



T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

ARPANIN CAS GENİ HOMOLOĞUNUN
KLONLANMASI VE KÜLLEME HASTALIĞINA
KARŞI DİRENÇLİLİKTE EKSPRESYON
SEVİYESİNİN İNCELENMESİ

CANSU SEVİNÇ

Yüksek Lisans Tezi

**ARPANIN CAS GENİ HOMOLOĞUNUN
KLONLANMASI VE KÜLLEME HASTALIĞINA
KARŞI DİRENÇLİLİKTE EKSPRESYON
SEVİYESİNİN İNCELENMESİ**

CANSU SEVİNÇ



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARPANIN CAS GENİ HOMOLOĞUNUN KLONLANMASI VE
KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇLİLİKTE EKSPRESYON
SEVİYESİNİN İNCELENMESİ**

CANSU SEVİNÇ

Yrd. Doç. Dr. FİGEN ERSOY
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2014

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Cansu Sevinç tarafından hazırlanan “Arpanın *Cas* Geni Homoloğunun Klonlanması ve Kütleme Hastalığına Karşı Dirençlilikte Fonksiyonunun Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Figen Ersoy

Başkan: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Serap Çelikler KASIMOĞULLARI
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Elif UZ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

.././...

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

.././.....

Cansu SEVİNÇ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ARPANIN CAS GENİ HOMOLOĞUNUN KLONLANMASI VE KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇLİLİKTE EKSPRESYON SEVİYESİNİN İNCELENMESİ

Cansu SEVİNÇ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY

Bitkilerde hastalığa karşı dirençlilik, bu konu üzerinde çok fazla araştırma olmasına rağmen hala çözümlenmemiş bir konudur. Dayanıklılıkta korunmuş olan elementlere, dirençli bitkilerin geliştirilmesi ve hastalık direncini anlamak için ihtiyaç duyulmaktadır. “Gen için gen dirençliliği” hipotezine göre bitkilerde bulunan R (dirençlilik) proteinleri hastalık yaratan organizmada bulunan Avr (avirulans) proteinini tanımaktadır. Bu tanımadan sonra R proteini bir sinyal iletim mekanizması başlatmakta ve bitkinin aşırı hassas tepki vererek, hidrojen peroksit (H₂O₂) biriktirmesine ve saldırıya uğrayan hücrenin ani ölümüne sebep olmaktadır. Bu durum dirençli bitkide patojenin yayılmasını engellemektedir. Patojenin algılanması ile aşırı hassas tepkinin oluşması arasında bulunan yolak henüz aydınlatılmamıştır.

Arpa *Mla6* geni külleme hastalığı etmeni olan *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) patojenine karşı dirençlilikten sorumlu genlerden biridir. Çalışmada amaç *Hücrel Apoptoz Duyarlılığı* (*CAS*) gen parçasının susturma çalışmalarında kullanılabilmesi için klonlanması ve *Mla6* tarafından sağlanan dirençlilik mekanizması sırasında ekspresyon düzeyinin incelenmesidir. Bu amaca yönelik olarak *Bgh*103 (64/01) izolatu ile enfekte edilmiş Pallas 01 bitkilerinden uygulama sonrasında 6., 12., 24. ve 72. saatlerde örnekler alınarak eş zamanlı PZR reaksiyonu ile transkript seviyeleri tespit edilmiştir. *CAS* transkript seviyesi 12. saat örneğinde 2,5 kat artış göstermiştir ve bu genin *Mla6* tarafından yönlendirilen dirençlilik mekanizmasında rol alma ihtimalini kuvvetlendirmiştir.

Anahtar Kelimeler: CAS, BSMV, Klonlama, Arpa, Külleme, qRT-PCR

2014, ix + 44 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

CLONING OF CAS BARLEY HOMOLOG AND INVESTIGATION OF ITS EXPRESSION DURING POWDERY MILDEW DISEASE RESISTANCE

Cansu SEVİNÇ

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Figen ERSOY

Plant disease resistance is still an unresolved topic although there are many researches on this topic. Conserved elements in resistance are needed for understanding the disease resistance and developing resistant crops. According to ‘‘Gene for gene resistance’’ hypothesis, if a plant is resistant to a certain disease, R (resistance) proteins in plants recognize the Avr (avirulence) protein of the disease causing organism. After this recognition R protein starts a signaling cascade which results in the hypersensitive response; accumulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) and sudden death of the attacked plant cell. This limits the spreading of the pathogen. The pathway between the perception of the pathogen and hyper sensitive response is still not clear.

The barley *Mla6* gene is one of the genes that are responsible for the resistance against the Powdery Mildew fungus *Blumeria graminis f. sp. hordei* (*Bgh*). The main aim in this study is to clone *Cellular Apoptosis Susceptibility* (*CAS*) gene fragment for further silencing experiments and to investigate its expression in *Mla6* mediated disease resistance response. For this purpose *Bgh103* (64/01) infected Pallas 01 plants are used and the *CAS* transcription levels at 6, 12, 24, 72 hpi were measured via qRT-PCR. *CAS* transcript is found to be upregulated 2,5 fold at 12hpi; this supports the idea that this gene might be involved in *Mla6* mediated disease resistance response.

Key Words: CAS, BSMV, Cloning, Barley, Powdery Mildew, qRT-PCR

2014, ix + 44 pages.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım süresince bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Figen Ersoy'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte eğitim gördüğüm ve arkadaşlıkları ile bana moral olan herkese,

Uzun süren uğraşlarda daima yanımda olan ve hayatımı aydınlatan Cemil Koç'a,

Hayatımın her alanında beni doğru yönde etkileyen, manevi desteklerini daima kalbimde hissettiğim ve evlatları olmaktan büyük gurur ve onur duyduğum sevgili annem ve babama,

Çalışmamıza maddi katkıda bulunan TÜBİTAK'a (110T984 nolu "SRP72 ve CAS Genlerinin Arpa Homologlarının Arpada Külleme Hastalığına Karşı Dirençlilikte Fonksiyonlarının Belirlenmesi" isimli proje),

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Cansu SEVİNÇ

.../.../....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Arpa (<i>Hordeum vulgare</i>).....	3
2.2. <i>Blumeria graminis</i>	4
2.3. Külleme Hastalığı (Powdery Mildew Disease).....	6
2.4. Bitkilerde Hastalığa Karşı Dirençlilik.....	8
2.5. <i>Hordeum vulgare</i> – <i>Blumeria graminis</i> Arasındaki İlişki.....	11
2.6. CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility) Proteini.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. CAS Geninin Klonlanması.....	15
3.1.1. Bitki materyali.....	15
3.1.2. Arpa bitkilerinin büyütülmesi	15
3.1.3. Primer hazırlanması	15
3.1.4. Bitkilerden RNA izolasyonu	16
3.1.5. cDNA sentezi	16
3.1.6. PZR reaksiyonu	17
3.1.7. pGEM-T Easy vektörüne bantların klonlanması.....	18
3.1.8. Kompetan <i>E. coli</i> hücrelerinin hazırlanması.....	19
3.1.9. <i>E. coli</i> kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması	19
3.1.10. Plazmit izolasyonu	20
3.1.11. İzole edilen plazmitlerin görüntülenmesi.....	21
3.1.12. DNA sekanslama ve hizalama	21
3.2. CAS Gen Parçasının Susturma Vektörü BSMV Gama'ya Aktarılması	22
3.2.1. Genlerin pGEM-T Easy vektöründen kesilerek çıkartılması.....	22
3.2.2. pγ.bPDS4As vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesimi	22
3.2.3. Genlerin BSMV vektörüne aktarılması.....	24
3.2.4. PZR amplifikasyonu ile klonanan parçaların kontrol edilmesi.....	24
3.3. CAS Geninin <i>Mla6</i> Tarafından Yönlendirilen Dirençlilik Tepkisi Sırasında Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi	25
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi.....	25
3.3.2. <i>Bgh103</i> (64/01) sporunun uygulanması	25
3.3.3. RNA izolasyonu	25
3.3.4. RNA kalitesinin ve konsantasyonunun belirlenmesi	25
3.3.5. cDNA sentezi	26
3.3.6. Eş zamanlı PZR uygulaması	26
4. BULGULAR	28
4.1. Arpa Yapraklarından Total RNA İzolasyonu	28
4.2. PZR Reaksiyonu	28

4.3. CAS Gen Parçasının pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	29
4.4. CAS Gen Parçasının Nükleotid ve Protein Sekansı Hizalamaları.....	30
4.5. CAS Gen Parçasının Susturma Vektörü BSMV Gama'ya Aktarılması	32
4.6. CAS Geninin <i>Mla6</i> Tarafından Yönlendirilen Dirençlilik Tepkisi Sırasında Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi	33
5. SONUÇ	35
KAYNAKLAR	37
EKLER.....	42
EK 1. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması	42
1. Agaroz Jel Hazırlanması	42
2. LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı Hazırlanması	42
3. LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması.....	42
EK 2. Sekanslama Sonuçları	43
1. Nükleotid Sekansı (201bç).....	43
2. Protein sekansı (66 amino asit)	43
ÖZGEÇMİŞ	44

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
γ	Gama
ΔCT	Delta Eşik Döngüsü
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre

Açıklama

Kısaltmalar

Avr	Avirülans
bç	Baz çifti
Bgh	<i>Blumeria graminis hordei</i>
Bkz	Bakınız
BSMV	Arpa Çizgili Mozaik Virüsü
CaCl ₂	Kalsiyum klorid
CAS	Hücrel Apoptoz Duyarlılığı
ddH ₂ O	Duble Distile Su
CC	Coiled coil
DEPC	Dietilpirokarbonat
dk	Dakika
dNTP	Deoksi-nükleotid trifosfat
dsRNA	Çift sarmal RNA
DTT	Dithiothreitol solüsyon
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EtBr	Etidyum Bromür
FAO	Gıda ve Tarımcılık Organizasyonu
h	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hpi	İnokülasyon sonrası geçen saat
HR	Aşırı Hassas Tepki
qRT-PZR	Kantitatif Eş Zamanlı PZR
LRR	Leusin Zengin Bölge
mg	Milligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
NB	Nükleotid Bağlanma
ng	Nanogram
p	Plazmit

Açıklama

PDS
pmol
PZR
R
RNA
Rpm
sn
TBE
U
Ubi
UV

Fitoen Desaturaz
Pikomol
Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Dirençlilik
Ribo Nükleik Asit
Dakikada devir
Saniye
Tris-Borik Asit-EDTA
Ünite
Übiküitin
Mor ötesi

ŞEKİLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. FAO'ya göre dünyadaki arpa üretiminin 2011 yılı verileri	4
Şekil 2.2. <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> yaşam döngüsü	5
Şekil 2.3. Arpa yaprağında <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> enfeksiyonu.....	6
Şekil 2.4. <i>Bgh</i> gelişimi	7
Şekil 2.5. R-Avr etkileşimine göre dirençlilik	9
Şekil 2.6. R proteinlerinde görülen motif yapıları.	10
Şekil 2.7. <i>Hordeum vulgare</i> – <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> etkileşimi	13
Şekil 3.1. pGEM-T Easy vektörü ve sekans referans noktaları	19
Şekil 3.2. BSMV vektörleri.....	22
Şekil 3.3. BSMV pγ.bpds4As vektörü restriksiyon enzimi kesim noktaları.....	23
Şekil 4.1. Pallas01 bitkisinden izole edilen total RNA görüntüsü	28
Şekil 4.2. PZR amplifikasyonu sonucunda <i>CAS</i> gen parçasının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	29
Şekil 4.3. pGEM-T Easy rekombinantlarının <i>PacI</i> ve <i>NotI</i> kesimi sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü	30
Şekil 4.4. Klonlanmış parçanın nükleotid hizalama sonucu	30
Şekil 4.5. Klonlanmış parçanın protein hizalama sonucu	31
Şekil 4.6. pγ.bpds4As vektörü <i>PacI</i> ve <i>NotI</i> enzimleri ile kesimi sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü	32
Şekil 4.7. pγ-CAS-As rekombinantlarının PZR sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü	33
Şekil 4.8. Arpa <i>CAS</i> (<i>CSE1</i>) transkript seviyelerinin <i>Mla6</i> tarafından oluşturulan hastalığa dirençlilik sırasında 4 farklı zaman için gösterimi	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. <i>CAS</i> geninin arpadan çoğaltılması için kullanılan primerler	18
Çizelge 4.1. <i>CAS</i> geninin ekspresyon seviyelerinin analizi	34

1.GİRİŞ

Arpa dünyada ekim alanı açısından ve ekonomik olarak buğday, pirinç ve mısırdan sonra gelen çok önemli bir tahıl bitkisidir. Arpa, ülkemizde tarla ürünleri arasında ekiliş alanı bakımından buğdaydan sonra gelmektedir. Buğday gibi ülkemizin tüm bölgelerinde yetiştirilmektedir. Ancak viral ve fungal hastalıklar, arpanın verimi ve niteliğini azaltmaktadır. Arpa fungal hastalıklarından en önemlisi külleme hastalığıdır. Külleme hastalığı bitkilerin en yaygın hastalıklarından biri olup binlerce tek çenekli ve çift çenekli bitkiyi hasta etmektedir (Jørgensen 1988, Zhou ve ark. 2001). Bu yüzden tahıllarda ürün verimini arttıracak çalışmalar çok önemlidir (Cakir ve ark. 2010).

Patojen tarafından salgılanan çeşitli ürünlerin bitkiler tarafından algılanması kabul gören bir hipotezdir. Bitkilerde bazal dirençlilik hücre duvarının kalınlaşması, patojenin bitki hücresine girişinin ve gelişiminin bitki tarafından engellenmesi şeklinde olmaktadır. Kalıcı dirençlilik için bazal dirençlilik elde edilmesi önemlidir.

