**T.C**
**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

# MISIR VE MISIR PASI KOMPATİBIL İNTERAKSİYONUNDA EKSPRESYONU DEĞİŞİM GÖSTEREN GENLERİN DDRT-PCR İLE TANIMLANMASI VE SEÇİLEN MESAJLARDA GEN EKSPRESYONUNUN RT-qPCR İLE ÇALIŞILMASI

**Hatice ÇİLKOL**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SÜDÜPAK**

**Yozgat 2020**

**T.C**
**YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**
**BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**Yüksek Lisans Tezi**

# MISIR VE MISIR PASI KOMPATİBIL İNTERAKSİYONUNDA EKSPRESYONU DEĞİŞİM GÖSTEREN GENLERİN DDRT-PCR İLE TANIMLANMASI VE SEÇİLEN MESAJLARDA GEN EKSPRESYONUNUN RT-qPCR İLE ÇALIŞILMASI

**Hatice ÇİLKOL**

**Tez Danışmanı**

**Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SÜDÜPAK**

**Bu çalışma, Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 6601-FBE/19-256 kodu ile desteklenmiştir.**

**Yozgat 2020**

## İÇİNDEKİLER

**ÖZET..... iii**

**ABSTRACT..... iv**

**TEŞEKKÜR..... v**

**TABLOLAR LİSTESİ..... vi**

**ŞEKİLLER LİSTESİ..... vii**

**KISALTMALAR LİSTESİ..... viii**

**1. GİRİŞ..... 1**

**2. GENEL BİLGİLER..... 3**

2.1. Bitki-Patojen İnteraksiyonları ve Savunma Yanıtları..... 3

2.2. Fitopatojenlerin Biyotrof, Nekrotrof ve Hemibiyotrof Enfeksiyon Stratejileri ve Bitki Savunma Yanıtlarıyla İlgileri..... 6

2.3. Pas Patojenlerinin Konukçularına Penetrasyonları ve Sonrasında Duyarlı Genotiplerde Gerçekleşen Olaylar..... 6

2.4. Kompatibıl ve İnkompatibıl Bitki-Patojen İnteraksiyonu..... 9

2.5. Bitki-Patojen İnteraksiyonlarının Transkriptom Analizleriyle Karakterizasyonu..... 9

**3. MATERYAL VE METOT..... 11**

3.1. Seçilen DDRT-PCR Etiketlerinin Toplanması, Re-amplifikasyonu ve Pürifikasyonu..... 11

3.2. Etiketlerin T-vektöre Ligasyonu..... 12

3.3. Kompetant Hücrelere Plazmid Transformasyonu..... 12

3.4. Koloni PCR..... 12

3.5. Sekans Karakterizasyonu, Gen Bankası Veritabanlarında Sekans Benzerliği Taraması..... 13
3.6. RT-qPCR Deneyleriyle Seçilen Genlerde Ekspresyonel Modülasyonun Çalışılması..... 13
3.6.1. Bitkisel Materyalin Yetiştirilmesi ve Total RNA İzolasyonu..... 13
3.6.2. cDNA Sentezi..... 14
3.6.3 Primer Tasarımı..... 15
3.6.4. RT-qPCR Deneyleri..... 15
**4. BULGULAR..... 17**
4.1. Etiket Sekanlarının Gen Bankalarında Benzerlik Taramaları..... 17
4.2. Pas İnokülasyonu ve Savunma Sinyal Molekülü Uygulamalarıyla Seçilen Genlerde Ekspresyonel Değişimin RT-sqPCR Değerlendirmesi... 19
4.3. Seçilen Genlerin RT-qPCR Teyitleri..... 21
**5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... 22**
5.1. Tanımlanan Karbonik Anhidrazın (CA) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü..... 23
5.2.Tanımlanan Aldehit Dehidrogenazın (cALDH) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü..... 25
5.3. Tanımlanan Binding Proteinin (BİP2) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü..... 27
5.4.Tanımlanan Auksinle Repres Edilen Proteinin (ARP) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü..... 30
5.5. Tanımlanan Asidik Ribozomal Protein P3'ün(ArpP3) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü..... 32
**6. KAYNAKLAR..... 35**

**MISIR VE MISIR PASI KOMPATİBIL İNTERAKSİYONUNDA EKSPRESYONU DEĞİŞİM GÖSTEREN GENLERİN DDRT-PCR İLE TANIMLANMASI VE SEÇİLEN MESAJLARDA GEN EKSPRESYONUNUN RT-qPCR İLE ÇALIŞILMASI**

**Hatice ÇİLKOL**

**Yozgat Bozok Üniversitesi**
**Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Biyoloji Ana Bilim Dalı**
**Yüksek Lisans Tezi**

**2020, Sayfa: 41**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali SÜDÜPAK**

# ÖZET

Bitki patojen interaksiyonlarında ekspresyonu değişim gösteren genlerin tanımlanması, konukçu direnci ve duyarlılığında gerçekleşen fizyolojik değişimler ve mekanizmalar ve bunlardan sorumlu genetik faktörler hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Mısır (*Zea mays*) ve mısır pası (*Puccinia sorghi*) uyumlu interaksiyonunda gerçekleştirilen çalışmada, ekspresyonu değişim gösteren 98 transkript derivativi fragment (TDF) çalışmada tanımlanmıştır. Klonlanarak sekans karakterizasyonu yapılan 72 TDF ile gerçekleştirilen GenBankası taramaları, münferit etiketler için bir veya daha fazla benzer kayıt bulunduğunu göstermektedir. Genel olarak, TDF'lerin yaklaşık yarısının fonksiyonu bilinen genlerin sekanslarına benzer olduğu ve bunların önemli bir bölümünün bitki-patojen interaksiyonlarında ekspresyonu değişim gösterenler oldukları tespit edilmiştir. Bunlar arasında, karbonik anhidraz, Bip2, An2, ARP ve ASR3 proteinlerini kodlayan genlere benzerlik gösteren TDF'ler bulunmaktadır. TDF'lerin kalan bölümü, diğer stres yanıtlarıyla ilgili olanlar ve karakterize edilmemiş/hipotetik protein kodlayan sekanslara benzerlik göstermektedir. *ZmBip2*, *ZmCA*, *ZmcALDH*, *ZmARP* ve *ZmARPP3* genleri için RT-qPCR primerler tasarlanarak kontrol ve infekte materyalde ekspresyon teyitleri yapıldı. *ZmCA* hariç diğerlerinin ekspresyon değişimleri doğrulandı. Sınırlı sayıda TDF çalışılmakla birlikte, belirli fonksiyonlarla ilişkili olanlarla birlikte fonksiyonu bilinmeyenler, çalışılan patosistem uyumlu interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren genler olarak tanımlanmıştır.

**Anahtar kelimeler**: *Zea mays*, *Puccinia sorghi*, uyumlu interaksiyon, gen ekspresyonu, RT-qPCR

**DDRT-PCR IDENTIFICATION OF MESSAGES SHOWING EXPRESSIONAL MODULATIONS IN THE COMPATIBLE INTERACTION BETWEEN MAIZE AND THE COMMON MAIZE RUST AND RT-qPCR EXPRESSIONAL VALIDATIONS OF SELECTED MESSAGES**

**Hatice ÇİLKOL**

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

**2020, Sayfa: 41**

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

# ABSTRACT

Differential display analyses of expressional modulations occurring in plant-microbe interactions provide valuable information about the physiological changes and underlying genetic factors and mechanisms involved in host resistance and susceptibility to disease. We carried out a differential display analysis study in the compatible interaction of *Z. mays* and *P. sorghi* and identified 98 Transcript Derived Fragments (TDFs) as expressional modulation showing tags. 72 TDFs were cloned and sequenced. Sequence database similarity searches revealed that there is at least one close matching GenBank record for each TDF. Compiled results showed that approximately a half of the TDFs was derived from genes with known functions, about a half of which are known to display expressional modulations in plant-microbe interactions. CA, BiP2, An2, ARP1 and ASR3-like protein encoding sequence similar TDFs constitute the prominent examples in this group. A large proportion of TDFs were found to be similar to uncharacterized/hypothetical protein encoding GenBank records. RT-qPCR primers were designed for *Bip2*, *CA*, *cALDH*, *ARP* and *Arpp3* genes to verify their observed expressional modulations, which were generally confirmed except for CA. Although a limited number of TDFs were characterized, overall, the results provide an overview to the expressional modulation showing genes in the compatible interaction of the studied pathosystem.

**Keywords:** *Zea mays*, *Puccinia sorghi*, compatible interaction, gene expression, RT-qPCR

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşıp yol gösteren, yardım ve desteklerini esirgemeyen, sayın Biyoloji Bölümü hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca maddi ve manevi her daim yanımda olup desteklerini hep hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 6601-FBE/19-256). Sağlanan destek ve kullanımında gösterilen kolaylık için teşekkür ederim.

# TABLOLAR LİSTESİ

**Sayfa**

**Tablo 3.1:** RT-qPCR çalışmalarında kullanılan primer sekansları ve özellikleri……..... 15

**Tablo 4.1:** Sekans karakterizasyonu yapılan mRNA etiketlerinin en yakın sekans benzerleri, ekspresyon profilleri ve diğer ilgili bilgiler…... 18

**Tablo 4.2:** RT-qPCR ile gen ekspresyon teyidi çalışılan genler…….. 21

# ŞEKİLLER LİSTESİ


**Sayfa**

**Şekil 1.1:** Konukçu olmama direnciyle birlikte konukçu/patojen genotiplerinin dörtlü interaksiyon kombinasyonu gösterimi…….. 2

**Şekil 2.2:** Bitkilerle (a)virülent patojenleri arasında savunma ve virülans kabiliyetlerinde osilasyonlarla silahlanma yarışının gerçekleştiğini ileri süren «zikzak modeli» şematik gösterimi…... 5

**Şekil 2.3:** Hipersensitif reaksiyonda gözlenen apoptosis değişimleri……..... 5

**Şekil 2.4:** Pas sporlarının mezofil dokusuna penetrasyonu..... 7

**Şekil 2.5:** (a) Haustoryum konukçu hücre arayüzü yapısı ve (b) arayüzde gerçekleşen bazı olaylar..... 8

**Şekil 4.6:** *P. sorghi* inokülasyonuyla A188 yapraklarında *ZmCA, ZmBip2, ZmARP, ZmArpP3, ZmcALDH* ekspresyonunun RT-sqPCR değerlendirmesi……... 20

**Şekil 4.7:** Savunma sinyal molekülleri sprey edilmiş A188 yapraklarında *ZmCA* ve *ZmcALDH* ekspresyonunun RT-sqPCR değerlendirmesi..... 20

**Şekil 5.8:** Çalışmada tanımlanan genlerin fonksiyonlarına göre gruplandırılması..... 23

**Şekil 5.9:** *Ps* inokülasyonuyla *ZmCA* geninde mRNA seviyesinde değişimin grafiği..... 25

**Şekil 5.10:** *Ps* inokülasyonuyla *ZmcALDH* mRNA seviyesinde değişim grafiği …… 27

**Şekil 5.11:** *Ps* inokülasyonuyla *ZmBİP2* mRNA seviyesinde değişim grafiği..... 29

**Şekil 5.12:** *Ps* inokülasyonuyla *ZmARP1* mRNA seviyesinde değişimin grafiği..... 31

**Şekil 5.13:** *Ps* inokülasyonuyla *ZmArpP3* mRNA seviyesinde değişimin grafiği …… 33

# KISALTMALAR LİSTESİ

**ARP:** Auksinle Repres Edilen Protein (Auxin Repress Protein)

**ARF:** Auksin Yanıt Faktör (Auksin Response Factor)

**ArpP3:** Asidik Ribozomal Protein P3 (Acidic Ribosomal Protein P3)

**BİP2:** Binding Protein 2

**CA:** Karbonik Anhidraz (Carbonic Anhydrase)

**cALDH:** Sitoplazmik Aldehit Dehidrogenaz (Cytoplasmic Aldehyde Dehydrogenase)

**cDNA-AFLP:** Amplifiye Komplementer Deoksiribonükleik Asit Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Complementer DNA-Amplified Fragment Length Polymorphism)

**Ct:** Eşik Değeri Döngüsü (Cycle Treshold)

**DEPC:** Diethylpyrocarbonate

**DDRT-PCR:** Diferenşıl Gösterim Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**EDTA:** Etilendiamintetraasetikasit

**ERAD:** Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Degradasyonu (Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation)

**ETI:** Efektörle Tetiklenen İmmünite (Effector-Triggered Immunity)

**ETS:** Efektörle Tetiklenen Duyarlılık (Effector-Triggered Sensitivity)

**HiCEP:** Yüksek Kapsamlı Gen Ekspresyon Profili (High Coverage Gene Expression Profiling)

**HR:** Hipersensitif Reaksiyon

**ISR:** İndüklenen Sistemik Direnç (Induced Systemic Resistance)

**IAA:** İndol 3-Asetik Asit (Indole 3-Acetic Acid)

**ml:** Mililitre

**mM:** Milimolar

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**PAMP:** Patojen Orijinli Moleküler Motifler **(**Pathogen-Associated Molecular Patterns)

**PRR:** Pattern Tanıma Reseptörleri (Pattern Recognition Receptors)

**PTI:** PAMP ile Tetiklenen İmmünite (PAMP Triggered Immunity)

**RT-qPCR:** Gerçek Zamanlı Kuantatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Quantative Polymerase Chain Reaction)

**SABP3:** Salisilik Asite Bağlanan Protein 3 (Salicylic Acid Binding Protein 3)

**SAGE:** Gen Ekspresyonu Serial Analizi (Serial Analysis of Gene Expression)

**SAR:** Sistemik Kazanılmış Direnç (Systemic Acquired Resistance)

**TDF:** Transkript Derivativi Fragment

**UPR:** Katlanmamış Protein Yanıtı (Unfolded Protein Response)

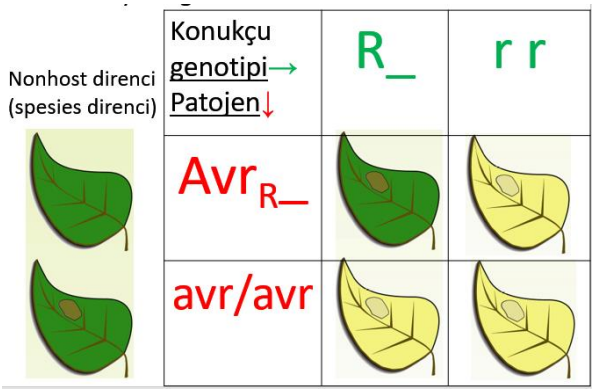
**µl:** Mikrolitre

**µM:**Mikromolar

# 1. GİRİŞ

Bitkiler patojenlere karşı kendilerini önceden oluşturulan ve sonradan aktive olan (indüklenen) direnç mekanizmalarıyla savunmaktadırlar. Bu savunma basamaklarını aşabilen patojenler konukçusu bitkileri enfekte edebilmektedir. Konukçu savunma sistemleri, patojenle karşılaşmadan, penetrasyon ve sonraki aşamalara bir dizi basamakta etkin olabilmektedir. İndüklenen savunma yanıtlarının iyi karakterize edilen iki formu, patojen elisitör ve efektörleriyle aktive edilmektedir. Bu savunma yanıtları özgün ve örtüşen bileşenleriyle, enfeksiyon bölgesinde hücre ölümü, patojen için toksik bileşiklerin sentezi, hücre duvarı güçlendirmesi gibi bir dizi modifikasyonlarla lokal ve sistemik koruma sağlamaktadırlar [1].

Bu savunma yanıtlarının patojen efektörü ve onu tanıyan bitki direnç faktörü interaksiyonuyla oluşturulan formu, oldukça sepesifik, ancak etkin bir mekanizmadır. Konukçu-patojen çiftlerinde, interaksiyon fenotipinin duyarlılık/dirençlilik ve patojen virülansı/avirülansı şeklinde tezahüründe rol oynayan genetik faktörler, 1950'li yıllarda Flor tarafından gene-karşı-gen spesifitesiyle tanımlanmıştır. Bu interaksiyon modunda, avirülans geni ürününe özgün konukçu direnç gen ürünü bulunduğu kombinasyonlar da, interaksiyon fenotipi patojen avirülansı ve konukçu direncinin ortaya çıktığı inkompatibilite tipdir. Bunun dışındaki diğer tüm kombinasyonlada konukçu duyarlılığı ve patojen virülansının görüldüğü kompatibilite tipdir (**Şekil 1.1**) [1-3].




**Şekil 1.1.** Konukçu olmama (nonhost) direnciyle birlikte konukçu/patojen genotiplerinin dörtlü interaksiyon kombinasyonu gösterimi.

