serin/treonin protein kinazın (2.09 kat) induklendiği rapor etmektedirler [65]. *P. polysora*-mısır interaksyonunu mikroarray analiziyle değerlendiren Wang ve arkadaşları serin/treonin protein kinaz PBS1'in (2 kat) induklendiğini rapor etmektedirler [67]. Benzer şekilde buğdayda *F. pseudograminearum* inokülasyonunda bir putatif serin/treonin kinaz protein ekspresyonunun induklendiği rapor edilmektedir [46]. DQ417753.1 aksesyon numaralı AC/CT-A16 etiketi serin/treonin kinaz sekans benzeri olarak bulunmuştur. Duyarlı ve dirençli genotip kontrollerinde ekspresyon olmayan serin/threonin protein kinaz sekans benzerliği olan bu sekans, duyarlı T1 ve T2 ile birlikte dirençli genotip T1 uygulamasında induklenebilir (Şekil 5.6). Karakterize edilen etiket (AC/CT-A16) sekansının bitki direncinin oluşturulmasında rol oynadığı anlaşılmaktadır.



**Şekil 5.6** AC/CT-A16 etiketinin AT1 ve AT2 pas inokülasyonu yapılan uygulamalar sonucu tarama jelindeki ekspresyon değişimi, A188 kontrol (AK), uygulama (GK)

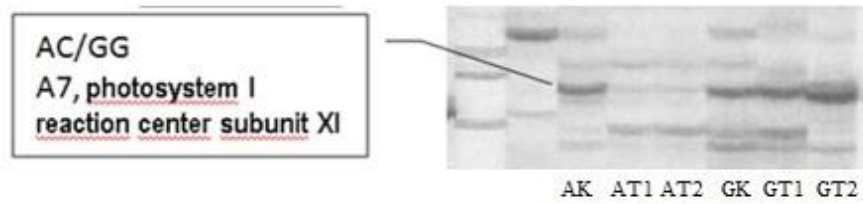
### 5.10. AC/TG-A4 Etiketi Thioredoxin H Tipi mRNA' nın Sekans Benzeridir

AC/TG-A4 etiketi (accession no:EU957399.1, e-değeri  $3E^{-99}$ ) tiyoredoksin H-tipi mRNA sekans benzeri olarak tespit edilmiştir. Tiyoredoksinler, hücrede redoks regülasyonunda ve sinyal iletim yollarında fonksiyonel olan küçük proteinlerdir ve bitkilerde multigenik bir *h* gen ailesi tarafından kodlanır [69]. Lokal savunma yanıtında salisilik asit (SA) birikimiyle hücre içi redoks durumunun okside edici durumdan redükte edici koşullara değişmesi tiyoredoksinlerin ekspresyonunu indukledeği rapor edilmekte [70] ve tiyoredoksinlerle dimerik NPR1

monomerizasyonunun gerçekleştiği, monomer halde bu proteinin çekirdeğe giderek bitki savunma yanıtında rol oynayan TGA ve WRKY transkripsiyon faktörleriyle interaksiyona girmek suretiyle bitki savunma yanıtının oluşturulmasında fonksiyonel olduğu değerlendirilmesi yapılmaktadır [10]. Ayrıca, peroksiredoksinlerin (peroksidazlar) peroksitleri redükte etmek için tiyoredoksinleri kullandıkları rapor edilmiştir [69]. Kontrolde hafif ekspresyon, duyarlı genotipte (AT1 de) hafif induksiyon ve (AT2 de) represyon gösteren AC/TG-A4 etiketinin, tiyoredoksin H-tipi mRNA sekans benzeri olarak bitki lokal savunma yanıtında dolaylı bir katkısı olabilir.

