

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BUĞDAY-KAHVERENGİ PAS ETKİLEŞİMİNDE ADAY EFEKTÖR
PTTG_00016’NİN ROLÜNÜN GEN SUSTURMA YOLUYLA
BELİRLENMESİ**

Begüm KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ

EDİRNE- 2025

BEGÜM KURT’UN hazırladığı “**BUĞDAY-KAHVERENGİ PAS ETKİLEŞİMİNDE ADAY EFEKTÖR PTTG_00016’NİN ROLÜNÜN GEN SUSTURMA YOLUYLA BELİRLENMESİ**” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ

Doç. Dr. Halide KARABIYIK

Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL

Tez Savunma Tarihi: 17/07/2025

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ
Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....
Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

17/07/2025

Begüm KURT

İmza

Yüksek Lisans Tezi

Buğday-Kahverengi Pas Etkileşiminde Aday Efektör *PTTG_00016*'nın Rolünün Gen Susturma Yoluyla Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Puccinia triticina (Pt), buğday bitkisinde kahverengi pas hastalığına sebep olan ve önemli verim kayıplarına neden olan bir patojendir. Patojenler tarafından salgılanan efektor proteinler, bitkinin savunma yanıtlarını baskılar ve hormon sinyal yollarını manipüle ederek enfeksiyon gelişimini sağlar. Patojene ait bu efektorların tespiti, gelişen hastalıkların enfeksiyon düzeylerini düşürmede ve kontrol altına almada, bitki savunma sistemlerinin aydınlatılmasında ve hastalıklara dayanıklı bitkiler geliştirmede önemlidir. Aynı zamanda tarımda çevresel, ekonomik ve biyolojik açıdan sürdürülebilir yaklaşımların desteklenmesine olanak sağlar. Bu tez çalışmasında daha önceki proteomik çalışmalarda tespit edilen aday efektorlardan birinin fonksiyonel analizi yapılarak gerçek efektor olup olmadığının analizi yapılmıştır. Analiz için aday efektor *PTTG_00016* kullanılmıştır. Aday efektor geni, HIGS yöntemi ile susturularak enfeksiyon gelişimindeki etkinliği analiz edilmiştir. HIGS, patojene ait genlerin konak aracılığı ile susturulduğu RNAi tabanlı bir işlemdir. Özellikle biyotrofik fungusların saldırı stratejilerinin anlaşılmasında bu yöntem sıkça kullanılmaktadır.

Tez kapsamında efektor adayı *PTTG_00016*'yı hedeflemek üzere eksonları içine alan 449 bp uzunluğundaki bir bölge RNAi fragmenti tasarımı için seçilmiştir. Tasarlanan RNAi fragmenti Arpa Çizgili Mozaik Virüsü (BSMV) vektörüne klonlanmış ve ardından Morocco buğday çeşidine dsRNA olarak transfer edilmeleri bu virus aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Viral semptomların belirgin olarak gözleendiği 10. günde BSMV inokulasyonunun ortalama olarak %75 oranında başarı ile

gerçekleştirdiği tespit edilmiş ve bitkiler, *Pt* ırk1 ile inoküle edilmişlerdir. Fungal inokülasyonun 3. gününde gen ekspresyon düzeyi qRT-PCR ile ve enfeksiyon gelişimi mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda *PTTG_00016* geninin ortalama olarak %25 oranında susturulduğu tespit edilmiştir. Mikroskopik değerlendirmede ise fungusun enfeksiyon yapılarının gelişiminde kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *Pt* inokülasyonunun 12. gününde ise HIGS uygulanmış ve kontrol örneklerde enfeksiyon şiddeti Cobb skalasına göre değerlendirilmiştir. Buna göre pas yoğunluğunun anlamlı düzeyde azalmadığı, enfeksiyon şiddetinin kontrole göre sadece %10 düzeyinde gerilediği tespit edilmiştir. Tez çalışması sonucunda *PTTG_00016*'nın gerçek bir efektör olduğu yönünde yeterli bulgu elde edilememiştir.

Yıl : 2025

Sayfa Sayısı : 84

Anahtar Kelimeler : Fonksiyonel Genomik, RNAi, Efektör, HIGS

Master Thesis

Determination of the Role of Candidate Effector PTTG_00016 in Wheat–Leaf Rust Interaction via Gene Silencing

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Biotechnology and Genetics Department

ABSTRACT

Puccinia triticina (Pt) is the causal agent of leaf rust in wheat, leading to significant yield losses. Effector proteins secreted by pathogens suppress plant defense responses and manipulate hormone signaling pathways, facilitating the establishment and progression of infection. Identification of such pathogen-derived effectors is crucial for reducing disease severity, elucidating plant immune mechanisms, and developing disease-resistant cultivars. Furthermore, it supports the implementation of environmentally, economically, and biologically sustainable approaches in agriculture. In this thesis, a functional analysis was conducted on one of the candidate effectors previously identified through proteomic studies to determine whether it acts as a true effector. The candidate effector gene PTTG_00016 was selected for analysis and was silenced using the Host-Induced Gene Silencing (HIGS) method. HIGS is an RNAi-based technique in which pathogen genes are silenced through expression in the host plant.