Etmeni, *Puccinia sorghi* olan mısır pası (common maize rust) hastalığı yaygın olarak tropik ve subtropik bölgelerde görülmekte ve infeksiyon seviyesine göre, %40'lara varan verim kayıplarına neden olmaktadır [4]. Pasın farklı ırklarına karşı direnç sağlayan çok sayıda konukçu direnç geni tanımlanmıştır [5]. Fakat patojen virülansı ve konukçu bitkide meydana gelen olaylar ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Diğer taraftan bitki-patojen interaksiyonu çalışmalarında yaygın olarak inkompatibilte çalışılmakta, kompatibılite durumu daha ender araştırılan olarak kalmaktadır. Kompatibılite tip interaksiyonda meydana gelen olayların karakterizasyonu, konukçu bitki metabolizması ve fizyolojisi, hastalık gelişimi sürecinde gerçekleşen olaylar ve rol oynayan faktörlerin belirlenmesi ve yeni hastalık kontrol noktaları tanımlanması açısından önemli olmaktadır [6].

Mevcut çalışma, bitki-patojen interaksiyonlarının bu boyutuna hitap edecek sonuçlar elde etmek üzere kurgulanmıştır. Mısır pası T09 izolatı ve ona duyarlı mısır A188 inbredi arasındaki uyumlu (kompatibıl) interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren mRNA'ların mRNA-DD tekniğiyle tanımlanarak, karakterizasyonu ve orijine oldukları genlerin konukçu duyarlılığı ve direncinde rollerinin değerlendirmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

# 2. GENEL BİLGİLER

Sesil organizmalar olarak bitkiler, sıcaklık, kuraklık gibi abiyotik stres faktörleriyle birlikte bakteriler, virüsler, funguslar gibi mikrobiyal patojenler, böcek, nematod gibi diğer zararlılara ve diğer bitkilerden oluşan geniş bir yelpazede çok sayıda biyotik stres faktörüne karşı direnç gösterip varlıklarını devam ettirmek zorundadırlar. Bitkiler, biyotik stres faktörlerinden olan patojenlere karşı koyma, enfeksiyon ve kolonizasyonları engellemede fonksiyonel olan geniş spektrumlu ve özgün savunma sistemlerini, mikrobiyal yelpazeyle birlikte evrimleri (ko-evolüsyonları) sürecinde geliştirmişlerdir. Mikrobiyal sistemler ile kolonize ettikleri bitkiler arasında ceryan eden olayların moleküler karakterizasyonu ve manipülasyonunun araştırılıp çalışıldığı "bitki-mikrop interaksiyonları" fitopatoloji alt disiplini de konunun önemi ve sağlanan bilgi birikimiyle oluşturulmuştur [1].

## 2.1. Bitki-Patojen İnteraksiyonları ve Savunma Yanıtları

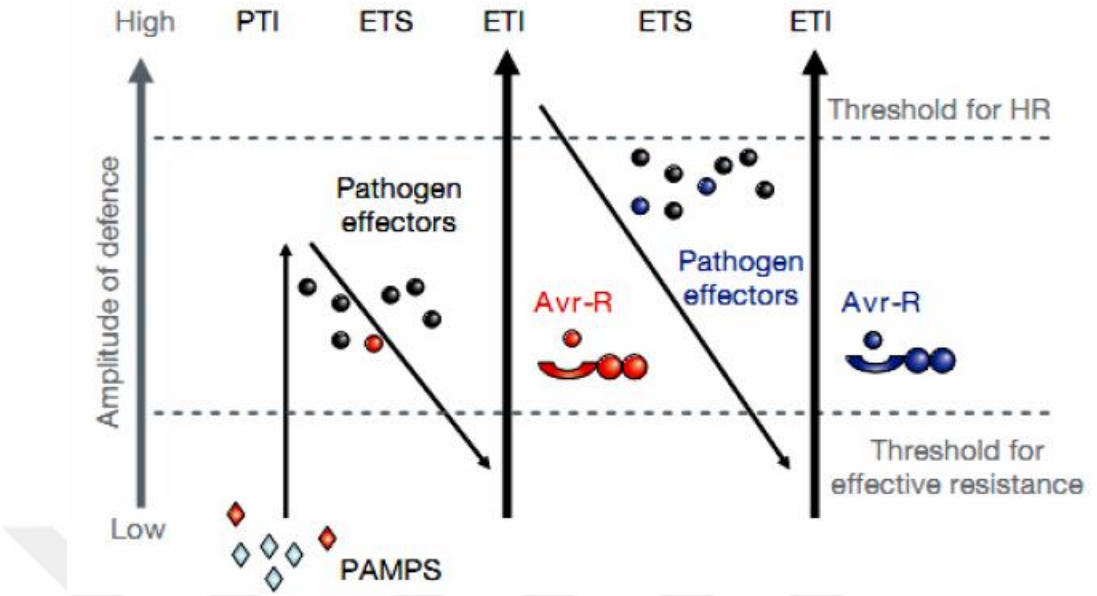
Memelilerinkine benzer bilinen bir adaptif immün sisteme sahip olmayan bitkilerin patojenlere yanıt ve savunmada rol oynayan mekanizmalarının karakterizasyonu, aktivasyonu/regülasyonu yoğun çalışılan alanlar olup, elde edilen bilgiler ışığında bir dizi pasif (konstitütif) ve aktif (indüklenen) savunma katmanı ortaya çıkarılmıştır [7].

Bitki savunma yanıtları esas olarak hücresel düzeyde olup, doğuştan gelen (innate) immünite olarak fonksiyonel olmaktadır. Önceden oluşturulan ve konstitütif bulunanlarla birlikte patojen teması/karşılaşmasıyla aktive olan (indüklenen) mekanizmalarla lokal ve sistemik olarak bitki savunması sağlanmaktadır. Sırasıyla pasif ve indüklenen direnç olarak ta adlandırılan bu mekanizmalardan pasif direnç, hücre duvarından vaks ve trikom yüzey örtülerine ve antimikrobiyal bileşiklerin sentezlenip biriktirilmesine geniş bir yelpazede yapısal ve biyokimyasal bileşenleri kapsamaktadır [7, 8]. Bu savunma unsurlarının bulunmadığı veya zayıf olduğu stoma açıklıkları gibi yapılar, patojenlerin, özellikle pasların konukçularına giriş yaptıkları ve parazitik/patojenik yaşam evrelerinin gerçekleştiği dokulara erişim alanları olmaktadır. Bazı türler/çeşitler stomalarını sabah geç açarak dahi enfeksiyona direnç gösterebilmektedir. Bu pasif savunmayı geçen patojenler hastalık oluşturabilmekte, virülanslıkları, aşağıda örnekleri tanımlanan bir sonraki savunma katmalarının

etkinliklerine, konukçu genotipine bağlı olarak değişiklik göstermekte, sonuç konukçu direnci veya hastalık gelişimi olabilmektedir [9].

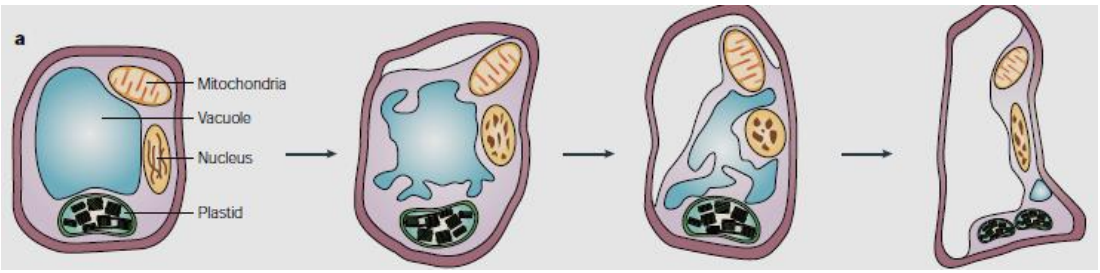
Bir ilk basamak savunma yanıtı, aynı zamanda bazal direnç veya onun bir parçası olarakta görülen ve patojen temasında, patojen orijinli moleküler motiflerin (PAMP) plazma membranındaki özgün reseptörlerince (Pattern Recognition Receptors, PRRs) tanınmasıyla aktive olan PAMP ile Tetiklenen Immunite, PTI'dır. Patojen temasıyla aktive olan PRR'lar üzerinden sinyal iletimiyle PTI yanıtları hücrede ve organizmada ortaya çıkmaktadır [10]. Lokalize kallus birikimi, reaktif oksijen türlerini (ROS) sentezi, MAPK aktivasyonu ve tek hücre ölümü gibi bir dizi savunma yanıtı hızlı bir şekilde bu yanıtla indüklenmektedir[10].

Patojenler kodladıkları efektör molekülleriyle bu ilk basamak gözetleme savunma yanıtını (PTI'yı) repres ederek aşabilmekte ve hastalık oluşturabilmektedir. Efektörlerle oluşturulan bu konukçu duyarlılığı, Efektörle Tetiklenen Duyarlılık (sensitivite) ETS (Effector-Triggered Sensitivity) olarak adlandırılmaktadır. ETS ile bazal seviyeye indirilen konukçu savunması, zikzak modeliyle [10] ileri sürüldüğü gibi, efektörü tanıyan direnç geni (R) proteini ortaya çıkışı, bu proteinle efektörün tanımasıyla diğer bir savunma katmanı aktive olmakta, konukçu savunması indüklenmiş seviyeye çıkmaktadır. Direnç geni proteininin, duruma göre direk ya da dolaylı olarak patojenin efektörünü tanıyabildiği bu savunma katmanı veya yanıtı Efektörle Tetiklenen Immünite, ETI, (Effector-Triggered Immunity) olarak adlandırılmaktadır [10]. Patojen ve konukçunun sahip olduğu karşılıklı gen çiftleriyle kodlanan bu ürünler arası interaksiyonlar Flor tarafından (1942) gene-karşı-gen (gene-for-gene) interaksiyonu olarak tanımlanmıştır [11]. Efektörün kaybı veya yeni efektörlerin evrimiyle ETI kırlmakta, ETS ortaya çıkmakta, gerçekleşen virülans hamlesi ve yeni efektörü tanıyan R proteini evrimiyle ortaya çıkan karşı savunma hamlesi (move-counter move) şeklinde devam eden ko-evolüsyon senaryosu, -kompatibilite-inkompatibilite osilasyonları-, modelin zikzak'larını oluşturmaktadır (Şekil 2.2) [10].




**Şekil 2.2.** Bitkilerle (a)virülent patojenleri arasında savunma ve virülans kabiliyetlerinde osilasyonlarla silahlanma yarışının gerçekleştiğini ileri süren «zikzak modeli» şematik gösterimi [10].

ETI yanıtı aktivasyonuyla, Hipersensitif Reaksiyon (HR) (Şekil 2.3) ile veya HR'sız olarak diğer bir dizi spesifik ve geniş spektrumlu sasavunma yanıtı lokal ve sistemik indüklenmektedir [2, 3]. ETI, PTI'ya göre çok daha etkili yükseltilmiş spesifik bir konukçu direnci sağlamaktadır [13].




**Şekil 2.3.** Hipersensitif reaksiyonda gözlenen apoptosis değişimleri [12].

Lokal savunma yanıtlarıyla birlikte, sistemik sinyallerle bitki genelinde geniş bir patojen spekturumuna yükseltilmiş direnç sağlayan "sistemik kazanılmış direnç" (Systemic Acquired Resistance), SAR, indüklenmektedir.

## 2.2. Fitopatojenlerin Biyotrof, Nekrotrof ve Hemibiyotrof Enfeksiyon Stratejileri ve Bitki Savunma Yanıtlarıyla İlgileri

Fitopatojenler biyotrof, nekrotrof ve hemibiyotrof olarak farklı yaşam tarzlarına sahip olabilmekte, farklı stratejilerle konukçularını enfekte edebilmektedirler. Biyotroflar, konukçu hücrelerini öldürmeden parazite ederek besin ve diğer gereksinimlerini karşılamaktadırlar, bunların örneklerini fungal, bakteriyal ve viral sistemlerde görmek mümkü olmaktadır. Biyotroflar bitki savunmasını supres ederek veya indüklemeden bitkisel dokuda gelişmekte, yaşam döngülerini tamamlamaktadırlar [15].

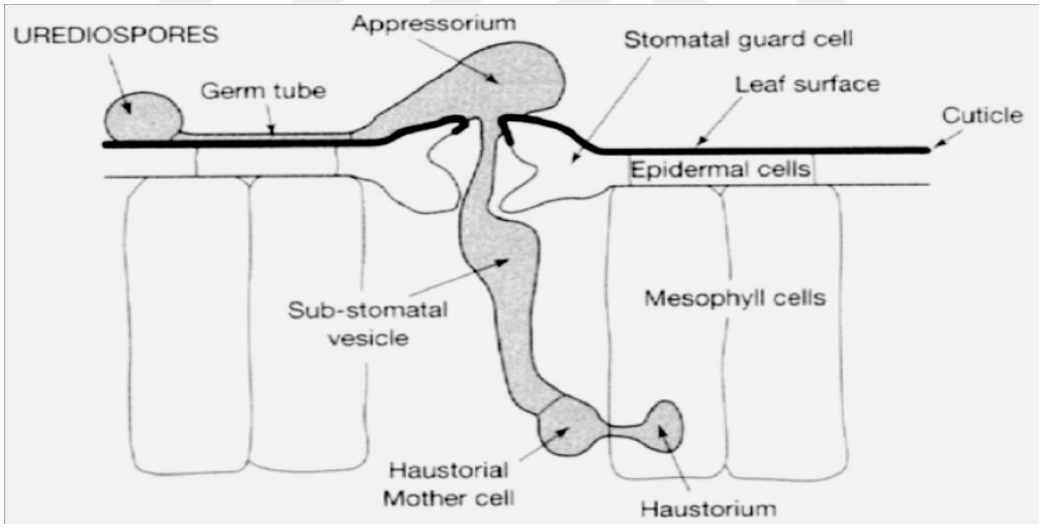
Nekrotroflar, konukçu hücreleri enfeksiyonla öldürerek besinlerini ve yaşam döngülerini ölü materyalden sağlayan fitopatojenlerdir. Konukçu hücrelerinin öldürülmesinde sentezleyip salgıladıkları fitotoksik maddeleri (toksinleri) hücre duvarı ve aradaki materyali sindiren enzimleri kullanmaktadırlar [16, 17]. Fitotoksinlerin birçoğu sekonder metabolitlerdir ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler olarak enfeksiyon bölgesi ve etrafında veya daha uzak bitki kısımlarına taşınmaları gerçekleşebilmektedir [20, 21].

Hemibiyotroflar, bir başlangıç biyotrofik faz sonrasında nekrotrofik yaşam stilini birlikte kullanan fitopatojenlerdir [20, 13].

## 2.3. Pas Patojenlerinin Konukçularına Penetrasyonları ve Sonrasında Duyarlı Genotiplerde Gerçekleşen Olaylar

Patojenlerin bitkide hastalık oluşturması birbirini takip eden olaylar zinciri sonucu meydana gelir ve bu olaylar zinciri hastalık evreleri ya da hastalığın seyri olarak isimlendirilir. Bitkide hastalık oluşumu inokülasyon, penetrasyon, infeksiyon, inkübasyon, fruktifikasyon (sporulasyon) evreleriyle olmaktadır. İnokulasyon, patojenin gelip bitki üzerine tutunmasıdır. Penetrasyon, konukçu bitki dokusunun içine hastalık etmeninin girmesine verilen isimdir. Patojenin konukçu bitki dokusunu beslenme ve gelişmeye uygun bularak yerleşmesi ve yayılmasına enfeksiyon denilmekte ve enfeksiyondan itibaren ilk hastalık belirtisinin görüldüğü zamana kadar geçen süre inkübasyon olarak adlandırılır. İnkübasyon dönemi bittikten sonra ise patojen, bitki dokusunda generatif organları olan sporlar, spor evleri ve spor taşıyıcılarını oluşturur ve bu dönem sporulasyon olarak isimlendirilir [21].

