



T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

**SRP72 GENİNİN ARPA HOMOLOGUNUN
ARPADA KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI
DİRENÇLİLİKTE FONKSİYONUNUN
BELİRLENMESİ**

SEFAWDİN BERTA BEDASSA

Yüksek Lisans Tezi

***SRP72* GENİNİN ARPA HOMOLOGUNUN
ARPADA KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI
DİRENÇLİLİKTE FONKSİYONUNUN
BELİRLENMESİ**

SEFAWDİN BERTA BEDASSA



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SRP72 GENİNİN ARPA HOMOLOGUNUN ARPADA KÜLLEME
HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇLİLİKTE FONKSİYONUNUN
BELİRLENMESİ***

Sefawdin Berta BEDASSA

Tez yöneticisi: Yrd. Doç.Dr. Figen ERSOY
(Danışman)

Prof. Dr.Mahinur S. AKKAYA
(İkinci Danışman)
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2012

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Sefawdin Berta BEDASSA tarafından hazırlanan“SRP72 Geninin Arpa Homologunun Arpada Külleme Hastalığına Karşı Dirençlilikte Fonksiyonunun Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman :Yrd. Doç. Dr. Figen Ersoy

İkinci Danışman :Prof. Dr. Mahinur S. Akkaya, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

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

Üye: Prof. Dr. Sezai Türkel
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı İmza

Üye: Doç. Dr. Ümit Arslan
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bitki Koruma Anabilim Dalı İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Kadri ARSLAN
Enstitü Müdürü

.././...

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

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

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

../../....

Sefawdin Berta BEDASSA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SRP72 GENİNİN ARPA HOMOLOGUNUN ARPADA KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇLİLİKTE FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİ

Sefawdin Berta BEDASSA

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY

İkinci Danışman: Prof. Dr. Mahinur S. AKKAYA, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Bitkilerde hastalığa karşı dirençlilik mekanizması henüz çözümlenmemiş bir konudur. Eğer bir bitki belirli bir hastalığa karşı dirençli ise; bitkilerde bulunan R (dirençlilik) proteinleri hastalık yaratan organizmada bulunan Avr (avirulans) proteinini tanır. Bu tanımadan sonra R proteini bir sinyal iletim mekanizması başlatır ve bitkinin aşırı hassas tepki vererek, hidrojen peroksit (H₂O₂) biriktirmesine ve saldırıya uğrayan hücrenin ani ölümüne sebep olur. Bu mekanizma ile bitki, düşman organizmanın saldırısını durdurur. Arpada *Mla6* geni *Blumeria graminis f. sp. hordei* (*Bgh*) tarafından oluşturulan külleme hastalığına karşı dirençlilikten sorumlu genlerden birisidir. Bu çalışmada amaç *Mla6* (Pallas01 arpa çeşidi) ve *AvrMla6* (*Bgh95(53/01)* izolatu) etkileşiminden, bitki hücrenin ölümüne kadar olan sinyal iletim mekanizmasının anlaşılmasıdır. Bu amaca yönelik *SRP72* (Sinyal Tanıma Partikülü 72) geninin arpa homologu, BSMV (Arpa Çizgili Mozaik Virüsü) kullanılarak Virüsle Uyarılan Gen Susturma (VIGS) yöntemi ile susturularak külleme hastalığındaki rolü tespit edilmiştir. *SRP72* geninin mRNA düzeyi susturma yapıldıktan sonra kontrol (BSMV: 00) bitkisine göre %57 azaldığı gösterilmiştir. *SRP72* geni susturulmuş bitkilerde külleme hastalığına karşı dirençlilik değişimi hifin uzunluğu ve spor verimi incelenerek tespit edilmiştir. *SRP72* geni susturulmuş arpa bitkilerinde toplam sporun %83.2'si çimlenirken, kontrol bitkilerinde %20.6'sı çimlenmiştir. Susturma olan bitkilerdeki hifin uzunluk ortalamasının ise kontrol bitkilerine göre iki kat daha uzun olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *SRP72*, Gen susturma, Bitkilerde hastalığa karşı dirençlilik, Arpa, Külleme

2012, viii +39 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF THE FUNCTION OF *SRP72* BARLEY HOMOLOG AGAINST POWDERY MILDEW DISEASE RESISTANCE IN BARLEY

Sefawdin Berta BEDASSA

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Figen ERSOY

Second Supervisor: Prof. Dr. Mahinur S. AKKAYA, Middle East Technical University

Disease resistance in plants is yet an unresolved topic. 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. By this mechanism plant stops the invasion of the enemy organism. 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 understand the signaling events between the *Mla6* (Pallas01 barley isolate) and Avr*Mla6* (*Bgh95* (53/01) isolate) recognition and the death of the plant cell. For this purpose *SRP72* (Signal Recognition Particle 72) barley homolog was silenced by using BSMV (Barley Stripe Mosaic Virus) mediated Virus Induced Gene Silencing (VIGS) and the role of *SRP72* in powdery mildew disease was determined. The level of mRNA in *SRP72* gene silenced plant samples showed 57% decrease with respect to control group (BSMV: 00). The change in resistance to powdery mildew in *SRP72* silenced plants were determined by using the length of the hyphae and the germination efficiency. In *SRP72* silenced plants 83.2% of the spores were germinated while 20.6% was germinated on control plants. The length of hyphae on silenced plant leaf was double than the hyphae on control plants.

Words: *SRP72*, Gene silencing, Plant disease resistance, Barley, Powdery Mildew

2012, viii+39 pages.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim ve çalışmalarımı süresince beni isabetli bir şekilde yönlendiren ve motive eden, sorunların çözümlenmesinde çok önemli katkılar sağlayan ve destekleyen saygıdeğer hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Figen Ersoy'a sonsuz saygı ve şükranlarımı yürekten arz ediyorum ve kendileriyle çalışmanın benim için büyük bir şans ve onur verici olduğunu belirtmek istiyorum.

Yüksek lisans ikinci tez danışmanlığımı da yapmış olan laboratuvar deneyimi kazanmama fırsat veren ve çalışmalarımı her zaman destekleyen sayın Prof. Dr. Mahinur S. Akkaya da saygı ve şükranlarımı arz ediyorum.

Laboratuvar aşamasında büyük bir titizlikle yardımcı olan değerli arkadaşım Kutay Öztürk'e teşekkür ediyorum.

Her zaman için manevi destekçilerim olan aileme ve eşim Raheal Waktole'e de sonsuz sevgilerimi iletiyorum ve onu kucaklıyorum.

Yukarıda isimleri yazılmayan Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerine ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza maddi katkıda bulunan TÜBİTAK'a (100T984 nolu 'SRP72 ve CAS Genlerinin Arpa Homologlarının Arpada Kütleme Hastalığına Karşı Dirençlilikte Fonksiyonlarının Belirlenmesi' isimli proje) teşekkürlerimi sunarım.

Sefawdin Berta BEDASSA

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Bitkilerde Hastalığa Karşı Dirençlilik	4
2.2. SRP72 Proteini	5
2.3. Arpada Külleme Hastalığı	6
2.4. Aşırı Duyarlı Tepki (HR)	8
2.5. RNAi'nin Gelişimsel Tarihçesi	8
2.6. Dicer	10
2.7. Küçük Engelleyici RNA (siRNA).....	11
2.8. RNA ile Uyarılmış Susturma Kompleksi (RISC)	11
2.9. Arpa Çizgili Mozaik Virüsü (BSMV) Kullanılarak Gen Susturulması	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1. Bitki Materyali	13
3.2. Arpa Bitkilerinin Büyütülmesi	13
3.3. Kompetan Hücre Hazırlanması	13
3.4. Transformasyon.....	14
3.5. Plazmit İzolasyonu ve Plazmit DNA'sının Lineer Hale Getirilmesi	15
3.6. Agaroz Jel Elektforezi.....	15
3.7. Primer Sentezi	16
3.8. Virüs RNA'sının <i>in vitro</i> Transkripsiyon ile Hazırlanması ve Arpa Yapraklarına Uygulanması.....	16
3.9. RNA Elektforezi	17
3.10. Arpa Bitkilerine <i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i> , (<i>Bgh95(53/01)</i> ve <i>Bgh103(64/01)</i> Uygulanması ve Trypan Mavisi ile Boyama Yöntemi	17
3.11. Bitkilerden RNA İzolasyonu	18
3.12. RNA'nin Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi	20
3.13. cDNA Oluşumu	20
3.14. qRT-PZR ile Susturma Yapılan Örneklerde SRP72 Transkript Miktarının Belirlenmesi	21
4. BULGULAR	22
4.1. Plazmitlerin Lineer Hale Getirilmesi	22
4.2. Transkriptlerin Kontrolü (RNA Elektforezi)	22
4.3. cDNA Sentezinin Kontrolü	23
4.4. qRT-PZR Sonuçları ve Susturma Düzeyi	24
4.5. BSMV: 00 Uygulanmış Arpa Yapraklarında Hif Büyümesi.....	24
4.6. BSMV Uygulanmamış Yapraklarında Hif Büyümesi	25
4.7. SRP72 Geni Susturulmuş Arpa Yapraklarında Hif Büyümesi.....	25
4.8. Hif Uzunluğu.....	27
4.9. Sporların Büyüme Verimi	28

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	29
KAYNAKLAR	31
EKLER.....	36
EK 1: Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması.....	36
1: Agaroz Jel Hazırlanması.....	36
2: LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı Hazırlanması	36
3: LB-Agar Besi Ortamı Hazırlanması.....	36
4: FES ve GP Solüsyonlarının Hazırlanması.....	36
EK 2: Susturma İçin kullanılan Hordeum vulgare (Arpa) SRP72 Genin Dizisi.....	38
ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

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

Açıklama

Kısaltmalar

Avr	Avirülans
Bgh	Blumeria graminis hordei
Bkz	Bakınız
BSMV	Arpa Çizgili Mozaik Virüsü
CaCl ₂	Kalsiyum klorid
CC	Coiled coil
dNTP	Deoksi-nücleotid trifosfat
dsRNA	Çift sarmal RNA
Dpi	İnokülasyon sonrası geçen gün
DTT	Dithiothreitol solüsyon
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik asit
ER	Endoplazmik Retikulum
EtBr	Etidyum Bromit
H	Saat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hpi	İnokülasyon sonrası geçen saat
HR	Aşırı Hassas Tepki
kb	Kilo baz
qRT-PZR	Kantatif Eş Zamanlı PZR
LRR	Leusin Zengin Bölge
Mg	Milligram
Min	Dakika
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
NB	Nükleotid Bağlanma
ng	Nanogram
p	Plazmit
PAZ: PİWİ	Argonaute ve Zwill

Açıklama

PİWI	P element İndüklenmiş Wimpy
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikomol
PTGS	Transkripsiyon Sonrası Gen Baskılama
R	Dirençlilik
RBD	RNA Bağlama Domaini
RISC	RNA ile Uyarılmış Susturma Kompleksi
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNAi	RNA interferans
Rpm	Dakikada devir
siRNA	Küçük engelleyici RNA
SRP72	Sinyal Tanıma Partikülü72
TBE	Triz-Borik asit-EDTA
TRNA	Total RNA
Ubi	Übiküitin
UV	Mor ötesi
VIGS	Virüs ile Uyarılmış Gen susturma

ŞEKİLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Külleme hastalığı etmeni <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	6
Şekil 2.2. Külleme hastalığının arpa yaprağında büyümesi.....	7
Şekil 2.3. RNAi mekanizması.....	9
Şekil 2.4. Dicer'in yapısı.....	11
Şekil 2.5. RNA ile Uyarılmış Susturma Kompleksi	12
Şekil 3.1. BSMV-VİGS kullanılarak tek çenekli bitkilerde gen susturma	17
Şekil 3.2. Pallas01 yapraklarına <i>Bgh95</i> (53/01) ve <i>Bgh103</i> (64/01) sporlarının uygulanması.....	18
Şekil 4.1. Plazmitlerin Lineer Hale getirilmesi.....	22
Şekil.4.2. %1 Agaroz jel Elektforezde transkriptlerin kontrolü:.....	23
Şekil 4.3. cDNA sentezinin kontrolü	23
Şekil 4.4. Negatif kontrol bitkileri üzerinde külleme hastalığının büyümesi	24
Şekil 4.5. BSMV uygulanmamış Pallas01 bitkileri üzerinde külleme hastalığının büyümesi.....	25
Şekil 4.6. SRP72 geni susturulmuş arpa bitkileri üzerinde külleme hastalığının büyümesi.....	26
Şekil 4.7. BSMV:00, BSMV:SRP72 ve BSMV uygulanmamış yapılan Pallas01 bitkilerinde spor büyümesinin hif uzunluğu açısından karşılaştırılması	27
Şekil 4.8. Sporların Büyüme Verimi.....	28

1.GİRİŞ

Buğday, pirinç ve mısırın yanı sıra arpa (*Hordeum vulgare L.*) dünyada ekonomik olarak en önemli tahıllar arasındadır (Czembor ve ark. 2002). Fakat gerek viral gerek fungal hastalıklar, arpanın verimi ve kalitesini azaltmaktadır. En önemli arpa fungal hastalıklarından birisi ise külleme hastalığıdır. Külleme hastalığı bitkilerin en yaygın hastalıklarından biri olup binlerce tek çenekli ve çift çenekli bitkiyi hasta etmektedir (Zhou ve ark. 2001, Jørgensen 1988). Bu sebeple tahıllarda ürün verimini arttıracak çalışmalar çok önemlidir (Cakir ve ark. 2010).

Tarımsal bitkileri enfekte eden patojenlerden dolayı her yıl önemli miktarda ürün kaybı olmaktadır ve milyonlarca dolar maddi kayıp meydana gelmektedir (Oerke ve Dehne 2004). Bitki zararlılarının ve hastalıklarının kontrol edilmesindeki önemli stratejilerden biri Moleküler Biyoloji'dir.

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 hücrelerinin ölümüne sebep olur ve patojenin diğer hücrelere yayılmasını engeller. Bitkilerin gösterdiği bu tepkiye Aşırı Hassas Tepki (Hypersensitive Response, HR) denilmektedir. Bu tepki ile hastalığa karşı dirençlilik sağlanmaktadır. *R*-Avr proteinlerinin etkileşiminden sonra aktive olan sinyal iletim mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

SRP72 proteininin buğdayda programlanmış hücre ölümünde regülatör olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Bitkilerde hastalığa karşı dirençlilikte bitkinin verdiği 'Aşırı Hassas Tepki' bir ani hücre ölümüdür. Bu sebeple bir *R* proteini ile etkileşime giren *SRP72*'nin hastalığa karşı dirençlilikte rol alan bir protein olduğu düşünülmektedir. *SRP72* geninin ekspresyonu arpa bitkisinde külleme hastalığı uygulamasından 12 saat sonra yaklaşık 3 kat artış göstermiştir (Yildirim-Ersoy ve ark. 2011). Bu sebeple arpa

bitkisinde külleme hastalığına karşı dirençlilikte rol alan bir protein olma ihtimali güçlüdür.

Mayada SRP72 ile HSP90 proteinlerinin genetik ilişkisi gösterilmiştir (Gavin ve ark. 2006). Bilindiği üzere HSP90 bitkilerde hastalığa karşı dirençlilik mekanizmasında rol alan çok önemli bir proteindir (Takahashi ve ark. 2003). HSP90 proteini ile etkileşimi saptanan ve aktivitesi belirlenen SRP72 proteinin hastalığa karşı dirençlilik mekanizmasında rol alabileceği bir kez daha desteklenmiştir. SRP72 proteinine benzer proteinler *Oriza sativa* (NP_001045044) ve *Arabidopsis thaliana* (NP_176936) bitkilerinde bulunmaktadır. Bu proteinler henüz arpa veya buğdaydan klonlanmamıştır.

Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma (PTGS; Post Transcriptional Gene Silencing) RNA tarafından yönlendirilen sistemik bir susturma mekanizmasıdır. Bitkilerde PTGS için “RNAi’nin eşleniği” denilmektedir. PTGS için pek çok metod uygulanmaktadır ve bunlardan en başarılısı VIGS yöntemidir (Baulcombe 1999, Dinesh-Kumar ve ark. 2003). Bitkiler RNA virüsleri ile enfekte oldukları zaman RNA tarafından kontrol edilen bir savunma mekanizması çalışmaya başlar. Bitkinin içine giren viral RNA ve bu RNA’lara eklenmiş olan transgenler parçalanır ve bitki virüse direnç gösterir (Voinnet 2001). PTGS sistemi hem vektörün içinde bulunan endojen gen sekansını hem de bitkideki aynı sekansı parçalayarak geni işlevsiz hale getirmektedir. Böylece VIGS yöntemi ile sekansa özel susturma yapılabilmektedir.

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. Daha önce dirençlilik (R) proteini ile etkileşimi saptanan *SRP72* geni VIGS tekniği ile arpada susturularak; susturma yapılan dirençli bitkilerde, arpa tarımını olumsuz etkileyen hastalıklardan biri olan külleme uygulanarak hastalığa karşı dirençlilik tepkileri ölçülmüştür. Çalışmada susturulan genin fonksiyonunun kaybolması ile bitkinin dirençlilik tepkisinde değişim olduğu için *SRP72* geninin hastalığa karşı dirençlilik mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

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. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bitkilerde Hastalığa Karşı Dirençlilik

R (Dirençlilik) geni genelde patojenleri tanıma ve büyümesini engelleme görevlerini yapar. 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). *R* proteinin dirençlilik için gereken sinyalleri başlatabilmesi için *R*-Avr etkileşimi gereklidir. Bu etkileşimden sonra *R* proteini bir sinyal iletim mekanizması başlatır ve bitkinin aşırı hassas tepki vererek hidrojen peroksit (H_2O_2) biriktirmesine ve saldırıya uğrayan hücrenin ani ölümüne sebep olur. Bu mekanizma ile bitki, düşman organizmanın saldırısını durdurur. *R* proteini veya Avr proteinin olmadığı her iki durumda da etkileşim olmadığı için patojen bitki tarafından tanınmaz ve patojen bitkide yayılmaya başlar (Halterman ve ark. 2001).

Arpada, yaklaşık olarak 30 tane farklı *Mla* geni bulunur. Bu genler külleme hastalığına karşı dirençlilikte rol almaktadır. Bu genlerden bazıları *Mla1*, *Mla6*, *Mla13*, *Mla7*, *Mla14*, ve *MI-RU3*'dür (Wei ve ark. 1999, Wise ve Ellingboe 1985). Örnek olarak; *Bgh103(64/01)* patojeni *AvrMla6* genine sahiptir. *Mla6* geni Pallas01 arpa çeşitinde *Bgh103(64/01)* patojenine karşı dirençlilik kazandıran gendir. Bu patojenin enfeksiyonu sırasında bu gen ürünleri etkileşime girip dirençlilik için gereken yollar aktive olur (Wei ve ark. 1999). Biyoblastik bombardıman metodu kullanılarak arpa ve buğdayda yapılan gen aktarma çalışmasında, *Mla6* geni aktarılan bitkilerde *Avr-Mla6* içeren patojenin büyümesinin % 50 azaldığı görülmüştür. Patojenler bitkiyi enfekte ettiği anda efektör adı verilen moleküller salgılanır. Bunlar enzim, büyüme düzenleyici hormonlar, toksik maddeler, defans bastırıcı maddeler ve polisakaritler olabilir. Örnek olarak, külleme patojeninin efektör olarak, eriyebilir karbonhidrat salgıladığı farklı tahıllarda tespit edilmiştir (Agrios 2005). Efektörler saldırıyı kolaylaştırır, tetikler veya ikisini bir arada gerçekleştirebilirler.

Her bitki kendi patojenleri tarafından saldırıya uğrar. Bitkinin kendisini farklı patojenlere karşı hangi etkinlikte savunduğu ise farklılık gösterir. Enfekte olma ve

hastalık gelişimi için şartlar uygun olduğunda bile, bitkinin ve ona saldıran patojenin özel genetik yapısına bağlı olarak hastalık gelişmeyebilir veya hafif/ciddi seviyede hastalık gelişebilir. Bir bitkinin patojenlere karşı korunaklı olmasında çok miktarda gen rol alır (Agrios 2005). Bu genlerin çoğu bitkiye genel bir dirençlilik sağlarken ana görevi bitkiyi belirli patojenlerden korumak olan genler de vardır. Bu özel genler patojenlere karşı toksik olan maddelerin veya patojenlerin toksinlerini etkisizleştiren maddelerin oluşumunu sağlar. Bu maddeler bitki saldırı altında olsun veya olmasın bitkinin içinde varolabilirler. Bitkiler aynı zamanda patojenin konukçunun içindeki ilerlemesini durduran veya yavaşlatan yapıların oluşumunu düzenleyen genlere de sahiplerdir. Bu yapılar bir bitkinin ömrü boyunca var olabilir veya çok sayıda patojenin saldırısına karşı tepki olarak veya abiyotik bir ajan tarafından yaralanmayı takiben de oluşturulabilirler.

2.2. SRP72 Proteini

Maya Sinyal Tanıma Partikülü; SRP72 korunmuş bir protein olup sinyal peptidlere bağlanan SRP kompleksinin önemli bir proteindir. SRP kompleksi salgılanacak olan proteinin Endoplazmik Retikulum'a (ER) taşınmasında rol oynar (Walter ve Blobel 1980, Walter ve Blobel 1982). SRP, Sinyal Tanıma Partikülü Ribonuklotik proteinlerden biri olup üç yaşam alanında bulunur. Farklı SRP proteinleri hücrelerin farklı organellerinde bulunur. SRP sinyal iletimi ve iletişimi kolaylaştırır.