It is frequently employed in the study of biotrophic fungal pathogens to uncover their infection strategies. For this purpose, a 449 bp fragment encompassing the exonic regions of PTTG_00016 was selected for RNAi construct design. The RNAi fragment was cloned into the Barley stripe mosaic virus (BSMV) vector, and the recombinant virus was used to deliver dsRNA into the Morocco wheat cultivar. By day 10 post-inoculation, distinct viral symptoms were observed, and the success rate of BSMV inoculation was approximately 75%. Subsequently, plants were inoculated

with **Pt** race 1. On the third day after fungal inoculation, the gene expression levels were quantified using qRT-PCR, and infection progression was examined microscopically. qRT-PCR analysis revealed that PTTG_00016 expression was silenced by approximately 25%. However, microscopic evaluation did not show a significant difference in the development of fungal infection structures compared to the control. On day 12 post-inoculation with Pt, the severity of infection in HIGS-treated and control plants was assessed based on the Cobb scale. The results indicated that rust severity did not decrease significantly; disease severity was reduced by only about 10% compared to the control. In conclusion, this study did not provide sufficient evidence to confirm that PTTG_00016 functions as a bona fide effector.

Year : 2025

Number of Pages : 84

Keywords : Functional Genomic, RNAi, Effector, HIGS

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimi sürecimde, her koşulda desteğini eksik etmeyen, bilimsel bakış açımı geliştirmemde ve araştırma disiplini kazanmamda bana kattıkları ve karşılaştığım her zorlukta yol gösterici yaklaşımı sayesinde bu çalışmayı başarıyla tamamlayabildiğim danışman hocam Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye, tez materyalini karşılayan Prof. Dr. Aslıhan GÜNEL'e, desteğini esirgemeyen bölüm başkanımız Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya, laboratuvar çalışmalarında desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Emrah AKPINAR ve Arş. Gör. Metin Burak TATLİSES'e, çalışma arkadaşlarım Neslihan YILMAZ, İlayda KÜÇÜK, her zaman arkamda olup her türlü desteği sağlayan canım aileme özellikle babaannem Nedime SİLİ'ye ve hayallerimin arkasında duran ve destekleyen Celil Berk YILMAZ' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK ARDEB tarafından 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında 221O329 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	4
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Fonksiyonel Genomik	4
2.2. Aday Genlerin Fonksiyonel Analizi	6
2.2.1. Heterolog Ekspresyon Sistemleri.....	7
2.2.2. Hedef Geninin İfadesini Baskılama: Gen inaktivasyonu ve Gen Susturma	8
2.2.2.1. Gen İnaktivasyonu (Knockout).....	8
2.2.2.2. Gen Susturma (Silencing)	9
2.3. Fitopatojenik Mantarlar	10
2.4. Bitki-Fungal Patojen Etkileşimi ve Eftörler.....	12
2.4.1. Bitki-Fungus Etkileşimi	12
2.4.2. Pas Fungusları ve Tarımsal Önemi	14
2.4.3. Pas Funguslarında Eftörler	15
2.5. Konak Aracılı Gen Susturma (HIGS)- Pas Eftörlerinin Fonksiyonel Analizi	16
BÖLÜM 3	19

MATERYAL VE METODLAR.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan Bitki materyali.....	19
3.1.2. Kullanılan Patojen	19
3.1.3. Efektör adayı	19
3.2. Metotlar	20
3.2.1. RNAi Fragmenti Tasarımı ve Alt Klonlaması.....	20
3.2.2. RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmentinin BSMV Vektörüne Klonlanması.....	23
3.2.3. HIGS Uygulaması	25
3.2.4. Gen Susturma ve Enfeksiyon Gelişimine Etkisinin Değerlendirmesi	30
3.2.4.1. Gen Ekspresyon Düzeyinin qRT-PCR ile Analiz	30
BÖLÜM 4	35
BULGULAR	35
4.1. RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmenti.....	35
4.1.1. RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmentinin Tasarımı.....	35
4.2. RNAi Fragmentinin Klonlanması	36
4.2.1. RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmentinin pJET1/2 Vektörüne Alt Klonlanması.....	36
4.2.2. RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmentinin BSMV pY Vektörüne Klonlanması	37
4.2.2.1. pY.PDS Plazmidlerine ve RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmentine Uygun RE Uçlarının Kazandırılması.....	37
4.2.2.2. pY Vektörüne RNAi ₀₀₀₁₆ Fragmentinin Klonlanması.....	38
4.3. HIGS Uygulaması: BSMV ve Pas İnokülasyonu	42
4.3.1. Kalıp DNA'ların Hazırlanması	42
4.3.2. pDNA'ların İn Vitro Transkripsiyonu	43
4.3.3. Bitkilerde BSMV İnokülasyonu	44
4.3.4. Pas inokülasyonu	45
4.3.4.1. Patojene ait Urediosporların Çoğaltılması	45
4.4. PTTG_00016 Genin Susturulması ve Enfeksiyon Gelişimine Etkisinin Analiz	46
4.4.1. qRT-PCR Analizleri ve Sonuçları.....	46
4.4.2. Mikroskopik Analizler	49
4.4.3. Enfeksiyon Şiddetinin Belirlenmesi	51
4.5. Değerlendirme.....	51
BÖLÜM 5	53