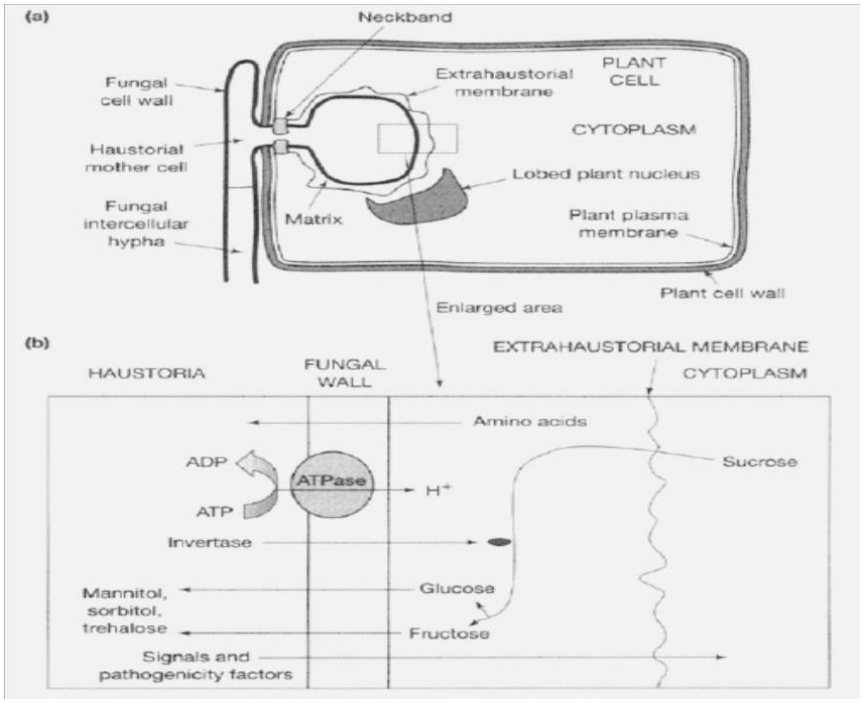
Daha çok ılıman tropik ve subtropik bölgelerde rastlanan ve genellikle mısır ortak pası olarak bilinen *Puccinia sorghi* obligat biyotrofik bir fungal patojendir [22]. Kompleks (heteroecious) yaşam döngüsüne sahip *P. sorghi* gibi pasların konukçu bitkisine penetrasyonu stoma açıklıkları üzerinden olmaktadır. Pas patojeni üretiosporları çiğ damlaları nemini kullanarak çimlenirler ve stoma açıklıkları üzerinde yüksek turgor basıncıyla appresorium yapısını oluştururlar. Takiben pas patojeni konukçu bitki stoma-altı kesecikleri üzerinde infeksiyon hifaları ve haustoryum ana hücrelerini oluşturmaktadır. Haustoryum ana hücresi üzerinden konukçu bitki hücresine girişleri, oluşturlan haustoryum (emeç) ile gerçekleşmekte, hücreiçi kesecikler gibi gözlenen bu yapılar, aslında bitki hücresi sitoplazmasıyla direk fiziksel teması olmayan, bitki hücresi plazma membranıyla çevrili fungal emeçlerdir. Konukçu patojen arasında bir arayüz olan bu yapıyla fungusa metabolit transferiyle birlikte konukçu metabolizması, savunma sistemi manipülasyonlarını sağlayan sinyal moleküllerinin transfer edilmektedir (Şekil 2.4) [7].




**Şekil 2.4.** Pas sporlarının mezofil dokusuna penetrasyonu [7].

Emeçler tüpsü bir boyuna sahip olup, bu kısımda bir boyun bandıyla (neckband) bitki plazma membranı ve fungal yüzey bir arada tutulmakta (yapıştırılmakta, kaspari şeridi gibi), bununla apoplasta muhtemel arayüz metabolit moleküllerinin kaçışı engellenmektedir. Haustoryumlar, sitolojik olarak düz ve dallanma gösteren şişkin uzantılar halinde gözlenebilmekte ve izole edilebilmektedir. Pas patojenleri aseksüel

hayat döngülerini haustoryumlarıyla konukçu bitkilerinden şeker ve aminoasit gibi metabolitleri alarak gerçekleştirmektedirler. Şekil 2.5' te transferi gerçekleştirilen metabolitler ve onların modifikasyonlarında rol oynayan aktivitelerin bir bölümüyle birlikte haustoryum ve onu çevreleyen bitki hücre yapısı modifikasyonları şematize edilmektedir. Şekil 2.5 (b)'de verildiği gibi muhtemelen bir metabolit gideri (sinki) haline getirilen ekstra-haustoryal matrikse bitki hücresinden sukroz, aminoasit gibi metabolitler salgılanmakta, bunlardan sukroz fungus tarafından sentezlenip bu alana salgılanan bir invertaz ile bileşeni heksozlara, glukoz ve früktoza ayrılarak haustoryuma transport edilmekte, bunlar sorbitol ve mannitol gibi fungus depo sakkaritlerine dönüştürülmektedir. Amino asitlerinde haustoryum membranında bulunan transport proteinleriyle (AAT1, AAT2, AAT3) matriksten alımı gerçekleştirilmektedir. Konuyla ilgili çalışmalar haustoryumların sadece konukçudan metabolit alımını gerçekleştiren yapılar olmadıklarını, bazı polipeptidlerin fungusa, avirülans gen ürünleri gibi polipeptidlerin bitki hücresine transferlerinin gerçekleştirildiği, sinyallerin iletildiği, konukçu metabolik aktivitelerinin yeniden programlanıp yönlendirildiği, kompatibıl interaksiyonda konukçu savunması supresyonunda rol oynayan bir yapı olduğunu gösterir yöndedir [23].




**Şekil 2.5.** (a) Haustoryum konukçu hücre arayüzü yapısı ve (b) arayüzde gerçekleşen bazı olaylar [7].

## 2.4. Kompatibıl ve İnkompatibıl Bitki-Patojen İnteraksiyonu

Bitki patojen interaksiyonlarında konukçu bitkinin ve patojeninin genetik materyalinin kodladığı moleküller ve bu moleküller arasındaki etkileşimlere göre kompatibıl veya inkompatibıl interaksiyon tanımlanmaktadır [2, 12]. Patojenin sahip olduğu efektör ve elisitör olarak adlandırılan sinyal molekülleri ile interaksiyon başlamakta ve bu moleküller lipit, peptit, oligosakkarit yapıda olabilmektedir [24].
Patojen infeksiyonu başarılı olduğu durumlarda bitki patojene duyarlı olmakta ve kompatibıl interaksiyon oluşmaktadır. İnkompatibıl interaksiyon ise bitkinin patojen infeksiyonuna direnç göstermesiyle oluşmaktadır. Konukçu bitkinin direnci kompatibıl interaksiyonda baskılanmakta, inkompatibıl bitki patojen interaksiyonunda ise direncin indüklenmesiyle gelişmektedir [25]. Kompatibıl interaksiyon fenotipinde patojen virülansı ve konukçu duyarlılığı, inkompatibıl interaksiyonda ise patojen avirülansı ve konukçu direnci görülmektedir. Moleküler etkileşimde mutasyon veya fonksiyon kaybı durumunda patojen virülansı ve konukçu duyarlılığı fenotipi oluşabilmektedir [7, 25, 26].

## 2.5. Bitki-Patojen İnteraksiyonlarının Transkriptom Analizleriyle Karakterizasyonu

Bitki-patojen interaksiyonlarında sinyal iletim yollarının karakterizasyonunu, konukçu bitki savunma yanıtını, patojen virülansında veya avirülansında rol alan faktörleri ve interaksiyondaki gen ekspresyon değişimlerini analiz etmek için çoğunlukla transkriptom analiz teknikleri kullanılmaktadır [27]. Ekspresyonel modülasyonda transkriptom analiz teknikleri kullanılması gen ekspresyonun düzenlenmesinin öncelikle transkripsiyon seviyesinde gerçekleşmesi esasına dayanmaktadır [28].

Transkriptom analiz tekniklerini jel esaslı, sekans esaslı ve hibridizasyon esaslı teknikler olarak üç genel gruba ayırabiliriz. Jel esaslı tekniklere örnek olarak DDRT-PCR [29], cDNA-AFLP [30], HiCEP [31] vb. verilebilir ve bu teknikler tüm genomlara uygulanabilmesinin yanısıra ön sekans bilgisi gerektirmemektedir [27]. DDRT-PCR, mRNA'ların oligo-dT primerlerle revers transkripsiyonu ile başlar. Takiben yapılan PCR amplifikasyonunda aynı primer ve ek olarak bir rastgele primer

kullanılır. Amplifikasyon sonrası jel seperasyonu ile kontrol ve uygulama grupları arasındaki ekspresyon değişimi değerlendirilerek sonuçlandırılır [32].

cDNA-AFLP (Complementer DNA-Amplified Fragment Length Polymorphism), klasik AFLP tekniğinin transkriptom analizi için modifiye edilmiş bir yöntemidir [32]. Genomik DNA'nın bir iki veya daha fazla restriksiyon enzimiyle kesilmesiyle açığa çıkan fragmentlerde polimofizmlerin alt setler halinde PCR amplifikasyonuyla değerlendirildiği AFLP'den farklı olarak, cDNA-AFLP ve HİCEP gibi tekniklerde ds-cDNA molekülleri, tek veya ikili kombinasyonlarda dört kesen restriksiyon enzimleriyle kesilip adaptörlenerek preselektif ve selektif PCR ampplifikasyonlarında kalıp olarak kullanılmaktadır. Sekans esaslı grup için SAGE ve derin transkriptom sekans analizleri örnek olmakta iken mikroarray analizleri ve çıkarımsal ve karşılaştırmalı hibridizasyon teknikleri ise hibridizasyon esaslı tekniklerin örneklerini oluşturmaktadır [27]. SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), *Fok* I gibi tip IIS restriksiyon enzimi cDNA etiketlerinin toplanıp klonlanarak sekanslanmasını, etiket frekanslarıyla gen ekspresyonu değerlendirmelerini sağlayan bir tekniktir. Mikroarrayler, cDNA veya oligonükleotitlerin cam yüzeye bağlanmasıyla hazırlanmakta, kontrol ve uygulama problarıyla array hibridizasyonuyla ekspresyon değişimlerinin tespiti ve değerlendirmeleri yapılmaktadır [33, 34].

Tez çalışmasıyla mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren mRNA'ların mRNA-DD tekniği ile tanımlanarak sekanslanması ve interaksiyonla meydana gelen ekspresyonel modülasyonun RT-qPCR ile çalışılıp delta-delta Ct metodu kullanılarak ekspresyonel değişimin belirlenmesi, kısaca interaksiyonda gerçekleşen olayların moleküler detaylarıyla ilgili bilgi elde etmek amaçlanmıştır.

# 3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada daha önce bir proje yan çalışması, B-planı olarak gerçekleştirilen DDRT-PCR çalışmasında hazırlanan jeller ve bunlarda tanımlanan diferenşıl ekspresyon bandları kullanıldı. 100 bandın bu jellerden elüt edilip klonlanması ve sekans karakterizasyonu yapıldı. Elde edilen verilerden seçilen beş gen için RT-qPCR çalışması yapıldı. Bunlar için materyal hazırlama ve PCR çalışmaları, DDRT materyalinde oluğu gibi gerçekleştirildi.

## 3.1. Seçilen DDRT-PCR Etiketlerinin Toplanması, Re-amplifikasyonu ve Pürifikasyonu

Ekspresyonel modülasyon gösteren mesaj bandlarının jelden kesilmeleri, yakın band karışması olmayacak bir şekilde band üzerine ~4 µl ddH2O damlatılıp, 1-2 dakika jelin hidrasyonunu takiben, aynı 10 µl'lik mikropipet ucuyla band örneğinin cam üzerinden soyularak 0.5 ml eppendorf tüpteki 75 µl $ddH_2O$ içine transferiyle gerçekleştirildi. Örnekler 15 dakika 100 ˚C'de kaynatmayı takiben 4 ºC'de bir gece bekletilerek 3 µl'si 25 µl reamplifikasyon PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı. Re-amplifikasyon PCR'ları toplanan her bir örnek için 15 µl hacimde 5.4 µl $ddH_2O$, 1.5 µl 10X PCR tampon, 1.5 µl 2.5 mM MgCl2, 1.5 µl 0.2 mM dNTP karışımı, 0.12 µl *Taq* DNA polimeraz, 15 µM 1 µl AP oligo-(dT) (3'A/G/C uzantılı) ve 3 µl kalıp olarak hazırlandı. PCR programı 94 $^oC$'de 3' başlangıç denatürasyonunu takiben her biri 94 $^oC$'de 30" denatürasyon, 40 $^oC$'de 30" primer bağlanması, 72 $^oC$'de 1' zincir uzatımı 35 döngü PCR olarak ve 72$^oC$'de 5' son uç doldurma şeklinde gerçekleştirildi. PCR'dan çıkan reaksiyonların 5 µl'si 6X agaroz jel yükleme boyasıyla (%50 gliserol, 6 mM EDTA, %0.1 Brom Phenol Blue (BPB), %0.1 Xylene Cyanol (XC), pH 8) karıştırılarak %2'lik 0.5X TrisBoratEDTA (TBE) agaroz jellerinde 10 V/cm voltajla yürütüldü. 0.4 ug/ml etidyum bromid içeren bu jellerde bandlar (312 nm) UV transillüminatör üzerinde değerlendirilip fotoğraflandı. Beklenen band büyüklüklerine sahip temiz PCR örneklerinin 3 ul'si ligasyon reaksiyonlarında kullanılırken, kirlilik ve ekstra bandlar durumunda jelden band purifikasyonları yapılarak ligasyon reaksiyonlarında kullanıldı.

### 3.2. Etiketlerin T-vektöre Ligasyonu

Direk PCR ürünleri veya pürifikasyonu yapılan etiketlerin T/A klonlanmaları, linear pTZ57 veya pUC18 T-vektörleri içine ligasyonları yapılarak gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonları 3.8 µl $ddH_2O$ içine sırasıyla 2 µl 5X DNA ligaz tamponu (Fermentas), 1 µl Linear T-vektör, (0.18 pmol uç, pTZ57 veya pUC18) ve 0.3 µl (1 U), T4 DNA ligaz (Fermentas) eklenmek suretiyle hazırlanan 7 µl ortak karışıma 3 µl PCR ürünü (~0.18 pmol uç) eklenerek hazırlandı. Reaksiyonlar takiben 22 °C'de 1 saat veya 4 °C'de bir gece inkübe edilerek ligasyonlar gerçekleştirilip, 2 µL'si transformasyonda kullanıldı.

### 3.3. Kompetant Hücrelere Plazmid Transformasyonu

*E. coli* JM107 hücrelerinin kullanıldığı transformasyon işleminde, 70 µl kompetant hücre preparasyonu üzerine 3 µl ligasyon karışımından eklenerek tüp tabanına hafifçe vurarak karışması sağlanıp, buz üzerinde 30' bekletilerek kompetant hücre yüzeylerine DNA-$Ca^{2+}$ komplekslerinin bağlanması, 90 sn 42°C 'de sıcaklık şoku uygulanarak hücre içine pDNA transferi gerçekleştirildi. Buz üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra üzerlerine 500 µl antibiyotiksiz LB (Muller) eklenerek, 30 dk, 37°C'de çalkalanarak inkübe edilip hücrelerin normal büyüme rutinine dönmeleri sağlandı. Hücrelerin tamamı, daha önceden 37°C'ye ısıtılıp LB amp+IPTG+X-gal petrilere yayılarak 37°C'de inkübe edildi. Ertesi sabah petrilerde büyüyen beyaz koloniler (insertli vektör taşıyan transformant hücreler) plazmid izolasyonu ve koloni-PCR deneylerinde kullanıldı.

### 3.4. Koloni PCR

Klonlanan insertlerin kontrolü ve sekanslama için hazırlanmaları, klonlama bölgesinde karşılıklı pozisyonlanan M13F/R primerleri ve bakteri hücreleriyle hazırlanan koloni PCR ile gerçekleştirildi. PCR reaksiyonları, 4.64 µl $ddH_2O$ içinde sırasıyla 1 µl - 10X PCR tamponu, 1 µl (200 µM) 2 mM dNTP karışımı, 0.8 µl (2 mM) 25 mM $MgCl_2$, 0.06 µl (0.3 U) Taq DNA polimeraz (Fermentas, 5U/µl), 0.25 µl (2.5 pmol,) M13 F-primeri (10 µM), 0.25 µl (2,5 pmol) M13 R-primeri (10 µM), en son olarak 2 µl sıvı kültür veya 2 µl ddH2O içinde süspansiyon haline getirilip

(koloniden alınan) bakteri kitlesi son hacim 10 µl olacak şekilde kombine edilerek hazırlandı.

### 3.5. Sekans Karakterizasyonu, Gen Bankası Veritabanlarında Sekans Benzerliği Taraması

Sekanslama için örnek hazırlanması başarılı olduğu durumlarda koloni PCR, başarılı olmadığı durumlarda ise plazmid izolasyonu ve plazmid kalıbı ile 30 µl reaksiyon hacimlerinde gerçekleştirildi. Bu reaksiyonlardan ürün pürifikasyonları ve miktar ayarlamaları yapılarak sekans hizmeti sağlayan firmalara gönderildi. Etiket sekans bilgileri tarafımıza e-posta ile iletilip, sekans verileri genbankası veritabanlarında (NCBI, maizeGDB, vb.) taranarak en yakın sekans benzerleri belirlenip ve ilgili oldukları fonksiyonlar, bunların bitki-patojen interaksiyonlarındaki rolleriyle ilgili literatür oluşturulan klasörlerde toplandı.

### 3.6. RT-qPCR Deneyleriyle Seçilen Genlerde Ekspresyonel Modülasyonun Çalışılması

#### 3.6.1. Bitkisel Materyalin Yetiştirilmesi ve Total RNA İzolasyonu

İki set halinde yetiştirilen A188 fideleri 7 günlük olunca kontrol ve uygulama grupları olarak tasnif edildi ve akşam saatlerinde uygulama grupları yeni hasat edilmiş pas sporlarıyla inoküle edilirken, kontrollerine sadece steril saf su uygulaması yapıldı. Her iki grup birlikte bir gecelik soğuk nem çemberinde (%90< nem, ~24 °C) inkübasyonla sporların çimlenerek enfeksiyonun başlatılmasının ardından bitkiler ~27 °C ve ~16h/8h gündüz/gece fotoperiyodunda büyümeye bırakıldı. Belirlenen zaman aralıklarında (6., 12., 24., 48., 72., 96. saatte) kontrol ve uygulama grup bitkilerinden iki tanesinin 2. yaprak 7 cm uç kısımları %70'lik etanolle silinmiş makasla kesilerek örneklendi.