#### 5.11. AC/GG-A7 Etiketi *Z. mays* Klon 1561202 Fotosistem 1 Reaksiyon Merkezi Alt Birim XI mRNA Sekans Benzeridir

Fotosistemler, farklı dalga boylarındaki ışığı absorbe eden klorofillerin ve diğer pigmentlerin tilakoid membran içinde bir araya gelerek oluşturduğu ünitelerdir. Fotosistem I reaksiyon merkezinde P700 olarak adlandırılan bir klorofil-a molekülü vardır. AC/GG-A7 ve AC/CC-G11 etiketleri, fotosistem I'in reaksiyon merkezindeki alt birim XI ve IVA sentezinden sorumlu *Z. mays* klonu mRNA sekanslarına benzerlik gösterir. Şekil 5.7'de verilen AC/GG-A7 etiketinin sekans jelinde P'de bol ekspresyon, T1 ve T2 de represyon görülmektedir. Bu mRNA'nın bitki savunma yanıtındaki muhtemel rolü fotosistem I reaksiyon merkezi proteinleri alt birimlerinin ve glikoz sentezinin durdurularak patojenin haustoryumdan beslenmesini engellemek olabilir.



Şekil 5.7 AC/GG-A7 etiketinin sekans jel fotoğrafı (AK: kontrol, GK: uygulama)

#### 5.12. Sonuçların İnteraksiyondaki Rollerinin Değerlendirmesi

Mısır ve mısır pası interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren mRNAların sekanslanması ve sekans taramaları sonucu bulunan benzerlerinin patojen enfeksiyonu sonucu her iki organizmada sinyal iletimiyle aktive olarak mısır direnç

yanıtında önemli roller üstlendikleri tespit edilmiştir. Mısır *rp3-1* genine sekans benzeri olarak bulunan etiket (AC/GG-A6 ile AC/CC-A1) ürünü proteinin pas inokulasyonundan sonra indüksiyon göstermesi gene-karşı-gen ile tanımlanan bitkideki belirli bir direnç geni ürününün belirli bir patojen ırkına direnç sağlamasına bir örnektir. Söz konusu ekspresyon değişimi bu etiket sekanslarının *rp3-1* geni ile benzer savunma fonksiyonlarının olduğunu düşündürmektedir. İlgili etiketlerin sekanslarının fonksiyonu üzerinde çalışılarak pas direnciyle ilgisinin açıklanması gerekmektedir.

Patojenlere karşı önemli pasif savunma yapılarından hücre duvarı yapısal proteini hidrokspiroline zengin glikoproteini mısır *HRGP* geni ve kütikula biyosentezinde rol oynayan beta-keto açıl redüktazı mısır inbred *B77* geni kodlamaktadır. Yağ asiti biyosentetik yolun enzimi olan beta-keto açıl redüktazın kütikula gibi temel bir savunma yapısının sentezi yanı sıra sinyal iletiminin modülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda tanımlanan etiketlerden AC/AG-A10 ve AC/TG-A10 bu genlerin sekans benzeri olarak bulunmuştur. Pas enfeksiyonu ile mısırdaki aktive olan gen ürünleri aktif savunma yanıtlarını oluşturmaktadır. Patojen elisitörlerin uyardığı savunma yanıtları ile ilgili en hızlı ve ölçülebilir değişiklik, plazma zarından geçici iyon flaksıdır. AC/CC-A10 etiketi mısır potasyum ( $K^+$ ) transport proteini (*ZMK1*) sentezinden sorumlu *ZMK1* gen sekansına benzer bulunmuştur. *ZMK1* proteini patojen inokulasyonunu takiben hücre içine  $Ca^{+2}$  alımı ve hücre dışına  $K^+$  verilmesi gibi metabolik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Chorismat mutaz enzimi SAR oluşumunda ve patojen yanıtında önemli sinyal iletim molekülü olan salisilik asit biyosentezinde rol oynamaktadır. HSP40 proteini pas enfeksiyonunun gelişim evresinde haustoryum çevresine salgılanarak bitki-patojen ara yüzündeki interaksyonda, Dp1, BTF3 ve x1 (muhtemel) transkripsiyon faktörleri patojen elisitörlerle aktive olan genlerin promotörlerine bağlanarak, tiyoredoksinler ve serin/threonin protein kinazlar lokal savunma yanıtında, hipotetik proteinler hücre içi sinyal iletiminde protein fosforilasyonu ve hedef molekülleri (enzim, protein veya transkripsiyon faktörleri) modifiye ederek spesifik direnç yanıtların ortaya çıkışında, F-box proteini SAR ve ISR oluşumunda fonksiyonel olup hücrenin aktif savunma yanıtında rol oynamaktadır. Yaralama yanıt proteinlerini kodlayan etiketlerin ve kimyasal savunma yapıları ile ilişkili peptidil-tRNA hidrolaz sentezinde pas