Bir bitki belirli bir hastalığa karşı dirençli ise; bitkilerde bulunan R (dirençlilik) proteinleri hastalık yaratan organizmada bulunan Avr (avirülans) proteinini tanır. Bu mekanizmaya “gen için gen dirençliliği (gene for gene resistance)” denilmektedir (Flor 1971). Bu tanımadan sonra R proteini bir sinyal iletim mekanizması başlatır. Bitkilerde hastalığa karşı dirençlilik sırasında ilk sentezlenen kimyasallardan birisi hidrojen peroksittir (H_2O_2) ve hidrojen peroksit birikimi enfekte olan bitki hücresinin ölümüne sebep olur ve patojenin diğer hücrelere yayılmasını engeller. R-Avr proteinlerinin etkileşiminden sonra aktive olan sinyal iletim mekanizması ise henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

CAS (Hücresel Apoptoz Duyarlılığı) proteininin arpada fonksiyonu henüz gösterilmemiştir. CAS insanda hem hücresel programlanmış hücre ölümünde hem de üreme de rol oynadığı gibi kanserde de rol almaktadır (Brinkmann ve ark. 1996, Scherf ve ark. 1996). CAS proteininin buğdayda ise programlanmış hücre ölümünde görev yaptığı düşünülmektedir. Bitkilerde hastalığa karşı dirençlilikte bitkinin verdiği “Aşırı Hassas Tepki” ani bir hücre ölümüdür. Bu sebeple bir R proteini ile etkileşime giren CAS proteininin hastalığa karşı dirençlilikte rol alan bir protein olduğu düşünülmektedir (Yildirim-Ersoy ve ark. 2011).

Bu tez çalışmasında CAS gen parçasının klonlanarak susturma çalışmalarında kullanılmak üzere BSMV γ plazmitine klonlanması ve Mla6 proteini tarafından yönlendirilen dirençlilik tepkisi sırasında CAS geninin ekspresyonundaki değişimlerin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Böylece dirençlilik sırasında aktive olan yolda rol alma ihtimali güçlenmiş olacaktır.

Bu tez çalışmasında birinci amaç bitkilerde dirençlilik mekanizmasında R-Avr proteinlerinin etkileşimi ile hastalığın tanınması ve bitkilerin dirençlilik göstermesinde rol alan genel sinyal iletim mekanizmasının aydınlatılmasıdır. Dirençlilik mekanizmasının aydınlatılmasında atılan her adım; bitkilerde kalıcı dirençlilik oluşturulmasına ve bitkilerin bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine katkıda bulunacaktır. Çalışmadan elde edilen sonuçların, ülkemizde ve bütün dünyada sorun olan bitki hastalıklarına karşı çözüm üretilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

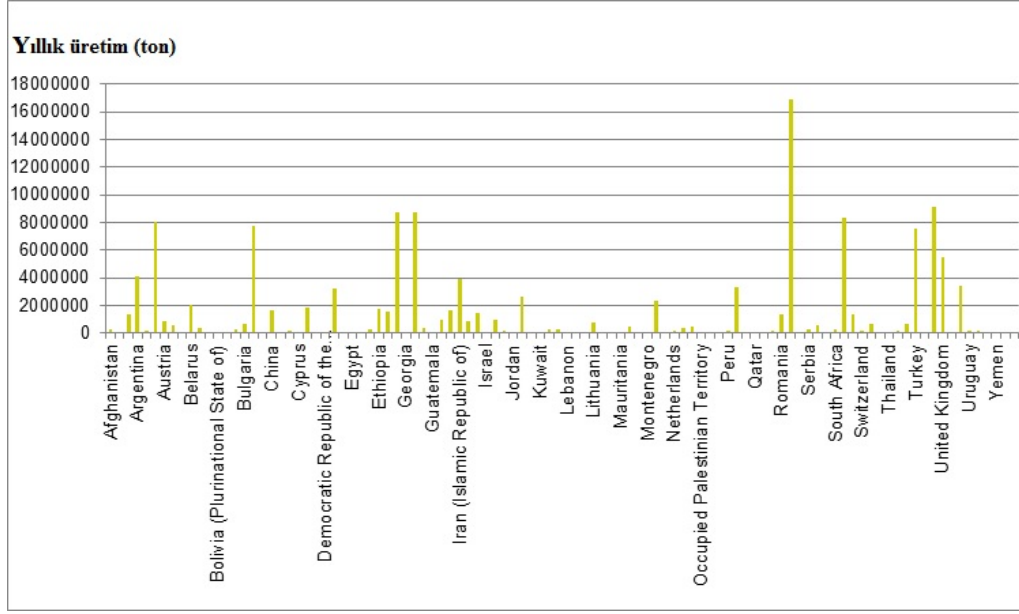
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arpa (*Hordeum vulgare*)

Arpa, ülkemizde buğdaydan sonra en çok kültürü yapılan bitki cinsi olup, kültür bitkileri içerisinde ilk kültüre alınan cinslerdendir. Günümüzde kültürü yapılan ve ekonomik öneme sahip olan arparın tamamı *Hordeum vulgare* adı altında toplanır. Arpa temel gıda olarak buğdaydan alt sıralarda yer almasına rağmen, yüksek tuz yoğunluğu, kuraklık ve verimsiz toprak gibi şiddetli çevre koşullarına dayanabilir ve farklı iklimlere çok iyi adapte olabilir (Zohary 2001). Bugün dünyada ekimi yapılan arpanın %65'i hayvan yemi olarak, %33'ü maltlık olarak bira ve viski yapımı ile biyodizel üretiminde, %2'si de insan besini olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Baik ve ark. 2008). Gıda ve Tarımcılık Organizasyonu'na (FAO) göre 2011 yılı verilerinde Türkiye arpa üretiminde dünyada 8. sıradadır (Şekil 2.1).

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), başak yapısına ve sıra sayısına göre kategorize edilmiş bir ot ailesi üyesidir. *Hordeum vulgare* iki alt türe sahiptir; *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (yabani arpa) ve *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* (kültürü yapılan arpa). Kültür arparı başaktaki tane sayılarına göre;

1. *Hordeum vulgare* var. *distichon*: iki sıralı arpar
2. *Hordeum vulgare* var. *hexastichon*: altı sıralı arpar olmak üzere iki varyeteye sahiptir.



Şekil 2.1. FAO'ya göre dünyadaki arpa üretiminin 2011 yılı verileri (<http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>)

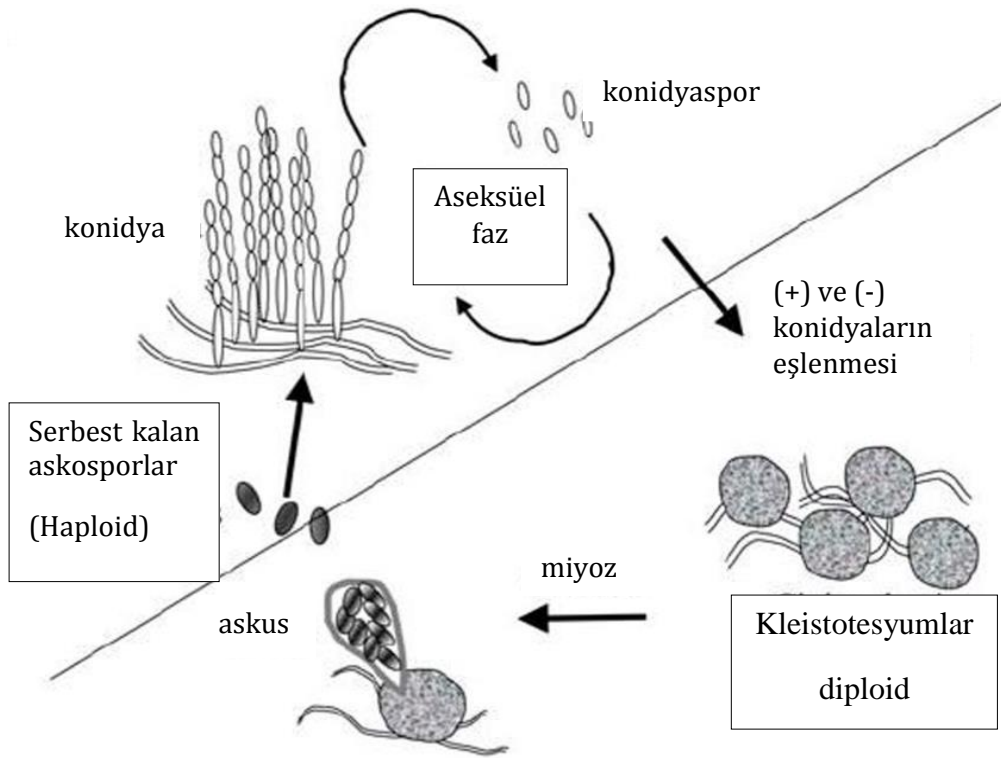
2.2. *Blumeria graminis*

Külleme hastalığı olarak da bilinen *Blumeria graminis*, dünya çapında monokotillerin farklı varyeteleri ve dikotil bitkiler üzerinde hastalığa yol açan zorunlu bir parazittir (Ing 1990). *Blumeria graminis* enfekte etmek ve gelişmek için, nispeten soğuk ve nemli çevre koşullarını tercih etmektedir (Soovali ve ark. 2006). Konakçı epidermis hücrelerinde büyür, çoğalır ve besinini konakçı bitkinin hücrelerinden direkt olarak veya emeçler (haustoryum) vasıtasıyla almaktadır (Ridout ve ark. 2006). Çoğalma konidya aracılığı ile olmaktadır. Konidya kendini konakçı üzerine yerleştirmekte ve yedi ila on gün arasında olgunlaşmaktadır (Braun ve ark. 2002).

Blumeria ailesi üyeleri *Poacea* ot familyasını etkilemek için konakçı seçiminde yüksek özgünlük oluşturmaktadır (Eichman ve ark. 2008). Bugüne kadar *Blumeria graminis* patojeninin farklı ot familyası üyelerini enfekte edebilen sekiz farklı taksonomik grubu belirlenmiştir (Braun ve ark. 2002). *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh), *Hordeum vulgare* bitkisini enfekte edebilen bir alttürdür (Wyand ve ark. 2003). *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* dışında yulaf (f. sp. *avenae*), çavdar (f. sp. *secalis*), salkım otu (*poae*), delice otu (*lolii*) ve kılçık brom (*bromi*) gibi bitkileri enfekte edebilen diğer alt gruplar da bulunmaktadır (Inuma ve ark. 2007).

Verimi ve ekonomik olarak yararı azalttığı için, tarım aşamalarında *Blumeria graminis* kontrol altında tutulmalıdır (Dean ve ark. 2012). Arpanın ekonomik önemi göz önüne alındığında, *Bgh*'nin en yoğun şekilde çalışılan külleme hastalığı etmeni olduğu söylenebilir (Zhang ve ark. 2005). Halen *Blumeria graminis* fungusunun enfeksiyon kapasitesini azaltmak için fungusitler kullanılmaktadır. Ancak fungus bu kimyasallara karşı hızlı bir şekilde dirençli hale gelmektedir. Bu nedenle bir sonraki çalışmalar bitkiyi bu patojenden korumak için yapılmalıdır (Glawe 2008).

Bgh yaşam döngüsü Şekil 2.2'de özetlenmiştir. Fungus haploid evrede canlı konakçıya bağımlıdır ki bu evrede askospor şeklinde dağılmıştır ve arpa epidermis hücrelerinde büyüyüp yayılmaktadır. Konidyasporların (+) ve (-) tipleri, diploit kleistotesyumlar oluşturmak için birbirleriyle birleşirler.



Şekil 2.2. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* yaşam döngüsü Fungus gelişiminin haploid ve diploit evreleri diyagonal çizgi ile ayrılmıştır. Fungus konidiaların epidermis yüzeyi boyunca dağılık olduğu aseksüel evrede bitkiye karşı tamamen obligattır ve epidermis hücrelerinden beslenmesiyle koloni oluşturur (Ridout ve ark. 2006)

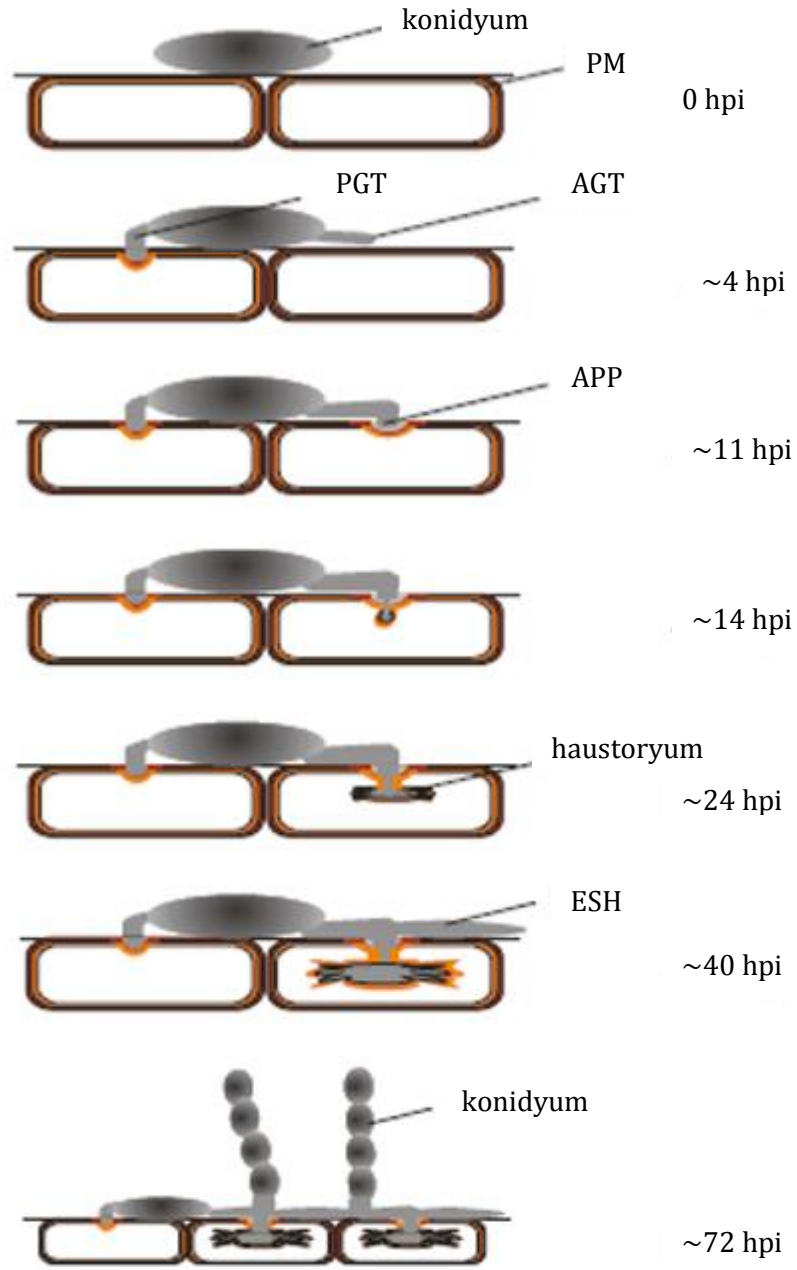
2.3. Külleleme Hastalığı (Powdery Mildew Disease)

Erysiphales takımında bulunan funguslar bitkilerde külleleme hastalığına neden olmaktadır. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* bu takım içerisinde arpa bitkisini etkileyen fungustur (Wyand ve ark. 2003). Bitki yapraklarını kaplayan beyazımsı kadifemsi görünüm külleleme hastalığının en karakteristik özelliklerinden biridir (Eichman ve ark. 2008). Eşaysız dönemde oluşturdukları zincir şeklindeki konidler bitki dokuları üzerinde beyaz bir misel ve konid örtüsü oluşturdukları için bitki üzerine kül serpilmiş gibi bir görünüm ortaya çıkar (Şekil 2.3). Mevsim sonunda kül benzeri tabaka üzerinde siyah noktacıklar halinde etmenlerin eşeyli çoğalma organları olan kleistotesyumlar oluşur.