Örneklenen yaprak uç kısımları (~100 mg), en kısa sürede ezmeden rulo haline getirilip ve nükleaz-free eppendorf tüpler içine yerleştirilerek sıvı azot içinde dondurulduu. Takiben bitkisel materyal yine sıvı azot içinde soğutulup konik uçlu bir tornavida yardımıyla tüp içinde toz haline getirilip, çözülmeden üzerine 1 ml RNAzol (MRC) eklenerek tüpün tabanına hafifçe vurarak karışması sağlanıp, hafifçe

vorteks edilerek homojenatlar hazırlandı. Proses edilmediğinde homojenatlar -20° C'de uzun süreli saklanabilir, hemen proses edildiklerinde ise, 10-15 dakika oda sıcaklığında ara-sıra çalkalanıp alt üst edilerek bekletilen homojenatlara 400 ul. $ddH_2O$ veya DEPC suyu eklenerek etkili bir şekilde 15-20 sn. çalkalandı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmeyi takiben homojenat DNA, protein ve karbohidrat bileşenleri 12.000xg'de oda sıcaklığında santrifüjle presipite edildi. Üstte oluşan süpernatant fazı nükleaz-free yeni bir eppendorf tüpe transfer edilerek 1 ml DEPC ile hazırlanmış 400 ul %75'lik etanol eklenip birkaç defa alt üst etmek suretiyle karışması sağlandı. 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra bu karışım 7-8 dakika 12.000xg'de santrifüj edilerek RNA'nın presipite olması sağlanıp, süpernatant fazı döküldü. Elde edilen RNA pelleti, iki defa 400 µl DEPC suyuyla hazırlanmış %75'lik etanol eklenerek yıkanıp ve her seferinde süpernatant pellet kaybedilmeden döküldü. Son yıkamanın ardından tüp kurutularak RNA pelleti büyüklüğüne bağlı olarak 50-100 ul DEPC suyu içinde çözünmesi beklendi. Oda sıcaklığında 1-2 saat çözünmeyi takiben konsantrasyon ölçümü spektrofotometrik olarak 260 nm'de yapıldı(1 $OD_{260}$= 40 ug/ml RNA). İzolasyonlarda, 200 nt< RNA fraksiyonu miktarı 60-80 ug/100mg (260/230=2.2-2.3 ve 260/280=1.8-2.0) arasında değişiklik göstermektedir.

### 3.6.2. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezleri, 18,5 µl DEPC muameleli-$ddH_2O$ içinde 10 µl total RNA (~4 µg.) ve 1.5 µl oligo-dT11 primeri kombine edilerek oluşturulan bileşimin 5 dakika 65°C'de tutularak 10 dakika 37 °C'ye soğutulmasıyla hazırlanan 30 ul karışımlara, 10 ul 5X Fermentas RT-$H^-$ tamponu, 2.5 µl (200 U) Ribolock (Fermentas 40 U/ul), 5 ul (0.2 µM) dNTP karışımı (Fermentas, 2 mM) ve 2.5 µl (200U/µl) Fermentas RT-$H^-$ bileşiminde hazırlanan 20 µl ortak karışım eklenerek oluşturulan 50 µl hacimde 60 dakika 42 °C'de inkübasyonla gerçekleştirildi. Takiben, karışımlar 5 dakika 95 °C'ye ısıtılarak enzim inaktive edilip ve sentez ürünleri -20 °C'de saklandı. Hazırlanan bu cDNA'lar seyreltme yapılarak hazırlanıp RT-qPCR deneylerinde kalıp olarak kullanıldı.

### 3.6.3 Primer Tasarımı

RT-qPCR primer tasarımı geleneksel PCR'dan farklıdır uygun primer sekans bilgisi sağlandıktan sonra tasarlandı. SYBR Green boyası kullandığımız için sonuçların güvenilir olması açısından en uygun primer çiftleri tasarlandı. RT-qPCR için uygun primer uzunluğu genelde 18-24 bp olarak kabul edilmektedir. Primerlerin Tm değeri için optimum aralık 59 ºC ve 66 ºC' dir. Aynı zamanda primer çifti (ileri-geri yani F-R) arasındaki fark 1 ºC olmalıdır. İdeal kalıp DNA uzunluğu 80-200 bp arasında olmalıdır. Primerlerde nükleotit tekrarı (örneğin ATTTTTTTT veya GCGCGCGCGC) olmamalıdır. Böyle bir durum engellenemezse maksimum tekrar sayısı dört olmalıdır. Primer 3' stabilitesi primer verimini etkilemektedir. Primer 5' ucu ise GC kelepçesi içermelidir bu sayede primer DNA ipliğine güçlü bir şekilde bağlanır. Ancak GC kelepçesi içeriğinin ikiden fazla olmaması gereklidir [35]. Bütün bu şartları içeren primer tasarımı web tabanlı Primer3plus (sourceforge.net/projects/primer3) programı ve NCBI primer blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) kullanılarak gen spesifik primerler tasarlandı (Tablo 3.1). Tasarlanan primer sekansları sentezletilerek RT-qPCR deneyleri bu gen spesifik primerler ile gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1.** RT-qPCR çalışmalarında kullanılan primer sekansları ve özellikleri.

| Genler | Primer sekansları, 5'→3' (sırasıyla, İleri / Geri primer) | Ürün (bç) | Kullanılan primer bağlanma sıcaklığı ($^{o}$C) |
|---|---|---|---|
| *ZmARP* | AATCGCCAATAAGCAACAAC<br>GCCCAAACTAGGATGGAAAT | 184 | 59 |
| *ZmCA* | AGTTCCTCACATGGAAAAAGTGAAA<br>TGGGCGATTGTTGATCCGGT | 195 | 59 |
| *ZmBip2* | TGTTTAGGAGGGAGGGTGGT<br>CACTGCAATGCGAATCCTCT | 135 | 59 |
| *ZmArpp3* | CAATGATGGTGAGCGGAGGT<br>AGGTTCACAGACAGGACAGC | 219 | 59 |
| *ZmcALDH* | TACAAGATGAGCGGGTTCGG<br>ACAGGATGAGGTCGGTCAGA | 120 | 59 |

### 3.6.4. RT-qPCR Deneyleri

Bozok Üniversitesi merkez laboratuvarında gerçekleştirilen bu deneylerde, içine kalıp ve primer ekleyerek çalıştığımız AMPLIQON Real Q-Plus/WO ROX 2x Green kiti kullanıldı. Her biri 20 µl hacimde hazırlanan reaksiyon içeriği 6 µl dd$H_2O$, 10 µl Real Q karışımı, 1 µl 10 pmol F/R gen spesifik primerler ve 3 µl cDNA kalıp (50X

seyreltme) şeklinde optimize edildi. İlk olarak yapılan deneyde primer validasyonu, *ZmAktin1* (J01238.1) geninin referans uygunluğu belirlendi. Takiben seçilen 5 mRNA etiketi için *(CA, ARP, Bip2, ArpP3* ve *cALDH)* için iki biyolojik iki teknik tekrar şeklinde hazırlanan reaksiyonlar Qiagen Rotor-Gene Q, Real-Time termal döngüleyicide 95$^{o}$C'de 15' HotStart DNA polimeraz, TEMPase aktivasyonunun ardından, her biri, 94$^{o}$C'de 20" denatürasyon, 59 $^{o}$C'de 20" primer bağlanması ve 72 $^{o}$C'de 30" zincir uzatımı olmak üzere 40 döngüden oluşan RT-qPCR programı ile çalışıldı. Kit bileşimindeki (SYBR) Green boyasıyla reaksiyonların ölçülen Ct değerleri kontrol ve uygulama grupları biyolojik ve teknik tekrarlar için ortalamalar alınıp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [36] metoduyla ekspresyonel değişim düzeyi belirlendi.

Bu çalışmada, diğer bir proje B-planı olarak gerçekleştirilen DDRT-PCR çalışması materyali jellerde tespit edilen diferenşıl ekspresyon bandları çalışılmıştır. Uyumlu (kompatibıl) interaksiyon materyalinin, kontrol grubu olarak 0-120 saat birleştirilmiş örneği (K) ve iki farklı zaman dilimi pas uygulaması örnekleri, 12-48h birleştirilmiş örneklerinden (T1) ve 72-120 h (T2) izole edilen total RNA'dan oligo dT primerleriyle sentezlenen cDNA kalıplarından amplifikasyonlarla bu ürünler elde edilmiştir. Toplam 100 band bu jellerden toplanarak amplifiye edilip klonlanmış ve sekanslanmıştır. Çalışılan interaksiyonda rol oynadığı düşünülen beş gen bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çerçevesinde seçilmiş ve ekspresyon değişimleri kuantatif real-time PCR (qRT-PCR) ile relatif kuantifikasyon yapılarak çalışılmıştır. Tanımlanan ve sekansı bilinen bu genler CA (karbonik anhidraz), cALDH (sitoplazmik aldehit dehidrogenaz), Bip2 (binding protein), ARP(auksinle repres edilen protein), ArpP3 (asidik ribozamal protein P3)'tür. Söz konusu genler için web tabanlı Primer3plus (sourceforge.net/projects/primer3) programı ve NCBI primer blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) kullanılarak gen spesifik primerler tasarlanıp sentezletildi ve RT-qPCR deneyleri sağlanan bu primerler ile gerçekleştirildi. RT-qPCR deneyleri sonuçlarına göre ölçülen Ct değerleri ile gen ekspresyon değişimleri delta-deltaCt metodu kullanılarak tespit edildi.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Etiket Sekanslarının Gen Bankalarında Benzerlik Taramaları

Daha önce bir proje kapsamında gerçekleştirilmiş mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren genlerin tanımlanması için DDRT-PCR çalışmasından elde edilen jel dokümantasyonlarından belirli bir prosedürle toplanan yaklaşık 100 mRNA etiketi tanımlanıp klonlandı. Bunlardan 72 etiketten elde edilen sekans bilgisi ile GenBankası veri tabanı taraması yapılarak fonksiyonu bilinen veya bilinmeyen gen sekanslarına benzerlik gösterdiği tespit edildi. Tespit edilen bu etiket bilgileri tablo halinde düzenlendi. Her bir etiketin aksesyon numarası, baz çifti (base pair) sayısı, benzer olduğu gen adı, benzerlik değeri ve diferenşıl ekspresyon sonuçları tabloda verilmiştir (Tablo 4.1). GenBankası veri tabanı taramaları sonucunda bu 72 etiketten 32 tanesinin belirli bir fonksiyona sahip olan ve fonksiyonu bilinen gen sekanslarına benzer olduğu tespit edildi. Bu etiketlerden 31 tanesinin hipotetik protein kodlayan sekanslara benzer olduğu görüldü. Bunlar dışındaki 9 etiket ise bir *P. graminis* Cullin 1 mRNA, bir mısır ctDNA, iki mısır mtDNA sekanslarına benzer olduğu tanımlanırken diğerlerinin farklı sistem sekanslarına benzer olduğu tespit edildi.

Fonksiyonu bilinen genlerle ilişkilendirilen etiketlerin bir bölümünün bitki-patojen interaksiyonlarında işlevsel olduğu ya da bu interaksiyonlarda rol aldığı bilinen mesajlardan oldukları sonucu elde edildi. Bitki savunma yanıtında biyotrofik patojenlere karşı SABP3 olarak rol oynadığı bilinen ve bir kloroplast enzimi olan karbonik anhidraz, ER şeperonu olan Bip2 proteini, absisik asit stres olgunlaşma proteini ve auksinle repres olan protein bitki patojen interaksiyonlarında rol alan mesajlar olup tanımlanan etiketlerdendir (Tablo 4.1). Ek olarak interaksiyonda rolü olan tetratrikopeptid, sitoplazmik aldehit dehidrogenaz (RF2C), büyüme düzenleyicisi faktör (GRF1) ve *ent*-kaurene sentaz 2 (gibberellik asit (GA) sentez yolu enzimi) benzeri olan genler tanımlanan etiketlerin diğer örnekleri olmaktadır (Tablo 4.1). Asidik ribozomal protein P3, gamma yanıtı I protein, SRC2, nikotinanamid sentaz 3, kinesin ve axillin gibi diğer streslerle ilişkili genler olup bu genlere benzer etiketler de tanımlanan sekanslar arasındadır (Tablo 4.1). Etiketlerden

mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda rolü olduğu düşünülen genler belirlenerek gen spesifik primerler tasarlanıp interaksiyondaki ekspresyonel değişimleri RT-qPCR ile çalışılarak bitki savunma sistemindeki rolleri moleküler açıdan değerlendirildi.

**Tablo 4.1.** Sekans karakterizasyonu yapılan mRNA etiketlerinin en yakın sekans benzerleri, ekspresyon profilleri ve diğer ilgili bilgiler.