mesajının rolü olduğu düşünölmektedir. Ayrıca interaksiyonda ekspresyonu değişen yapısal proteinlerin (fotosistem I reaksiyon merkezi alt ünite I ve IV proteinleri, mitokondrial beta peptidaz) hücre metabolizması veya madde taşınmasında görevli proteinlerin, benzeri bilinmeyen sekansların patojen yanıtında rollerinin olup olmadığının açıklanması gerekmektedir. Tez çalışmamda tanımlanan bazı etiketlerin yukarda sayılan enzim ve proteinleri kodlayan genlerin sekans benzerleri olarak bulunması mısır ve mısır pası interaksiyonunda fonksiyonel ürönlere ait sekanslar olduklarını ortaya koymaktadır. Genbank sekans benzerliği taramalarından elde edilen sonuçlar tezimde tanımlanan etiketlerin genel olarak bitki-patojen interaksiyonunda rollerinin açıklanmasına katkı sağlamıştır.

## KAYNAKLAR

1. Sdpak, M. A., Mısır (*Zea mays* L.) ve Mısır Pası (*Puccinia sorghi* Schw.) İnteraksiyonunda Ekspresyonu Modüle Edilen mRNA'ların Modifiye cDNA-AFLP Tekniği ile Tanımlanması ve Karakterizasyonu, TBİTAK Proje Sonuç Raporu: 209T002, 2013.
2. Flor, H. H., Current Status of the Gene-For-Gene Concept, Annual Review of Phytopathology, 9:275-96, 1971.
3. Keen, N. T., Gene-For-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. Annual Review of Genetics, 24: 447-63, 1990.
4. Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G., Plant Disease Resistance Genes, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:575-607, 1997.
5. Liu, J., et al., Recent Progress in Elucidating the Structure, Function and Evolution of Disease Resistance Genes in Plants, Journal of Genetics and Genomics 34 (9): 765-76, 2007
6. Leach, J. E., White, F.F., Bacterial Avirulence Genes. Annual Review, Phytopathology, 34:153-79, 1996.
7. Paker, J. E., Coleman M. J., Molecular Intimacy Between Protein Specifying Plant Pathogen Recognition, Trends in Biochemical Sciences,22: 291-6,1997.
8. Van Der Biezen, E. A., Jones, J. D. G., Plant Disease Proteins and the Gene-For-Gene Concept. Trend in Biochemical Sciences, 23: 454-6, 1998.
9. Dodds P., et al., The *Melampsora lini AvrL567* Avirulence Genes Are Expressed in Haustoria and Their Products Are Recognized Inside Plant Cells,The Plant Cell, 16:755–68, 2004.
10. Dickinson, M., Molecular Plant Pathology, Bios Scientific Publishers, Taylor & Francis Group. New York Pp. 160, 2005
11. Sacco, M. A., Moffett, P., Disease Resistance Genes: Form and Function, Molecular Plant-Microbe Interactions. (Ed) Bouarab vd., Cab International, 94, 2009.
12. Ellis JG., Jones AG., Plant Disease Resistance Genes, Infectious Disease: Innate Immunity, Edited by: R. A. B. Ezekowitz and J. A. Hoffmann © Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003.
13. Sdpak, M. A., et al., Unequal Exchange and Meiotic Instability of Disease-Resistance Genes in the *Rp1* Region of Maize, Genetics 133 (1): 119-125, 1993.
14. Richter et al., New rust resistance specificities associated with recombination in the *Rp1* complex in maize, Genetics; 141(1): 373–381, 1995.