SONUÇ VE TARTIŞMA	53
KAYNAKÇA.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	68



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa:	Amino asit
As:	Antisene
Avr:	Avirülens Genler
Bç/bp:	Baz çifti
BSMV:	Arpa Çizgi Mozaik Virüsü
CaCl ₂ :	Kalsiyum Klorür
cDNA:	Komplementer DNA
CRISPR:	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
DEPC:	Dietil Pirokarbonat
Dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
dNTP:	Deoksinükleotitfosfatlar
dsRNA:	Çift Zincirli RNA
ETI:	Efektör Tetikli İmmünite
EtOH:	Etanol
ETS:	Efektör Tetikli Duyarlılık
F Primer:	Forward Primer
HIGS:	Konak Aracılı Gen Susturma
HR:	Aşırı Duyarlı Yanıt
LB:	Lysogeny Broth
LiCl ₂ :	Lityum Klorür
mRNA:	Mesajcı RNA
NF H ₂ O:	Nükleaz free su

NK:	Negatif Kontrol
NLR:	Nükleotit Bağlayıcı lösin-zengin Tekrar İçeren Reseptör
Nt:	Nükleotit
NTP:	N�kleikfosfatlar
PAMP:	Patojenle İlişkili Moleküler Desen
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pDNA:	Plazmid DNA'sı
PDS:	Phytoene desaturase
Pgt:	<i>Puccinia graminis</i>
PK:	Pozitif Kontrol
PRRs:	Desen tanıyan Reseptör
Pst:	<i>Puccinia striiformis</i>
Pt:	<i>Puccinia triticina</i>
PTGS:	Post Transkripsiyonel Gen Susturma
PTI:	Ptojen Tetikli İmmünite
PTTG_00016:	<i>Puccinia triticina f. sp. tritici</i> germline_00016
qRT-PCR:	Hızlı Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R Primer:	Reverse Primer
RE:	Restriksiyon Enzimi
RISC:	RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
RNA:	Ribonükleik Asit
RNAi:	RNA interferans
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
RPM:	Dakikada Devir Sayısı
S:	Sense
SDH:	Succinate Dehydrogenase
siRNA:	Susturucu RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fonksiyonel genomik, genomun, genlerin, proteinlerin ve aynı zamanda metabolitlerin bir fenotipi oluşturmak üzere nasıl ortak olarak çalıştığını inceler (EMBL, 2025)	5
Şekil 2.2. Aday genlerin fonksiyonel karakterizasyonuna yönelik uygulanan stratejiler (Prasad P. Savadi S., 2019).....	6
Şekil 2.3. Bitki ve patojen etkileşiminde PTI (PAMP-Triggered Immunity) ve ETI (Effector-Triggered Immunity) savunma cevabı (Ramirez-Zavaleta, 2022).....	13
Şekil 2.4. Bitki-fungus etkileşiminde efektörlerin konukçu hücrelere dağılımı ve işlevlerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.5. HIGS mekanizması	17
Şekil 4.1. <i>PTTG_00016</i> geni (EssembleFungi)	36
Şekil 4.2. RNAi ₀₀₀₁₆ fragmenti için hedeflenen gen bölgesi (renkli gösterilen bölgeler proteomik projesi kapsamında tanımlanan peptidlerin eşleştiği bölgelerdir. Seçilen mavi bölge RNAi ₀₀₀₁₆ fragmenti için hedeflenen bölgedir)	36
Şekil 4.3. pJET.(00016) <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonuna ait koloniler	37
Şekil 4.4. Koloni PCR ile pJET.00016 içeren transformant <i>E. coli</i> kolonilerinin doğrulanması (RNAi ₀₀₀₁₆ boyutu 449 bp)	37
Şekil 4. 5. PacI ve NotI enzimleri kullanarak pDNA'ların kesilmesi pJET.00016 RNAi fragmentinin ayrılması ve pY.PDSs ve pY.PDSas plasmidlerinden pYs ve pYas vektörlerinin ayrılması	38
Şekil 4.6. Transformasyon sonrası üremeye bırakılan plazmidlerin görüntüsü	39
Şekil 4.7. pY.00016s ve pY.00016as plazmidlerinin Koloni PCR sonucu (k:koloni).....	39