| Etiket | Uzunluk (bç) | Aksesyon no | En yakın sekans benzeri | E-değeri | Ekspresyon | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Stres, savunma, sinyal iletimi, büyüme-düzenleme ilişkili etiketler: 20/72=%28** | | | | | **K** | **T1** | **T2** |
| DD1 | 97 | XM_008647554.1 | *Z.m.* ABA stres-olgunlaşma protein 3-benzeri mRNA | 8e-99 | * | I | R |
| DD2 | 52 | XM_008657861.1 | *Z.m.* Loricrin-benzeri transkript var. X2, mRNA | 6e-16 | + | R | R |
| DD3 | 138 | EU954250.1 | *Z.m.* SRC2 mRNA | 1e-58 | * | I | R |
| DD4 | 216 | XM_008659761.1 | *Z.m.* Filamentasyon temperatür-sensitif H2A | 3e-123 | + | R | I |
| DD5 | 147 | EU964946.1 | *Z.m.* Auksinle repres edilen protein mRNA | 0.0 | * | I | I |
| DD6 | 45 | EU973052.1 | *Z.m.* Büyüme düzenleyici faktör mRNA | 3e-18 | * | * | * |
| DD7 | 114 | XM_008653311.1 | *Z.m.* Gamma yanıtı I protein mRNA varyantı X8 | 3e-30 | + | R | R |
| DD8 | 199 | XM_008650278.1 | *Z.m.* Kauren sentaz 2 (*An2*) mRNA varyantı X1 | 9e-21 | * | I | R |
| DD9 | 71 | XM_008669566.1 | *Z.m.* Tetratrikopeptid tekrar motifli protein transkript varyantı X1 | 5e-23 | + | R | R |
| DD10 | 83 | XM_008662088.1 | *Z.m.* TPR tekrar içeren karakterize edilmemiş protein, mRNA | 4e-13 | + | R | I |
| DD11 | 140 | NM_001152569.1 | *Z.m.* Tetratrikopeptid tekrar protein mRNA | 1e-45 | - | I | R |
| DD12 | 76 | EU966630.1 | *Z.m.* Tetratrikopeptid tekrar protein mRNA | 3e-32 | - | I | R |
| DD13 | 169 | XM_008675810.1 | *Z.m.* Auxilin-related protein 1-benzeri mRNA | 6e-09 | + | R | R |
| DD14 | 123 | NM_001112424.1 | *Z.m.* Bip2 (ER şeperonu) mRNA | 4e-30 | + | I | I |
| DD15 | 176 | NM_001157006.1 | *Z.m.* Ribozom tekrar kullanım (recycling) faktörü (RRF) mRNA | 3e-11 | + | R | R |
| DD16 | 75 | NM_001111919.1 | *Z.m.* Asidik ribozomal protein P3 (arpp3) mRNA | 1e-63 | * | * | * |
| DD17 | 120 | EU968527.1 | *Z.m.* 17.5 kDa sınıf II HSP mRNA | 3e-13 | * | * | * |
| DD18 | 146 | XM_008646106.2 | *Z.m.* U5 küçük nüklear ribonükleoprotein mRNA | 1e-48 | + | I | R |
| DD19 | 96 | DQ417753.1 | *Z.m.* B73 serin/treonin kinaz protein vd., içeren gDNA sekansı | 8e-36 | + | R | R |
| DD20 | 102 | NM_001111704.2 | *Z.m.* Metil binding domain protein mRNA | 9e-46 | * | * | * |
| **Fotosentez, metabolizma ve transport ilişkili etiketler: 13/72=%18,05** | | | | | | | |
| DD21 | 136 | EU969568.1 | *Z.m.* Rubisco küçük alt birim (rbcS-m3) geni | 4e-32 | + | R | R |
| DD22 | 294 | EU965446.1 | *Z.m.* Fotosistem II 22 kDa protein mRNA | 4e-74 | + | R | R |
| DD23 | 270 | NM_001111758.2 | *Z.m.* Fotosistem II alt birim PsbS1 mRNA | 5e-99 | + | R | R |
| DD24 | 95 | AF467541.1 | *Z.m.* Treonin dehidrataz mRNA (kloroplast formu) | 0.0 | + | + | R |
| DD25 | 100 | NM_001154374.1 | *Z.m.* Karbonik anhidraz (CA) mRNA sekansı | 1e-56 | * | I | R |
| DD26 | 66 | XM_008666956.1 | *Z.m.* Nikotinanamid sentaz 3-benzeri mRNA sekansı | 2e-34 | * | I | I |
| DD27 | 59 | AF348412.2 | *Z.m.* Sitosolik aldehit dehidrogenaz, cALD (RFC2) mRNA | 9e-39 | + | I | I |
| DD28 | 81 | X15642.1 | *Z.m.* Fosfoenol pürivat (PEP) karboksilaz mRNA | 2e-39 | + | R | R |
| DD29 | 146 | XM_008679140.3 | *Z.m.* Siklik nükleotid kontrollü iyon kanalı mRNA | 2e-60 | + | R | R |
| DD30 | 136 | EU954542.1 | *Z.m.* ATP sentaz C zinciri mRNA'sı | 6e-47 | - | - | I |
| DD31 | 171 | GU075813.1 | *Z.m.* ATP sentaz F0 subunit 6 (atp6) mRNA | 1e-72 | + | I | + |
| DD32 | 96 | X80820.1 | *Z.m.* ABP1 mRNA (aktin-depolimerizasyon faktörü) | 7e-07 | + | R | R |
| DD33 | 407 | EU971052.1 | *Z.m.* Sucrose synthase 1 mRNA varyantı X1 | 2e-87 | + | R | R |
| **Hipotetik, karakterize edilmemiş ve bir fonksiyonla ilişkilendirilemeyen etiketler: 30/72=%41,6** | | | | | | | |
| DD34 | 115 | XM_002462795.1 | *S. bicolor* hipotetik protein, mRNA | 4e-20 | * | I | R |
| DD35 | 99 | EU957821.1 | *Z.m.* hipotetik protein mRNA | 1e-36 | * | I | I |
| DD36 | 73 | NM_001149742.2 | *Z.m.* hipotetik protein mRNA | 1e-39 | * | I | I |
| DD37 | 130 | XM_008678695.3 | *Z.m.* hipotetik protein transkript varyantı X3 | 2e-62 | + | + | R |
| DD38 | 267 | EU972793.1 | *Z.m.* hipotetik protein mRNA | 5e-32 | + | R | R |
| DD39 | 188 | NM_001137722.1 | *Z.m.* hipotetik protein mRNA | 1e-170 | * | I | I |
| DD40 | | EU957361.1 | *Z.m.* hipotetik protein mRNA | 8e-15 | + | R | R |
| DD41 | 102 | XM_002462795.1 | *S. bicolor* hipotetik protein mRNA | 3e-25 | * | - | I |
| DD42 | 251 | XM_008649425.1 | *Z.m.* karakterize edilmemiş protein mRNA varyant X2 | 2e-31 | * | I | I |
| DD43 | 108 | XM_008658634.1 | *Z.m.* karakterize edilmemiş mRNA sekansı | 3e-62 | * | I | I |
| DD44 | 212 | NM_001151612.2 | *Z.m.* karakterize edilmemiş protein mRNA | 5e-32 | + | R | R |
| DD45 | 224 | NM_001368938.1 | *Z.m.* karakterize edilmemiş mRNA | 1e-84 | - | I | R |
| DD46 | 185 | NM_001153541.1 | *Z.m.* karakterize edilmemiş protein mRNA sekansı | 4e-94 | + | I | R |
| DD47 | 144 | XM_008674447.1 | *Z.m.* karakterize edilmemiş protein transkript varyantı X1 | 3e-07 | * | * | * |
| DD48 | 147 | XM_020540443.2 | *Z.m.* karakterize edilmemiş protein transkript varyantı X6 | 0.16 | + | R | R |
| DD49 | 44 | BT038584.1 | *Z.m.* BFb0295C08 mRNA sekansı | 4e-44 | + | R | R |
| DD50 | 89 | AY107706.2 | *Z.m.* PCO080730 mRNA sekansı | 0.12 | - | - | I |
| DD51 | 194 | BT061413.1 | *Z.m.*BFb0143H02 mRNA sekansı | 2e-11 | + | R | R |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DD52 | 255 | BT041450.1 | *Z.m.* BFc0036E14 mRNA sekansı | 1e-30 | + | R | R |
| DD53 | 115 | BT018843.1 | *Z.m.* EL01N0553G03.d mRNA sekansı (yan kök oluşumu) | 2e-145 | - | I | I |
| DD54 | 148 | BT018699.1 | *Z.m.* EL01N0514H05.d mRNA sekans | 1e-35 | - | I | I |
| DD55 | 144 | EU940898.1 | *Z.m.* 1167995 mRNA sekansı | 3e-18 | * | I | I |
| DD56 | 69 | XR_556486.1 | *Z.m.* karakterize edilmemiş ncRNA | 1e-27 | * | I | I |
| DD57 | 345 | EU940829.1 | *Z.m.* klon 1157575 mRNA sekansı | 3e-16 | * | I | - |
| DD58 | 76 | BT041486.1 | *Z.m.* BFc0033G04 mRNA sekansı | 4e-35 | * | I | I |
| DD59 | 101 | EU946764.1 | *Z.m.* 323461 mRNA sekansı | 3e-25 | * | * | * |
| DD60 | 100 | EU940898.1 | *Z.m.* 1167995 mRNA sekansı | 3e-18 | * | I | I |
| DD61 | 101 | EU950803.1 | *Z.m.* 623087 mRNA sekansı | 1e-136 | * | I | R |
| DD62 | 84 | EU941821.1 | *Z.m.* 1470241 mRNA sekansı (sukroz sentaz1) | 2e-87 | + | R | R |
| DD63 | 392 | KM057483.1 | *Z.m.* ZmSh1_UGA_088 chr 9 gDNA sekansı | 7e-06 | - | I | I |
| **Organel, Puccinia ve diğer sistem sekanslarına benzer etiketler: 9/72=%12,5** | | | | | | | |
| DD64 | 144 | XM_003335301.2 | *P. graminis* f. sp. tritici Cullin 1 mRNA sekansı | 0.007 | - | - | I |
| DD65 | 238 | DQ645537.1 | *Zea luxurians* mt genom sekansı | 1e-123 | * | I | I |
| DD66 | 50 | DQ645539.1 | *Z.m. subsp. parviglumis* mt genom sekansı | 1e-125 | * | I | I |
| DD67 | 42 | KF241980.1 | *Z.m.* subsp. *mays* A188 ctDNA sekansı | 2e-102 | + | R | I |
| DD68 | 100 | XM_003718426.1 | *M. oryzae* hipotetik protein mRNA | 0.0 | - | - | I |
| DD69 | 108 | Kc510278.1 | *Isaria fariosa* strain STH3, rRNA | 1e-36 | + | R | I |
| DD70 | 276 | HE662629.1 | Kültürü yapılmayan bakteri kısmi 16S rRNA | 3e-15 | - | - | I |
| DD71 | 86 | AM940970.1 | Kültürü yapılmayan bakteri kısmi 16S rRNA | 2e-17 | + | R | I |
| DD72 | 107 | XM_625702.1 | *C. parvum* Iowa II hipotetik protein mRNA | 3.4 | * | I | I |

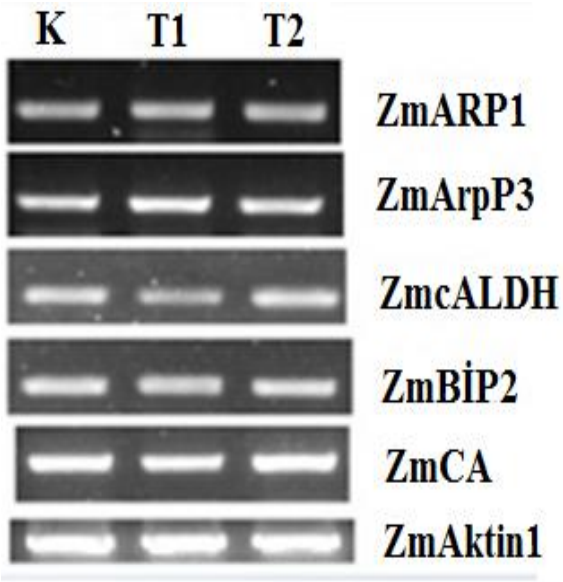
K; kontrol, T1; uygulama 1, T2; uygulama 2, R; Represyon, I; İndüksiyon "+"/"-"; band "var" / "yok", "*"; kaydedilmemiş bilgi

## 4.2. Pas İnokülasyonu ve Savunma Sinyal Molekülü Uygulamalarıyla Seçilen Genlerde Ekspresyonel Değişimin RT-sqPCR Değerlendirmesi

Mısır-mısır pası patosisteminde işlevsel olduğu düşünülen *ZmCA, ZmARP, ZmBip2, ZmArpp3* ve *ZmcALDH* genleri için primer validasyonu ve ekspresyonel değişim ön çalışma olarak RT-sqPCR ile değerlendirildi. Bu deney K, Kontrol 0-120 saat enfekte olmamış materyal; T1, 12-48 saat örnekleri pool edilerek hazırlanmış enfekte materyal; T2, 72-120 saat örnekleri pool edilerek hazırlanmış enfekte materyaller ile gerçekleştirildi (Şekil 4.6).

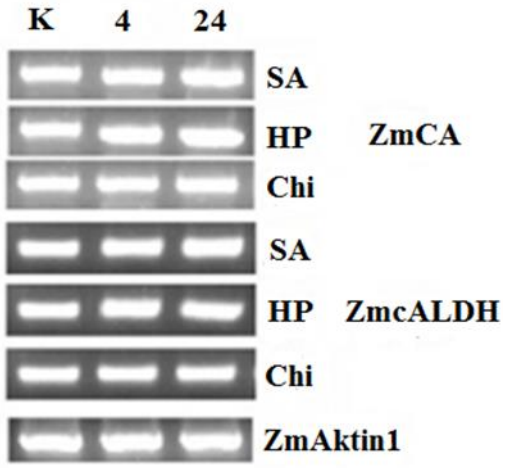
*ZmARP, ZmArpP3, ZmBip2* genlerinde T1 ve T2 inokülasyon örneklerinde indüksiyon gözlemlenirken, *ZmcALDH* T1 enfekte örneğinde represyon T2'de ise ekspresyonu indüklenmiş olarak gözlemlendi. *ZmCA* ekspresyonu T1 örneğinde kontrol bandına göre represyon, T2'de ise kontrole göre indüksiyon şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.6).

Ek olarak savunma sinyal molekülleri (10 mM Salisilik Asit, 10 mM Hidrojen Peroksit ve 5mg/ml kitin) ile muamele edilen kontrol, muamele 4 ve 24 saat sonrası A188 yapraklarında *ZmCA* ve *ZmcALDH* genlerinin ekspresyonu RT-sqPCR ile değerlendirildi (Şekil 4.7).




**Şekil 4.6.** *P. sorghi* inokülasyonuyla A188 yapraklarında *ZmCA, ZmBip2, ZmARP, ZmArpP3, ZmcALDH* ekspresyonunun RT-sqPCR değerlendirmesi.

Salisilik asit (SA) uygulanmış yapraklarda CA ekspresyonunda 24 saat sonrasında indüksiyon gözlemlenirken, hidrojen peroksit (HP) ile her iki zaman diliminde de indüksiyon tespit edildi. Kitin (Chi) muamelesi ise CA ekspresyonunda represyon oluşturduğu gözlendi. ALDH ekspresyonu ise kontrol bantlarına göre SA ve HP muamelesi ile indüklenirken, Chi muamelesi sonrası represyon şeklinde tespit edildi (Şekil 4. 7).




**Şekil 4.7.** Savunma sinyal molekülleri sprey edilmiş A188 yapraklarında *ZmCA* ve *ZmcALDH* ekspresyonunun RT-sqPCR değerlendirmesi.

### 4.3. Seçilen Genlerin RT-qPCR Teyitleri

Mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda rolü olduğu düşünülen ve RT-qPCR ile çalışılan beş gen (*ZmCA*, *ZmARP*, *ZmBip2*, *ZmArpp3* ve *ZmcALDH)* için GenBankası veri tabanı taraması mRNA etiket benzerlik sonuçları ayrı bir tablo olarak hazırlandı (Tablo 4.2). Bu genler için tasarlanan primerler ve uygun prosedürlerle gerçekleştirilen RT-qPCR deneyleri, iki biyolojik tekrar ve bunların her birinin iki teknik tekrarı olarak Merkez laboratuvarında bulunan Rotor gene Q, RT-PCR cihazıyla gerçekleştirildi (Tablo 3.1). Referans gen olarak *ZmAktin1* (GenBankası aksesyon no: J01238.1) kullanılan analizde *ZmAktin1* ekspresyonuyla normalize edilerek çalışılan deneyin sonuçlarından elde edilen dört Ct değerinin ortalamaları alınıp delta delta Ct methodu (Livak) ile relatif ekspresyon değişimleri belirlendi. Hesaplanan relatif mRNA seviyesi değerlerinin uygulama saatleriyle çizgi grafikleri hazırlandı.

DDRT-PCR tarama jelinden alınan örneklerde gözlenen ekspresyonel değişim elde edilen sonuçlarda genelde doğrulanmıştır. Karbonik anhidraz (*ZmCA*) için tarama jelinde gözlenen indüksiyon ve represyon durumu pas uygulaması 6-96 saat zaman dilimlerinde genel olarak represyon şeklinde gözlemlendi. *ZmALDH* ve *ZmBip2* genlerinde genel olarak indüksiyon gözlemlendi. *ZmArpp3* gen ekspresyonu dar bir aralıkta indüksiyon olmakta iken, *ZmARP1* gen ekspresyonu ise ardışık olarak indüksiyon ve represyon şeklinde tespit edildi.

**Tablo 4.2.** RT-qPCR ile gen ekspresyon teyidi çalışılan genler

| Etiket | Uzunluk | Aksesyon no | En yakın sekans benzeri | E değeri |
|---|---|---|---|---|
| DD25 | 100 | NM_001154374.1 | *Z.m.* Karbonik anhidraz (CA) mRNA sekansı | 1e-56 |
| DD27 | 59 | AF348412.2 | *Z.m.* Sitosolik aldehit dehidrogenaz, cALDH(RFC2) mRNA | 9e-39 |
| DD14 | 123 | NM_001112424.1 | *Z.m.* Bip2 (ER şeperonu) mRNA | 4e-30 |
| DD5 | 147 | EU964946.1 | *Z.m*. Auksinle repres edilen protein mRNA | 0.0 |
| DD16 | 75 | NM_001111919.1 | *Z.m.* Asidik ribozomal protein P3 (ArpP3) mRNA | 1e-63 |

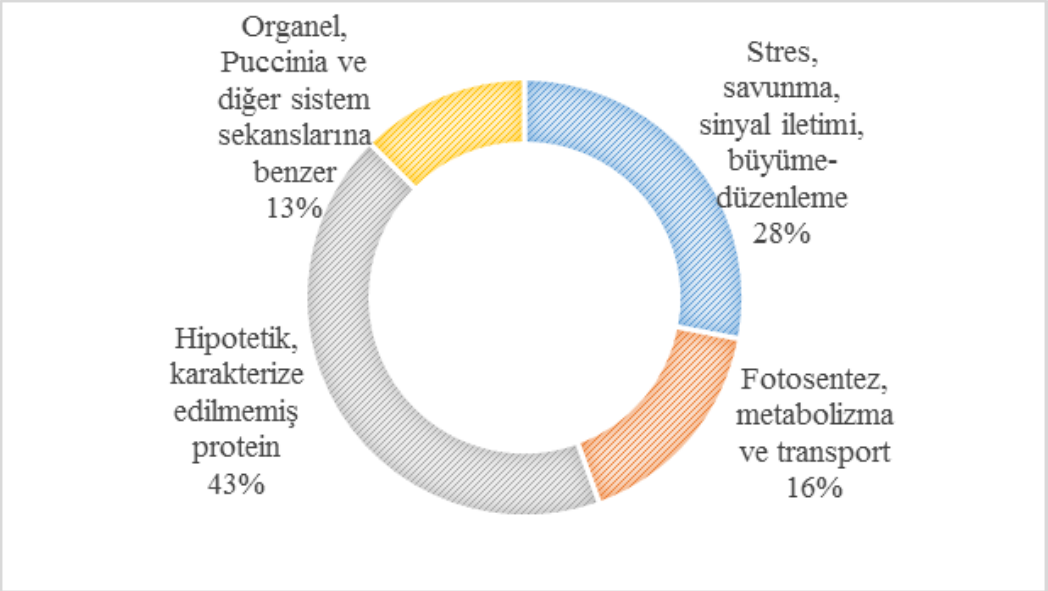
# 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki-patojen interaksiyonlarında fizyolojik mekanizmalar, aktive ya da inaktive olan biyokimyasal yollar, konukçu bitki duyarlılığı veya direncinde işlevsel olan faktörler yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmaktadır. Bu çalışmalar bitki patojen interaksiyonunda rolü olup ekspresyonu değişim gösteren genlerin moleküler karakterizasyonu yapılıp genlerin tanımlanması ile gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalar ile patosistemlerde rol oynayan ve ekspresyonu değişim gösteren genler bir dizi teknik kullanılarak tanımlanmaktadır [37-42].