Şekil 2.3. Arpa yaprağında *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* enfeksiyonu (Anonim, 2013)

Şekil 2.4 fungal gelişimin epidermis dokularında nasıl yer aldığını şematikselsel olarak açıklamaktadır. Konidyum haploid evresini 5-6 günde tamamlamaktadır. Şekilde görüldüğü üzere, hastalık ilerlemesi, birincil çim tübü (primary germ tube, PGT) ve apresorial çim tübü'nün (appressorial germ tube, AGT) konidya oluşumlarında çimlenme ile başlamaktadır. Bunu takiben AGT'nin genişlemesi ile apresoryum (APP) oluşmaktadır. Eğer fungus konak hücreye başarılı bir şekilde penetrasyon gerçekleştirirse, konak hücreden besin elde etmek amacıyla beslenme organı olan haustoryumu geliştirmektedir. Sonrasında uzamış ikincil hifler, yeni konidya jenerasyonlarına öncülük etmek üzere yaprak yüzeyinde bulunmaktadır (Thordal - Christensen ve ark. 2000).



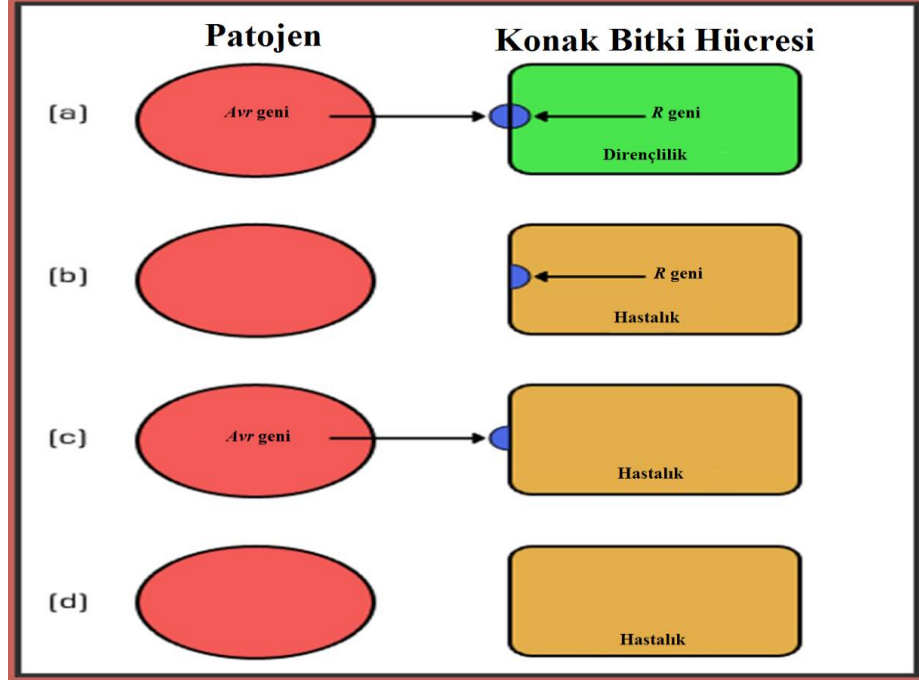
Şekil 2.4. *Bgh* gelişimi (Thordal – Christensen ve ark. 2000) Kısaltmalar: AGT, apresoryal çim tübü; APP, apresoryum; ESH, ikincil hif uzaması; hpi, enfeksiyon sonrası saat; PGT, birincil çim tübü; PM, plazma zarı

2.4. Bitkilerde Hastalığa Karşı Dirençlilik

Bitkilerde bulunan hastalık direnç mekanizması, konakçı bitkinin pestisit, fungus, bakteri ve virüslerden korunması için çok büyük önem taşımaktadır (Brunner ve ark. 2012). İnsanlara ve hayvanlara göre bitkiler daha sade bağışıklık sistemine sahiptirler çünkü bitkiler gezici bağışıklık hücrelerinden yoksundurlar ve patojenleri algılamak için bir dolaşım sistemleri bulunmamaktadır (Spoel 2012). Bunun yerine bitki hücreleri, her hücre için, doğal bağışıklık sistemini ve enfeksiyon bölgelerinden başlayan sistemik sinyalleri kullanmaktadır (Ausubel 2005).

Patojen, bitki ile ilk defa etkileşime girdiğinde, patojen ilişkili moleküler kalıplar (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) üretmektedir (Dubery ve ark. 2012). PAMPs, konak bitkide türetilmiş desen tanıma reseptörleri (Pattern- Recognition Receptors, PRRs) tarafından tanınmaktadır (Spoel ve ark. 2012). Adapte olan patojenler karşı koymak için bitki savunma mekanizmalarını baskılayan efektör moleküller kullanmaktadır (Jones ve ark. 2006). Patojenlerle beraber ortak bir evrim sürecinde, bitkiler efektör moleküllere karşı koymak için hücre içi bağışıklık reseptörlerini geliştirmişlerdir (Spoel ve ark. 2012). Dolayısıyla efektörlerle tetiklenen bağışıklık sisteminin üstesinden gelinmiştir.

H.H. Flor'un keten ve keten pası *Melanspora lini* üzerindeki öncül çalışmaları, bitkilerdeki dayanıklılığı sağlayan her bir gene karşı, patojende bu gene denk gelen ve virülensliği kontrol eden bir genin bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Bitkide direnci sağlayan gen *R* geni olarak, patojende virülensliği sağlayan gen ise *Avr* geni olarak ifade edilmektedir (Flor 1971) (Şekil 2.5). *R* geni genelde patojenleri tanıma ve büyümesini engelleme görevlerini yapmaktadır. Eğer bitki belirli bir hastalığa karşı dirençli ise, bitkilerde bulunan *R* proteinleri hastalık yaratan organizmada bulunan *Avr* proteinlerini tanır. Bu mekanizmaya “gene karşı gen dirençliliği” (gene for gene resistance) denir (Flor 1971).



Şekil 2.5. *R-Avr* etkileşimine göre dirençlilik a) bitki *R* genini ve patojen *Avr* genini taşıdığında dirençlilik gözlenir b) bitki *R* genini taşır ama patojende *Avr* geni olmadığı için dirençlilik gözlenmez c) patojen *Avr* geni içerse de bitkide *R* geni bulunmadığından dirençlilik gözlenmez d) bitki ve patojenin birbirlerini tanıması için gerekli olan *R* ve *Avr* geni olmaması durumunda dirençlilik gözlenmez (http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/PlantPathology/infection/image_pages/gene4gene.htm)

R genleri bitki genomu içinde bulunan, *R* proteinlerini üreterek patojenlere karşı bitki hastalık direnci taşıyan genlerdir. Bitki dayanıklılık (*R*) proteinlerinin oluşturdukları protein yapıları araştırıldığında dayanıklılık proteinlerinin “domain” adı verilen özel alanlardan oluştuğu ve bu özel alanların biyokimyasal fonksiyonlarına bakılarak dayanıklılık genlerinin 3 sınıfta toplandığı görülmektedir (Şekil 2.6):

- Birinci sınıf dayanıklılık genleri nükleotidlerin bağlandığı yer (Nucleotide Binding Site, NBS) ve lösin amino asidince zengin tekrarların olduğu (Leucine Rich Repeats, LRR) protein motifleri içermektedir (Dangl ve ark. 2001). LRR bölgeleri, düzenli aralıklarla lösin ya da başka hidrofobik birimler ile yaklaşık 24 aminoasit uzunluğundaki motiflerin seri ve çoklu tekrarlarıdır. Bazıları da düzenli aralıklarla yerleştirilmiş prolinler ve argininler içerebilir. LRR bölgeleri protein-protein etkileşimlerinde görev alır ve direnç genleri arasında en çok varyasyon LRR bölgesinde oluşur (Zhang ve ark. 2003, DeYoung ve ark.2006).

b) İkinci sınıf dayanıklılık proteinleri hücre yüzeyinde reseptör benzeri membran geçişini sağlayan heliks (receptor-like transmembrane) proteinleri ve reseptör benzeri kinaz (receptorlike kinases) proteinleri içermektedirler. Bu proteinlerin genel özelliği hücre dışına uzanan lösün zengini tekrarlardan meydana gelen (ekstre hüresel-LRR: eLRR) protein domainlerin bulunmasıdır (Çalış 2011).

c) Son sınıf dayanıklılık proteinleri yukarıda belirtilen protein motiflerini yada bir protein domaini içererek yapısal olarak ilk 2 sınıfa benzemektedir. Ancak proteinlerin yapısal bazı farklılıkları bu dayanıklılık proteinlerinin yeni protein yapısı kazanmasını sağlamaktadır (Şekil 2.4.2.). Yapısal olarak başka tipi olmayan birer örnekle tanımlanan bu dayanıklılık proteinleri ilk 2 protein sınıfı ile kolayca mukayese edilebilir (Çalış 2011).

Çekinik karakterde olan arpa *mlo* dayanıklılık geni arpa külleme hastalık etmenlerine, *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, karşı dayanıklılığı sağlamakta olup MLO proteinini yedi adet transmembran heliks domain içermektedir (Buschges ve ark. 1997).

R protein sınıfı	Şekilsel domain yapısı	Öngörülen fonksiyonu	Örnek dayanıklılık proteini	Referans
NBS-LRR		Reseptör	N, L	Lawrence <i>et al.</i> , 1995, Whitman <i>et al.</i> , 1994
		Reseptör	RPM1, RPS2	Bent <i>et al.</i> , 1994, Grant <i>et al.</i> , 1995
		Reseptör	RRS1-R	Deslands <i>et al.</i> , 2002, Yamasaki <i>et al.</i> , 2005
eLRR		Reseptör	C9, RPP27	Jones <i>et al.</i> , 1994, Tor <i>et al.</i> , 2004
		Reseptör	Xa21, Xa26	Song <i>et al.</i> , 1995, Sun <i>et al.</i> , 2004
Tipik olmayan		Konukçuda hedef	Pto, PBS1	Martin <i>et al.</i> , 1993, Swiderski and Innes, 2001
		Bilinmiyor	RPW8	Xiao <i>et al.</i> , 2001
		Bilinmiyor	Xa27	Gu <i>et al.</i> , 2005
		Döllenme	Xa13	Chu <i>et al.</i> , 2006
		Negatif regülör	MLO	Buschges <i>et al.</i> , 1997

Şekil 2.6. R proteinlerinde görülen motif yapıları TIR: Toll and interleukin-1 reseptör, NBS: Nükleotidlerin bağlandığı domain (nucleotide binding site), eLRR: Hücre dışına uzanan leucine zengin tekrarlar (extracellular leucine rich repeats), CC: sarmal protein (coiled coil) domain, W: WRKY domain, Kin: Serine-thyronine içeren kinase, TM: membran geçişini sağlayan heliks (transmembrane helix) domain (Çalış 2011)

Aşırı hassas tepki (Hypersensitive response, HR) bitkilerin patojenlere karşı kendilerini savunmada kullandıkları en önemli mekanizmalardan biridir. Mikrobiyal patojenlerin enfeksiyonunu önlemek için bitkiler tarafından kullanılmaktadır. Patojen enfeksiyonu sonucu patojenin girdiği noktadan itibaren konakçı bitki hücrelerinin hızla ölecek nekrotik bir durum alması olarak ifade edilir (Heath 2000, Freeman 2003). İlk aşamada, *R* genlerinin aktivasyonu sonucu, potasyum ve klor iyonları hücre içinden dışarıya sızmakta, bunların yerine kalsiyum ve hidrojen iyonları hücre içine girmektedir. İkinci aşamada hücreler, reaktif oksijen türlerini (süperoksit anyonları, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, nitröz oksit) kullanarak oksidatif yanıklık oluşturmaktadırlar (Matthews ve ark. 2007). Patojen istilasının ardından konakçı hücre ne kadar hızlı ölürse, bitki enfeksiyona karşı o kadar dirençlidir.

Klasik reseptör-elisitör modelinin basit sürümü, *R* proteini ve karşılık gelen *Avr* proteini arasında doğrudan bir etkileşim olduğunu öngörmektedir. Ancak, *R* ve *Avr* proteinlerin çok sayıda setleri ile yapılan yoğun çalışmalar, iki doğrudan etkileşimi ortaya koymuştur. *R*-*Avr* etkileşiminin kanıtlanabilir olmayışı, Van der Biezen ve Jones tarafından “guard hipotezi” formülasyonuna yol açmıştır (Tang ve ark. 1996, Jia 2000). Bu model, *R* proteinlerinin, *Avr* proteinlerinin hedefi olan bekçi proteinleri koruduğunu ya da onlarla etkileştiğini önermektedir. *Avr* proteini bekçi protein ile etkileştiğinde, *R* geni müdahaleyi algılar ve direnci etkinleştirir (Van der Biezen ve ark. 1998). Çeşitli deneyler bu hipotezi desteklemektedir. Örneğin *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki *Rpm1* geni, *P. Syringae* patojenindeki birbiriyle tamamen ilgisiz iki avirulans faktöre karşı yanıt verebilme yeteneğindedir. Bekçi protein *Avr* proteinleri tarafından hiperfosforile edilen RIN4’tür (Shao ve ark. 2003).