Şekil 4.8. Seçilen kolonilerden elde edilen pY.00016s 'ya ait dizilerin BioEdit uygulaması ile hizalanması	40
Şekil 4.9. Seçilen kolonilerden elde edilen pY.00016as 'ya ait dizilerin BioEdit uygulaması ile hizalanması	41
Şekil 4.10. pY plasmidinde transkripsiyon ve lineerizasyon bölgesi	42
Şekil 4.11. Linner hale getirilen pDNA'lar (C: kesilmiş (cut), UC: kesilmemiş (Uncut))	43
Şekil 4.12. in vitro transkripsiyon ile sentezlenen RNA'lar	43
Şekil 4.13. BSMV inokülasyonu sonrası yapraklarda gözlemlenen semptomlar	45
Şekil 4.14. Pt-ırk1'in inokulasyonla çoğaltılması (A.-80oC de 1 yıl muhafaza edilmiş ürediosporlarla inokulasyon B. Bitki üzerinde bulunan canlı ürediosporlarla inokulasyon sonucu çoğaltım)	46
Şekil 4.15. BSM:00016s/as için HIGS uygulaması yapılan bitkilerden elde edilen total RNA izolasyonu (Örnek açıklaması: 1.3 ve 1,4 olarak adlandırılan yaprak örneklerinde 1, 1. bitki olduğunu; 3 ve 4, 3. Ve 4. Yaprakları olduğunu belirtmektedir.)	47
Şekil 4.16. qRT-PCR analizde Melting Curve grafiği	48
Şekil 4.17. qRT-PCR sonrası örneklerin agaroz jel görüntüsü	48
Şekil 4.18. Efektör adayına ve kontrol gruplarına ait değerlerin ortalamalarının karşılaştırılması	49
Şekil 4.19. Pt inokülasyonu sonrası 3.günde yaprak örneklerinin ışık mikroskobu görüntüsü	50
Şekil 4.20. Mofiy edilmiş Cobb skalası. A. enfeksiyon şiddeti skalası (%) (Roelfs vd. 1992) B. Tez çalışması sonucu örneklerde gözlenen enfeksiyon şiddeti	51
Şekil 4.21. HIGS uygulaması ve <i>Pt</i> enfeksiyon şiddeti A) BSMV semptomları B) <i>Pt</i> semptomları C) Ekspresyon grafiği	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. <i>PTTG_00016</i> için tasarımı yapılan RNAi fragmentine özgü primerler	20
Çizelge 3. 2. Koloni PCR için sıcaklık koşulları.....	22
Çizelge 3. 3 . RE kesim için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	24
Çizelge 3. 4. Vektörler ve linerizasyon için kullanılan restriksiyon enzimleri.....	27
Çizelge 3. 5. qRT-PCR analizlerinde kullanılan primerler.....	31
Çizelge 3. 6. qRT-PCR'ın gerçekleşmesi için kullanılan koşullar.....	33

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Buğday dünyada genelinde üretimi en çok yapılan tahıl ürünüdür (Blanco, ve diğerleri, 2002). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'ya ait verilere göre 2012 ve 2016 yılları arasında dünya genelinde 721 milyon ton buğday ile rekor bir üretim gerçekleşmiştir (FAO, 2025). Tarım teknolojilerinin gelişmesi ile hasatlarda hastalıklardan dolayı oluşacak verim kayıplarında azalma görülmüştür. Fakat üretilen mahsullerin yaklaşık %12-15'i bitki hastalıklarından dolayı hasat döneminde verimsizliğe sebep olmaktadır (H., A., E.L., T.J., & Hussey, 2006). Verim kayıplarında etkisi yüksek olan biyotrofik *Puccinia* türleri, buğday ve arpada yılda 5 milyar ABD doları gibi bir kayba sebep olmaktadır (Roelfs, McCallum, McVey, & Groth, 1997).

Bitkiler ve patojenleri arasındaki moleküler düzeyde gerçekleşen savunma-saldırı mekanizmalarının aydınlanması, hedef genlerin belirlenmesi ve bu genlerin fonksiyonlarının tanımlanması önemlidir. Bu durum, hastalıklar ile mücadelede sürdürülebilir yeni stratejilerin gelişmesine olanak sağlar. Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler pek çok patojende yeni genlerin keşfedilmesine, gen işlevlerinin belirlenmesine, gen ağlarının ve çevresel faktörlerin gen aktivitesi üzerindeki etkisinin ortaya konmasına yönelik önemli sonuçlar ortaya koymuştur (Evelina & Vaidutis, 2017). Omik teknolojileri ile ilgili biyolojik süreçlerde aday genlerin tespiti yapılabilmekte ve RNAi aracılı gen susturma gibi yöntemler ile bu genlerin fonksiyonel analizleri yapılarak hangi metabolik yolları etkilediği ve hücre içerisindeki işlevleri gibi soruların cevaplarına ulaşılmaktadır (Koch & Wassenegger, 2021).

Bitki ve patojenleri arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasında, patojen tarafından üretilen efektörlerin anlaşılması önemlidir. Efektör proteinler, fungal saldırıda ve bitkinin savunma mekanizmasını baskılamada başarı ile kullanılan patojenin etkin silahlarıdır. Evrimsel süreçte fungus yeni efektörlerle yeni saldırı stratejileri geliştirirken buna karşılık konak bitki de farklı savunma yanıtları ile geri tepki oluşturmak üzere evrimleşir (Jones & Dangl, 2006).