15. Shenk, P.M., et al., Coordinated Plant Defense Responses in *Arabidopsis* Revealed by Microarray Analysis. *Proceeding National Academy of Sciences of USA*, 97:11655-60, 2000.
16. Durrant, W. E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G., cDNA-AFLP Reveals a Striking Overlap in Race-Specific Resistance and Wound Response Gene Expression Profiles. *Plant Cell* 12: 963-77, 2000.
17. Dellagi, A., et al., cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora*, *Microbiology*, 146:165-71, 2000.
18. Ditt, R. F., Nester, E. W., Comai, L., Plant Gene Expression Response to *Agrobacterium tumefaciens*, *Proceeding National Academy of Sciences of Usa*, 98:10954-59, 2001.
19. Mahalingam, R., et al., Characterizing The Stress/Defense Transcriptome of *Arabidopsis*, *Genome Biology* 4:R20, 2003.
20. Bozkurt, E., Winchester, J., Ruffet, G., Rojaya B., Age and Chemistry of Miocene Volcanic. Rocks from the Kiraz Basin of the Küçük Menderes Graben: Its Significance for the Extensional Tectonics of Southwestern Anatolia, Turkey, décembre 2008. □
21. Wang, X., et al., cDNA-AFLP Analysis Reveals Differential Gene Expression in Compatible Interaction of Wheat Challenged with *Puccinia Striiformis* F. Sp. *Triticum*, *BMC Genomics*, 10:289- 2009.
22. Sabelli, P. A., cDNA Cloning and Characterisation of a Maize Homologue of the MCM Proteins Required For the Initiation of DNA Replication, *Mol. Genetic*, 27; 252 (1-2): 125-36, 1996.
23. Khun, E., From Library Screening to Microarray Technology: Strategies to Determine Gene Expression Profiles and to Identify Differentially Regulated Genes in Plants. *Annals of Botany*, 87:139-55, 2001.
24. Yamazaki, M., Saito, K., Differential Display Analysis of Gene Expression in Plants, *Cell. Mol. Life Sci.* 59.1246-55, 2002.
25. Dixon, AR., Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism, *The Plant Cell*, 1995.
26. Greenberg, J.T., Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:525-41, 1997.
27. Lam, E., Controlled Cell Death, Plant Survival and Development, *Nature Review*, 5:305- 2004.
28. Panstruga, R., Establishing Compatibility Between Plants and Obligate Biotrophic Pathogens, *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 320-26, 2003.

29. Gururani, M. A., Venkatesh, J., Plant Disease Resistance Genes: Current Status and Future Directions, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78:51-65, 2012.
30. Scheel, D., Nuernberger, T., Signal Transduction in Plant Defense Responses to Fungal Infection, *Fungal Disease Resistance in Plants: Biochemistry, Molecular Biology and Genetic Engineering*, (Ed) Punja Z. K., The Haworth Press, pp 2, 2004.
31. Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F., Dangl, J. L., Recognition and Response in The Plant Immune System, *Annual Review of Genetics*, 37:579-609, 2003.
32. Stuible, H.P., Krombrink, E., The Hypersensitive Response and its Role in Disease Resistance, *Fungal Disease Resistance in Plants: Biochemistry, Molecular Biology and Genetic Engineering*, (Ed) Punja Z. K., The Haworth Press, pp.56. 2004.
33. Lamb, C., Dixon, R. A., The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48:251-75, 1997.
34. Çalış, Ö., Bitkilerde Dayanıklılık Genleri ve Proteinleri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4 (2):1-9, 2011.
35. Pandey, SP., Somssich, IE., The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology* August Vol. 150 No. 4 1648-1655, 2009.
36. Wei, K., et al., Molecular Phylogenetic and Expression Analysis of the Complete WRKY Transcription Factor Family in Maize, *DNA Research* 19:153-64, 2012.
37. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., PR Proteinleri. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 84, 6750. 1987
38. Farmer, L. M., et al., The Rad 23 Family Provides An Essential Connection Between the 26Ss Proteasome and Ubiquitylated Proteins in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 22:124-42, 2010.
39. Liang, P., Pardee AB., Differential Display of Eukaryotic mRNA by Means of the Polymerase Chain Reaction, *Science*, Aug 14; 257(5072): 967-71, 1992.
40. Bozkurt, O., Unver, T., Akkaya, M. S., Genes Associated with Resistance to Wheat Yellow Rust Disease Identified by Differential Display Analysis, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71:251-59, 2007.
41. Schena, M., et al., Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* (8); 467-470, 1995.
42. Kozian, D. H., Kirschbaum Bj., Comparative Gene-Expression Analysis, *Trends Biotechnology*., Vol 17, 1999.