2.5. *Hordeum vulgare* – *Blumeria graminis* Arasındaki İlişki

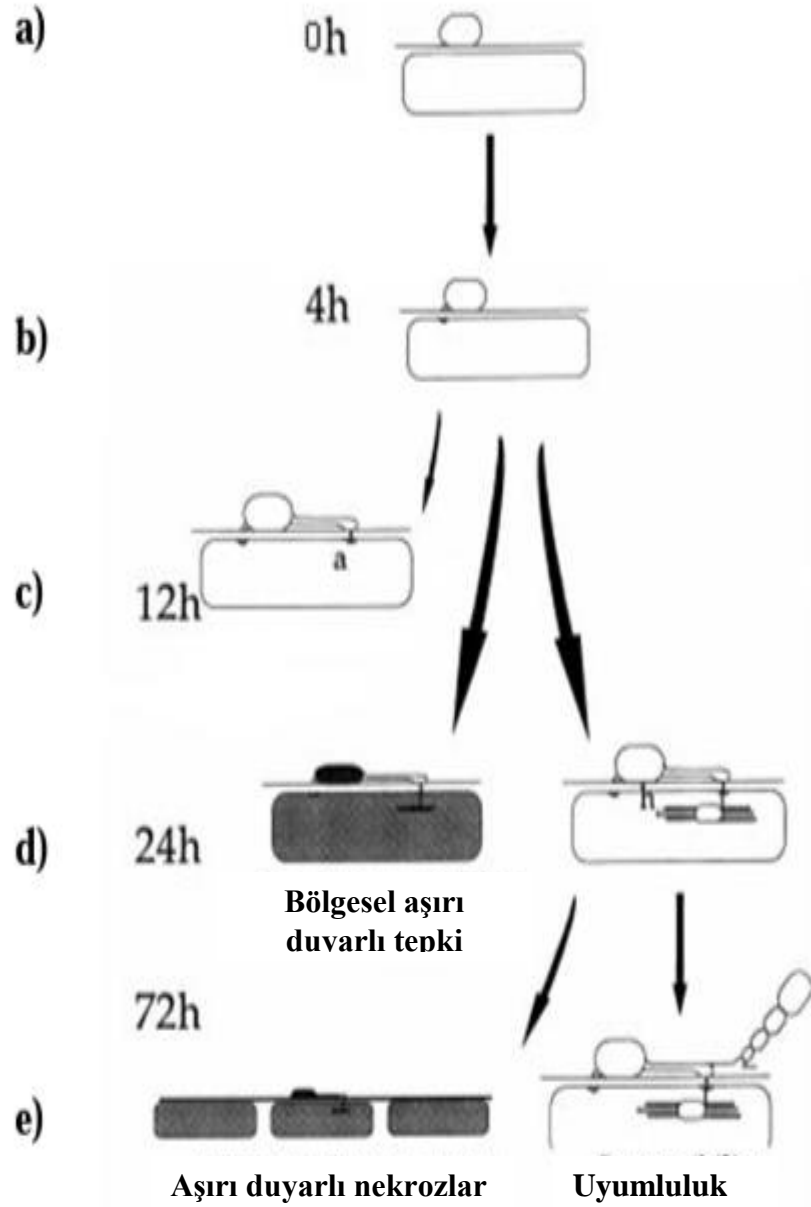
Arpa-*Bgh* etkileşimiyle ilgili olarak, birçok bitki *R* geni ve patojen *Avr* geni bulunmuştur ve ilişkilerinin gen için gen hipotezini geliştirdiği söylenmektedir. Bitki *R* proteini, uyumlu olan *Avr* molekülü yardımıyla patojeni tanıdığına, aşırı hassas tepki de denilen programlanmış hücre ölümü ile patojenin daha fazla büyümesini engellemektedir (Jones ve ark. 2006).

Bgh patojeninin aseksüel yaşam döngüsü sporların arpa yaprak yüzeyine düşmesiyle başlamaktadır. Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında fonksiyonel olan birçok proteinin, patojenin yaprak üzerine düşmesinden sonra aktive olduğunun bulunması; protein sentezi ve katlanması gibi depo moleküllerin katabolizması için patojenin hazırlık yaptığını kanıtlamaktadır (Noir ve ark. 2009; Bindschedler ve ark. 2009). Spor çimlenmesinden sonra, patojen hücre duvarından girerek apresoryumlar gelişme gösterir (Şekil 2.5.). Patojenin yaprak yüzeyine yaptığı adhezyon, uzun zincirli aldehytlerin ve epikutikular alkanların salınmasına yol açmaktadır (Feng ve ark. 2009).

Sporun yaprakta yerleşmesinden sonra en önemli adım başlamaktadır ki bu, epiderminin ilk hücresinin ele geçirilmesidir. Patojenin konakçı hücre içine girebilmesi için, arpa mutlaka *Mildew lokus O (Mlo)* genine sahip olmalıdır (Büschges ve ark. 1997). Buna ek olarak, diğer konakçılar örneğin; *Arabidopsis thaliana* (Consonni ve ark. 2006), domates (Bai ve ark. 2008), ve bezelye (Humphry 2011) de *Mlo* geni varlığında patojen tarafından ele geçirilebilmektedir. Bu durum hastalık için ortak bir mekanizmanın olduğunu göstermektedir. *Mlo* gen ürünleri, bitkiye özel integral membran proteinleridir ancak biyokimyasal rolü hala tam olarak bilinmemektedir (Devoto ve ark. 1999). *Mlo* gen ürünleri, *in vivo* (Bhat ve ark. 2005) ve *in vitro* (Kim ve ark. 2002) koşullarda kalsiyum bağımlı kalmodulin bağlanmasına olanak sağlayan C-terminal sitoplazmik kalmodulin bağlanma domaini içerir. 12-24 saat aralığındaki fungal penetrasyonda arpada *Mlo* bağlanan kalmodulin sayısı artmaktadır (Bhat ve ark. 2005).

Farklı arpa türü farklı *Bgh* patojenlerine hassastır. R ve Avr etkileşimi özel bir ilişkidir. Örneğin: pallas01(Mla6); *Bgh95(53/01)* (AvrMla1) patojenine karşı hassas olduğu halde *Bgh103(64/01)* (AvrMla6) patojenine karşı dayanıklıdır.

Çalışmada kullanılan dirençlilik proteini Mla6; CC-NB-LRR tipinde bir dirençlilik proteini olup %91,2 oranında Mla1 proteinine benzemektedir. Mla6 proteini hastalığa karşı dirençlilikte *RAR1* geni ile birlikte çalışmaktadır (Halterman ve ark. 2001) ve AvrMla6 proteinini tanıyarak hastalığa karşı dirençlilik tepkisini başlatmaktadır.



Şekil 2.7. *Hordeum vulgare* – *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* etkileşimi a) Fungus hücre yüzeyinde yer alır. b) 4 saat sonra, fungus hücre duvarının içinde yoğun papilla oluşumuna neden olur. c) 12 saat sonra, apresorial çim tübü hücreyi penetre etmeye çalışır (a ile işaretlenmiştir.) d) 24 saat sonra aşırı hassas tepki dirençli hücrede hücre ölümüne neden olur. Duyarlı konakçıda ise haustorya yapısı oluşur. e) 72 saat sonra, dirençli konakçıda geniş çapta çok hücreli aşırı hassas nekrozlar meydana gelir. Duyarlı hücrede, patojen gelişmeye devam eder (Collinge ve ark. 1993)

2.6. CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility) Proteini

Moleküler biyolojideki CAS/CSE protein ailesi, memeli hücrelerinde apoptoz duyarlılık (CAS) proteinleri ve maya kromozom ayrılma proteinlerini (CSE1) içeren bir protein ailesidir (Brinkmann ve ark. 1995). CAS proteini hem hücrel apoptozda hem de üreme de rol oynadığı gibi ayrıca kanserde de rol almaktadır (Brinkmann ve ark. 1996, Scherf ve ark. 1996). CAS proteininin ekspresyonu hücrel üremeye bağlantılı iken, CAS tükenmiş hücrelerde apoptoz önlenmektedir. CAS, hücre döngüsünde G1-S aralığında fonksiyonu olan ve iyi bilinen birçok kanser geninin aksine, kromozomların doğru ayrılmasını sağlayan mitotik kontrol noktasında önemlidir (Brinkmann 1998). CAS (CSE1) mitotik kontrol noktası için zorunlu bir proteindir ve mikrotübül ağı ve mitotik iğ iplikleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Scherf ve ark. 1996). Hücre çekirdeğinde CAS importin metabolik yolunda nükleer transport faktörü olarak rol oynamaktadır (Kutay ve ark. 1997). İportin metabolik yolu, mitoz ve daha fazla gelişme için önemli olan birçok proteinin hücre çekirdeğine taşınmasına aracılık etmektedir. CAS proteininin, bu proteinlerin taşınmasına olan rolünden dolayı hücre döngüsünü etkilediği düşünülmektedir (Kutay ve ark. 1997). Birçok proteinin (P53 ve transkripsiyon faktörleri gibi) hücre çekirdeğine girmesi apoptoz için gerekli olduğundan, CAS proteininin bu önemli proteinlerin en azından alt kümelerinin hücre çekirdeğine girmesini kolaylaştırmasıyla apoptoza olanak sağladığı önerilmektedir (Brinkmann 1998).

CAS proteininin programlanmış hücre ölümü ile ilişkisi ve buğdayda bir dirençlilik proteini ile etkileşime girmesi bitkilerde hastalığa karşı dirençlilikte rol alması ihtimalini kuvvetlendirmektedir (Yildirim-Ersoy ve ark. 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. CAS Geninin Klonlanması

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada kullanılan külleme suşları (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh103*(64/01)) petri kabında, bitki materyali (Pallas01) ise tohum olarak, ODTÜ Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mahinur Akkaya'dan temin edilmiştir. Çalışmalar sadece laboratuvar koşullarında yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan bitki materyali Pallas01 (*Mla6* dirençlilik genini içermektedir) *Bgh103*(64/01) sporu için dirençli tür olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Arpa bitkilerinin büyütülmesi

Çalışmada CAS gen parçasının klonlanması için kullanılan bitki materyali Pallas01 arpa türüdür. Tohumlar musluk suyu ile ıslatılmış filtre kağıdı arasında nemli ortamda 3 gün karanlıkta bekletildikten sonra, çimlenme gözlemlenen tohumlar toprağa aktarılmıştır. Toprağa aktarıldıktan sonra bitki büyütme kabininde bitkiler 14 gün boyunca; 18°C'de 12 saat gündüz ve 12°C'de 12 saat gece fotoperiyodu uygulanmıştır. Uygun koşulların sağlanması için bitki büyütme dolabı (JSPC-30°C) kullanılmıştır. 14 gün sonunda bitkilerden yaprak örnekleri toplanarak RNA izolasyonuna başlanmıştır.

3.1.3. Primer hazırlanması

Homoloji analizinde literatürde bulunan gen sekansları kullanılarak ClustalX programı yardımı ile sekanslar hizalanmış ve korunmuş olan bölgelerin sekans bilgisinden yararlanılarak CAS geninin çoğaltılması için primer çiftleri hazırlanmıştır. Hazırlanan primerlere *PacI* ve *NotI* restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklenerek ilerleyen çalışmalarda klonlanabilmesi için uygun hale getirilmiştir. Hazırlanan primerler, arpadan izole edilmiş olan RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesinden sonra PZR için kullanılmıştır.

3.1.4. Bitkilerden RNA izolasyonu

RNA izolasyonu üreticinin hazırladığı prosedüre göre TRIzol (Invitrogen) kullanılarak yapılmıştır.

Homojenizasyon: 100 mg bitki örnekleri sıvı azot kullanılarak 1 mL TRIzol reaktifi içerisinde 2 mL'lik steril tüplerde parçalanarak homojenize edilmiştir.

Faz ayırımı: Homojenize edilen örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlanmış, 1 mL TRIzol reaktifi için 0,2 mL kloroform eklenmiştir. Tüplerin kapakları iyice kapatılıp 15 sn boyunca elle kuvvetlice çalkalayarak karıştırılmış, 2-3 dk oda ısısında bekletilmiş ve 20 dk 4°C'de 15 000 rpm de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası karışım dipte kırmızı, fenol kloroform fazına, bir ara faza ve renksiz sıvı bir üst faza ayrılmıştır. RNA bu üst fazda bulunur ve bu üst fazın hacmi kullanılan TRIzol hacminin %60'ı kadardır.

RNA çökeltmesi: Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarılmış ve izopropil alkolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Homojenizasyon esnasında kullanılan TRIzol reaktifinin yarısı kadar izopropil alkol eklenmiştir. Örnekler oda ısısında 10 dk bekletilip daha sonra 15 000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir.

RNA yıkaması: Üst faz uzaklaştırılmış ve RNA çökeltisi %75'lik etanol ile bir kez yıkanmıştır. Kullanılan her 1 mL TRIzol reaktifi için 1 mL etanol kullanılmıştır. Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5 dk 10 000 rpm de 4°C'de santrifüj edilmiştir.

RNA çözülmesi: İşlemler sonunda RNA 5-10 dk kurumaya bırakılmıştır. RNA 30 µL steril su ile çözülmüş ve 10 dk 55-60°C'de bekletilip kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.1.5. cDNA sentezi

RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra cDNA sentezi işlemine geçilmiştir. Bu işlemin sağlıklı yapılabilmesi için de, olası DNA ve protein kalıntıları RNA örneklerinden uzaklaştırılmıştır. Bunun için RNA örneklerinden 10 µg alınarak 10 ünite RNase içermeyen DNaseI ile 20 µL'lik reaksiyon hacminde toplanmış ve 37°C'de 30 dk

tutularak 65°C'de 10 dk ek inkübasyon ile toplam RNA örnekleri DNA'dan arındırılmıştır. Daha sonra DNase muamelesi yapılmış olan RNA örnekleri 2,5 M LiCl ile -20°C'de inkübe edilerek çöktürülmüş ve 4°C'de, 15 000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak toplanmıştır. Çöken RNA %70'lik etil alkol ile yıkanarak daha önceden DEPC ile muamele edilmiş olan ddH₂O ile çözülmüştür. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop ND-2000 spektrofotometre ile 1µL örnek kullanılarak ölçülmüştür. RNA'nın düzgünlüğü %1'lik formaldehit-agaroz jelde elektroforez ile kontrol edilmiştir.