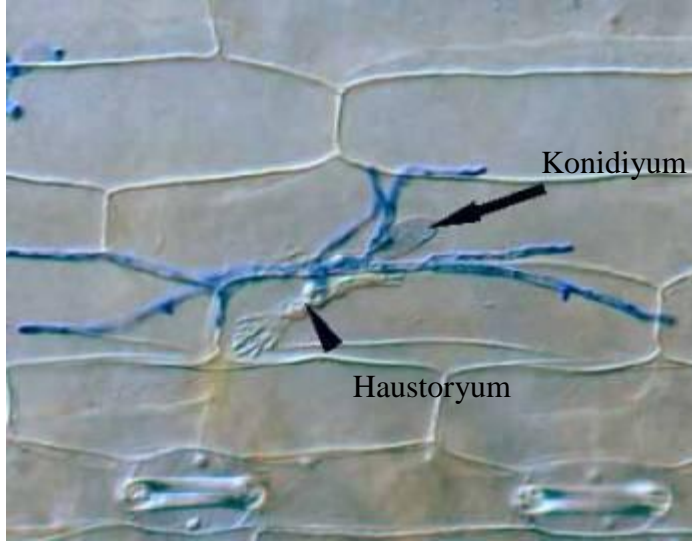
İnsanda SRP72'nin apoptoz sırasında parçalandığı bulunmuştur (Utz ve ark. 1998). Bu programlanmış hücre ölümü sırasında gerçekleşen translasyon sonrası bir modifikasyondur. Çeşitli kimyasallar, kaspaz engelleyiciler ve bcl-2 proteininin (apoptotik hücre ölümünü engeller) fazla ekspres olması SRP72'nin parçalanmasını engellemektedir. SRP72'nin parçalanması ve fosforlanması, salgılanacak olan proteinlerin ER'a ulaşması için apoptoz sırasında gereklidir (Utz ve ark. 1998). Başka bir çalışmada SRP68 veya SRP72 genlerinin susturulması sonucunda ani hücre ölümü gözlemlenmiştir (Lustig ve ark. 2005).

Bu çalışmada külleme hastalığı sırasında fonksiyonunu tespit etmek amaçlı susturulan *SRP72* geninin ekspresyonu arpa bitkisinde külleme hastalığı uygulamasından 12 saat sonra yaklaşık 3 kat artış göstermiştir (Yıldırım-Ersoy ve ark. 2011). Bu sebeple Mla6-AvrMla6 etkileşimi sonrasında aktive olan yolda önemli bir gen olduğu düşünülmektedir.

2.3. Arpada Külleme Hastalığı

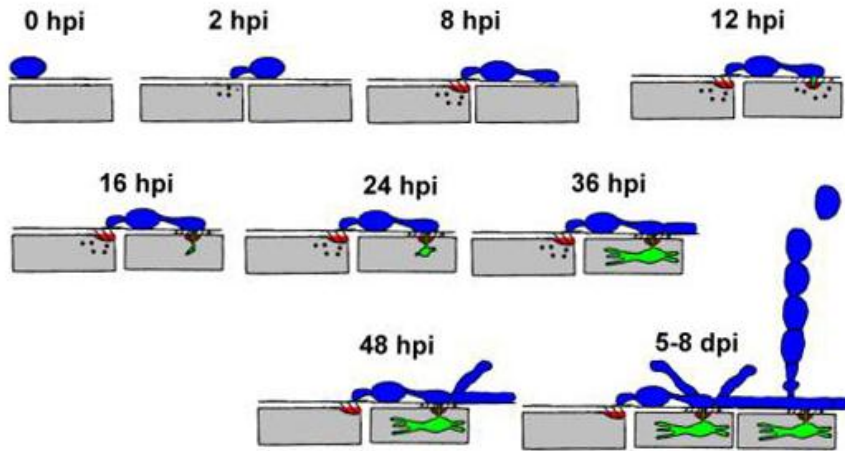
Arpa bitkisini hasta eden zorunlu biyotrofik mantar, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, eskiden *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* olarak biliniyordu (Jarosch ve ark.1999) (Şekil 2.1.). Patojen epiderm ve hücre duvarının yıkması için uzmanlaşmış bir yapı olan ‘Appressoria’yı kullanarak bitkiye girer. Lipaz (LIP1) gibi enzimler patojenin büyümesi ve diğer fonksiyonları için ilk olarak salgılanır (Feng ve ark. 2009). Bu patojen önce biyotrofik sonra nekrotrofik olarak hareket eder (Agrios 2005). Farklı arpa türü farklı *Bgh* patojenlerine hassastır. R ve Avr etkileşimi özel bir ilişkidir. Örneğin: pallas01(Mla6) *Bgh*95(53/01) (Avr-Mla1)’e karşı hassas olduğu halde *Bgh*103(64/01) (Avr Mla6)’e 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 2.1. Külleme hastalığı etmeni *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. (Anonim 2005)

Külleme sporları konukçu ile temasa geçer geçmez yaşam döngüsü başlar. Külleme hastalığının sporu (konidiyum) ilk dört saat içinde çim tüpü (Germ tube) geliştirir ve üç güne kadar apresoryum ve haustoryum ismi verilen çok önemli yapıları geliştirip, yaşam döngüsünü devam ettirir. Tamamen fonksiyonel olan haustoryum enfeksiyondan 24 saat sonra oluşmaktadır. Bu aşamalarda, fungusun beslenmesi bitki epidermal hücrelerin içinde birçok ikincil haustoria aktivitesi tarafından desteklenmektedir (Both ve ark. 2005). Haustoryum oluşumundan sonra yapraklarda hif oluşumu gözlemlenmektedir (48 hpi) ve en son aşama olarak konidya oluşumu enfeksiyondan 5-8 gün sonra tam olarak gözlemlenmektedir (Şekil 2.2).



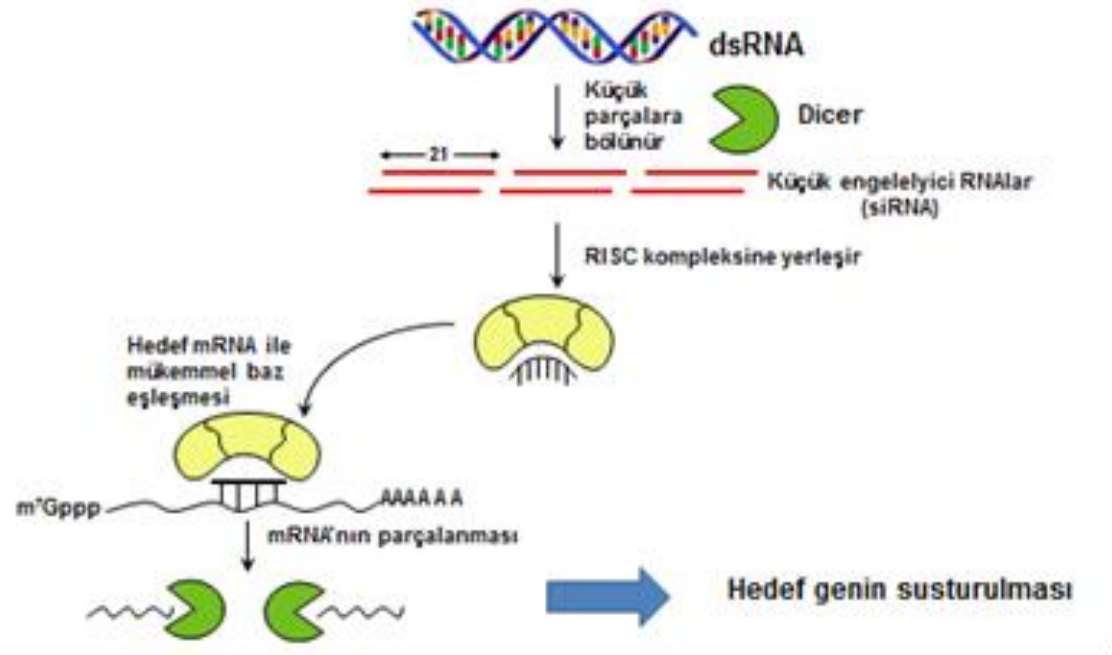
Şekil 2.2. Külleme hastalığının arpa yaprağında büyümesi (hpi: enfeksiyon sonrası geçen saat, dpi: enfeksiyon sonrası geçen gün) (Anonim 2005).

2.4. Aşırı Duyarlı Tepki (HR)

Aşırı Duyarlı Tepki, hızlı bölgesel hücre ölümü olarak karakterize edilir. Bu tepki, patojenlerin ürettiği özel sinyal moleküllerinin bitki tarafından tanınması ile başlar. Patojen, bitki ile fiziksel temasa geçer geçmez, bitki patojenin varlığını gösteren sinyalleri almaya başlar. Aşırı Duyarlı Tepki, yapısal bir savunma mekanizmasından ziyade biyokimyasal bir savunma mekanizmasıdır. Çıplak gözle veya mikroskopla görülebilen bazı hücrel tepkilerle birlikte gerçekleşir. Patojen istilasının ardından konukçu hücre ne kadar hızlı ölürse, bitki enfeksiyona karşı o kadar dirençlidir. Ayrıca, Aşırı Duyarlı Tepki sırasında aktive olan bileşikler ve yollar, bölgesel ve sistemik dirençliliği sağlamada rol oynarlar (Agrios 2005).

2.5. RNAi'nin Gelişimsel Tarihçesi

RNA interferans (başka bir deyişle RNA müdahale veya RNA girişimi) hedef genin transkriptinin diziye özgü bir ilişki ile çift sarmallı RNA (dsRNA) tarafından yönlendirilen bir mekanizma ile parçalanmasıdır (Şekil 2.3). RNAi mekanizması mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda bulunmaktadır ve hepsinde de benzer hücre bileşenlerinin yardımıyla oluşur. RNAi mekanizmasında başlangıç molekülü çoğunlukla, RNA bağımlı RNA polimerazın kalıp olarak endojen veya ekzojen kaynaklı bir RNA'yı kullanarak sentezlediği çift zincirli RNA'dır. RNAi mekanizmasında transkripsiyon engellenmez, transkriptler parçalanarak seviyeleri azalır.



Şekil 2.3. RNAi mekanizması

RNA interferans tekniğinin temeli aslında tamamen şans eseri bulunmuştur. 1990 yılında Napoli ve arkadaşları petunya çiçeklerini daha mor yapmak için Kalkon sentaz (*chs*) isiminde bir geni transgenik yöntemler ile bitkiye aktardığında üç çeşit bitki gözlemlemiştir: Mor, beyaz ve mor ve beyaz bitkiler. Petunya bitkisine *chs* geninin ekstra kopyasının aktarılması, onun ekspresyonunda beklenen artışın aksine azalmaya neden olmuş ve RNA interferans mekanizmasının temelini oluşturmuştur. Aktarılan transgenin sadece kendisini değil aynı zamanda endojenik *chs* geninin ekspresyonunu da etkileyen bu olayda, hem endojenik hem de transgenik mRNA'nın kaybını tanımlamak için Eş Baskılama terimini kullanmışlardır (Napoli ve ark. 1990, Jorgensen 1990).

Fire ve arkadaşları (1998) nematod olan *Ceanorhabditis elegans*'ta çift sarmallı RNA'nın, gen ekspresyonunu spesifik ve selektif olarak inhibe ettiğini ilk defa deneysel olarak göstermişlerdir. Deneylerinde bir kas proteini içeren RNA'yı ikili sarmal olarak *C. elegans*'a enjekte ettiklerinde bu kas proteininin bozulduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durum transkripsiyon sonrası RNA parçalanmasını ifade eden Transkripsiyon Sonrası Gen Baskılama (Post Transkriptional Gene Silencing (PTGS)) olarak tanımlanmıştır.