Mısır-*Puccinia* sisteminde sınırlı sayıda gerçekleştirilen araştırmalar ile mısır mısır pası interaksiyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Mısır-*Puccinia polysora* interaksiyonunun Affimetrix mısır GeneChip ile değerlendirildiği bir çalışmada ekspresyonu değişim gösteren 532 prob tanımlanmıştır. Bir biyotik stres olarak değerlendirilen patojen saldırısı esnasında bitkinin yanıtında rol oynayan probların indüksiyon gösterdiği, abiyotik stres yanıtlarında rolü olanların ise represyon gösterdiği çalışma sonucu olarak verilmektedir [43]. Mısır-*P. sorghi* patosisteminin çalışıldığı kompatibıl ve inkompatibıl interaksiyonların her iki interaksiyon durumunun değerlendirildiği başka bir çalışmada ise 310 TDF'nin cDNA-AFLP tekniği ile sekans karakterizasyonu yapıldığı rapor edilmektedir. TDF'lerin büyük çoğunluğunun fonksiyonu bilinen genlere benzerlik gösterdiği ve bitki patojen interaksiyonlarında fonksiyonel olan genler olduğu çalışmada tespit edilmiştir. Diğer TDF'lerin ise bitki stres ve savunma sistemleri veya biki metabolizmasında bunlara benzer işlevleri olduğu belirlenmiştir [44].

Tez çalışmasıyla A188 mısır inbredi ve *P. sorghi* T09 izolatı uyumlu interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren mRNA etiketleri kullanılarak sekans karakterizasyonu yapılan 72 TDF'nin genbankası veri tabanı taraması yapıldı. Bu taramada TDF'lerin benzerlik gösterdiği gen sekansları belirlendi. TDF'lerin 32 tanesinin belirli bir fonksiyonla ilişkilendirilebilen, fonksiyonu bilinen gen sekanslarına benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 5. 8). Bu TDF'lerden 31 etiket sekansı karakterize edilmemiş/hipotetik protein kodlayan sekanslara benzerlik gösterirken, ek olarak biri *P. graminis* Cullin 1 mRNA sekansına benzer, ikisi mısır

mtDNA, biri mısır ctDNA sekansına benzerlik gösteren ve beşi farklı sistem sekanslarına benzer olmak üzere toplam 9 etiket tanımlanmıştır (Şekil 5. 8).




**Şekil 5. 8.** Çalışmada tanımlanan genlerin fonksiyonlarına göre gruplandırılması

Bitki-patojen interaksiyonlarında çoğunlukla çalışılan genleri içeren TDF'lerin fonksiyonu bilinen genlere benzerlik gösterdiği tespit edilmekle birlikte önemli bir kısmının stres ve bitki savunma yanıtıyla ilişkili olduğu sonucu elde edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda ekspresyon değişimi gözlemlenen bu genlerden beş tanesi için RT-qPCR çalışması ile relatif kuantifikasyon yapılarak mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda gen ekspresyon seviyeleri ve söz konusu patosistemdeki fonksiyonları değerlendirildi.

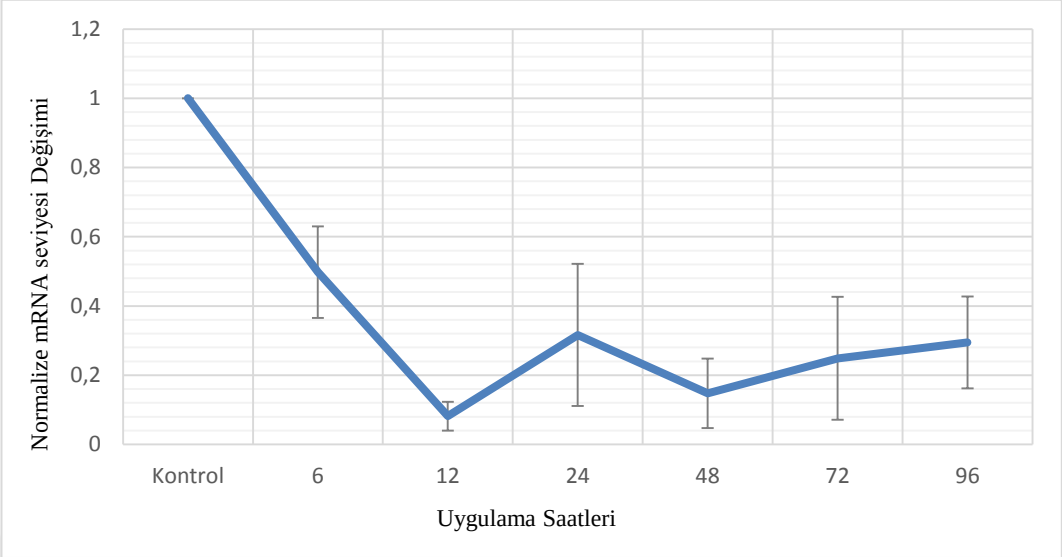
### 5.1. Tanımlanan Karbonik Anhidrazın (CA) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü

Bitkisel dokularda en çok yapraklarda bulunan karbonik anhidrazın (CA) yapılan araştırmalarla iki formunun bulunduğu bildirilmiştir. Bu formlar çözünür-CA ve bağlı-CA olarak adlandırılmaktadır. Bitki bağlı-CA formu kloroplast tilakoitlerinde lokalize olmuşken çözünür-CA formu ise bitki hücresi sitoplazmasında az miktarda, kloroplast granalarında çok miktarda bulunmaktadır [45-47].

CA'lar solunum, lipid biyosentezi, fotosentez ve stoma hareketlerinde görev yapmaktadırlar [48]. Tütün kloroplastlarında salisilik asit (SA) bağlayan protein 3 (SABP3- Salicylic Acid Binding Protein 3) olarak β karbonik anhidraz (βCA) tespit edilmiştir [49]. Bu enzimin SABP3 olarak bitki savunmasında da fonksiyonel olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışma *A. thaliana* bitkisinde SA analoğu bir kimyasal olan benzotiadiazol uygulamasından sonra *Pseudomonas syringae* inokülasyonu yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucu CA gen ekspresyon seviyesinin represyonu şeklinde rapor edilmiştir [50].

Fungal hastalık olarak tanımlanan mildiyö (geç yanıklık) etmeni olan *Phytophthora infestans'*ın etkisi *Nicotiana benthamiana* bitkisinde çalışılmıştır. Bitki patojen interaksiyonu başlangıcında direnç geni Pto'ya karşılık patojen avirülans geni olan AvrPto ile karşılaşması HR'yi tetikler. *N. benthamiana* yapraklarında CA (SABP3) gen ekspresyonunun susturulması (VIGS-Virüs Induced Gene Silencing) ile söz konusu patojenin büyüdüğü ve HR gelişiminin inhibisyonu gözlemlenmiştir [49]. Başka bir çalışmada patates-*Phytophthora infestans* kompatibıl interaksiyonunda incelenen CA ekspresyonunun patojen uygulamasından sonra repres olduğu tespit edilmiştir [51]. *Phytophthora infestans* patojeninin kompatibıl interaksiyon gösterdiği domates bitkisinde patojenin transkripsiyon dinamiğinin incelendiği bir çalışmada ise bitki savunma sistemi açısından CA gen ekspresyonunun hem bitki hem patojen açısından incelenmesinin önemli olacağı rapor edilmiştir [52].

Yapılan çalışmada literatürde verilen sonuçlara benzerlik göstermiş olarak *ZmCA* (GenBankası aksesyon no: NM_001154374.1) geninin patojen inokülasyonundan 6. saat ve sonrası çalışılan zaman dilimlerinde mRNA seviyesinin azaldığı (transkripsiyonel represyonunun gerçekleştiği) tespit edilmiştir.




**Şekil 5. 9.** *Ps* inokülasyonuyla *ZmCA* mRNA seviyesinde değişim grafiği. İki biyolojik tekrarın iki teknik tekrar halinde çalışıldığı RT-qPCR deneylerinde, ölçülen Ct değerleri ortalamaları, referans gen, ZmActin1, ekspresyonuyla normalize edilerek kontrole göre hesaplanan relatif (kat) ekspresyon değerleri, şekilde verilmektedir.

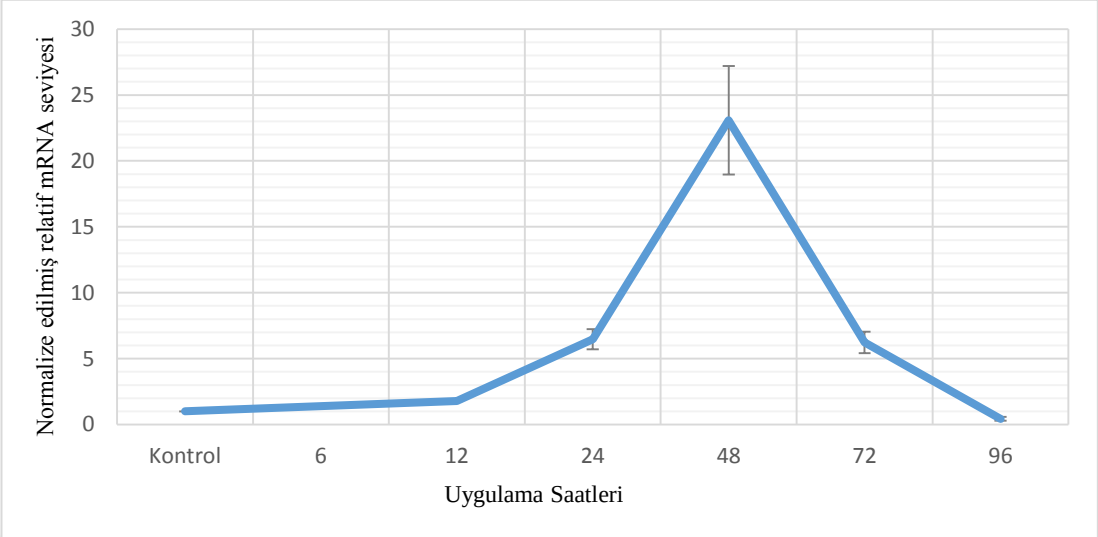
Uygulama saatlerine (6-96 saat) genel bir yorum olarak kontrole göre patojen inokülasyonuyla bu genin ekspresyonunun represyon gösterdiği tespit edildi (Şekil 5. 9). *ZmCA* ekspresyonunun patojen inokülasyonuyla repres olması ve kodladığı proteinin muhtemel bir SABP3 olması, bitki-fungus interaksiyonlarında bu kloroplast formu CA'nın fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Konukçu duyarlılığının oluşturulmasında gözlenen transkripsiyonel represyon muhtemelen önemli olup, diğer boyutuyla, ekspresyonu konukçu fungus direncinde aktif rol oynadığını göstermektedir.

## 5.2. Tanımlanan Aldehit Dehidrogenazın (cALDH) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü

Aldehit dehidrogenazlar, bitkilerde genellikle biyotik ve abiyotik streslere karşı tepki gösteren, bitki büyüme ve gelişmesinde farklı rollere sahip olan çeşitli protein ailelerinden oluşurlar [53, 54]. Bitkiler, özellikle *Zea mays* (24 ALDH geni) ve *Vitis vinifera* (23 ALDH geni) gibi yüksek yapılı bitkiler olmak üzere hayvanlar ve mantarlardan daha fazla sayıda ALDH geni içermektedir [55].

Aldehitlerin karboksilik asitlere oksidasyonunu kataliz eden aldehit dehidrogenazların (ALDH) sitoplazmik (sınıf I ALDH) ve organel (sınıf II ALDH) formları bulunmaktadır. ALDH'lerin bazıları spesifik substratları okside ederken (NAD+ veya NADP+ redüksiyonuyla) diğerleri geniş bir substrat yelpazesini modifiye edebilmektedir. Diğer metabolitler ve metabolik olaylarla birlikte alkol metabolizması ve lipid peroksidasyonuyla açığa çıkan aldehitler kimyasal reaktiflikleri nedeniyle ortadan kaldırılmaları, detoksifiye edilmeleri gerekmektedir, aldehit dehidrogenazlar bu aşamada fonksiyonel olmaktadırlar. Söz konusu bileşikler biyotik ve abiyotik stresörlere maruz kalma durumunda da sentezlenebilmekte, bunların detoksifikasyonu stres toleransı veya direncinde önemli olabilmektedir. Bitkilerde bazı ALDH'lerin ekspresyonu konstitüf gerçekleşirken diğerleri biyotik ve abiyotik stres faktörlerince indüklenebilmektedir. Konuyla ilgili çalışmalardan yapılan genel bir değerlendirme, ALDH ekspresyonunun bitki stres yanıtı yollarında, özellikle de oksidatif stres oluşturanlarda, önemli olduğu yönündedir. Mısırda anter gelişimi ve erkek fertilitesinde rol oynayan (RF2A, RF2C) ALDH enzimleri, ozmotik, kuraklık, tuz stresleri ve oksidatif streste de rol oynamaktadır [56].

Bitki-mikrop interaksiyonlarında ALDH enzimlerinin rolleri son yıllarda yapılan çalışmalarla belirginleşmektedir. Çin üzümünde (*Vitis pseudoreticulata*) yapılan mRNA-DD çalışmasında, külleme fungusu *Uncinula necator* infeksiyonunu takiben indüklenen ALDH genlerinden orijine olan mRNA etiketleri tanımlanmıştır [57]. Biber bitkilerinin avirülent (AvrBsT kodlayan) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) Ds1 inokülasyonuyla hızlı ve güçlü bir şekilde CaALDH1 ekspresyonu indüklenmektedir. Tütünde (*N. benthamiana*) CaALDH1 ve avrBsT genlerinin birlikte ekspresyonu avrBsT ile tetiklenen programlı hücre ölümünde dramatic artışa neden olmuştur. Söz konusu genin biberde susturulması hidrojen peroksit birikimine, hücre ölümü yanıtı ve *Xcv* ya direncin azalmasına neden olmaktadır [58]. Benzer sekilde, söz konusu enzimlerin programlı hücre ölümünde rollerine bir kanıt ta, pirinç hastalık lezyonu mimik mutantında (*cdr2*) da yüksek seviye de ALDH proteini birikiminden gelmiştir [59]. Arabidopsis te artırılmış CaALDH1 ekspresyonu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2 infeksiyonlarına duyarlılığı azaltmaktadır [58].




**Şekil 5.10.** *Ps* inokülasyonuyla *ZmcALDH* mRNA seviyesinde değişim grafiği. İki biyolojik tekrarın iki teknik tekrar halinde çalışıldığı RT-qPCR deneylerinde, ölçülen Ct değerleri ortalamaları, referans gen, ZmActin1, ekspresyonuyla normalize edilerek kontrole göre hesaplanan relatif (kat) ekspresyon değerleri, şekilde verilmektedir.

Bu çalışmada da literatürde verilen çalışmalara paralel olarak *ZmcALDH* (GenBankası aksesyon no: AF348412.2, RF2C) pas inokülasyonunun ardından ilk 6 saat zaman diliminden itibaren gen ekspresyonunun kontrole göre indüksiyon gösterdiği tespit edildi (Şekil 5. 10). *ZmALDH* ekspresyonu pas inokülasyonu sonrasında yaklaşık yirmibeş kat indüksiyon olarak gözlemlendi. Gözlemlenen bu relatif ekspresyon değişimi genin bitki savunma yanıtında ve mısır-mısır pası patosisteminde işlevsel olduğunu kanıtlar niteliktedir.