DNA'dan arındırılmış olan RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için aşağıdaki prosedür takip edilmiştir: 200 µL'lik steril PCR tüpünde; 9 µL mRNA, 1µL 10mM dNTP mix ve 1 µL 10 pmol/µL oligo dT konulduktan sonra 5 dk 65°C'de inkübe edilip, buzun üstünde beklemeye alınmıştır. Karışımın üstüne 4µL 5X birinci sarmal tampon çözeltisi (Invitrogen), 2 µL 0,1 M DTT (Invitrogen), 1 µL RNase out 40 U/µL (Invitrogen) ve 1µL Superscript III 200 U/µL (Invitrogen) konulduktan sonra reaksiyon 10 dk 25°C'de, 1 saat 42°C'de gerçekleştirilip, 70°C'de 15 dk inkübe edilerek enzim inaktivasyonu yapılmıştır.

Burada ürün olarak elde edilmiş olan tek zincir cDNA daha sonra kalıp DNA olmak üzere primerler kullanılarak susturulması planlanan genlerin arpadan çoğaltılması için kullanılmıştır. PZR reaksiyonunun koşulları oluşturulan primerlere göre optimize edilmiştir. PZR reaksiyonu sonucunda çoğaltılan gen parçaları agaroz jelde yürütülmüştür.

3.1.6. PZR reaksiyonu

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 1X PZR Tampon çözeltisi (75 mM Tris-HCl 25°C'de pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, %0,01 (v/v) Tween20), 0,25 mM dNTP karışımı (DNAmP), 1,5 mM MgCl₂ (DNAmP), 1 ünite *Taq* DNA polimeraz, 15 pmol ileri primer, 15 pmol geri primer ve steril distile su son hacim 20 µL olacak şekilde karıştırılmıştır.

PZR döngü koşulları: 94°C’de 2 dk başlangıç denatürasyonu, 35 döngü; 94°C’de 30 sn, 50°C’de (optimizasyon sonrasında en iyi çalışan bağlanma sıcaklığı olarak tespit edilmiştir) 30 sn ve 72°C’de 1 dk yapıldıktan sonra en son 5 dk 72°C’de tutularak tamamlanmıştır. Kullanılan primerlerin sekansları Çizelge 3.1’de gösterilmektedir. PZR ürünleri %1’lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Çizelge 3.1. CAS geninin arpadan çoğaltılması için kullanılan primerler

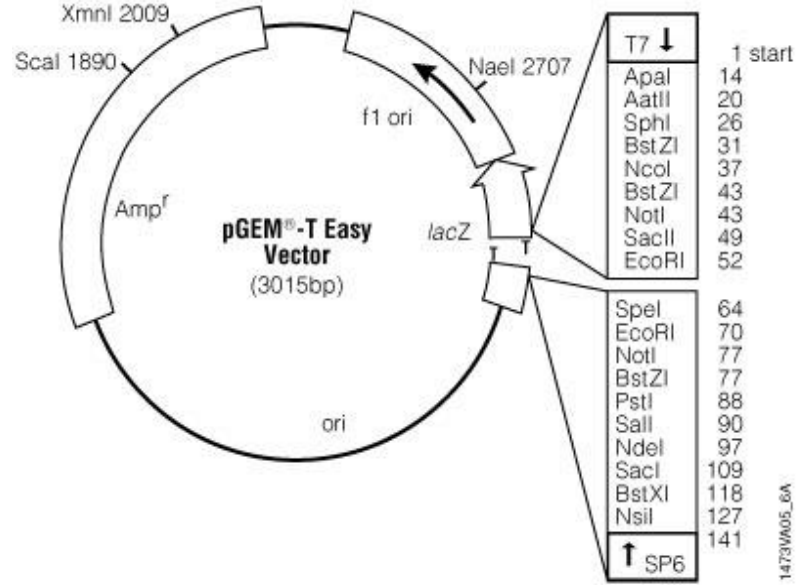
Primerler	Sekans (5'den 3'e)
CAS-F-Pac I	CACTTAATTAAGGAGTGCTCTCTTTACTCGCT
CAS-R1-Not I	CATGCGGCCGCCAAGAGAACCTTTGATCAAC

3.1.7. pGEM-T Easy vektörüne bantların klonlanması

Kesilen bantlar “Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit” kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde jelden temizlenmiştir.

Kesilen jel parçası tartılarak, 3 birim tampon QG 1 birim jele eklenmiştir (100mg~100µL). Tüp 10 dk 50°C’de inkübe edilmiştir (jel tamamen çözünene kadar). 1 birim izopropanol eklenerek karıştırılmıştır. DNA’nın bağlanması için, örnekler QIAquick kolonuna yüklenmiş ve 1 dk 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Akışkan kısım atılarak, QIAquick kolon tekrar aynı toplama tüplerinin içine yerleştirilmiştir. 0,5 mL tampon QG, QIAquick tampona eklenerek 1 dk 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Yıkamak için, 0,75 mL tampon PE QIAquick kolona eklenmiş ve 13 000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Akışkan kısım atılarak, QIAquick kolon 1 dk daha 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. QIAquick kolon 1,5 mL’lik temiz mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve DNA’yı ayırtmak için 50 µL tampon EB, QIAquick membranın ortasına eklenerek 1 dk santrifüj yapılmıştır.

Agaroz jelden izole edilen bantlar pGEM-T Easy (Promega) vektörüne (Şekil 3.1.2) klonlanmıştır. 6 µL çözünmüş DNA, 5 ng pGEM-T Easy vektörü (Promega), 1X ligaz tampon çözeltisi (Promega) ve 2 ünite T4 DNA ligaz enzimi (Promega) son hacim 10 µL olacak şekilde PZR tüpüne konulmuştur. Karışım gece boyunca 4°C’de (yaklaşık 18 saat) inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1.1. pGEM-T Easy vektörü ve sekans referans noktaları

(<http://www.xenbase.org/reagents/vectorAction.do?method=displayVectorSummary&vectorId=8716564>)

3.1.8. Kompetan *E. coli* hücrelerinin hazırlanması

Kompetan hücreler Fredrick ve ark. (1994) prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. Tek koloni *E. coli* DH5- α hücresi 2 mL LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Hücreler 37°C’de 250 rpm’de gece boyunca büyütülmüştür. Gece boyunca büyüyen hücrelerden 1 mL alınarak 100 mL LB sıvı besiyerine aktarılmış, hücreler 37°C ve 250 rpm’de A590 9nm değeri 0,375 oluncaya kadar büyütülmüştür. Kültür iki adet 50 mL önceden soğutulmuş tüpe bölünerek 10 dk buzda bekletilmiş ve 7 dk 3 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Çözelti döküldükten sonra çöken hücreler 5 mL soğuk CaCl₂ (4 mM) solüsyonunda çözülmüştür. Hücreler 5 dk 2 500 rpm’de santrifüj edilerek çökertilmiş ve çözelti dökülmüştür. Her bir çökeltiye 2 mL soğuk CaCl₂ (4 mM) solüsyonu eklenerek hücreler tekrar 5 dk 2 500 rpm’de santrifüj edilmiş ve çözelti kısmı dökülerek çöken hücreler 1,6 mL soğuk CaCl₂ (4 mM) solüsyonunda çözülmüştür. 24 saat boyunca buzda bekletildikten sonra hazır olan hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

3.1.9. *E. coli* kompetan hücrelere ligasyon ürününün aktarılması

E. coli DH5- α kompetan hücrelerine klonlanmış DNA parçası içeren pGEM-T Easy vektörü üretcinin tavsiye ettiği şekilde aktarılmıştır. Steril 2 mL tübe 5 mL ligasyon ürünü, 0,02M β -Merkaptoetanol ve 30 mL *E. coli* DH5- α kompetan hücre eklenmiştir.

Karışım 30 dk buzda bekletildikten sonra 42°C’de 45 sn ısı şoku uygulanmıştır. Hücrelerin üzerine 100 mL LB sıvı besiyeri eklenerek 37°C’de 45 dk büyütülen hücreler 2 dk buzda bekletildikten sonra LB agar besiyerine ekilerek gece boyunca 37°C’de büyütülmüştür. Transformasyon, hücrelerin ampisilin içeren (LB ampisilin 50 µg/mL) ortamda büyümesi ve X-Gal (80 µg/mL) kimyasalının substrat olarak kullanımı (IPTG(100 µg/mL)) ile aktive edilen β Galaktosidaz aktivitesi sebebiyle mavi kolonilerin oluşması ile kontrol edilmiştir. Beyaz koloniler seçilerek hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

3.1.10. Plazmit izolasyonu

Plazmidler “QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit” kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edilmiştir.

2 mL bakteri kültürü alınıp 5 dk 15 000 rpm’de santrifüj edilerek toplanmıştır. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı dökülerek, tüp ters düz edilmiş ve fazlalık oluşturan maddeleri uzaklaştırmak için kağıt havlu ile kurutulmuştur. Tüpe tampon P1 (250 µL) eklenerek ve hücre peleti vorteks yapılarak tamamen akıcı hale getirilmiştir. Tampon P2 (250 µL) eklenerek ve tüp dört kere yavaşça ters düz edilerek karıştırılmış, yaklaşık 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklere N3 solüsyonu (350 µL) eklenerek, dört sefer ters düz edilerek karıştırılmıştır. Örnek tüpler 10 dk 15 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Lizat temizlenerek üstteki faz dönme kolonuna transfer edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dk 15 000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.

Santrifüjden sonra, toplama tüpündeki alt faz atılarak toplama tüpü geri çıkartılmıştır. 750 µL Kolon Yıkama solüsyon tamponu PE dönme kolonuna eklenerek oda sıcaklığında 1 dk 15 000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Akışkan kısım atılarak toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiş ve 1 dk daha santrifüj yapılarak kalan yıkama tamponu tamamen uzaklaştırılmıştır. Dönme kolonu içeriği 1,5 mL yeni steril bir tübe aktarılmış, plazmid DNA’sı 50 µL tampon EB (elution buffer) eklenerek ve 1 dk 15 000 rpm’de santrifüj yapılarak ayrıştırılmıştır. İzole edilen plazmid DNA’sı -20°C’de saklanmıştır.

3.1.11. İzole edilen plazmitlerin görüntülenmesi

DNA'nın plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *PacI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir. 5 µL plazmit DNA'sı, 1X NE Tampon Çözeltisi (New England Biolabs), 1 Ünite *PacI* ve 1 ünite *NotI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37°C'de 3 saat bekletilmiş ve örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

3.1.12. DNA sekanslama ve hizalama

İzole edilen plazmidler (600 ng) M13 geri primeri kullanılarak ABI prism-310 Genetic Analyzer kullanılarak sekanslatılmıştır.

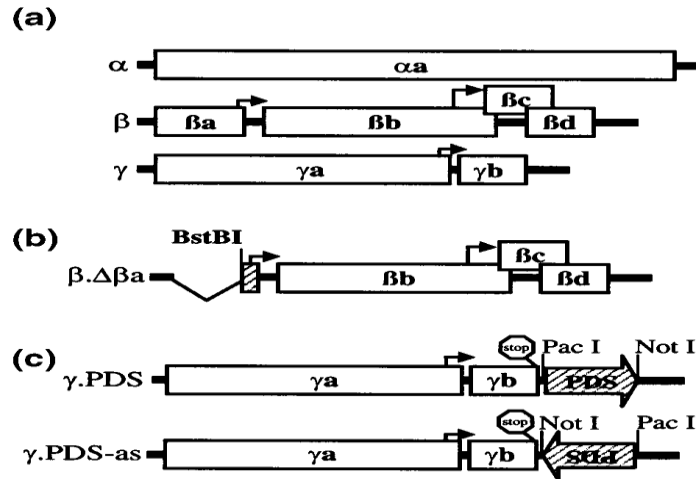
3.2 CAS Gen Parçasının Susturma Vektörü BSMV Gama'ya Aktarılması

3.2.1 Genlerin pGEM-T Easy vektöründen kesilerek çıkartılması

pGEMT Easy vektörüne klonlanmış olan CAS gen parçası öncelikle restriksiyon enzimi içeren primerler kullanılarak çoğaltılıp klonlandıkları için bu enzimler ile kesilerek yeni vektöre aktarılmaları sağlanmıştır. pGEM-T Easy plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *PacI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir. 5 µL plazmit DNA'sı, 1X NE Tampon Çözeltisi (New England Biolabs), 1 ünite *PacI* ve 1 ünite *NotI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37°C'de 3 saat bekletilmiş ve örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Kesilen bantlar "Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit" kullanılarak jelden ayrıldıktan sonra (Bölüm 3.1.7) klonlama yapmak üzere *PacI* ve *NotI* ile kesilmiş BSMV gama vektörüne ligaz enzimi ile yapıştırılmıştır.