43. Çevik, M., Mikroarray Teknolojisi ve Bitkilerde Uygulama Alanları, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9-3, 2005.
44. Shenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., Manners, J. M., Coordinated Plant Defense Responses in *Arabidopsis* Revealed by Microarray Analysis. Proceeding National Academy of Sciences of USA, 97: 11655-60, 2000.
45. Albrecht, U., Bowman, K. D., Gene Expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck Following Infection With the Bacterial Pathogen *Candidatus liberibacter Asiaticus* Causing Huanglongbing in Florida, Plant Science 175:291-306, 2008.
46. Desmond, O. J., Manners, J.M., Gene Expression Analysis of the Wheat Response to Infection by *Fusarium pseudograminearum*, Physiological and Molecular Plant Pathology.73:40-7, 2008.
47. Wei, T., et al., Transcriptional Profiling of Rice Early Response To *Magnaporthe Oryzae* Identified Os WRKYs as Important Regulators in Rice Blast Resistance, Plos One 8 (3): 1-14, E59720, 2013.
48. Karaca M.A., Mikroarray Gen Expresyon Teknolojisi Ve Bitkisel Üretimde Kullanım, Alatarım ; 3, 2004.
49. Bachem C. W., et al., Visualisation of Differential Gene Expression Using a Novel Method of RNA Fingerprinting Based on AFLP: Analysis of Gene Expression During Potato Tuber Development. Plant J. 9 (5): 745-53, 1996.
50. Südüpak, M. A., A cDNA-AFLP Protocol With Reciprocally Arranged 2-Enzyme Sequential Digestion And Silver Staining Detection, Turkish Journal of Biology 38: TUBİTAK, 2014.
51. Weiberg A., et al., Improved Coverage of cDNA-AFLP by Sequential Digestion of Immobilized cDNA, BMC Genomics, 2008.
52. İşler, N., Mısır Tarımı, Mustafa Kemal Üni. Matbaası, S.14, 2012.
53. Dillard, HR., Zitter, TA., VEGETABLE CROPS Common Rust of Sweet Corn Fact Sheet Page 727.40 Date: 12- Cooperative Extension New York State • Cornell University, 1987.
54. Smith, S., Pryor, A., Hulbert, S. H., Allelic and Haplotypic Diversity at the *Rp1* Rust Resistance Locus of Maize, Genetics, 167:1939-47, 2004.
55. Collins, N.,et al., Molecular Characterization of The Maize *Rp1-D* Rust Resistance Haplotype and its Mutants, Plant Cell 11:1365-76, 1999.
56. Brown, A. F., Juvik, J.A., Pataky, J. K., Quantitative Trait Loci in Sweet Corn Associated with Partial Resistance to Stewart's Wilt, Northern Corn Leaf Blight, and Common Rust, Phytopathology, (3) 293-300, 2001.