### 5.3. Tanımlanan Binding Proteinin (BİP2) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü

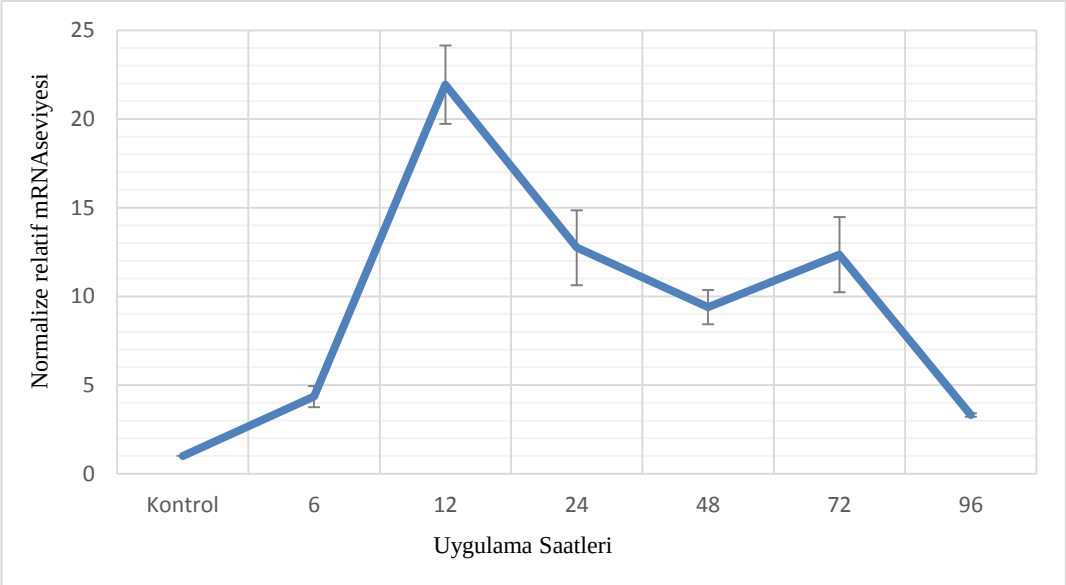
Farklı abiyotik (yüksek ışık, yüksek sıcaklık, kuraklık, tuz, ozmotik ve ağır metal stresi) ve biyotik (bakteriyel ve fungal patojenler, virüsler) stresler, endoplazmik retikulumda (ER) katlanmış ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur ve bu da ER stresini indükleyebilir [ 60-64]. Bir HSP70 moleküler şaperonu olan bağlanma proteini (BiP), hücrelerin stres yanıtında yer alan önemli ve en iyi çalışılmış bir ER proteinidir. Bitkilerde, BiP'nin çeşitli streslere karşı savunmada rol oynadığı rapor edilmektedir [65, 66].

BiP proteinleri ER lümeninde yanlış katlanmış proteinlerin bağlanarak proteazom aracılığıyla ER ile assosiye degredasyonunda (ERAD) rol oynamaktadır. Yanlış katlanmış proteinlerin ER'da birikimi, ER stresine, katlanmamış protein yanıtının (unfolded protein response, UPR) tetiklenmesine neden olmaktadır. İleri düzeyli ER stresi durumlarında UPR ile aktive edilen koruyucu mekanizmalar yeterli olmayıp apoptozisle hücre ölümü gerçekleşmektedir. BiP, bu anlamda ER stresi ve ilişkili apoptozis sinyali regülasyonunda fonksiyonel bir molekül gibi gözükmektedir. Bitkilerde yapılan çalışmalar ER stres attenüasyonu yanında, BiP'in transgenik soya (*Glycine max*) ve tütünde (*Nicotiana tabacum*) kuraklık toleransı sağladığını, ER stresi ve ozmotik stresle indüklenen apoptozis attenuasyonuna neden olduğunu ve patojenlere immunite de rol oynadığını göstermektedir [65, 67, 70, 71].

ER, diğer proteinlerle birlikte, bitki savunma yanıtlarında rol oynayan moleküllerin sentezlendiği, katlanması ve modifikasyonunun gerçekleştiği, belirli düzeyde olgunlaştırıldığı bir organeldir. Yapılan çalışmalar, patojen infeksiyonlarında, savunmada rol oynayan moleküllerin sentezi ve salgılanmasının büyük ölçekli artığını, söz konusu sentez yolu ve fonksiyonel olan elemanlarının savunma yanıtlarında önemli olduğunu göstermektedir [62]. BiP'ler bu alanda rolleri ilk fark edilenlerden biri olup, Bip2, SAR kurulumunda rol oynamaktadır, *bip2* ekspresyonunun susturulması, SAR markırı PR1 sekresyonunu ve patojen direncini attenue etmektedir [70].

Prinçte artırılmış BiP3 ekspresyonu, immüno reseptörün proses edilmesi ve stabilitesini düzenleyerek Xa21 ile sağlanan dirençte rol oynadığı ileri sürülmektedir [72]. Soya da artırılmış BiP ekspresyonunun, *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 ile indüklenen non-host HR'nı hızlandırdığı tespit edilmiştir [73]. Bu tespitler çerçevesinde, BiP'in PCD pozitif regülatörü olduğu ileri sürülmektedir. BiP ile birlikte diğer bir ER proteini, CRT3, *N. benthamiana* da direnç geni proteini Cf ile indüklenen HR'da rol oynamaktadır. Her iki proteinin Cf proteiniyle interaksiyona girdiği ve bu proteinlerin direnç proteini katlanması ve stabilizasyonunda rol oynadığı değerlendirmesi yapılmaktadır. Bu yönüyle PAMP reseptörlerinde tespit edilen duruma benzemektedir [68]. *N. benthamiana* diğer bir çalışmada, TMV ile indüklenen HR'da, BiP ve diğer ER şeperonlarının seviyesinde

artış tespit edilmiş, CRT2 ve CRT3'ün susturulması ise, HR'da azalmaya neden olmuş ve hücreler arası viral iletime izin vermiştir [69]. PAMP reseptörleri, direnç geni proteinleri, antimikrobiyal proteinler gibi bir dizi direnç faktörleri, ER üzerinden sentezlenerek işlenip hedeflenmekte ve salgılanmaktadır. Konuyla ilgili çalışmalar, ER ve protein sentezi ve işleme kapasitesinin regülasyonunun bitki savunma yanıtlarında önemli bir yere sahip olduğunu göstermekte, bu yolun bir elemanı olan BiP, UPR ve PCD regülasyonunda rol oynayan önemli bir proteindir [70]. Çalışılan patosistem de ekspresyonu ve fonksiyonunun çalışılması, bitki-mikrop interaksiyonlarıyla ilgili bilgilerimize ve bu sistemlerin manipülasyonuna önemli katkılar sağlayabilir.




**Şekil 5.11.** *Ps* inokülasyonuyla *ZmBİP2* mRNA seviyesi değişim grafiği. İki biyolojik tekrarın iki teknik tekrar halinde çalışıldığı RT-qPCR deneylerinde, ölçülen Ct değerleri ortalamaları, referans gen, ZmActin1, ekspresyonuyla normalize edilerek kontrole göre hesaplanan relatif (kat) ekspresyon değerleri, şekilde verilmektedir

Yapılan çalışmada da mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda *ZmBip2* (GenBankası aksesyon no: NM_001112424.1), gen ekspresyonunun literatür bilgilerine paralel olarak indüksiyon gösterdiği tespit edildi. RT-qPCR ile analizi yapılan mısır *Bip2* gen ekspresyonu yirmi kata kadar çıkabilen indüksiyon olarak gözlemlendi (Şekil 5.11). *BİP* geninin bitki savunma yanıtında işlevsel olduğu literatürde de verilmiş olmakla birlikte bu analiz ile literatüre *BİP2* relatif ekspresyon

değişimi indüksiyon olması ve kompatibıl bitki-patojen interaksiyonunda çalışılması yönüyle katkı sağlamaktadır.

### 5.4. Tanımlanan Auksinle Repres Edilen Proteinin (ARP) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü

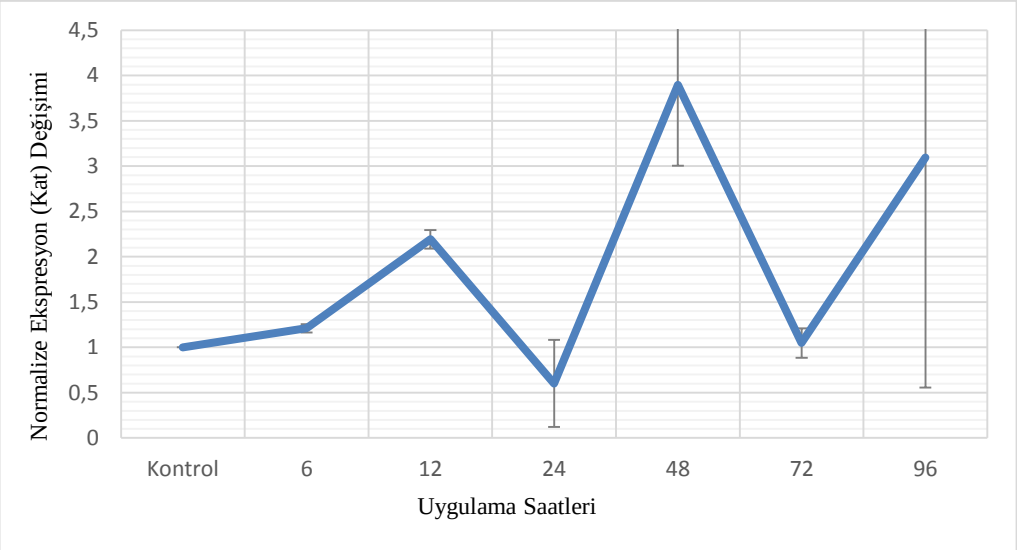
Auksin bitki büyüme gelişmesini ve çevreyle interaksiyonu düzenleyen bir fitohormondur. Bitki patojen interaksiyonlarındaki rolleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bununla birlikte diğer hormonlarla veya bağımsız bir şekilde aktif rol oynadığını gösteren bulgular literatürde görülmektedir [74, 75].

Fungal veya bakteriyel patojenler auksini sentezleyip ya da sentezletip patogenezde direk kullanabilmektedirler. Bununla beraber veya bitki hormonal regülasyon ağlarını bundan bağımsız olarak bozup bitki kontrolünü değiştirerek, atlatarak bitki savunma yanıtlarını baskılayabilmektedirler [76].

Auksin sinyal iletimi ile algılanması, transportu, inaktivasyonu, sentezi ve konjugasyonu gibi boyutları bitki patojen interaksiyonlarında kullanılabilmektedir [74]. İndolden ve triptofandan çoklu metabolik yollarla auksin sentezlenebilmektedir. Auksin salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA), absisik asit (ABA), reaktif oksijen türleri (ROS) ve sitokinin sinyallerinin modülasyonunda işlevsel olmaktadır [75].

SCF ubikuitin kompleksinde F-box proteini olarak görev alan Transport Inhibitör Response 1 (TIR1) veya Auxin Signaling F-Box (AFB) reseptör proteinleri ile auksin sinyali algılanmaktadır. Auksin Response Factor (ARF) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleri ise auksine yanıt genlerin ekspresyonunu sağlamaktadırlar. Auksinle gen ekspresyonunun regülasyonu Auxin/Indole 3-Acetic Acid (Aux/IAA) reseptör protein-ARF olarak ve ARF-ARF dimerizasyonu, ARF'ların DNA bağlanma yeteneğini kontrol etmesiyle sağlamaktadır. ARF'lar farklı bitki türlerinde 10-43 üyeye sahip olup auksinle indüklenen ve repres olan genlerin ekspresyonunda işlevsel olmaktadırlar. Aux/IAA, *Small Auksin up RNA* (SAUR) ve *Gretchen Hagen 3* (GH3) gen aileleri auksinle indüklenen genleri oluşturmaktadır. Bunlardan farklı bir gen ailesi olan Auxin Repress Protein (ARP) genleri auksinle repres edilenleri oluşturmaktadır [77].

ARP genlerinden ARP1 in tütün bitkisi ve onun mutantında yapılan bir çalışmayla bitki savunma yanıtında rolü olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada ARP1 in vejetatif büyümeyle bitki direnci veya savunma yanıtında her iki durumda da ARP1 fonksiyonu karakterize edilerek bitki savunma yanıtında rolü olduğu ortaya konmuştur. ARP1 gen ekspresyonu olmadığı durumda bitki direnci pozitif vejetatif büyüme regülatörü olmakta iken, eksprese edildiğinde negatif bir regülatör olarak işlevsel olduğu tanımlanmıştır. Ek olarak PTI aktivasyonunda ARP1'in flg22 ve kitin gibi PAMP'lara (elisitör) benzer şekilde bitki savunma yanıtında rol aldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç ARP1 geninin susturulduğu genotiplerde PTI yanıtının bloke olduğunun gözlenmesiyle elde edilmiştir. ARP1 ekspresyonunun arttırıldığı durumlarda hastalık direncinin arttığı ve vejetatif büyümenin zayıfladığı görülmüştür. Elde edilen bu verilerle ARP'ların bir üyesi olan ARP1 için büyümede ve hastalık direncinde antagonist çalışan integral bir regülatör olarak fonksiyonel olduğu ileri sürülmüştür [78].




**Şekil 5.12.** *Ps* inokülasyonuyla *ZmARP1* mRNA seviyesi değişimi grafiği. İki biyolojik tekrarın iki teknik tekrar halinde çalışıldığı RT-qPCR deneylerinde, ölçülen Ct değerleri ortalamaları, referans gen, ZmActin1, ekspresyonuyla normalize edilerek kontrole göre hesaplanan relatif (kat) ekspresyon değerleri, şekilde verilmektedir.

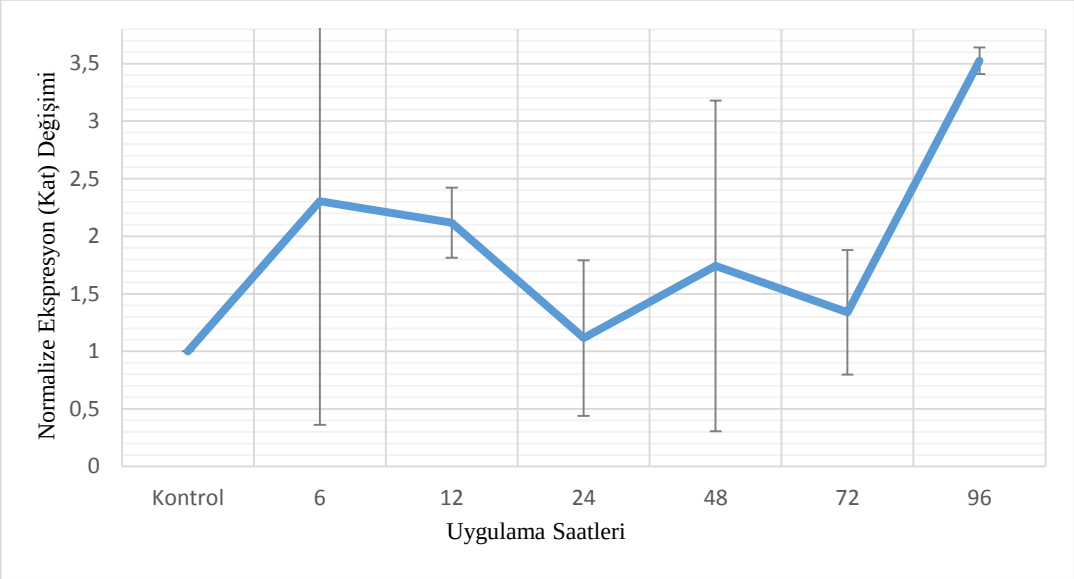
Yapılan çalışmada *ZmARP1* (GenBankası aksesyon no: EU964946.1) geninin pas inokülasyonuyla ekspresyonunun indüksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile kontrole göre *ZmARP1* gen ekspresyonu yaklaşık dört kat indüksiyon olarak

gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuç ile bitki-patojen interaksiyonlarında *ARP1* geninin fonksiyonel olduğu söylenebilir (Şekil 5.12). Mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda çalışılan *ZmARP1* ekspresyonunda kontrole göre dört kat indüksiyon gözlemlenmesi bitki-patojen interaksiyonunda rolü olduğunu destekleyen bir sonuçtur.

## 5.5. Tanımlanan Asidik Ribozomal Protein P3'ün (ArpP3) Bitki-Patojen İnteraksiyonlarında ve Çalışılan Patosistemde Muhtemel Rolü

Ökaryotik ribozomlarda bulunan P protein kompleksi olarak adlandırılan bir grup protein büyük ribozomal alt birim aktif bölgesinde yanal bir sap yapısı oluşturmaktadır. Bununla birlikte elongasyon evresinde işlevi olduğu düşünülen bir protein kompleksidir. Çoğunluğu bazik olan bu ribozomal proteinlerin pH 3–5 aralığında izoelektrik noktalara sahip olup fosforile edilmiş bir grubu asidik ribozomal proteinlerdir. Asidik ribozomal proteinler P0, P1 ve P2'den oluşmakta ve yalnızca monokotil ve dikotiledonlu bitkilerde bu üç gruptan farklı olarak P3 proteini bulunmaktadır [79].

*Arabidopsis* bitkisinde yapılan bir çalışmada *AtP3B* gen ekspresyonunda yüksek ve düşük sıcaklıklarda indüksiyon gözlemlenmiştir. Bu çalışmayla *AtP3B*'nin sıcak ve soğuk stresinde bitkiyi korumasının yanısıra bir RNA şeperon aktivitesi gösterdiği de tespit edilmiştir. Sıcaklık stresi durumunda protein agregasyonunu önlemekte iken, soğuk stresi durumunda RNA işleme, stabilite ve translasyon kontrolü gibi posttranskripsiyonel RNA metabolizmasında işlevsel olmaktadır [80]. Transgenik tatlı patateste (*Ipomoea batatas L.*) yine *AtP3B* geniyle yapılan bir çalışmayla RT-PCR yöntemi kullanılarak çalışılan genin düşük sıcaklıkta ekspresyonunun indüklendiği ve bitkinin düşük sıcaklığa toleransının arttığı tespit edilmiştir [81].