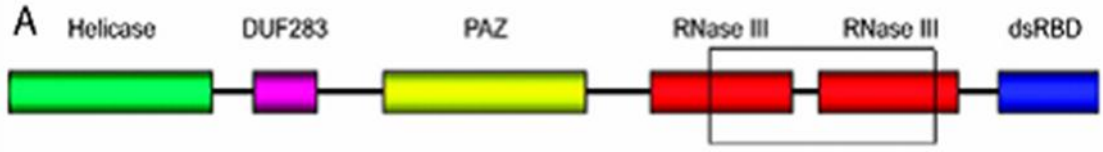
Bitkilerde bu mekanizma doğal bir işlem olup, canlı organizmadaki biyolojik fonksiyonu, virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerin istilasına karşı genomu koruyan bir hücrel savunmadır (Agrawal ve ark. 2003).

Moleküler düzeyde işleyen RNAi mekanizma sistemik olarak bitkide diğer hücreden hücreye (Voinnet ve Baulcombe 1997, Voinnet ve ark. 1998, Lu ve ark. 2003) ve dokularına da devam eder. Susturma sinyali hücreden hücreye plazmodezmata ya da iletim sistemi yolu ile ulaşır. Hedeflenen genin ifade edilmesi engellenir ve sonuçta oluşan fenotip ya da genotip değerlendirilerek bu genin fonksiyonu geri genetik vasıtasıyla tanımlanmış olur.

Bitkilerde Transkripsiyon Sonrası Gen Susturması için pek çok yöntem uygulanmaktadır ve bunlardan en başarılısı Virüs ile Uyarılan Gen Susturma (Virus Induced Gene Silencing (VIGS)) yöntemidir (Baulcombe 1999; Dinesh-Kumar ve ark. 2003). Bu sebeple pek çok araştırmacı tarafından tercih edilen bir yöntem olmuştur.

2.6. Dicer

Dicer protein Bernstein ve ark. (2001) tarafından keşif edilmiştir. RNAaz III ailesi ribonükleazlar dsRNA'ları spesifik olarak tanır ve parçalar. Bu enzimin N-terminali bir helikaz domaini, C-terminal domaini ise dsRNA bağlanma domaini taşır (Şekil 2.4.). PAZ domaini RNA'ya bağlanır. Dicer enzimine sahip olduğu helikaz domaini ise, bu kesim aşamasından ziyade siRNA zincirinin açılması ve tek zincirinin RISC kompleksine aktarılması sırasında rol almaktadır. PAZ domaini bir nükleik asit bağlama domaini olup dsRNA'nın enzime bağlanmasında rol almaktadır (Zhang 2004, Hutvagner ve Simard 2008). Dicer enziminin kesim aktivitesinin arka arkaya sıralı olan iki katalitik RNase III domaini tarafından sağlandığı düşünülmektedir. Bu şekilde RNaz III ribonükleaz ailesine ait enzimler RNA interferansın ilk adımını başlatır. Hücrelerde RNAi mekanizmasını uzun dsRNA'lar başlatırken çoğu deneysel çalışmalarda etki edici moleküller olarak siRNA'lar kullanılmaktadır (Filipowicz 2005).



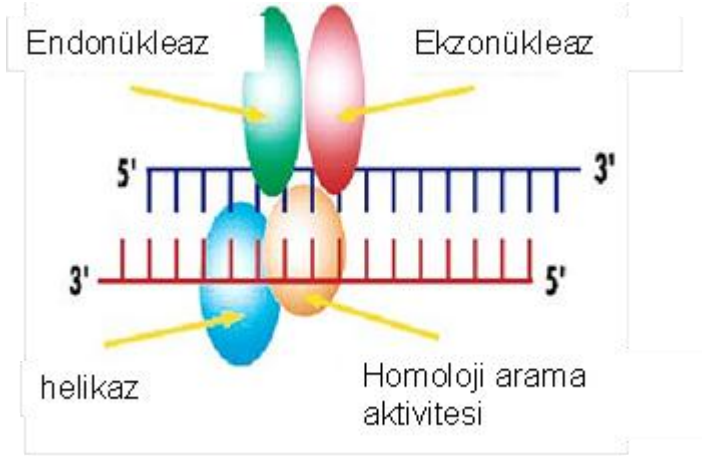
Şekil 2.4. Dicer'in yapısı (Murchison ve ark. 2005)

2.7. Küçük engelleyici RNA (siRNA)

Küçük engelleyici RNA'lar RNA ile Uyarılmış Susturma Kompleksi'ni (RISC, RNA-induced silencing protein complex) aktive eder ve çift sarmallı RNAlar açılarak tek sarmal yapı halini alır. siRNA'lar uygun mRNA degradasyonu için rehber RNA olarak görev alırlar (Agrawal ve ark. 2003). Dicer enziminin nüklez aktivitesi ile dsRNA'lar, 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçlara sahip ve 3'- hidroksil uçlarında 2- 3 nükleotidlik çıkıntı bulunan 21-23 nükleotid uzunluğunda siRNA'lara parçalanırlar (Zamore ve ark. 2000, Elbashir ve ark. 2001). siRNA'nın bu yapısal özelliği RISC kompleksine bağlanması ve RNAi mekanizmasının sonraki aşamaları için önemlidir.

2.8. RNA ile Uyarılmış Susturma Kompleksi (RISC)

RISC, nüklez aktiviteli RNA-multiprotein kompleksi olup asimetric olarak siRNA'lara bağlanarak uygun siRNA zincirinin rehberliğinde komplementer hedef mRNA'yı parçalamaktadır (Agrawal ve ark. 2003) (Şekil 2.5). Yapısında endonüklez, ekzonüklez ve helikaz enzimlerini içermektedir. Bu kompleksin protein bileşenlerinden birisi Argonot ailesinin üyesi olarak tanımlanmıştır (Agrawal ve ark. 2003). Argonaute proteinleri iki korunmuş domain yapısı içermektedir. PAZ domaini aynı zamanda Dicer enziminde de bulunurken PIWI domaini bu proteinleri özgürdür. Bünyesel bitki RNA susturma sistemi aynı zamanda RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRP) içermektedir. Bu polimeraz RNA kalıbını kullanarak cRNA'lar (complementary RNA) üretmektedir. Son zamanlarda RNA susturma sistemi geniş bir şekilde bitkilerde ve hayvanlarda tanımlanmıştır (Fire ve ark. 1998, Denli ve Hannon 2003).



Şekil 2.5. RNA ile Uyarılmış Susturma Kompleksi

2.9. Arpa Çizgili Mozaik Virüsü (BSMV) Kullanılarak Gen Susturulması

Bitkiler RNA virüsleri ile enfekte oldukları zaman RNA tarafından kontrol edilen bir savunma mekanizması çalışmaya başlar. Bitkinin içine giren viral RNA ve bu RNA'lara eklenmiş olan transgenler parçalanır ve bitki virüse direnç gösterir (Voinnet 2001). Transkripsiyon sonrası gen susturması sistemi hem vektörün içinde bulunan endojen gen sekansını hem de bitkideki aynı sekansı parçalayarak geni işlevsiz hale getirmektedir. Böylece VIGS yöntemi ile sekansa özel susturma yapılabilmektedir.

'Hordeivirus' ailesine ait olan BSMV ilk olarak arpada (Holzberg ve ark. 2002) sonra buğdayda (Scofield ve ark. 2005) Virüs ile Uyarılmış Gen Susturması (VIGS) için kullanılmaktadır. BSMV üçe ayrılmış tek-iplikli (single-stranded) pozitif sens RNA virüsüdür. Bitki inokülasyonu için T7 promotorunun kontrolü altında olan vektörden RNA transkriptleri hazırlanır (yöntem kısmında açıklanmıştır). BSMV, arpa ve buğday için yaygın olarak kullanılır (Holzberg ve ark. 2002, Lacomme ve ark. 2003, Hein ve ark. 2005, Scofield ve ark. 2005). Çok yakın zamanda BSMV farklı amaçlar için de kullanılmaya başlanmıştır. Örnek olarak, BSMV-VIGS sistemi kullanarak patojen geni doğrudan bitkiye yollanıp patojenin geninin ifadesini engellenerek genin fonksiyonu anlaşılmasına çalışılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan külleme suşları (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh95(53/01) ve 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) Bgh95(53/01) için hassas Bgh103(64/01) için dirençli tür olarak bu çalışmada kullanılmıştır. Pallas01 üzerine virulent ve avirulent külleme sporları kullanılarak gen susturma sonrasında arpa bitkisindeki külleme hastalığına karşı dirençlilikte değişimler gözlemlenmiştir.

3.2. Arpa Bitkilerinin Büyütülmesi

Çalışmada *SRP72* geninin klonlanması 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 büyütme kabininde bitkiler 14 gün boyunca; 18 °C'de 16 saat gündüz ve 8 saat gece fotoperiyodu uygulanmıştır. Bir hafta sonra her bitkide yaklaşık eşit büyüme sağlamak için maleik hidrazit (20ml/kap) verildi. 14'ncü günde *in vitro* transkripsiyon ile hazırlanan BSMV RNAları bitkiye uygulanmıştır. Hastalık uygulamaları ise susturmanın 14'ncü gününde yapılmıştır. Daha sonra 20°C'de 16 saat ışıktaki, ardından 18°C'de 8 saat karanlıkta bekletilmiştir. Bunun için çok yönlü çevresel bitki büyütme dolabı (Biogen) kullanılmıştır.

3.3. Kompetan Hücre Hazırlanması

Kompetan hücre CaCl₂ metoduyla hazırlanmıştır. Stok *E.coli* DH5α hücresi, -80 °C'den alınıp ve 2 ml LB (500 mL LB hazırlaması için: 5gm trypton, 2.5 g yeast bacto, 5mg

Nacl ve 480 mL ddH₂O olarak hazırlanan LB) içine inoküle edildikten sonra 37⁰C'de gece boyunca (12-16 saat 250 rpm) çalkalanarak inkübe edilmiştir (Bertani G. 1951) Ertesi gün gece boyunca inkube olan hücrelerden 1mL alıp, 100mL LB içinde çalkalayarak, OD600nm 0.45 oluncaya kadar (>2 saat) inkübe edilerek üretilmiştir.

Bakteri kültürü buz üzerine konarak soğutulmuş ve yine buz üzerinde bulunan iki kültür tüpüne 500'er µL paylaştırılmıştır.10 dakika buza tutulan tüpler soğutmalı santrifüje (4⁰C) alınarak 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek ve çökelti 10 mL soğuk CaCl₂ (100 mM) ile nazik bir şekilde pipetlenerek çözülmüştür. 10 dakika buza tutulduktan sonra 5000 rpm'de 5 dakika (4⁰C'de) santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek ve çökelti 2 mL soğuk CaCl₂ (0.1 M) ilave edilerek nazik bir şekilde pipetlenerek çözülmüştür. Buz üzerinde en az 5 dakika inkübe edildikten sonra tüplerdeki sıvılar birleştirilerek ve nazikçe pipetlenmiştir. Bakteri transformasyona hazırlanmıştır. Kaç farklı plazmitle transformasyon yapılacaksa o kadar mikro santrifüj tüpüne (1 adet de kontrol amaçlı) yüzer µL paylaştırılmış geriye kalan miktar ise % 50'lik gliserol stoku oluşturularak -80⁰C'de saklanmıştır. Kompetent hücre soğuk ve steril olan 0.1 M CaCl₂ ile muamele edilmiştir.