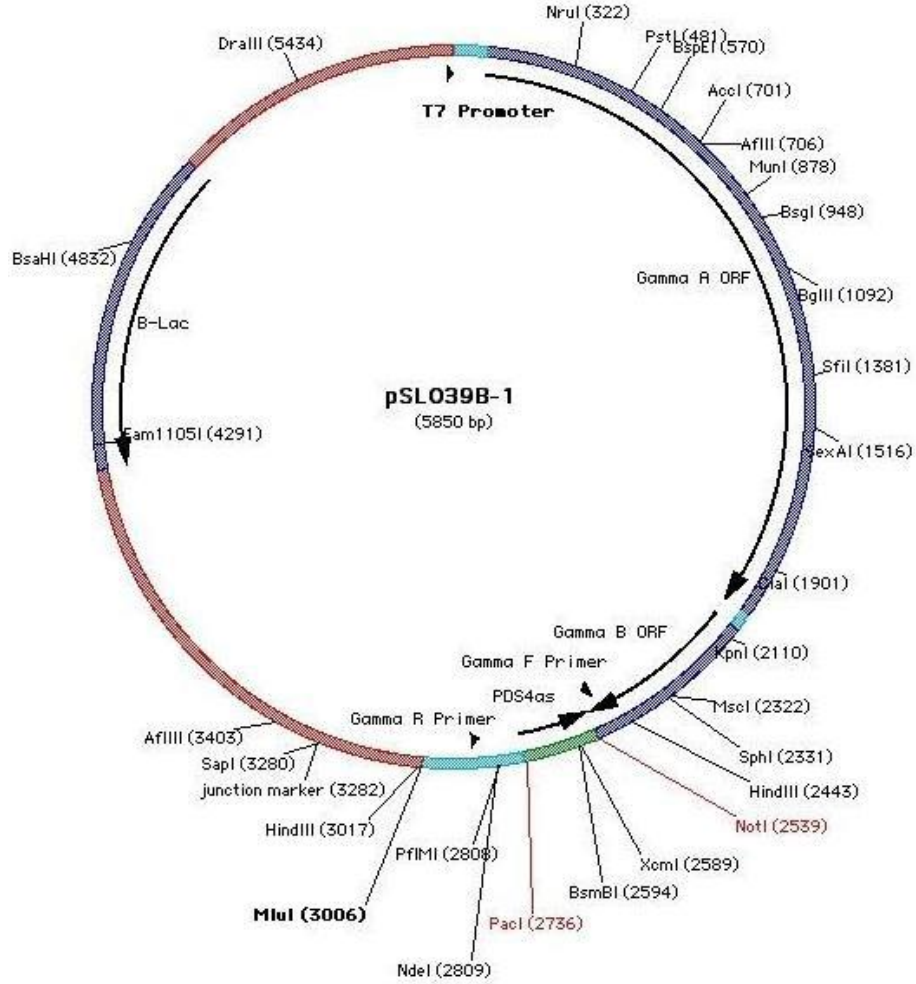
3.2.2 pγ.bPDS4As vektörünün restriksiyon enzimleri ile kesimi

BSMV vektörleri pα, pβΔβa, pγ ve pγ.bPDS4S (sense yönünde) ve pγ.bPDS4As (anti-sense yönünde) (Şekil 3.1.2.) Prof. Dr. Mahinur Akkaya'dan temin edilmiştir.



Şekil 3.1.2. BSMV vektörleri (Holzberg ve ark. 2002)

Klonlanma için kullanılan *py.bpds4As* vektörünün restriksiyon haritası Şekil 3.1.3'te gösterilmektedir. *PacI* ve *NotI* enzimleri kullanılarak kesim sonucunda *pds4* gen parçası çıkartılarak yerine ilerleyen çalışmalarda susturulması planlanan *CAS* gen parçası klonlanmıştır.



Şekil 3.1.3. BSMV *py.bpds4As* vektörü restriksiyon enzimi kesim noktaları *NotI* ve *PacI* enzimleri kullanılarak *PDS4* gen parçası çıkartılarak susturulması planlanan genlerin parçaları bu bölgeye klonlanabilmektedir (Öztürk 2012)

py.bpds4As vektörü *PacI* ve *NotI* enzimleri ile kesilerek agaroz jelde yürütülmüştür. 5 µL plazmit DNA'sı, 1X NE Tampon Çözeltilisi (New England Biolabs), 1 ünite *PacI* ve 1 ünite *NotI* restriksiyon enzimleri (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 37°C'de 3 saat bekletilmiş ve örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Kesim sonrasında içinden *pds4* geni çıkartılan yapışkan uçlu vektör (*py*) agaroz jelden kesilerek "Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit" kullanılarak protokolüne uygun şekilde temizlenmiştir (Bölüm 3.2.1.).

3.2.3. Genlerin BSMV vektörüne aktarılması

2 µL jelden temizlenmiş plazmit DNA'sı (pγ), 6 µL jelden temizlenmiş klonlanacak CAS gen parçası, 1X NE Tampon Çözeltisi (MBI Fermentas), 1 ünite DNA ligaz (MBI Fermentas), son hacim 10 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışım 4°C'de gece boyunca bekletilmiş ve ertesi gün kompetan *E. coli* DH5-α hücrelerine aktarılmıştır (Bölüm 3.1.8., 3.1.9.). Transformasyon, hücrelerin ampisilin içeren (LB ampisilin 50 µg/mL) ortamda büyümesi ile kontrol edilmiştir. Büyüyen hücrelerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmidler "QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit" kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edilmiştir (Bölüm 3.1.10.).

3.2.4 . PZR amplifikasyonu ile klonanan parçaların kontrol edilmesi

İzole edilen plazmidler (pγ-CAS-As) CAS geninin primerleri (Çizelge 3.1.) kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve plazmitlerin içinde bu parçaların olduğu gösterilmiştir.

200 µL steril PZR tüpünün içerisinde 1X PZR Tampon çözeltisi (75 mM Tris-HCl 25 °C'de pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, %0,01 (v/v) Tween20), 0,25 mM dNTP karışımı (DNAm), 1,5 mM MgCl₂ (DNAm), 1 ünite *Taq* DNA polimeraz, 15 pmol ileri primer, 15 pmol geri primer ve steril distile su son hacim 20 µL olacak şekilde karıştırılmıştır.

PZR döngü koşulları: 94°C 2 dk başlangıç denatürasyonu, 35 döngü; 94°C'de 30 sn, 50°C'de (optimizasyon sonrasında en iyi çalışan bağlanma sıcaklığı olarak tespit edilmiştir) 30 sn ve 72°C'de 1 dk yapıldıktan sonra en son 5 dk 72°C'de tutularak tamamlanmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde de görüntülenmiştir.

3.3 CAS Geninin *Mla6* Tarafından Yönlendirilen Dirençlilik Tepkisi Sırasında Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi

3.3.1.Bitkilerin büyüülmesi

Çalışmada CAS geninin ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılan bitki materyali Pallas01 arpa türüdür. Tohumlar musluk suyu ile ıslatılmış filtre kâğıdı arasında nemli ortamda 3 gün karanlıkta bekletildikten sonra, çimlenme gözlemlenen tohumlar toprağa aktarılmıştır. Toprağa aktarıldıktan sonra bitki büyüme kabininde bitkilere 14 gün boyunca; 18°C’de 16 saat gündüz ve 8 saat gece fotoperiyodu uygulanmıştır.

3.3.2. *Bgh103(64/01)* sporunun uygulanması

Her bitkiden iki parça yaprak alınmış ve iki ayrı besiyerine (%1 Benzimidazol içeren %15’lik agar) aynı yapraktan alınan örnekler yerleştirilmiştir. Birinci besiyerindeki yapraklara *Bgh103(64/01)* patojeni uygulanırken ikinci besi yerindeki yapraklara mok uygulama yapılmıştır (negatif kontrol grubu).

Yapraklar 16 saat ışık, 8 saat karanlıkta ve %60 nem oranında bitki büyüme dolabı içinde tutulmuştur. Enfeksiyondan sonra 6. saat, 12. saat, 24. saat ve 72. saatlerde hem kontrol hem de hastalık uygulanan bitkilerden örnekler alınmıştır.

3.3.3. RNA izolasyonu

6. saat, 12. saat, 24. saat ve 72. saat örneklerinden (külleme uygulanmış dirençli yapraklar) ve her saat için alınan kontrol yapralarından (mok uygulama) toplam 8 adet RNA izolasyonu üreticinin hazırladığı prosedüre göre TRIzol (Invitrogen) kullanarak yapılmıştır (Bölüm 3.1.4)

3.3.4. RNA kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop ND-2000 spektrofotometre ile 1µL örnek kullanılarak ölçülmüştür. RNA’nın kalitesi: 230/260 ve 260/280 oranı ~1,6 - 2,00 olan RNA örnekleri qRT-PZR için kullanılmıştır. RNA örnekleri -80°C’de saklanmıştır.

3.3.5 cDNA sentezi

Bölüm 3.1.5.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.3.6. Eş zamanlı PZR uygulaması

Tek ilk iplik cDNA 1/20 oranda sulandırılarak konsantrasyonu 50 ng/ μ L olacak şekilde ayarlanmıştır. Hedef genlerin hastalık uygulamasından sonra dirençli bitkide transkriptinin kontrole göre ne kadar değiştiğini saptamak için eş zamanlı PZR (qRT-PZR) kullanılmıştır.

CAS geninin transkript seviyesini belirlemek için 5'-AGCAATGCTACTTGGGATCG-3' ileri primer ve 5'-GCTGCTGCGTGAAAATAGAC-3' geri primer olarak tasarlanmıştır. qRT-PZR reaksiyonları üçer kez tekrarlı olarak yapılmıştır. RNA miktarının normalizasyonu için iki referans gen, Übikütin ve Uzama (Elongation) Faktörü 1 α primerleri kullanılmıştır (Übikütin İleri Primeri: 5'-GCCGCACCCTCGCCGACTAC-3', Übikütin Geri Primeri 5'-CGGCGTTGGGGCACTCCTTC-3'; Uzama (Elongation) Faktörü 1 α ileri primeri 5'-ATGATTCCCACCAAGCCCAT-3', Uzama (Elongation) Faktörü 1 α geri primeri 5'-ACACCAACAGCCACAGTTTGC-3'). Normalizasyon analizi iki transkriptin deneysel koşullar altında sürekli ifade edildiğini göstermektedir ve her cDNA örneği için normalizasyon faktörünü oluşturmaktadır (Vandessompele ve ark. 2002). (geNorm program v3.5; <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>)

4,6 μ L ddH₂O, 5 μ L cDNA (50 ng/ μ L), 0,1mM ileri ve geri primer kullanılmıştır. 10 μ L SYBR yeşil karışımı (SybrGreen JumpStart™ Taq Ready mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) her reaksiyona eklenmiştir. PZR döngü koşulları 95°C'de 4 dk, 30 döngü; 94°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 saniyedir.

Erime eğrisi primerlerin dimer oluşturup oluşturmadığını görmek için analiz edilmiştir. Normalizasyon sonrası genlerin ekspresyonundaki farklılıklar Delta eşik döngüsü (Δ CT-treshold cycle) değerlerine göre formül 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

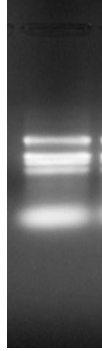
$$\text{Kat deęiřimi} = \frac{(E_{\text{hedef gen}})^{\Delta C_p \text{ Hedef gen (kontrol- örnek)}}}{(E_{\text{Referans gen}})^{\Delta C_p \text{ Referans gen (kontrol- örnek)}}$$

3.1

4. BULGULAR

4.1. Arpa Yapraklarından Total RNA İzolasyonu

Pallas01 bitkisinden cDNA hazırlanması için RNA izolasyonu ‘‘TRIZol (Invitrogen)’’ kullanılarak yapılmıştır. Spektrofotometre ile RNA konsantrasyonu ölçüldükten sonra RNA’nın bütünlüğünün saptanması için örnek %1 formaldehit-agaroz jelinde tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).

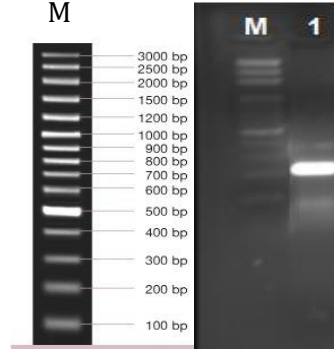


Şekil 4.1. Pallas01 bitkisinden izole edilen total RNA görüntüsü

Bir ters transkriptaz enzimi olan ‘‘Superscript III (Invitrogen)’’ kullanılarak RNA’dan tek zincirli cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

4.2. PZR Reaksiyonu

CAS gen parçasının çoğaltılması için hazırlanmış olan primerler kullanılarak (Çizelge 3.1.) PZR gerçekleştirilmiş ve genler arpadan kısmi olarak çoğaltılmıştır. CAS gen parçası için beklenen parça boyu 201 bp’dir. Çoğaltma sonuçları, etidyum bromür ile boyanmış %1’lik agaroz jelinde tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



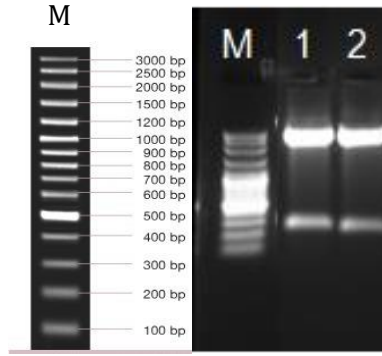
Şekil 4.2. PZR amplifikasyonu sonucunda *CAS* gen parçasının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. **1:** *CAS*-201bç, **M:** Moleküler ağırlık markörü (VC 100bp plus DNA ladder, Vivantis)

Agaroz jelden *CAS* gen parçasını içeren bant kesilerek “Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit” kullanılarak jelden arındırılmıştır.

4.3. *CAS* gen parçasının pGEM-T Easy vektörüne klonlanması

Temizlenen *CAS* gen parçası pGEM-T Easy (Promega) vektörüne (Şekil 3.1.1.) DNA ligaz kullanılarak klonlanmıştır. Klonlama sonrasında ligasyon ürünü kompetan *E. coli* hücrelerine aktararak, transforme olmuş hücreler ampisilin içeren (LB ampisilin 50 µg/mL) ortamda büyütülerek ve rekombinant vektör ise β Galaktosidaz aktivitesi kullanılarak seçilmiştir. β Galaktosidaz aktivitesi göstermeyen beyaz koloniler seçilerek plazmit izolasyonu için kullanılmıştır.

Plazmidler “QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit” kullanılarak izole edildikten sonra *CAS* gen parçasının plazmit DNA'sına entegre olduğunu göstermek için plazmit DNA'sı *PacI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Beklenen boydaki bantlar (201 bç) agaroz jelde tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. pGEM-T Easy rekombinantlarının *PacI* ve *NotI* kesimi sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü. 1 ve 2 nolu kuyucuklar: PGEM-T Easy/CAS-201bç, M: Moleküler ağırlık markörü (VC 100bp plus DNA ladder, Vivantis)

İzole edilen plazmidler (600 ng) M13 geri primeri kullanılarak ABI prism-310 Genetic Analyzer kullanılarak sekanslatılmıştır.