Buğdayda kahverengi pas hastalığına sebep olan *Puccinia triticina* (Pt), gövdede gerçekleşen siyah pas hastalığına sebep olan *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Pgt) ve yaprak yüzeyinde şerit olarak kendini gösteren sarı pas hastalığına sebep olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst), buğday'da yüksek düzeyde patojenite gösteren hastalıklardandır (Guan, Zhang, Park, & Ding, 2025). Bu pas patojenleri, biyotrofik oldukları için konak hücre üzerinde yaşamları için gerekli olan bütün gereksinimlerini tedarik ederler. Bunun için appressoria ve haustoria gibi spesifik enfeksiyon yapıları oluştururlar. Bu sayede konağın hücreler arası, hücre içi ve hatta gen ekspresyonuna etki edecek olan efektör salınımı gerçekleştirirler (Selin, Kievit, Belmonte, & Fernando, 2016). Böylelikle salınan efektör proteinler, patojenin lehine konak hücrelerinde savunma genlerinin baskılanması, hormon sinyal yollarının manipülasyonu gibi etkileri ile enfeksiyon gelişimini sağlarlar (Hogenhout, Van der Hoorn, Terauchi, Kamoun, & Hogenhout, 2009).

Biyoteknolojik çalışmaların artması, patojen kaynaklı hastalıklara karşı direnç sağlayan bitkilerin geliştirilmesi veya patojenin kontrolüne olanak tanımıştır. Özellikle patojen kontrolünde RNAi aracılı gen susturma en etkili stratejilerden biri haline gelmiştir. HIGS olarak ifade edilen konak aracılı gen susturma, bitkide çoğaltılan veya üretilen siRNA ile patojene ait genlerin susturulduğu RNAi tabanlı bir işlemdir. HIGS sadece funguslar değil çeşitli zararlı ve patojenler için RNAi pestisitlerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır ve yakın gelecekte pek çok ürünün kullanıma girmesi beklenmektedir (Qi, ve diğerleri, 2019). Ayrıca HIGS, paslar gibi biyotrofik funguslarda aday genlerin fonksiyonel analizinde de etkili biçimde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında da *Puccinia triticina* kaynaklı enfeksiyon gelişiminde, efektör aday geninin HIGS yöntemi ile susturularak, patojenin virülensliğindeki etkilerinin anlaşılması hedeflenmiştir. Hedef aday gen *PTTG_00016*'ye ait RNAi

fragmenti tasarlanmış ve fragment Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) vektörüne klonlanmıştır. Ardından HIGS metodu ile önce bitkiye ve ardından patojene ulaştırılan *PTTG_00016*'ya özgü dsRNA'ların geni susturma etkinliği tespit edilmiş ve enfeksiyon gelişimindeki değişim ortaya konarak hastalık gelişimi üzerindeki etkileri gözlemlenmiştir.