3.4. Transformasyon

Yukarıdaki işlemler sonunda bakteri, ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alabilecek duruma getirilmiştir. Işı şoku yöntemiyle (42⁰C'de 90 saniye tutularak) plazmitler (pα, pβΔβ ve pγ: 00) ve ilgili gene sahip plazmitler (Pγ: *pds* ve Pγ: *SRP72*) *E.coli* (DH5α)'ya aktarılmıştır. Hedef gene sahip olan *E.coli* (DH5α), içerisinde agar-ampisilin besiyeri bulunan petri kabına inoküle edilip, 12-16 saat, 250 rpm ve 37⁰C'de büyütülmüştür. Büyüyen kolonilerden tek koloni seçilip 5 mL LB-ampisilin besiyeri içerisinde bir gece boyunca (12-16 saat) 37⁰C'de inkübe edilmiştir. Plazmit içeren hücreler % 50'lik gliserol ile karıştırılıp -80⁰C'de saklanmıştır.

3.5. Plazmit İzolasyonu ve Plazmit DNA'sının Lineer Hale Getirilmesi

BSMV vektörleri $p\alpha$, $p\beta\Delta\beta$, $p\gamma$, $pPDS4As$ (anti-sense yönünde) Prof. Dr. Mahinur Akkaya'dan temin edilmiştir. Bir genin susturulması için öncelikle susturma vektörüne o genin bir parçasının klonlanması gerekmektedir (Tai ve ark. 2005). *SRP72* genine homoloji gösteren 298 bp uzunluğundaki DNA arpadan daha önceki çalışmalar sırasında Figen ERSOY tarafından klonlanmış ve $P\gamma$: *SRP72* hazırlanmıştır. Vektörler kompetan *E.coli* DH5 α hücrelerine aktarılmıştır Plazmit izolasyonu 'Plasmid purification Kit (Mini kit, Qiagen)' ile protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Plazmit izolasyonundan sonra NANO-DROP ND-1000 spektrofotometere kullanarak konsantrasyonu belirlenmiştir. $p\alpha$, $p\beta\Delta\beta$, $p\gamma$ ve $p\gamma$: $pPDS4As$ plazmitleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. $p\alpha$ plazmit DNA'sı *MluI* enzimi (New England Biolabs) ile kesilmiştir. 4 μ g $p\alpha$ plazmit DNA'sı, 1X RE tampon çözeltisi (New England Biolabs), 10 U *MluI* enzimi (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 μ l olacak şekilde PZR tüpünde birleştirilerek karışım 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. $p\beta\Delta\beta$ plazmit DNA'sı *BcuI* enzimi (New England Biolabs) kullanılarak kesilmiştir. 4 μ g temizlenmiş $p\beta\Delta\beta$ plazmit DNA'sı, 1X sarı enzim tampon çözeltisi (New England Biolabs), 10 U *BcuI* (NEB Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 μ l olacak şekilde PZR tüpünde birleştirilerek karışım 37°C' de 2 saat inkübe edilmiştir. $p\gamma$ plazmit DNA'sı *BssHII* enzimi (New England Biolabs) kullanılarak kesilmiştir. 4 μ g $p\gamma$:*SRP72* plazmit DNA'sı, 1X NEB3 tampon çözeltisi (New England Biolabs), 10 U *BssHII* enzimi (New England Biolabs) ve PZR suyu son hacim 50 μ l olacak şekilde PZR tüpünde birleştirilerek karışım 50°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Kesilen plazmit DNA örnekleri 1 % agaroz jelde gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

3.6. Agaroz Jel Elektrofrez

Örnekler 30 μ L etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde elektrofrez işlemi ile analiz edilerek fotoğraflanmıştır. Agaroz 1x TAE içinde eritilmiş ve DNA'nın ultraviyole ışık altında görünmesini sağlayan etidyum bromür ilave edilerek elektrofrez kasetine dökülmüştür. Jel donduktan sonra 1xTAE içeren elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. PZR ürünleri yükleme tamponu karıştırarak DNA'nın deliklere çökmesi sağlanmıştır.

DNA'lar 70v/50 mA elektrik akımında 2 saat yürütülmüştür. DNA bantları 312 nm UV ışık altında fotoğraflanmıştır.

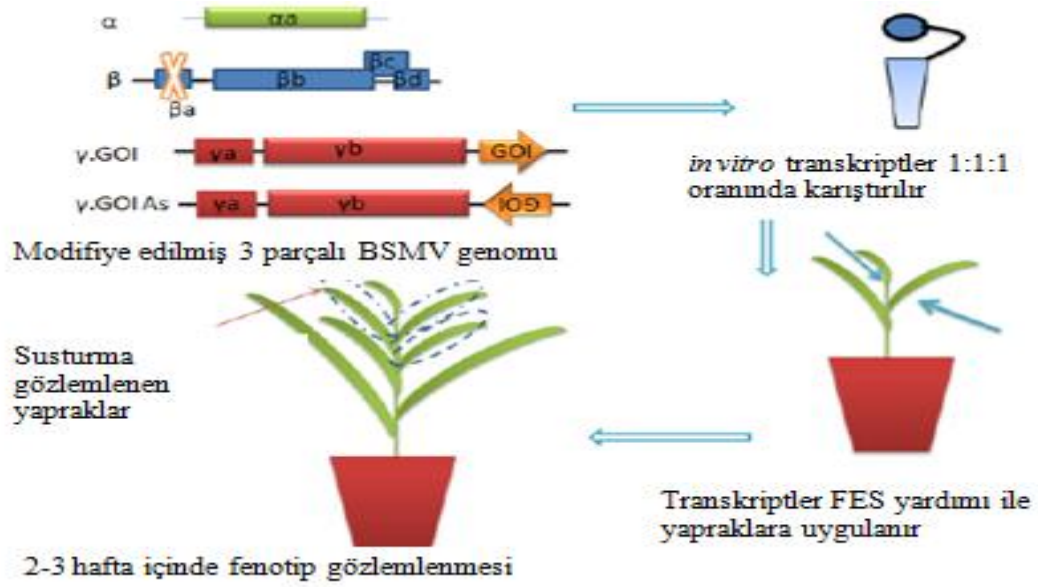
3.7. Primer Sentezi

Öncelikli olarak homoloji analizleri yapılmış ve çalışmamızda susturulması planlanan genin çoğaltılması için primer hazırlanmıştır. Homoloji analizinde literatürde bulunan gen sekansları kullanılarak NCBI yardımı ile sekanslar hizalanmış (tasarlanmış) ve korunmuş olan bölgelerin sekans bilgisinden yararlanılarak *SRP72* genini çoğaltabilmek için primer çiftleri hazırlanmıştır. Bu bölgenin dışında kalan bölgeler içinde susturma işleminin takibi ve qRT-PZR reaksiyonları için de primerler aynı şekilde hazırlanmıştır.

3.8. Virüs RNA'sının *in vitro* Transkripsiyon ile Hazırlaması ve Arpa Yapraklarına Uygulanması

α , $\beta\Delta\beta$ ve γ lineer genomları (RNA'lar) mMessage mMachine T7 *in vitro* transcription kit (cat no: 1340, Ambion, Austin, Tx) kullanılarak sentezlenmiştir. 500 μ L steril PZR tüpüne her bir plazmit ($p\alpha$ -*MluI*, $p\beta\Delta\beta$ -*BcuI*, $p\gamma$ -*BssHIII*, $p\gamma$.*bpds4As-BssHIII* ve $p\gamma$.*SRP72*) ayrı ayrı 0.05 μ g/ μ L olarak hazırlanmıştır. Tüplere 1X Tampon Çözelti (Ambion), 1X NTP Cap'lı nucleotit karışımı (Ambion), 10x dNTP 5 μ L, 10x buffer 1 μ L ve 1 μ L T7 RNA polimeraz karışımı hazırlanıp, karışım 37 °C de 2 saat bekletilmiştir.

VIGS uygulaması bitkiler ilk yapraklarını çıkarttıktan sonra (yaklaşık filizlenmeden 14. gün sonra) yapılmıştır. BSMV transkriptleri 1:1:1 oranında yapraklara uygulanmıştır (Şekil 3.1.). Transkripsiyon karışımına (1 μ L $p\alpha$ -*MluI*, 1 μ L $p\beta\Delta\beta$ -*BcuI*, 1 μ L $p\gamma$ -*BssHIII* veya 1 μ L $p\gamma$.*bpds4As-BssHIII* veya 1 μ L $p\gamma$.*SRP72*) 27.5 μ L FES eklenmiştir. Bu karışım bitkilerin yapraklarına sürülerek virüs uygulanmıştır (Şekil 3.1). BSMV ile enfekte edilen bitkiler 16 saat ışık, 8 saat karanlıkta ve % 60 nem oranında on dört gün boyunca bitki büyütme dolabı içinde tutulmuştur. Virüs uygulamasından sonra sistemik yayılma 7-10 gün içinde gözlemlenmiştir. Susturma kontrolü olarak *PDS* genin susturulması kullanılmıştır. *PDS* geni susturulduğunda klorofil sentezi durduğu için yapraklar beyaz renkli olmaktadır.



Şekil 3.1. BSMV-VIGS kullanılarak tek çenekli bitkilerde gen susturma (Unver ve Budak 2009)

3.9. RNA Elektroforezi

RNA jeli için 10X sodyum fosfat tampon çözeltisinden (Fermentas) 100 ml alınarak 1 L 1X tampon hazırlanmıştır. 0,6 g agaroz 60 ml 1X tampon çözeltisi ile karıştırılarak pişirme ocağı içinde ısıtılmış ve arasına karıştırılmıştır. Yaklaşık 50°C oluncaya kadar soğutulmuş ve 30 μ L etidyum bromür agroz karışıma koyup karıştırılmıştır. Karışım elektroforez kasetine yüklenip jel polimerizasyon için 30 dakika bekletilmiştir. Kalan 1X tampon çözeltisi yürütme işlemi için kullanılmıştır. Jel polimerize olduktan sonra 4 μ L PZR H₂O, 1 μ L boya (RNA boyası) ve 1 μ L RNA transkripti ($p\alpha$, $P\beta$, $p\gamma$: 00, $P\gamma$: *SRP72* ve $P\gamma$: *PDS*) karıştırılarak jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi iki saat 60V'da gerçekleştirilmiştir. Analiz için jel fotoğrafı çekilmiştir.

3.10. Arpa bitkilerine *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, (*Bgh95(53/01)* ve *Bgh103(64/01)*) Uygulanması ve Trypan Mavisi ile Boyama Yöntemi

Sustulmuş olan arpa bitkilerden 14'ncü günde yaprak örnekleri *Bgh* enfeksiyonu ve mRNA izolasyonu için toplanmıştır. Her bitkiden iki parça yaprak alınmış ve %1

Benzimidazol içeren %15'lik agar besiyerlerine yerleştirip *Bgh95(53/01)* (*avrMla6* içeren) patojenle enfekte edilmiştir (Şekil 3.2.). Yapraklar 16 saat ışık, 8 saat karanlıkta ve % 60 nem oranında bitki büyüme dolabı içinde tutulmuştur. Enfeksiyondan sonra 3'ncü ve 5'nci günlerde farklı yapraklar farklı zamanda alınmıştır. *Bgh95(53/01)* sporlarının büyümesinin incelenmesi amacıyla yapraklar bir gece boyunca % 90 etil alkol içinde bekletilerek yapraklardan klorofil çıkarılmıştır. Ertesi gün 15 dakika tryphan mavisi solüsyonu (20 mL etanol, 10 mL fenol, 10 mL su, 10 mL laktik asit (83%), ve 10 mg trypan mavisi) içinde bekletilmiştir. Yapraklardaki fazla boya yıkama solüsyonu (Kloral hidrat (2.5 g/mL su) ile gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek çıkartılmıştır (Koch ve Slusarenko 1990). *Bgh95(53/01)* sporlarının büyümesi ışık mikroskobu (Leica DFC 280) ile incelenmiştir.