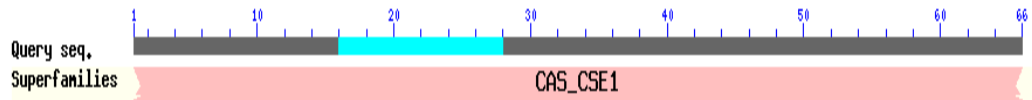
4.4. CAS gen parçasının nükleotid ve protein sekansı Hizalamaları

Sekansların doğruluğunun tespiti için Gen Bankası CAS gen parçasına ait nükleotid ve protein sekansları kullanılarak NCBI Blast ile taranmıştır (Şekil 4.4., Şekil 4.5.).

Download		GenBank		Graphics	
Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIAshv2147N18					
Sequence ID: dbj AK372187.1 Length: 3450 Number of Matches: 1					
Range 1: 2455 to 2655		GenBank		Graphics	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
372 bits(201)	7e-100	201/201(100%)	0/201(0%)	Plus/Plus	
Query	1	GGAGTGCCTCTTTACTCGCTTACAGACTAGGCCAAGCAGTTAAGTTTGTGAACCTCTCTTG	60		
Sbjct	2455	GGAGTGCCTCTTTACTCGCTTACAGACTAGGCCAAGCAGTTAAGTTTGTGAACCTCTCTTG	2514		
Query	61	TGGTGGTCATGTCCTTGGTGTCAAGTATGGGCCAGGTGTTCTTGTCAAGTCTCTGTTG	120		
Sbjct	2515	TGGTGGTCATGTCCTTGGTGTCAAGTATGGGCCAGGTGTTCTTGTCAAGTCTCTGTTG	2574		
Query	121	ATACGATTCAGCCGAATCTCTTCACCAAAATTCCTCAGCGTTTTTGGATTCCCAATCTCA	180		
Sbjct	2575	ATACGATTCAGCCGAATCTCTTCACCAAAATTCCTCAGCGTTTTTGGATTCCCAATCTCA	2634		
Query	181	AGTTGATCAAAGGTTCTCTTG	201		
Sbjct	2635	AGTTGATCAAAGGTTCTCTTG	2655		

Download		GenBank		Graphics	
PREDICTED: Setaria italica exportin-2-like (LOC101786565), mRNA					
Sequence ID: refl XM_004981930.1 Length: 3449 Number of Matches: 1					
Range 1: 2450 to 2650		GenBank		Graphics	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
200 bits(108)	4e-48	170/201(85%)	0/201(0%)	Plus/Plus	
Query	1	GGAGTGCCTCTTTACTCGCTTACAGACTAGGCCAAGCAGTTAAGTTTGTGAACCTCTCTTG	60		
Sbjct	2450	GGAGTGCCTTTGTTACTCGGCTACAGTCTAGACAGGCAGTGAAGTTTGTGAATCTCTCTTG	2509		
Query	61	TGGTGGTCATGTCCTTGGTGTCAAGTATGGGCCAGGTGTTCTTGTCAAGTCTCTGTTG	120		
Sbjct	2510	TGGTCTTCATGTCCTTAGTGTGCTCAAAATATGGATCAGGCGTTCTTGTCAAGTCTCTGTTG	2569		
Query	121	ATACGATTCAGCCGAATCTCTTCACCAAAATTCCTCAGCGTTTTTGGATTCCCAATCTCA	180		
Sbjct	2570	ATGCAATTCACCAAAATCTATTACCCAAATCCTCAGCGTTTTTGGATTCCCAATCTCA	2629		
Query	181	AGTTGATCAAAGGTTCTCTTG	201		
Sbjct	2630	AATTGATCAAAGGTGCCCTTG	2650		

Şekil 4.4. Klonlanmış parçanın nükleotid hizalama sonucu (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)



Download ▾ GenPept Graphics

Exportin-2 [Aegilops tauschii]

Sequence ID: [gb|EMT29370.1](#) Length: 812 Number of Matches: 1

Range 1: 610 to 675 GenPept Graphics

▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
132 bits(332)	3e-34	Compositional matrix adjust.	66/66(100%)	66/66(100%)	0/66(0%)
Query 1		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			60
		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			
Sbjct 610		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			669
Query 61		LIKGS L 66			
		LIKGS L			
Sbjct 670		LIKGS L 675			

Download ▾ GenPept Graphics

Exportin-2 [Triticum urartu]

Sequence ID: [gb|EMS56189.1](#) Length: 821 Number of Matches: 1

Range 1: 619 to 684 GenPept Graphics

▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
132 bits(332)	4e-34	Compositional matrix adjust.	66/66(100%)	66/66(100%)	0/66(0%)
Query 1		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			60
		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			
Sbjct 619		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			678
Query 61		LIKGS L 66			
		LIKGS L			
Sbjct 679		LIKGS L 684			

Download ▾ GenPept Graphics

predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]

Sequence ID: [dbj|BAK03385.1](#) Length: 981 Number of Matches: 1

Range 1: 779 to 844 GenPept Graphics

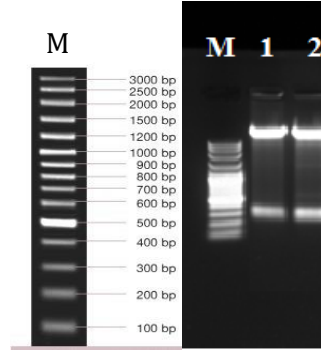
▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
129 bits(325)	5e-33	Composition-based stats.	66/66(100%)	66/66(100%)	0/66(0%)
Query 1		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			60
		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			
Sbjct 779		SALFTRLQTRQAVK FVNSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRFWIPNLK			838
Query 61		LIKGS L 66			
		LIKGS L			
Sbjct 839		LIKGS L 844			

Şekil 4.5. Klonlanmış parçanın protein hizalama sonucu (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

4.5. CAS Gen Parçasının Susturma Vektörü BSMV Gama'ya Aktarılması

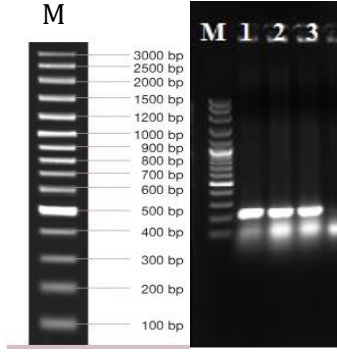
pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış olan *CAS* gen parçası öncelikle restriksiyon enzimi içeren primerler kullanılarak çoğaltılıp klonlandıkları için bu enzimler ile kesilerek yeni vektöre aktarılmaları sağlanmıştır. pGEM-T Easy plazmit DNA'sı izole edildikten sonra *PacI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş beklenen boydaki bantlar tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). *PacI* ve *NotI* enzimleri kullanılarak BSMV gama (γ .bpds4As) vektörü (Şekil 4.6.) kesilmiştir. Kesim sonrasında içinden *pds4* geni çıkartılan yapışkan uçlu vektör (γ) agaroz jelden kesilerek “Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit” kullanılarak protokolüne uygun şekilde temizlenmiştir. Kesilen bantlar jelden ayrıldıktan sonra yapışkan uçları sayesinde eşleştikten sonra DNA ligaz enzimi ile yapıştırılmıştır.



Şekil 4.6. γ .bpds4As vektörü *PacI* ve *NotI* enzimleri ile kesimi sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü. M: Moleküler ağırlık markörü (VC 100bp plus DNA ladder, Vivantis)

Klonlama sonrasında ligasyon ürünü kompetan *E. coli* hücrelerine aktararak, transforme olmuş hücreler ampisilin içeren (LB ampisilin 50 μ g/mL) ortamda büyütülerek seçilmiştir.

İzole edilen plazmidler (γ -CAS-As) *CAS* geninin primerleri (Şekil 3.1.1) kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinant vektörler PZR sonuçlarına göre tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. p γ -CAS-As rekombinantlarının PZR sonrasında %1'lik agaroz jelde görüntüsü. 1,2,3 nolu kuyucuklar: p γ - CAS-As (201bç) M: Moleküler ağırlık markörü (VC 100bp plus DNA ladder, Vivantis)

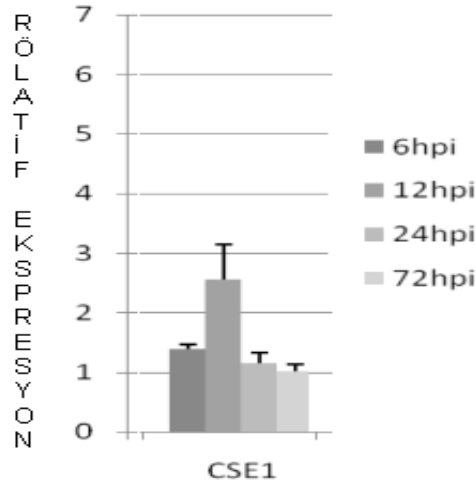
4.6 CAS Geninin *Mla6* Tarafından Yönlendirilen Dirençlilik Tepkisi Sırasında Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi

Çalışmada CAS geninin ekspresyon seviyelerini belirlemek için kullanılan bitki materyali Pallas01 arpa türü, küllleme suşu ise *Bgh103*(64/01)'dir. Pallas01 *Mla6* dirençlilik genini içermekte olup *Bgh103*(64/01) sporuna dayanıklılık göstermektedir. Dirençlilik tepkisi sırasında CAS geninin transkript seviyesindeki değişimler, hastalık uygulamasından sonra 6, 12, 24 ve 72. saat örneklerinin kontrol ile kıyaslanması ile tespit edilmiştir. Çalışmada 6, 12, 24 ve 72. saatlerde hastalık uygulaması yapılmış Pallas01 bitkisinden ve hastalık uygulaması yapılmamış Pallas01 bitkisinden örnekler alınarak toplam 8 adet total RNA izolasyonu yapılmıştır. Her bir RNA örneğinden tek iplikli cDNA sentezlenerek eşzamanlı PZR reaksiyonlarında kullanılmıştır. cDNA konsantrasyonlarının normalizasyonu için iki referans gen, β -tubulin ve uzama faktörü 1 α kullanılmıştır. Normalizasyon analizi iki transkriptin deneysel koşullar altında sürekli ifade edildiğini göstermektedir ve her cDNA örneği için normalizasyon faktörünü oluşturmaktadır (Çizelge 4.1).

Hastalık uygulamasından 12 saat sonra arpa bitkisi (Pallas 01) örneklerinde CAS (*CSE1*) geninin transkript seviyelerinde belirgin artış tespit edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.8).

Çizelge 4.1. CAS geninin ekspresyon seviyelerinin analizi

Örnekler	Ortalama CT	DeltaCT	2 ^{deltaCT}	Normalizasyon faktörü	Ortalama normalize ekspresyon	Rölatif ekspresyon
6 hpi	26,45	-0,24	0,846745	0,3295	2,569789	1,380214
6h kontrol	27,26333	-1,05333	0,481854	0,2588	1,861876	
12 hpi	26,42333	-0,21333	0,862542	0,3878	2,224193	2,519863
12h kontrol	26,28667	-0,07667	0,948246	1,0743	0,882664	
24 hpi	27,19333	-0,98333	0,50581	1,0656	0,474671	1,142172
24h kontrol	26,68667	-0,47667	0,718636	1,72921	0,415586	
72 hpi	26,21	0	1	4,6913	0,213161	1,019854
72h kontrol	26,81667	-0,60667	0,656712	3,142	0,209011	



Şekil 4.8. Arpa CAS (*CSE1*) transkript seviyelerinin *Mla6* tarafından oluşturulan hastalığa dirençlilik sırasında 4 farklı zaman için gösterimi (3 teknik tekrar yapılarak standart sapmalar hesaplanmıştır)

5. SONUÇ

Dirençlilik (R) proteinleri ile Avirülans (Avr) proteinleri etkileşime girdikten sonra, bitki hücreleri aşırı hassas tepki ismi verilen bir dizi reaksiyonu başlatmaktadır. Arpada *Mla6* geni *Blumeria graminis f. sp. hordei* (Bgh) tarafından oluşturulan külleme hastalığına karşı dirençlilikten sorumlu genlerden birisidir. Bu çalışmada amaç Mla6-AvrMla6 etkileşiminden, bitki hücrelerinin ölümüne kadar olan sinyal iletim mekanizmasında CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility) proteininin rolünü araştırmaktır. Bu sebep ile öncelikli olarak susturma çalışmaları yapılmak üzere CAS gen parçası arpa bitkisinden klonlanarak BSMV gama (virüs ile uyarılan gen susturma) vektörüne aktarılmıştır. Aynı zamanda dirençlilik tepkisi sırasında transkript seviyesindeki değişimler tespit edilerek bu yolda rol alma ihtimali güçlendirilmiştir.

CAS proteini memeli hücrelerinde apoptoz, üreme ve kanser yollarında rol oynamaktadır. Proteinin apoptoz sırasında rol alması ve bitkilerde hastalığa dirençlilik mekanizmasında apoptoz ile yakın ilişkili olması sebebi ile CAS proteinin hastalığa karşı dirençlilik tepkisi sırasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Hücre çekirdeğinde CAS importin metabolik yolunda nükleer transport faktörü olarak rol oynamaktadır (Kutay ve ark. 1997). İportin metabolik yolu, mitoz ve daha fazla gelişme için önemli olan birçok proteinin hücre çekirdeğine taşınmasına aracılık etmektedir. Apoptoz birçok proteinin (P53 ve transkripsiyon faktörleri gibi) hücre çekirdeğine girmesi için gerekli olduğundan, CAS proteininin bu önemli proteinlerin en azından alt kümelerinin hücre çekirdeğine girmesini kolaylaştırmasıyla apoptoza olanak sağladığı önerilmektedir (Brinkmann 1998). Hastalığa karşı dirençlilik sırasında da benzer şekilde görev yaptığı düşünülmektedir (Yıldırım-Ersoy ve ark. 2011).

Çalışmada CAS gen parçasının arpa homoloğu öncelikli olarak bir TA klonlama vektörü olan pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış, sekansı doğrulandıktan sonra BSMV gama vektörüne aktarılmıştır. Böylece arpa bitkisinde susturma çalışmalarında kullanılabilir hale gelmiştir.