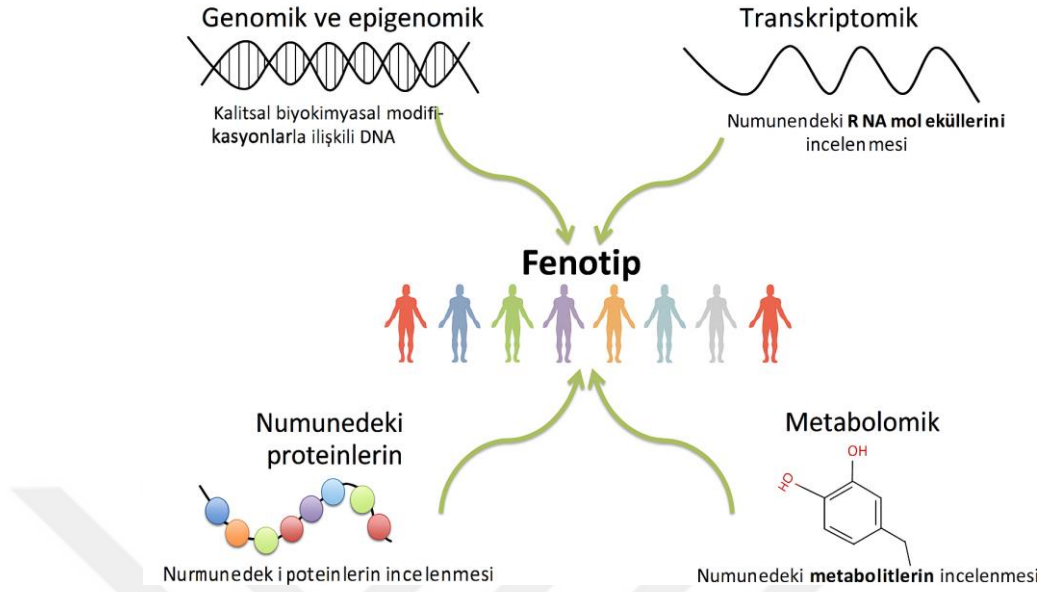


BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Fonksiyonel Genomik

Fonksiyonel genomik, moleküler biyoloji tekniklerinin gen bazlı yaklaşımlarının aksine, genom çapındaki yaklaşımlarından faydalanarak genlerin ve proteinlerin fonksiyonlarını ve aynı zamanda etkileşimlerini tanımlamayı hedefler. DNA dizisi, gen ekspresyonu ve protein fonksiyonu ile ilgili çeşitli süreçler ile örneğin protein-DNA, protein-RNA, transkripsiyon, protein translasyonu, protein-protein gibi etkileşimlerle elde edilen bilgileri bütünleştirir. Bu etkileşimlerden elde edilen bilgiler, gen ifadesini, hücre döngüsü ve hücre farklılaşması ile farklı organizma ve çevresel faktörlere cevabı düzenleyen etkileşimli ve dinamik ağları modellemek için önemlidir (Evelien, Bunnik, & Le, 2013). Fonksiyonel genomik DNA düzeyinde (genomik ve epigenomik), RNA düzeyinde (transkriptomik), protein düzeyinde (proteomik) ve metabolit düzeyindeki (metabolik) çeşitliğe yoğunlaşır. İlgili süreçteki örneğin verilerini, normal koşuldaki örnekle karşılaştırmalı olarak analiz eder, genlerin, proteinlerin veya metabolitlerin bir fenotipi oluşturmak üzere nasıl çalıştığını ve etkileştiğini inceler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Fonksiyonel genomik, genomun, genlerin, proteinlerin ve aynı zamanda metabolitlerin bir fenotipi oluşturmak üzere nasıl ortak olarak çalıştığını inceler (EMBL, 2025)

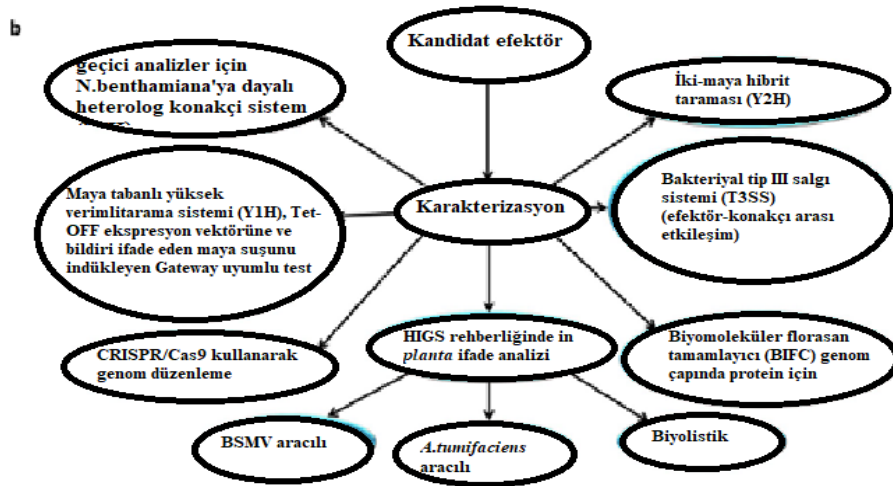
Her gün gelişen bu alan, yeni keşfedilen genlerin işlevlerinin belirlenmesinde, gen ağlarının keşfedilmesinde ve çevresel faktörlerin gen aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu sebeple fonksiyonel genomik çalışmalarda genin fonksiyonu ve karmaşık özelliklerinin altında yatan mekanizmalar hakkında bilgi sağlayarak tıp, tarım ve biyoteknoloji gibi alanlardaki ilerlemelere katkı sağlar (Evelina & Vaidutis, 2017). Fonksiyonel genomikte ilk tüm hücre modeli olarak *Mycoplasma genitalium*'dur. Bilgisayar modellemeleri ile elde edilen tüm araştırma verileri (makale, kitap vb) ilişkilendirilerek her bir geninin işlevinin ortaya konduğu ilk modeldir. Bu model, 28 hücresel sürece ait 28 alt-modelden oluşmaktadır ve toplamda 401 genin işlevi, 722 bileşik, 1.857 reaksiyon ve 1.836 parametre işlenmiştir. *M. genitalium*'daki hipotetik proteinlerin büyük ölçekli etkisiz hale getirilmesi sonucunda canlılığın ve hücresel fonksiyonların sürdürülmesi için gerekli 317 temel genin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Ancak tanımlanmayan ve fonksiyonu belirsiz birçok protein de bulunmaktadır (J.R., ve diğerleri, 2012).

Çeşitli organizmalar için varsayımsal proteinlerin in vitro fonksiyonel çalışmaları da yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere, genlerin fonksiyonlarını anlayabilmek fonksiyonel genomik çalışmalarının en önemli

amaçlarından biridir. Birçok genom dizileme çalışması sayesinde yeni genlerin keşfinin hızı sürekli artmaktadır. Buna paralel işlevi bilinmeyen genlerin sayısı da büyük bir hızla artmaktadır. Çeşitli biyoenformatik araçlarla fonksiyonu tahminlenen aday genlerin doğrulanması gerekmektedir ve bunun için de faydalı olacak yeni nesil araçlar geliştirilmektedir.