Şekil 3.2. Pallas01 yapraklarına *Bgh95(53/01)* ve *Bgh103(64/01)* sporlarının uygulanması: Susturma yapılmış bitkilerden ve kontrol bitkilerinden yaprak örnekleri toplanarak *Bgh95(53/01)* virulant ve *Bgh103(64/01)* avirulant küllerle uygulanmıştır.

3.11. Bitkilerden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu üreticinin hazırladığı prosedüre göre TRIzol (Invitrogen) kullanarak 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 dakika oda sıcaklığında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlanmıştır. 1 ml reaktifi için 0.2 ml kloroform eklenmiştir. Tüplerin kapakları iyice kapatılıp 15 sn boyunca elle kuvvetlice çalkalayarak karıştırılmış ve 2-3 dakika oda ısısında bekletilmiştir. 20 dakika 4 °C' de 15000 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 aktarılır ve izopropil alkolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Homojenizasyon esnasında kullanılan TRIzol reaktifinin yarısı kadar izopropil alkol eklenerek örnekler oda ısısında 10 dakika bekletilip daha sonra 15000 rpm de 4 °C de 10 dakika santrifüj edilmiştir. RNA yıkaması: Üst faz uzaklaştırılmıştır. 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 dakika 10000 rpm de 4 °C de santrifüj edilmiştir. RNA çözülmesi: İşlemler sonunda RNA 5-10 dakika kurumaya bırakılmış ve RNA 30 µL steril su ile çözülerek ve 10 dakika 55-60 °C de bekletilip kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.12. RNA'nin Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 spektrofotometre ile 1µL örnek kullanılarak ölçülmüştür. RNA'nın düzgünlüğü 1 % formaldehit-agaroz jel'de elektroforez ile kontrol edilmiştir. 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.

3.13. cDNA Oluşumu

RNA izolasyonları tamamlandıktan sonra cDNA sentezi işlemine geçilmiştir. Bu işlemin sağlıklı yapılabilmesi için de, olası DNA ve protein kalıntıları RNA örneklerinden uzaklaştırılmıştır. Bunun için RNA örneklerinden 400 ng (Her 1 µL içinde 50 ng RNA olacak şekilde hazırlanmış) alınarak 10 unite RNase 'free' DNase I ile 20 µL ilk reaksiyon hacminde toplanmış ve 37 °C'de 45 dakika tutularak 65 °C 10 dakika ek inkübasyon ile toplam RNA örnekleri DNA'dan arındırılmıştır.

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 oligodT konulduktan sonra 5 dakika 65 °C'de inkübe edilip, buzun üstünde beklemeye alınmıştır. Karışımın üstüne 4 µL 5X birinci sarmal tampon çözeltisi (Invitrogen), 2 µL 0.1M DDT (Invitrogen), 1 µL RNase out 40 U/µL (Invitrogen) ve 1µL Superscript III 200 U/µL (Invitrogen) konulduktan sonra reaksiyon 10 dakika 25 °C'de, 1 saat 42 °C'de gerçekleştirilip, 70 °C'de 15 dakika inkübe edilerek enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Burada ürün olarak elde edilmiş olan tek zincir cDNA daha sonra kalıp DNA olmak üzere primerler kullanılarak qRT-PZR reaksiyonlarında kullanılmıştır.

3.14. qRT-PZR ile Susturma Yapılan Örneklerde SRP72 Transkript Miktarının Belirlenmesi

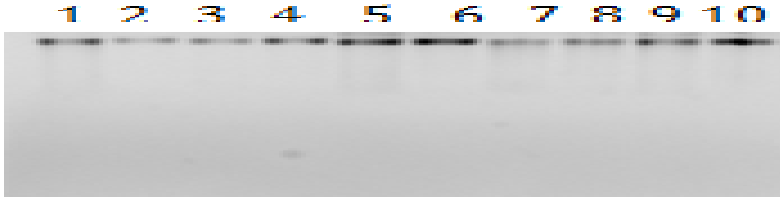
Tek ilk iplik cDNA 1/20 oranda sulandırılarak 50 ng/ μ L olacak şekilde ayarlanmıştır. Hedef genin susturulmasından sonra transkript miktarının belirlenmesi için eş zamanlı PZR (qRT-PZR) kullanılmıştır. SRP72 geninin transkript seviyesini belirlemek için 5'-CATCGCTGCTCTAGTTG-3'ileri primer ve 5'-GCCAGCTCGAAGCTCAT-3' geri primer olarak tasarlanmıştır. qRT-PZR reaksiyonları üçer kez tekrarlı olarak yapılmıştır. RNA miktarının Normalizasyonu için 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').

4.6 μ L ddH₂O, 5 μ L cDNA (50 ng/ μ L), 0.1mMolar 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 dakika, 30 döngü; 94 °C'de 30 saniye at, 50 °C'de 30 saniyeye 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 hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Plazmitlerin Lineer Hale Getirilmesi

in vitro transkripsiyon için hazırlanan plazmitler restriksiyon enzimleri ile kesilerek kesim %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

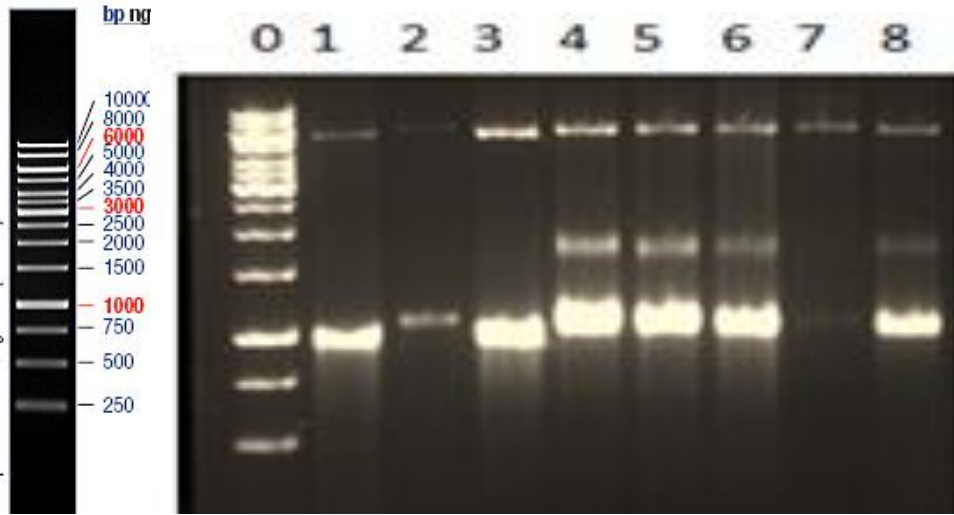


Şekil 4.1. Plazmitlerin Lineer Hale getirilmesi

1-4 nolu kuyucuklar: α plazmit DNA'sını, 5-8 nolu kuyucuklar: $\beta\Delta\beta$ plazmit DNA'sını, 8 ve 9 nolu kuyucuklar: γ :SRP72 plazmit DNA'sını ve 10 nolu kuyucuk: p γ .pdsAS4 plazmit DNA'sını göstermektedir.

4.2. Transkriptlerin Kontrolü (RNA Elektroforezi)

Bitkilere uygulamak üzere *in vitro* olarak hazırlanan BSMV RNA'ları (α , β ve γ) karıştırılıp bitkiye uygulanmadan önce transkripsiyon reaksiyonunun çalışması agaroz jelde görüntülenerek tespit edilmiştir.

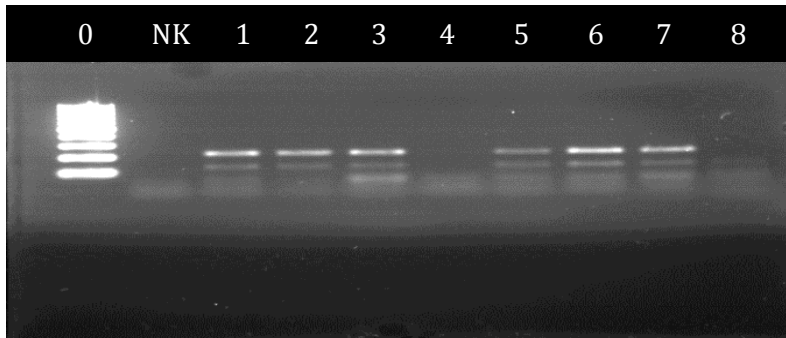


Şekil.4.2. %1 Agaroz jel Elektforezde transkriptlerin kontrolü:

0 nolu kuyucuk: 1kb Markör, Gene ruler (Fermentas), 1 nolu kuyucuk: *pa* transcripti, 2 nolu kuyucuk: *pβΔβ* transcripti, 3 nolu kuyucuk: *pγ* transcripti, 4 nolu kuyucuk *pγ: pdsAs4* transcripti, 5 nolu kuyucuk: *Pγ: SRP72* transcripti, 6 ve 8 nolu kuyucuklar: *Pγ: pdsAS4* transcriptidir.

4.3. cDNA Sentezinin Kontrolü

Bitki örneklerinden izole edilen toplam RNA cDNA'ya dönüştürüldükten sonra, tek iplikli cDNA agaroz jelde yürütülerek reaksiyonun çalışması tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. cDNA sentezinin kontrolü

0 nolu kuyucuk: 1kb Markör, Gene Ruler (Fermentas), NK: Negatif Kontrol, 1-8 nolu kuyucuklar: *SRP72* susturulmuş bitkilerden hazırlanan farklı cDNA örnekleri, (4. ve 8. örneklerde reaksiyon çalışmadığı için bu örnekler qRT-PZR çalışmalarında kullanılmamıştır)

4.4. qRT-PZR Sonuçları ve Susturma Düzeyi

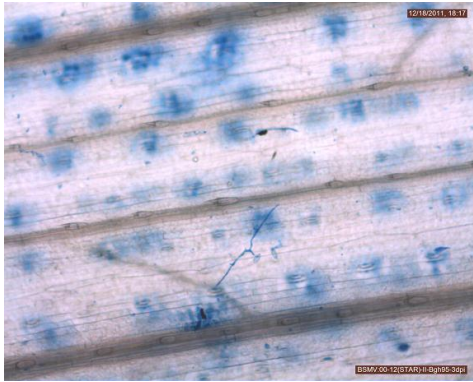
qRT-PZR sonucunda elde edilen eşik değerleri arasındaki farklar *SRP72* geninin susturulduğu bitkilerde ve kontrol bitkilerinde analiz edilerek, genin susturulmasında ne kadar başarılı olduğu saptanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan formül aşağıda yer almaktadır (Pfaffl 2004).

$$\text{mRNA düzeyi} = \frac{2^{-\Delta C_t} \text{ hedef gen (kontrol genin ortalaması - Denesel genin ortalaması)}}{2^{-\Delta C_t} \text{ referans gen (kontrol genin ortalaması - Deneysel genin ortalaması)}}$$

Çalışmada 3 farklı biyolojik replika (*SRP72* geninin susturulduğu 3 farklı bitki örneği) ve her bir biyolojik replika için 3 teknik replika (qRT-PZR reaksiyonu 3 kez tekrarlanarak) kullanılarak ortalama susturma değeri %57 olarak hesaplanmıştır.