57. Sun, Q., et al., Recombination Between Paralogues At the *Rp1* Rust Resistance Locus in Maize, *Genetics*, 158(1):423-38, 2001.
58. Webb, C. A., et al., Genetic and Molecular Characterization of the Maize *Rp3* Rust Resistance Gene, *Genetics* 162 (1):381-94, 2002.
59. Smith, S., Hulbert, S. H., Recombination Events Generating a Novel *Rp1* Race Specificity, *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 18(3): 220-8, 2005.
60. Bassam B. J., Cactano A. G, Gresshoff, P. M., Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Biochemisrty*, 196: 80-3, 1991.
61. Atkinson, M., et al., Involvement of Plasma Membrane Calcium Influx in Bacterial Induction of the K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Hypersensitive Responses in Tobacco, *Plant Physiol.*, 92 (1) :215-21, 1990.
62. Van Den Burg, H. A., et al., The F-Box Protein ACRE 189/ACIF1 Regulates Cell Death and Defense Responses Activated During Pathogen Recognition in Tobacco and Tomato, *Plant Cell*, 20:697-719, 2008.
63. Gou, M., et al., The F-Box Protein CPR1/CPR30 Negatively Regulates R Protein SNC1 Accumulation, *Plant J.* 69 (3):411-20, 2012.
64. Kim, H. S., Terrence, P. D., *Arabidopsis* Son1 is An F-Box Protein that Regulates a Novel Induced Defense Response Independent of Both Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance, *Plant Cell* 14:1469-82, 2002.
65. Campos-Soriano L., Garcia-Martinez J., Segundo, B. S., The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Promotes the Systemic Induction of Regulatory Defence-Related Genes in Rice Leaves and Confers Resistance to Pathogen Infection *Molecular Plant Pathology* 13(6):579-92, 2012.
66. Hubert, D. A., Cytosolic HSP90 Associates with and Modulates the *Arabidopsis* *Rpm1* Disease Resistance Protein, *Embo Journal*, 22:5679-89, 2003.
67. Wang, X., et al., Gene Expression Profiles in Maize (*Zea mays* L.) Leaves Inoculation With Southern Corn Rust (*Puccinia polysora* Underw.), *Acta. Physiol. Plant* 34:997-1006, 2012.
68. Das G., Varshney U., Peptidyl-tRNA Hydrolase and its Critical Role Protein, *Biosynthesis, Microbiology*, 152(Pt 8): 2191-5, 2006.
69. Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J., The Thioredoxin *H* System of Higher Plants, *Plant Pyhsiology and Biochemistry*, 42(4):265-71, 2004.
70. Vlot, A. C., Dempsey, D.A., Klessig, D. F., Salicylic Acid a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206, 2009.

## ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Yozgat/Sorgun'da doğan Nevzat PARLAK, ilk, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Sorgun Agahefendi İlkokulu, Sorgun Lisesi Ortaokulu ve Sorgun Lisesi'nde tamamladı. 1988 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünü 1992 yılında başarıyla bitirdi.

Yüksek lisans eğitimine Bozok Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında başladı. Yard. Doç.Dr. Mehmet Ali SÜDÜPAK danışmanlığında hazırladığı “Mısır (*Zea mays* L.) ve Mısır Pası (*Puccinia sorghi* Schw.) İnteraksiyonunda Ekspresyonu Değişim Gösteren mRNA'ların Tanımlanması, Sekans Karakterizasyonu ve İnteraksiyonda Rollerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tezini tamamlayıp mezun oldu.

1993 yılından beri Sorgun'da öğretmen ve halen Sorgun Anadolu Lisesi'nde idareci olarak çalışan Nevzat PARLAK evli ve iki çocuk babasıdır.

### İletişim Bilgileri

Adres: Sorgun Anadolu Lisesi

Sorgun/Yozgat

Telefon: (354) 415 29 00

E-posta: nvztpark@hotmail.com