CAS geninin hastalığa karşı dirençlilik tepkisi sırasında ekspresyonundaki değişiminin saptanması için *Mla6* geni içeren Pallas01 bitkisi, *AvrMla6* genini içeren *Bgh103*(64/01) patojeni ile enfekte edilmiştir. Patojenin enfeksiyonu sonrasında hassas bitkilerde 4-6 saat sonra papilla oluşumu, 12 saat sonra çim tübü oluşumu, 24 saat sonra haustorya oluşumu gözlemlenmektedir. Dirençli bitkilerde ise patojenin bitkiye uygulanmasından 24 saat sonra lokal aşırı hassas tepki ve 72 saat sonrasında ise belirgin nekrozlar gözlemlenmektedir. Çalışmada patojen uygulamasından sonra bu saatler seçilerek CAS geninin transkript seviyeleri kontrol bitkisi ile kıyaslanmıştır.

Sonuç olarak hastalık uygulamasından 12 saat sonra dirençlilik tepkisi sırasında CAS geninin transkript seviyesinde yaklaşık 2,5 kat artış tespit edilmiştir. CAS geninin ekspresyonunun aşırı hassas tepki gözlemlenmesinden önce (12. saat) arttığı ve aşırı hassas tepki sırasında (24. saat) tekrar normal seviyesine düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuç CAS proteininin *Mla6-AvrMla6* etkileşiminden, bitki hücresinin ölümüne kadar olan sinyal iletim mekanizmasında rol oynama ihtimalini güçlendirmektedir.

Bitkilerde hastalıklara karşı dirençlilik ekonomik açıdan büyük bir sorun teşkil etmektedir. Dünyada bitki ıslahı konusunda çalışan pek çok araştırmacı bitkilere kalıcı dirençlilik kazandırılması için uğraşmaktadır. Bitkilerde dirençlilik mekanizmasının anlaşılması ve genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi bu yolda atılan en büyük adımlardandır. Bu çalışmada bulunan sonuçlar pek çok yeni çalışmaya öncülük edecek niteliktedir. Genlerin pek çok hastalıkta etkili olması ve bitkilerde bağışıklık sistemini uyarması durumunda, genler genetik mühendisliği ile dayanıklı bitkilerin yapımında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Anonim, 2012. FAO'ya göre dünyadaki arpa üretiminin 2011 yılı verileri. [http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD-\(02.12.2013\)](http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD-(02.12.2013)).

Anonim, 2013. R-Avr etkileşimine göre dirençlilik. [http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/PlantPathology/infection/image_pages/ge ne4gene.htm-\(04.12.2013\)](http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/PlantPathology/infection/image_pages/ge ne4gene.htm-(04.12.2013)).

Anonim, 2013. Klonlanmış parçanın protein hizalama sonucu. [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi-\(15.12.2013\)](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi-(15.12.2013)).

Anonim, 2013. pGEM-T Easy vektörü ve sekans referans noktaları. [http://www.xenbase.org/reagents/vectorAction.do?method=displayVectorSummary&vectorId=8716564-\(16.12.2013\)](http://www.xenbase.org/reagents/vectorAction.do?method=displayVectorSummary&vectorId=8716564-(16.12.2013)).

Anonim, 2013. geNorm program v3.5. <http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>

Ausubel, Frederick M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology.*, 6(10), 973-9.

Baik, B.K., Ulrich, S.E. 2008. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science.*, 48, 233–242.

Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N.F., Reinstädler, A., Lotti, C., De Giovanni, C. 2008. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 21(1), 30-9.

Bhat, R.A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., Panstruga, R. 2005. Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 102(8), 3135-40.

Bindschedler, L.V., Burgis, T.A., Mills, D.J.S., Ho, J.T.C., Cramer, R., Spanu, P.D. 2009. In planta proteomics and proteogenomics of the biotrophic barley fungal pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular and Cellular Proteomics.*, 8(10), 2368-81.

Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., Pastan, I. 1995. Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92 (22): 10427–31.

Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., Scherf, U., Pastan, I. 1996. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biochemistry.*, 35 (21): 6891–9.

- Brinkmann, U. 1998.** CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am. J. Hum. Genet.*, 62 (3): 509–13.
- Brunner, S., Stirnweis, D., Diaz Quijano, C., Buesing, G., Herren, G., Parlange, F., Barret, P. 2012.** Transgenic Pm3 multilines of wheat show increased powdery mildew resistance in the field. *Plant Biotechnology Journal.*, 10(4), 398-409.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R. 1997.** The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell.*, 88(5), 695-705.
- Cakir, C., Tör, M. 2010.** Factors influencing Barley Stripe Mosaic Virus-mediated gene silencing in wheat. *Physiol. Mol. Plant P.*, 1-24.
- Collinge, D.B., Bryngelsson, T., Gregersen, P., Thordal-Christensen, H., Tronsmo, A.M. 1993.** The molecular and biochemical basis of plant disease resistance. *Växtskyddsnotiser.*, 57: 102-107.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J. 2006.** Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics.*, 38(6), 716-20.
- Cook, A., Fernandez, E., Lindner, D., Ebert, J., Schlenstedt, G., Conti, E. 2005.** The structure of the nuclear export receptor Cse1 in its cytosolic state reveals a closed conformation incompatible with cargo binding. *Molecular Cell.*, 18 (3): 355–367.
- Çalış, Ö. 2011.** Bitki dayanıklılık genleri ve proteinleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.*, 4 (2):1-9
- Dangl, J.L., Jones, J.D. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.*, 411(6839), 826-33.
- Dean, R., Van Kan, J.A. L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J. 2012.** The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology.*, 13(4), 414-30.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G., Schulze-Lefert, P. 1999.** Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *The Journal of Biological Chemistry.*, 274(49), 34993-5004.
- DeYoung, B.J., Innes, R.W. 2006.** Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.*, 7 (12): 1243
- Dubery, I. A., Sanabria, N.M., Huang, J.C. 2012.** Nonself perception in plant innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 738, 79-107.

Eichmann, R., Huckelhoven, R. 2008. Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology.*, 165, 5-18.

Feng, J., Wang, F., Liu, G., Greenshields, D., Shen, W., Kaminskyj, S., Hughes, G. R. 2009. Analysis of a *Blumeria graminis*-secreted lipase reveals the importance of host epicuticular wax components for fungal adhesion and development. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 22(12), 1601-10.

Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9:275-296.

Fredrick, K.L., Helmann, J.D. 1994. Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains. *J. Bacteriol.*, 176: 2727-2735

Freeman, S. 2003. Biological Science, Ed.: Beth Wilbur, pp: 710-720

Glawe, D.A. 2008. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology.*, 46, 27-51.

Halterman, D., Zhou, F., Wei, F., Wise, R.P., Schulze-Lefert, P. 2001. The 1 MLA6 coiled-coil, NBS-LRR protein confers AvrMla6-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. hordei in barley and wheat. *Plants J.*, 25(3):335-348.

Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology.*, 44 (3): 321-34

Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., Pogue, G.P. 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal.*, 30(3), 315-27.

Humphry, M., Reinstädler, A., Ivanov, S., Bisseling, T., Panstruga, R. 2011. Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea er1 plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. *Molecular Plant Pathology.*, 12(9), 866-78.

Ing, B. 1990. An introduction to British powdery mildews. *Mycologist.*, 4(2), 88-90.

Inuma, T., Khodaparast, S.A., Takamatsu, S. 2007. Multilocus phylogenetic analyses within *Blumeria graminis*, a powdery mildew fungus of cereals. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, 44(2), 741-51.

Jia, Y. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.*, 19, 4004-4014

Jones, J.D.G., Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature.*, 444(7117), 323-9.

Jørgensen, J.H. 1988. *Erysiphe graminis*, powdery mildew of cereals and grasses. *Adv. Plant Pathol.*, 6:135-157.

Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C. 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature.*, 416(6879), 447-51.

Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., Gorlich, D. 1997. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell.*, 90 (6): 1061–71.

Matthews, B. 2007. The hypersensitive response. *Agricultural Research Service: Plant Science Institute. The United States Department of Agriculture.*

Noir, S., Colby, T., Harzen, A., Schmidt, J., Panstruga, R. 2009. A proteomic analysis of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) conidiospores. *Molecular Plant Pathology.*, 10(2), 223-36.

Öztürk, K.İ. 2012. Elucidation of the role of *GCN2* gene in response to powdery mildew infection. *Yüksek Lisans Tezi*, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara

Ridout, C.J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J.D.G., Brown J.K.M. 2006. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *The Plant Cell.*, Vol. 18, 2402–2414.

Scherf, U., Pastan, I., Willingham, MC., Brinkmann, U. 1996. The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 (7): 2670–4.

Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., Innes, R.W. 2003. Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science.*, 301 (5637): 1230–3

Sooväli, P., Bender, A. 2006. The occurrence of powdery mildew on crested hairgrass in different growing conditions. *Agronomy Research.*, 4, 385-388.

Spoel, S.H., Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 12(2), 89-100.

Tang, X. 1996. Physical interaction of avrPto and the Pto kinase defines a recognition event involved in plant disease resistance. *Science.*, 274, 2060–2063

Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L., Collinge, D.B. 2000. The Barley/*Blumeria* (Syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. Mechanisms of resistance to plant diseases. Ed.: Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., Van Loon, L.C. *Kluwer Academic Publishers.*, p. 77-100.

Van der Biezen, E.A., Jones, J.D.G. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.*, 12, 454–456

Vandessompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3, research 00341-003411.

Yildirim-Ersoy, F., Ridout, C.J., Akkaya, M.S. 2011. Detection of physically interacting proteins with the CC and NB-ARC domains of a putative yellow rust resistance protein, Yr10, in wheat. *J. Plant Dis. Protect.*, 118 (3/4):119-126

Wyand, R.A., Brown, J.K.M. 2003. Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Molecular Plant Pathology.*, 4(3), 187-98.

Zhang, L., Meakin, H., Dickinson, M. 2003. Isolation of genes expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia triticina*) and wheat using cDNA-AFLP. *Mol. Plant Pathol.*, 4 (6): 469–77

Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T.L.W., Thomas, B.J., Skamnioti, P., Gurr, S.J. 2005. Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Mol. Plant Pathol.*, 6, 561–575.

Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Valè, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., Schulze-Lefert, P. 2001. Cell-autonomous expression of barley Mla1 confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a Rar1-independent signaling pathway. *Plant Cell*, 13:337-350.

Zohary, D., Hopf, M. 2001. Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe, and the Nile Valley. *Oxford University Press, USA*, pp: 328

EKLER

EK 1: Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

1: Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz pahalı bir madde olduğu için öncelikle jel döküm tablasının boyutları (jel kalınlığı da dikkate alınarak) ölçülür ve hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gereken agaroz miktarı dikkatli bir şekilde tartılır ve erlen içine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanır) konarak ateş üzerine alınır ve eritilir (3-5 sn kaynaması yeterlidir). Ateşten alınan jel üzerine son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde stok EtBr. solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50°C'ye (el sıcaklığı) geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür ve yaklaşık 40 dk beklenerek donması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılır. Jel, örneklerin yüklenmesine ve elektroforeze hazırdır.

2: LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı Hazırlanması

1 litre için

Yeast extract: 5 gr

Bacto tryptone: 10 gr

NaCl: 10 gr

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre içindir. Hazırlanacak olan hacim için gereken miktar içerik orantılanarak tartılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür ve pH'sı NaOH ile 7,5'e ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanır ve erlenlere (erlen hacminin 1/10'u oranında) paylaşılır. Erlenlerin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak otoklavlanır. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir. Kontaminasyon belirtisi olanlar dökülür.

3: LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması

Hazırlanan sıvı besi yerine %1,5 oranında agar katılır ve aynı şekilde otoklavlanır. Kullanılacak petri kutuları da alüminyum folyo ile sarılarak otoklavlanır. Besi yeri steril kabin içinde petri kutularına paylaşılır ve donduktan sonra streç filmle sarılarak +4°C'de saklanır. Saklama süresi iki haftayı geçmemelidir. Antibiyotik ilave edileceği zaman, son konsantrasyonlar dikkate alınarak besi yeri sıcaklığı yaklaşık 48°C'ye geldiğinde ilave edilir ve zaman geçirmeden petri kutularına paylaşılır. Plakların üzerine ilgili bilgiler yazılarak etiketlenir.

EK 2: Sekanslama Sonuçları

1: Nükleotid Sekansı (201bç)

GGAGTGCTCTCTTTACTCGCTTACAGACTAGGCAAGCAGTTAAGTTTGTGAA
CTCTCTTGTGGTGGTCATGTCCTTGGTGTCAAGTATGGGCCAGGTGTT
CTTGTCAGTTCTGTTGATACGATTCAGCCGAATCTCTTCACCACAATTCTTCA
GCGTTTTTGGATTCCCAATCTCAAGTTGATCAAAGGTTCTCTTG

2: Protein sekansı (66 amino asit)

SALFTRLQTRQAVKFNLSLVVMSLVSVKYGPGVLVSSVDTIQPNLFTTILQRF
WIPNLKLIKGS

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: CANSU SEVİNÇ
Doğum Yeri ve Tarihi	: TEKİRDAĞ, 1987
Yabancı Dili	: İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	
Lise	: Tekirdağ Tuğlacılar Lisesi /2001-2005
Lisans	: Uludağ Üni. F.E.F. Biyoloji B. / 2006-2011
Yüksek Lisans	: U.Ü. F.B.E. Biyoloji A.B.D Moleküler Biyoloji B.D /2011-2013
İletişim (e-posta)	: cnssvnc@gmail.com
Yayınları	: Figen Ersoy, Mahinur Akkaya, Ibrahim Kutay Ozturk, Sefawdin Bedassa, Cansu Sevinç “Determination of the Functions of SRP72 and CAS Barley Homologues Against Powdery Mildew Disease Resistance in Barley” COST FA1208 Pathogen informed strategies for sustainable broad spectrum crop resistance 1 st annual meeting, 9-11 Ekim Birnam, Edinburgh, UK sayfa 74
Burslar	: TÜBİTAK Araştırma Projesi Yüksek Lisans Öğrenci Bursu, <i>SRP72</i> ve <i>CAS</i> Genlerinin Arpa Homologlarının Arpada Külleme Hastalığına Karşı Dirençlilikte Fonksiyonlarının Belirlenmesi, Proje Yürütücüsü: Yrd.Doç. Dr. Figen ERSOY, 110T984, 2010-2014