4.5. BSMV: 00 Uygulanmış Arpa Yapraklarında Hif Büyümesi

Negatif kontrol bitkileri sadece BSMV:00 ile enfekte edilmiştir. Çalışmada 12 adet BSMV:00 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisi kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol bitkilerinde beklenen şekilde *Bgh95*(53/01) sporları az büyümüştür.



(a)



(b)

Şekil 4.4. Negatif kontrol bitkileri üzerinde külleme hastalığının büyümesi (a) BSMV:00 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95*(53/01) uygulanmasından 3 gün sonrası sporların gelişimi (10X), (b) BSMV:00 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95*(53/01) uygulanmasından 5 gün sonrası sporların gelişimi (10X)

4.6. BSMV Uygulanmamış Yapraklarında Hif Büyümesi

Virüs içermeyen enfeksiyon (sahte enfeksiyon, mock) için Pallas01 bitkilerine sadece FES solüsyonu uygulanmıştır. Bu deney için 6 adet Pallas01 bitkisi kullanılmıştır. Yapraklarda beklenen şekilde *Bgh95(53/01)* sporları az büyümüşür.



(a)



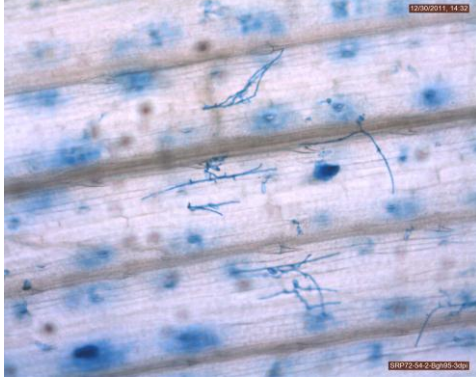
(b)

Şekil 4.5. BSMV uygulanmamış yapılan Pallas01 bitkileri üzerinde külleme hastalığının büyümesi

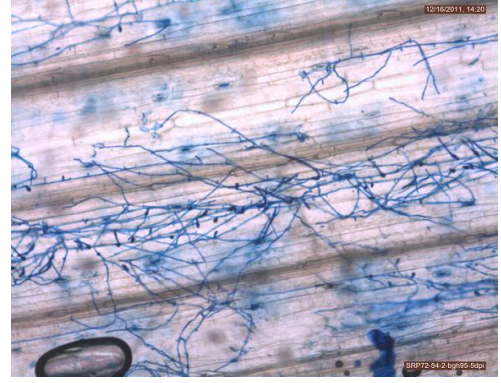
(a) Enfeksiyon yapılmamış (BSMV uygulanmamış) bitkilerde *Bgh95(53/01)* uygulanmasından 3 gün sonrası sporların gelişimi (10X), (b) Enfeksiyon yapılmamış bitkilerde *Bgh95(53/01)* uygulanmasından 5 gün sonrası sporların gelişimi (10X)

4.7. *SRP72* Geni Susturulmuş Arpa Yapraklarında Hif Büyümesi

Çalışmada 12 adet Pallas01 bitkisinde *SRP72* geni susturulmuştur. *SRP72* geninin susturulduğu (BSMV:*SRP72*) bitkilerde *Bgh95(53/01)* sporları kontrol bitkilerine göre daha fazla büyümüşür. Bu büyüme farklılığı iki farklı parametre (hif uzunluğu ve çimlenme verimi) kullanılarak değerlendirilmiştir.



(a)



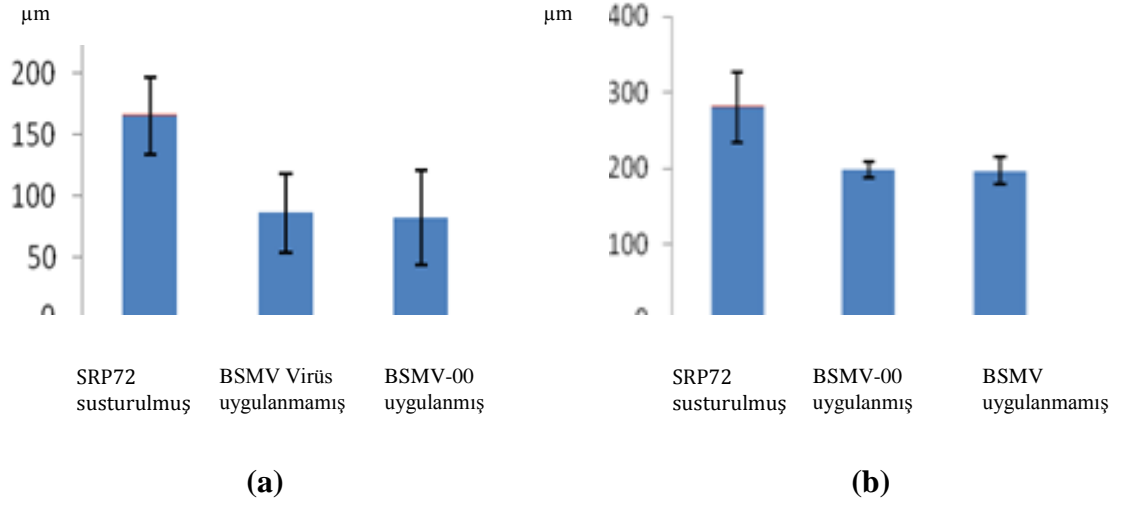
(b)

Şekil 4.6. *SRP72* geni susturulmuş arpa bitkileri üzerinde külleme hastalığının büyümesi

(a) BSMV:SRP72 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95(53/01)* uygulanmasından 3 gün sonrası sporların gelişimi (10X), (b) BSMV:SRP72 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95(53/01)* uygulanmasından 5 gün sonrası sporların gelişimi (10X)

4.8. Hif Uzunluğu

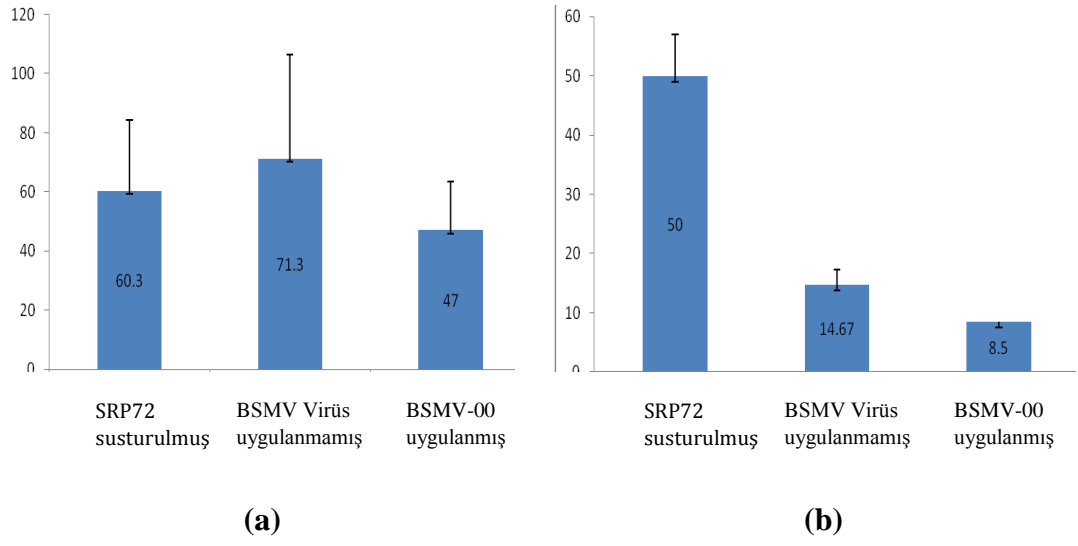
Susturma yapılan (BSMV:SRP72), Negatif Kontrol (BSMV:00) ve Enfeksiyon yapılmamış (BSMV uygulanmamış) Pallas01 bitkilerinde büyüyen bütün sporların uzunluğu mikroskop ile incelenerek, hif uzunluğu ölçülmüştür. Susturma yapılan bitkilerde sporlar kontrol bitkilerine göre yaklaşık olarak iki kat daha fazla büyüme göstermiştir.



Şekil 4.7. BSMV:00, BSMV:SRP72 ve BSMV uygulanmamış yapılan Pallas 01 bitkilerinde spor büyümesinin hif uzunluğu açısından karşılaştırılması (a) Hif uzuluğu (3dpi), (b) Hif uzuluğu (5dpi)

4.9. Sporların Büyüme Verimi

Susturma yapılan (BSMV:SRP72), Negatif Kontrol (BSMV:00) ve Enfeksiyon yapılmamış (BSMV uygulanmamış) Pallas01 bitkilerinde her bir yaprağa düşen spor sayısı ile bunlardan çimlenen sporlar sayılarak büyüme verimi hesaplanmıştır. Herbir örnek için yapraklarda çimlenen spor sayısı toplam yapraklara düşen spor sayısına bölünüp 100 ile çarpılmıştır. *SRP72* geni susturulmuş arpa bitkilerinde toplam sporun %83.2'si çimlenirken, kontrol bitkilerinde %20.6'sı çimlenmiştir.



Şekil 4.8. Sporların Büyüme Verimi

(a) Ortalama yaprak başına düşen spor sayısı ve (b) Toplam yapraklara düşen sporlardan çimlenmiş spor sayısı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerde bulunan R (dirençlilik) proteinleri hastalık yaratan organizmada bulunan Avr (avirulans) proteinini tanır ve patojenin saldırısını durdurmak için bir dizi reaksiyon başlatır. Bu etkileşimden sonra aktive olan yollar henüz net olarak bilinmemektedir. 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 hücresinin ölümüne kadar olan sinyal iletim mekanizmasında *SRP72* proteininin rolünü araştırmaktır. Bu amaca yönelik *SRP72* (Sinyal Tanıma Partikülü 72) geninin arpa homologu, BSMV (Arpa Çizgili Mozaik Virüsü) kullanılarak Virüsle Uyarılan Gen Susturma (VIGS) yöntemi ile susturularak külleme hastalığındaki rolü tespit edilmiştir.

Susturma çalışmasının başarılı olup olmadığını anlamak için 3 farklı biyolojik tekrar yapılarak qRT-PZR tekniği ile *SRP72* geninin mRNA düzeyi tespit edilmiştir. Bu örneklerde ortalama olarak susturma yapıldıktan sonra *SRP72* transkript seviyesinin kontrol (BSMV: 00) bitkisine göre %57 azaldığı gösterilmiştir.

SRP72 geni susturulmuş Pallas01 bitkilerine külleme sporları (*Bgh95*(53/01) virulent, *Bgh103*(64/01) avirulent) uygulanmıştır. Avirulat sporların kontrol (BSMV:00) ve *SRP72* geni susturulmuş Pallas01 bitkilerine uygulanması sonucunda dirençlilik seviyesinde bir değişim tespit edilmemiştir (Gösterilmeyen sonuç). Bitkilerde R-Avr proteinlerinin etkileşiminden sonra, dirençliliğin oluşması için sadece tek bir gen değil pek çok gen ürünü birlikte çalışmaktadır. Çalışmada susturulan *SRP72* geni bir R geni değildir, sadece dirençliliğin sağlanması için gerekli olan yolda rol alan bir gen olma ihtimali yüksektir. Bu sebeple *SRP72* geninin susturulması dirençliliğin tamamen kayıp olmasına sebep olmamıştır.