2.2. Aday Genlerin Fonksiyonel Analizi

Fonksiyonel genomik ile aday genler tanımlandıktan sonra bazı yöntemler ile bu aday genlerin hangi biyolojik süreçlerde rol aldığı, hangi metabolik yolları etkilediği ve hücre içerisindeki işlevleri gibi fonksiyonlarına ilişkin tahminlerin in vivo veya in vitro olarak analizleri yapılmaktadır. Bu metotlar arasında, gen inaktivasyonu (Knockout) (V. & Y., 2003), gen susturma (silencing), yeast-two hybrid (Y2H) (Fields & Song, 1989), heterolog ekspresyon sistemleri (Watt, A., Sankaranarayanan, Watts, & R.K., 2021) gibi yöntemler yer almaktadır. Ayrıca, in silico fonksiyon tahminleri (homoloji, ortoloji) için geliştirilen çeşitli biyoenformatik araçlar da bulunmaktadır (Gabaldón & Koonin, 2013). Bunlar arasında özellikle heterolog sistemler ve gen susturma metodları sıklıkla kullanılmaktadır (Wilhelm & Landry, 2009).



Şekil 2.2. Aday genlerin fonksiyonel karakterizasyonuna yönelik uygulanan stratejiler (Prasad, Savadi, Bhardwaj, & Gupta, 2019).

2.2.1. Heterolog Ekspresyon Sistemleri

Aday genlerin fonksiyonlarını belirlemek için yapılan çalışmalarda önemli metotlardan biri heterolog ekspresyondur. Heterolog ifade, ilgili aday genin kodlayıcı DNA dizisinin orijinal kaynaktan, bu geni içermeyen başka bir organizmaya transfer edilmesidir. Bu süreçte hedef gen dizisi, seçilen konak organizmanın kodon kullanımına göre optimize edilir. Daha sonra uygun bir ekspresyon vektörüne yerleştirilerek konak hücreye transformasyonu gerçekleştirilir. Böylece transfer edildiği organizmanın hücrelerinde transfer edilen yabancı proteinlerin ifadesi gerçekleşir. Bu ifade sonucu organizmada nasıl bir biyolojik değişim gerçekleştiği analiz edilerek genin fonksiyonu hakkında bilgi elde edilir. Örneğin buğday bitkisinde bir silisyum (Si) taşıyıcı geni olan *TaLsi1* ve bu genin çeltikte ortoloğu olan *OsLsi1* geni, düşük Si alım kapasitesine sahip *Arabidopsis*'e transfer edilerek bir heterolog sistem geliştirilmiştir. Bu iki ortolog gen, bor taşıyıcı geni (*AtNIP5;1*) promotörü kontrolü ile ifade edildiği zaman *Arabidopsis*'te Si emiliminin arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile heterolog ifade sistemlerinin etkili bir şekilde çalıştığı gösterilmiştir (Montpetit, ve diğerleri, 2012). Bir başka örnekte *Fusarium solani*'den PKS3 içeren biyosentetik gen kümesi, kademeli olarak yeniden oluşturulup, *Saccharomyces cerevisiae*'ya aktararak ekspresyonları gerçekleştirilmiştir. Bu ekspresyonla *S. cerevisiae*'da kırmızı bir aza-antrakınon pigmenti olan bostrycoidinin üretmek mümkün olmuştur (Pedersen, Hansen, Furlan, Sørensen, & Mortensen, 2020).

Patojen aday genlerinin fonksiyonunu belirlemek amacıyla yapılan heterolog ekspresyon çalışmalarında genellikle Agro infiltrasyon yöntemi ile aday patojen genin bitkilerde geçici ekspresyonu sağlanarak enfeksiyon etkileri izlenmektedir. Bu kapsamda sıklıkla *Nicotinia bentamia* ve *Nicotinia tabaccum* bitkisi kullanılmakta, özellikle bitki dayanıklılık (R) genleri ve aday efektör (Avr) genlerinin etkileşimi konusunda araştırmalar yürütülmekte, kısa sürede çok sayıda aday genin fonksiyonel taraması yapılabilmektedir. Örneğin domates R geni I-2'nin aday Avr2 genleriyle birlikte ekspresyonu, avirulent aleli tanımlamak için kullanılmıştır. Ayrıca, agroinfiltrasyon, I-2'nin (a) Isı Şoku Proteini 90, (b) yardımcı şaperonu Protein Fosfataz 5 ve (c) küçük Isı Şoku Proteini RSI2 gibi bitki proteinleriyle fiziksel etkileşimlerini göstermeyede olanak sağlamıştır. Ayrıca yapı/işlev analizlerinde de bu

yöntem, işlev kaybı veya yapısal aktivite açısından hızlı bir şekilde test edilmesine olanak sağlamaktadır. Son olarak, floresan etiket ile işaretlenerek aday genin ekspresyonu sonucu üretilen proteinin, bitkide hücre altı lokalizasyonunun belirlenmesine de olanak vermektedir (Ma, Dong, Stavrinos, & Guttman, 2012).

Heterolog sistemler ayrıca rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır ve *Escherichia coli* rekombinant protein üretiminde sıklıkla tercih edilen bir organizmadır (Rosano & Ceccarelli, 2014). Transfer sonrası heterolog ifade bazen konak hücrelerde düşük protein ifadesine neden olabilir. Optimize bir heterolog gen ifadesi için, alıcı türün kodon kullanımı, guanin ve sitozin (GC) bileşimi, Shine-Dalgarno dizisi, mRNA kararlılığı ve genin ekleme deseni gibi çok sayıda faktörün incelenmesi gerekmektedir (Watt, Subramanian, Watts, & Raipuria, 2021). Heterolog bir genin ifade edilmesi için transfer edildiği konak hücresinde etkili olarak transkribe edilmesi (Genuth & Barna, 2018), mRNA ve proteinin konak hücre içinde erken yıkıma uğramaması gerekmektedir (Desai, Shrivastava, & Padh, 2010).