**Şekil 5.13.** *Ps* inokülasyonuyla *ZmArpP3* mRNA seviyesinde değişim grafiği. İki biyolojik tekrarın iki teknik tekrar halinde çalışıldığı RT-qPCR deneylerinde, ölçülen Ct değerleri ortalamaları, referans gen, ZmActin1, ekspresyonuyla normalize edilerek kontrole göre hesaplanan relatif (kat) ekspresyon değerleri, şekilde verilmektedir.

Çalışmada mısır bitkisi asidik ribozomal proteini P3 (*ZmArpP3*) (GenBankası aksesyon no: NM_001111919.1) geninin pas inokülasyonu sonrası, 6. saat ve sonrası takip edilen zamman diliminde ekspresyonunda genel bir indüksiyon gözlendi. Ekspresyon indüksiyonunun genelde bir iki kat olduğu gözlemlenen *ZmArpP3* geninde ekspresyon seviyesinin diğer zaman dilimlerine göre 96. saat zaman diliminde daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 5.13). Mısır-mısır pası kompatibıl interaksiyonunda çalışılan asidik ribozomal protein P3'ün bitki patojen interaksiyonu ve bitki savunma yanıtlarında rolü olduğunu tespit edilen gen ekspresyon değişimi göstermektedir.

Bitki patojen interaksiyonlarında modülasyon gösteren diğer bir dizi etiket de Tablo 4.1'de listelenmiştir. Bunlar arasında tetratricopeptide tekrar domein içeren protein, SRC2, bulunmaktadır. Sınırlı sayıda etiket çalışılmış olmakla birlikte, bitki patojen interaksiyonlarında sıklıkla tanımlanan gen etiketlerinin çalışmada tanımlanmış olması çalışılan transkriptomun amaç açısından kapsandığını göstermektedir. Bu yönüyle ve tanımlanan genlerin bitki patojen interaksiyonlarının biyoteknolojik manipülasyonlarında kullanılabilir nitelikte olması çalışmanın amacına ulaştığını

göstermektedir. Ek olarak mevcut çalışma, sınırlı sayıda çalışılmış bir interaksiyon formu olan bitki patojen kompatibıl interaksiyonunun moleküler mekanizmasını kapsaması yönüyle ilgili literatüre katkı sağlayabilecektir. Belirli fonksiyonlarla assosiye olan genlerle birlikte fonksiyonu bilinmeyenlerin bitki patojen interaksiyonlarında, özellikle de mısır-mısır pası interaksiyonunda gerçekleşen olayların moleküler detayları ve manipülasyonlarına, önemleri ölçüsünde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

# 6. KAYNAKLAR


1. Südüpak, 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, TÜBİTAK Proje Sonuç Raporu, Proje No: 209T002, 2013.
2. Greenberg, J. T., Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 525-541, 1997.
3. Heath, M. C., Hypersensitive Response-Related Death, *Plant Mol Biol*, 44, 321–334, 2000.
4. Sahah, D.A., Dillard, H., Yield Loss in Sweet Corn Caused by *Puccinia sorghi*: A Meta-Analysis, *Plant Dis*, 90, 1413-1418, 2006.
5. Hulbert, S.H., Structure and Evolution of the *Rp1* Complex Conferring Rust Resistance in Maize, *Annu Rev Phytopathol*, 35(1), 293-310, 1997.
6. Rezzonico, F., Rupp, O. ve Fahrentrapp, J., Pathogen Recognition in Compatible Plant-Microbe Interactions, *Scientific Reports*, 7, 63-83, 2017.
7. Dickinson, M., Molecular Plant Pathology, BIOS Scientific Publishers, Taylor & Francis Group, s. 273, New York, 2005.
8. Bigeard, J., Colcombet, J. ve Hirt, H., Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI), *Mol Plant*, 8, 521-539, 2015.
9. Agrios, G., Plant Pathology, s. 952, University of Florida, Gainesville, U.S.A., 2005.
10. Jones, J.D., Dangl, J.L., The Plant Immune System, *Nature*, 444, 323–329, 2006.
11. Flor, H.H., Current Status of the Gene-For-Gene Concept, *Annu Rev Phytopathol*, 9, 275-296, 1971.
12. Lam, E., Controlled Cell Death, Plant Survival and Development, Nature Rev Mol Cell Biol., 5, 305-315, 2004.
13. Gebrie S.A., Biotrophic Fungi Infection and Plant Defense Mechanism, *J. Plant Pathol Microbiol*, 7, 378, 2016.
14. Stone, J.K., Necrotroph, In: Encyclopedia of Plant Pathology, OC Maloy, TD Murray (eds.) 2, 81676– 81677, 2001.

**15.** Mendgen, K., Hahn, M., Plant Infection and The Establishment of Fungal Biotrophy, *Trends Plant Sci*, 7 (8), 352–346, 2002.

**16.** Alfano, J.R., Collmer, A., Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall, *Plant Cell*, 8 (10), 1683–1698, 1996.

**17.** Walton J.D., Host-Selective Toxins: Agents of Compatibility, *Plant Cell*, 8 (10), 1723–1733, 1996.

**18.** Yoder, O.C., Toxins in Pathogenesis, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 18, 103-129, 1980.

**19.** Nishimura, S., Kohmoto, K., HST"s and Chemical Structures from *Alternaria* spp., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 21 (1), 87-116, 1983.

**20.** Perfect S.E., Green J.R., Infection Structures of Biotrophic and Hemibiotrophic Fungal Plant Pathogens, *Mol Plant Pathol*, 1 (2), 101–108, 2001.

**21.** Dolar, F.S., ve ark., Fitopatoloji, Anadolu Üniversitesi Yayını, Yayın No 2293, s. 199, Eskişehir, 2011. (https://docplayer.biz.tr/51467516-2-konu-bitkilerde-hastalik-gelisimi.html).

**22.** Dunhin, B. J., ve ark., Description of Spore Stages of *Puccinia sorghi* in South Africa, *South African Journal of Plant and Soil*, 21(1), 48-52, 2004.

**23.** Panstruga, R., Establishing Compatibility Between Plants and Obligate Biotrophic Pathogens, Curr Opin Plant Biol., 6, 320-326, 2003.

**24.** Maffei, M.E., Arimura, G., Mithöfer, A., Natural Elicitors, Effectors and Modulators of Plant Responses, *Nat Prod Rep*, 29(11), 1288–1303, 2012.

**25.** Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D., Plant Disease Resistance Genes, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48, 575-607, 1997.

**26.** Staskawicz B.J., ve ark., Molecular Genetics of Plant Disease Resistance, *Science*, 5(5211), 661–667, 1995.

**27.** 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.

**28.** Venkatesh, B., ve ark., Conversion of cDNA Differential Display Results (DDRT-PCR) into Quantitative Transcription Profiles, *BMC Genomics*, 6, 51, doi:10.1186/1471-2164-6-51, 2005.

**29.** Liang, P., Pardee, A. B., Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction, *Science*, 257, 967–971, 1992.

**30.** Bachem, C. W. B., ve ark., 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), 745-753, 1996.

**31.** Fukumura, R., ve ark., A Sensitive Transcriptome Analysis Method That Can Detect Unknown Transcripts, *Nucleic Acids Res*, 31-94, 2003.

**32.** Bozkurt, O., Unver, T., Akkaya, M. S., Genes Associated with Resistance to Wheat Yellow Rust Disease Identified by Differential Display Analysis, *Physiol Mol Plant Path*, 71, 251-259, 2007.

**33.** Quere R., ve ark., Mining SAGE Data Allows Large-Scale, Sensitive Screening of Antisense Transcript Expression, *Nucleic Acids Res*, 32(20), 163-170, 2004.

**34.** Aharoni A., Vorst O., DNA Microarrays for Functional Plant Genomics, *Plant Mol Biol*, 48, 99-118, 2001.

**35.** Thornton, B., Basu, C., Real-Time PCR (qPCR) Primer Design Using Free Online Software, Bıochem Mol Bıol Edu, 39(2), 145–154, 2011.

**36.** Livak, K.J., Schmittgen, T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25, 402-408, 2001.

**37.** Truesdell, G.M., Dickman, M.B., Isolation of Pathogen/Stress-Inducible cDNAs from Alfalfa by mRNA Differential Display, *Plant Mol Biol*, 33, 737-743, 1997.

**38.** Seehaus, K., Tenhaken, R., Cloning Genes by mRNA Differential Display Induced During the Hypersensitive Reaction of Soybean After Inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Plant Mol Biol*, 38, 1225-1234, 1998.

**39.** Kazan, K., ve ark., DNA Microarrays: NewTools in the Analysis of Plant Defense Response, *Molecular Plant Pathology*, 2(3), 177-185, 2001.

**40.** Wang, X., ve ark., cDNA-AFLP Analysis Reveals Differential Gene Expression in Compatible Interaction of Wheat Challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *BMC Genomics*, 10, 289, 2009.

**41.** Wise, R.P., ve ark., Transcript Profiling in Host-Pathogen Interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 457-479, 2007.

**42.** Lodha, T.D., Basak, J., Plant–Pathogen Interactions: What Microarray Tells About It?, *Mol Biotechnol*, 50, 87–97, 2012.

**43.** Wang, X., ve ark., Gene Expression Profiles in Maize (Zea mays L.) Leaves Inoculation with Southern Corn Rust (*Puccinia polysora* Underw.), *Acta Physiol Plant*, 34, 997, 2012.

**44.** Südüpak, M. A., A cDNA-AFLP Protocol With Reciprocally Arranged 2-Enzyme Sequential Digestion and Silver Staining Detection, Turk J Biol, 38, 260-270 , 2014.

**45.** Majeau, N., Coleman, J.R., Correlation of Carbonic Anhydrase and Ribulose -1.5- Bisphosphate Carboxlase / Oxygenase Expression in Pea, *Plant Physiol*, 104, 1393-1399, 1994**.**

**46.** Kachru, R.B., Anderson, L.E., Chloroplast and Cytoplasmic Enzymes, *Planta*, 118, 235-240, 1974.

**47.** Williams, T.G., Colman, B., Identification of Distinct Internal and External Isozymes of Carbonic Anhydrase in *Chlorella saccharophila*, *Plant Physiol*, 103, 943- 948, 1993.

**48.** DiMario, R.J., ve ark., Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations, Evolution, and Physiological Roles, *Mol. Plant*, 10, 30–46, 2017.

**49.** Slaymaker, D.H., ve ark., The Tobacco Salicylic Acid-Binding Protein 3 (SABP3) is The Chloroplast Carbonic Anhydrase, Which Exhibits Antioxidant Activity and Plays A Role in The Hypersensitive Defense Response, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 11640–11645, 2002.

**50.** Medina-Puche, L., ve ark., β-Carbonic Anhydrases Play A Role in Salicylic Acid Perception in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 12, e0181820, 2017.

**51.** Restrepo, S., ve ark., Gene Profiling of A Compatible Interaction Between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* Suggests A Role for Carbonic Anhydrase, *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 913–922, 2005.

**52.** Zuluaga, A.P., ve ark., Transcriptional Dynamics of *Phytophthora infestans* During Sequential Stages of Hemibiotrophic Infection of Tomato. *Mol Plant Pathol*., 17(1), 29–41, 2016.

**53.** Stiti, N., ve ark., Aldehyde Dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana*: Biochemical Requirements, Metabolic Pathways, and Functional Analysis, *Front Plant Sci.*, 2, 65, 2011.

**54.** Brocker, C., ve ark., Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) Superfamily in Plants: Gene Nomenclature and Comparative Genomics, *Planta*, 237, 189–210, 2013.

**55.** Rejeb, I.B.,, Pastor, V., Mauch-Mani, B., Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms, *Plants*, 3, 458-475, 2014.

**56.** Singh, S., ve ark., Aldehyde Dehydrogenases in Cellular Responses to Oxidative/Electrophilic Stress, Free Radic Biol Med., 56, 89–101, 2013.

**57.** Wang, X., Wang, Y., Hao, W., cDNA cloning and characterization of the novel genes related to aldehyde dehydrogenase from wild Chinese grape (*Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang), *DNA Sequence*, 18(1), 9-18, 2007.

**58.** Kim, N. K., Hwang, B. K., Pepper Aldehyde Dehydrogenase CaALDH1 Interacts with *Xanthomonas* Effector AvrBsT and Promotes Effector Triggered Cell Death and Defence Responses, *J Exp Bot.*, 66(11), 3367–3380, 2015.

**59.** Tsunezoka, H., ve ark., Proteome Analysis of Programmed Cell Death and Defense Signaling Using The Rice Lesion Mimic Mutant Cdr2, *Mol Plant Microbe Interact*, 18, 52–59, 2005.

**60.** Poór, P., ve ark., The Multifaceted Roles of Plant Hormone Salicylic Acid in Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response, *Int. J. Mol. Sci.*, *20*, 5842, 2019.

**61.** Liu, J.X., Howell, S.H., Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants, *Plant Cell*, *22*, 2930–2942, 2010.

**62.** Kørner, C., ve ark., Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Plant Immunity at The Crossroad of Life and Death, *Int. J. Mol. Sci.*,16, 26582–26598, 2015.

**63.** Verchot, J., How Does The Stressed Out ER Find Relief During Virus Infection?, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 17, 74–79, 2016.

**64.** Nawkar, G.M., ve ark., Activation of The Transducers of Unfolded Protein Response in Plants, *Front. Plant Sci.*, 9, 214, 2018.

**65.** Alvim, F.C., ve ark., Enhanced Accumulation of BiP in Transgenic Plants Confers Tolerance to Water Stress, *Plant Physiol*, 126, 1042-1054, 2001.

**66.** Muench, D.G., Molecular Cloning, Expression and Subcellular Localization of A BiP Homolog From Rice Endosperm Tissue, *Plant Cell Physiol*, 38, 404-412, 1997**.**

**67.** Reis, P. A. B., ve ark., The Binding Protein BIP Attenuates Stress Induced Cell Death in Soybean Via Modulation of The N-Rich Protein Mediated Signaling Pathway, *Plant Physiol*, 157, 1853–1865, 2011.

**68.** Liebrand, T.W., ve ark., Endoplasmic Reticulum-Quality Control Chaperones Facilitate The Biogenesis of cf Receptor-Like Proteins Involved in Pathogen Resistance of Tomato, *Plant Physiol*, 159, 1819–1833, 2012.

**69.** Caplan, J. L., ve ark., Induced ER Chaperones Regulate a Receptor-Like Kinase to Mediate Antiviral Innate Immune Response in Plants, *Cell Host Microbe*, 6, 457–469, 2009.

**70.** Wang, D., ve ark., Induction of Protein Secretory Pathway is Required for Systemic Acquired Resistance, *Science*, 308, 1036-1040, 2005.

**71.** Valente, M.A., ve ark., The ER Luminal Binding Protein (BiP) Mediates an Increase in Drought Tolerance in Soybean and Delays Drought-Induced Leaf Senescence in Soybean and Tobacco, *J. Exp. Bot*., 60, 533–546, 2009.

**72.** Park, C. J., ve ark., Elucidation of XA21-Mediated Innate Immunity, *Cell Microbiol*., 12, 1017-1025, 2010.

**73.** Carvalho, H.H., ve ark., The Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events, *Plant Physiol.*, 164, 654-670, 2014.

**74.** Fu, J., Wang, S., Insights into Auxin Signaling in Plant-Pathogen Interactions, *Front Plant Sci.*, 2, 74, 2011.

**75.** Vidhyasekaran, P., Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity, s. 458, Springer Science Media Dordrecht, Springer Netherlands, 2015.

**76.** Kazan, K., Lyons, R., Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors, *Plant Cell*, 26, 2285-2309, 2014.

**77.** Lee, J., Han, C. T., Hur, Y., Molecular Characterization of the *Brassica rapa* Auxin-Repressed, Superfamily Genes, *BrARP1* and *BrDRM1*, *Mol Biol Rep*., 40, 197-209, 2013.

**78.** Zhao, Y., ve ark., Recessive Mutation Identifies Auxin-Repressed Protein ARP1, Which Regulates Growth and Disease Resistance in Tobacco, *MPMI*, 27(7), 638-654, 2014.

**79.** Szick, K., Springer, M., Serres, J.B., Evolutionary Analyses of the 12-kDa Acidic Ribosomal P-Proteins Reveal A Distinct Protein of Higher Plant Ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(5), 2378-2383, 1998.

**80.** Kang, C.H., ve ark., Ribosomal P3 Protein AtP3B of *Arabidopsis* Acts As Both Protein and RNA Chaperone to Increase Tolerance of Heat and Cold Stresses, *Plant Cell and Environ.*, 39, 1631-1642, 2016.

**81.** Ji, C.Y., ve ark., Overexpression of *Arabidopsis P3B* Increases Heat and Low Temperature Stress Tolerance in Transgenic Sweetpotato, *BMC Plant Biol*, 17, 139, doi:10.1186/s12870-017-1087-2, 2017.