Ancak virulent spor uygulamalarında hassas tepkime veren Pallas01 bitkisi *SRP72* geni susturulup virulent spor uygulandığı zaman daha da hassas hale gelmiştir. Bu sonuca göre *SRP72* geninin *Mla6* geni sonrasında aktive olan yolda rol oynayan proteinlerden biri olduğu tespit edilmiştir. *SRP72* geninin susturulması sonrasında hem sporların

çimlenme verimi artmıştır (kontrol bitkilerinde %20.6, susturma yapılan bitkilerde %83.2), hem de hifler daha çok büyüme göstermiştir (kontrole göre 2 kat daha uzun hif uzunluğu).

Bu çalışmada susturulan *SRP72* geni arpada külleme hastalığına dirençlilikte bugüne kadar rolü gösterilmemiş bir gen olduğu için çalışma önemlidir. *SRP72* geni ilk kez arpa bitkisinde susturulmuş (Daha önce hiçbir bitkide susturma çalışması yapılmamıştır) ve arpada külleme hastalığına dirençlilikteki rolü ilk defa tespit edilmiştir.

Bitkilerde hastalıklara karşı dirençlilik ekonomik açıdan çok önemli bir sorundur. Dünyada pek çok araştırmacı bitkilere kalıcı dirençlilik kazandırılması için çalışmaktadır. Bitkilerde dirençlilik mekanizmasının anlaşılması ve genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi bu yolda atılan en büyük adımlardır. Bu çalışmada bulunan sonuçlar pek çok yeni çalışmaya öncülük edecek niteliktedir. Bu genlerin pek çok bitki ve hastalıkta etkili olması ve bitkilerde bağışıklık sistemini uyarması durumunda genler transgenik bitki yapımında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, N., Dasaradhi, P., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R., Mukherjee, S. 2003.** RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 4:657-685.
- Agrios, G. 2005.** Plant Pathology. Department of Plant Pathology University of Florida, United States of America, 922 pp.
- Anonim, 2005.** (http://www.uni-giessen.de/fbr09/ipaz/abt_phytopath/ag-phytopath/DFG-Nachwuchs/Nachwuchs--en.htm) (03/07/2012)
- Baulcombe, D.C. 1999.** Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2:109–113.
- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S. And Hannon, G. 2001.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-366.
- Bertani, G. 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62:293-300.
- Both, M., Csukai, M., Stumpf, P.H., Spanu, D. 2005.** Gene Expression Profiles of *Blumeria graminis* Indicate Dynamic Changes to Primary Metabolism during Development of an Obligate Biotrophic Pathogen. *Plant Cell*, 17:2107–2122.
- Brow, T. 2010.** Gene cloning and DNA analysis. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, UK, 338 pp.
- Cakir, C., Tör, M. 2010.** Factors influencing Barley Stripe Mosaic Virus-mediated gene silencing in wheat. *Physiol. Mol. Plant P.*, 1-24
- Czembor, J.H., Czembor, J.H. 2002.** Selections from barley landrace collected in Libya as new sources of effective resistance powder mildew. *Rostl. Vyr.*, (48)5:217-223.
- Denli, A.M., Hannon, G.J. 2003.** RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem. Sci.*, 28: 196-201.
- Dinesh-Kumar, R., Anandalakshmi, R., Marathe, M., Schiff, Liu, 2003.** Virus-induced gene silencing, *Methods Mol. Biol.*, 236:287-294.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl T. 2001.** RNA interference is mediated by 21-22-nucleotide RNAs. *Gene. Dev.*, 15:188-200.
- Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811.

Feng, J., Wang, F., Liu G., Greenshields, D., Shen, W., Kaminskyj, Susan., Hughes G.R., Peng, Y., Selvaraj, G., Zou J., Wei, Y. 2009. Analysis of a *Blumeria graminis*-Secreted Lipase Reveals the Importance of Host Epicuticular Wax Components for Fungal Adhesion and Development. *Mol. Plant Microbe In.*, 22 (12):1601-1610.

Filipowicz, W. 2005. RNAi: The Nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, 122:17-20.

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

Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dümpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B., Superti-Furga, G. 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 440:631-636.

Halterman, D., Zhou, F., Wei F., Wise, R, Schulze, P. 2001. The l 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.

Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen M., Soenderby, I. E., Sundar. S. Jarmolowski. A., Shirasu, K., Lacomme, C. 2005. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol.*, 138:2155-2164.

Himiton, A.J., Buncombe, D.C. 1999. A species of antisense RNA in post – transcriptional gene silencing in plants. *Science*. 286:950-952.

Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., Pogue. G. 2002. Berley strip Mosaic Virus-induced gene silencing in monocot plant. *Plant J.*, 3:315-327.

Hutvagner G. Simard M.J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature*, 9:22-32.

Jarosch B., Kogel, K. H., Schaffrath, U. 1999. The Ambivalence of the Barley Mlo Locus: Mutations Conferring Resistance against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhances susceptibility to the Rice blast fungus *magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Microbe In.* (12)6:508-514.

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

Jorgensen, R.A. 1990. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.*, 8:340-344.

- Koch E, Slusarenko A (1990).** Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell*, 2: 437-445.
- Kumagai, M.H., Donson, J., Della-cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Grill, L.K. 1995.** Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *P. Natl. Acad. Sci., USA*, 92:1679-1683.
- Laroche, A., Eudes, F., Frick, M.M., Huel, R., Nykiforuk, C.L., Conner, R.L., Kuzyk, A., Acharya, S., Jordan, M., A. 2002.** Wheat resistance gene against stripe rust. *Can. J. Plant Pathol.*, 24:504-507.
- Lacomme, C., Hrubikova, K., Hein, I. 2003.** Enhancement of Virus-induced Gene Silencing through viral-based production of inverted-repeats. *Plant J.*, 34:543-553.
- Lu, R., Martin-Hernandez A.M., Peart, J.R, Malcuit, I., Baulcombe D.C. 2003.** Virus-induced gene silencing in plants, *Methods*, 30:296–303.
- Lustig, Y., Goldshmidt, H., Uliel, S., Michaeli, S. 2005.** The Trypanosoma brucei signal recognition particle lacks the Alu-domain-binding proteins: purification and functional analysis of its binding proteins by RNAi. *J. Cell Sci.*, 118:4551-4562.
- Murchison, E., Partridge, J.F., Tam, O H., Cheloufi, S., Hannon G.J. 2005.** Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *P. Natl. Acad. Sci., USA*, 102(34):12135–12140.
- Napoli, C., Lemieux C., Jorgensen R. 1990.** Introduction of a chimeric chalcone Synthase Gene in to Petunia Result in Suppression of homologous Reversible Co-suppression of homologous genes in transgenic plant. *Plant Cell*, 2:279-289.
- Oerke, E.C., Dehne, H.W. 2004.** Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.*, 23:275–285.
- Pfaffl, M.W 2004.** Quantification strategies in real-time PCR: A-Z of quantitative PCR, Editör: Bustin, S.A., La Jolla, CA, USA, 87-112.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane S.A., Baulcombe, D.C. 1999.** Gene silencing without DNA: rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell*, 11:1207-1215.
- Scofield, S.R., Huang, L., Brandt, A.S., Gill, B.S. 2005.** Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiol.*, 138:2165-2173.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu K. 2003.** HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *P. Natl. Acad. Sci., USA*, 100:11777-11782.
- Tai Y.S., Bragg J.N., Edwards M.C. 2005.** Virus vector for gene silencing in wheat. *Biotechniques*, 39:310-314.

Thomas T. 2001. RNA Interference and Small Interfering RNAs. *ChemBioChem*, 2:239-245.

Unver, T., Budak, H. 2009 .Virus-induced gene silencing, a Post transcriptional gene silencing method. *Int. J. Plant Genom.*, 2009:1-8

Utz, P.J., Hottelet, M., Le, T.M., Kim, S.J., Geiger, M.E., van Venrooij, W.J., Anderson, P. 1998. The 72-kDa component of signal recognition particle is cleaved during apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273:35362-35370.

Van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., Stuitje, A.R., 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2:291-299.

Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.*, 17:449-459.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localised introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95:177-187.

Voinnet, O., Baulcombe, D.C. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389-553.

Walter, P., Blobel, G. 1980. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *P. Natl. Acad. Sci., USA.*, 77:7112-7116.

Walter, P., Blobel, G. 1982. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 299:691-698,

Wei, F., Werner, K.G., Morroll, S.M., Kurth, J., Mao, L., Wing, R., Leister, D., Lefert, P.S., Wise, R.P. 1999. The Mla (Powdery Mildew) Resistance Cluster Is Associated With Three NBS-LRR Gene Families and Suppressed Recombination Within a 240-kb DNA Interval on Chromosome 5S (1HS) of Barley. *Genetics*, 153:1929-1948.

Wise, P.R., Ellingboe, H.A. 1985. Fine structure and instability of the ml-a locus in barley. *Genetics*, 111:113-130.

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.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P., Bartel, D.P. 2000. Double-Stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell*, 101: 25-33.

Zhang, H. 2004. Biochemistry and Modeling of Human Dicer, A Key Protein Involved in RNA Interference, Ph.D. Thesis, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel.

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.

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 hakim için gereken miktar agaroz 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 saniye kaynaması yeterlidir). Ateşden alınan jel üzerine son konsantrasyon 0.5µg/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 oluşturmaktan dökülür ve yaklaşık 40 dakika 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 kağıda 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.

4: FES ve GP Solüsyonlarının Hazırlanması

FES için GP solüsyonuna ihtiyaç vardır (10X GP: 18.77 g glysin, 26.13 g K₂HPO₄, ddH₂O son hacim 500 mL olacak şekilde ekleyip 20 dakika otoklavlanmıştır). FES; GP

solüsyonuna 2.5 g Sodyum pyrofosfat, 2.5 g bentonit, 2.5 g selit ve ddH₂O eklenerek son hacim 250 mL olacak şekilde karıştırılmış ve 20 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

EK 2: Susturma İçin Kullanılan *Hordeum vulgare* (Arpa) SRP72 Genin Dizisi

CAAGGTCGCCGACCAAGTCCTCGCGGCGTCGCCGGGCGACGAGGACGCGGT
GCGATGCAAGGTGGTCGCGCACATCAAGTCCGACGCGACGGACAAGGCGCT
CGCGGCCATCCGCGCCGCGGAGCGCCTCCCCATCGATCTCAGCTACTACAA
GGCATACTGCTACTACAGGCAAAATAAATTGCAAGAAGCTCTGGATATATT
GAATGGTCAAGAAGAAACAGCTGCTGTTCTCCAGCTGGAATCCCAGATCTA
TTACCGATTAGGAAGAATGAATGATTGCATGA

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Sefawdin Berta BEDASSA
Doğum Yeri ve Tarihi	: Etiyopya, 1982
Yabancı Dili	: İngilizce ve Türkçe
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	
Lise	: Dembi Lisesi
Lisans	: Jima Üniversitesi
Yüksek Lisans	: Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Bölümü/
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl	: Mizan Tepi Üniversitesi
İletişim (e-posta)	: nebilsefa@gmail.com
Yayımları	:----