2.2.2. Hedef Geninin İfadesini Baskılama: Gen inaktivasyonu ve Gen Susturma

2.2.2.1. Gen İnaktivasyonu (Knockout)

Hedef genin fonksiyonunun anlaşılmasına yönelik kullanılan yöntemler arasında öne çıkan knock-out, genomik bir lokusun heterolog DNA ile yer değiştirmesi ya da genlerin değişimi ile elde edilen mutantların fenotipik olarak incelendiği bir yöntemdir (Marshall & A., 1989). Hedeflenen genin fonksiyonunun anlaşılması için birkaç tip inaktivasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak, hedef genin inaktive edilmesi yerine ifadesinin değiştirilmesi, genin kodlayıcı dizisinin insersiyon veya delesyonla bozulması, geninin yanlış ifadesi ve bu yaklaşımları birleştiren gen replasmanı (Bhadauria, Banniza, Wei, & Peng, 2009). *Magnaporthe grisea*, mantar-bitki etkileşimlerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında öncü bir modeldir. Hedef genin bozulması ile *M. grisea* mantarının patojenite üzerinde etkili bazı genlerinin (örneğin MPG1 geni) fonksiyonları tanımlanmıştır (Talbot, Ebbale, & Hamer, 1993). Gen inaktivasyonunda avantajlardan biri belirli bir bölgenin hedeflenmesidir. Fakat bu yöntemin uygulanmasında bazı zorluklar öne çıkmaktadır. Bunlar, insert DNA'nın hedef bölge yerine genomda rastgele bir bölgeye entegrasyonu

ve knock-out için gerekli dizileri içeren vektörlerinin hazırlanmasının zaman alması ve her fungus için uygun olmamasıdır. Bu zorluklar doğrultusunda genetik modifikasyon verimliliği düşüktür. Verimlilik bitki ve patojen türleri arasında değişiklik göstermektedir (Bhadauria, Banniza, Wei, & Peng, 2009).

2.2.2.2. Gen Susturma (Silencing)

Gen susturma, hedef geninin ekspresyonunun geçici olarak azaltılması ya da gen ifadesinin tamamen baskılanmasıdır. Son 20 yılda, fonksiyonel genomik araştırmalarında gen susturma için farklı yöntemlerin geliştirilmesi ile önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunlar arasında RNA interference (RNAi), uygulamada kolaylığı ve etkinliği ile öne çıkmakta ve birçok farklı alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadır. RNAi, bir gen susturma yöntemidir.

RNA temelli susturma, çoğu ökaryotik canlıda etkili ve korunmuş bir yöntemdir. RNA interferansın keşfi çalışmaları ile önemli derecede katkılar sunan Andrew Fire ve Craig Mello 2006 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülünü kazanmışlardır (Jorgensen, 2006).

Transkripsiyonel gen susturulması (TGS) ve Post-transkripsiyonel gen susturulması RNA'ya bağlı susturma mekanizmaları olarak ikiye ayrılır. TGS, spesifik genlerin promotör bölgesinde RNA aracılı DNA metilasyonu ile ilgili genin ifadesini baskılar. Diğer tarafta PTGS ise sitoplazmada mRNA'ların tanınması ile ilgilidir, RNAi baskılanmasıdır (Rössner, Lotz, & Becker, 2022).

RNAi gen susturmada funguslar dahil tüm ökaryotlarda gen ekspresyonunun regülasyonunda ve savunmada işleyen doğal bir mekanizmadır. Doğal süreçte bitkiler ve hayvanlarda hedeflenen genler için çift sarmallı RNA'yı (dsRNA) kodlayan genler bulunur ve bu genlerin transkripsiyonu ile dsRNA'lar oluşur (Motorina, 2024). RNAi mekanizmasında, hücre içinde eksprese olan veya in vitro hazırlanan dsRNA'lar hücre içinde, DICER ailesine ait ribonükleaz enzimi ile yaklaşık 21-22 nükleotit uzunluğunda olacak şekilde kesilip küçük dsRNA'lara (siRNA) dönüştürülür (Voinnet, 2014). Dönüşümü tamamlanan siRNA'lar, ARGONAUTE (AGO) protein ailesine ait bir protein ile kompleks oluşturur. Oluşan bu komplekse RNA-indüklenen susturma kompleksi (RISC) adı verilir. RISC de yer alan siRNA'nın bir zinciri ayrılır

ve kalan zincir kompleks ile birlikte, tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla susturulacak hedef genin transkriptine mRNA'ya bağlanır. Ardından kompleksde yer alan nukleazlar tarafından mRNA kesilerek hedef genin translasyonu engellenir (Fang & Qi, 2016). Kesilmiş mRNA parçaları, RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRP) aracılığıyla yeni dsRNA sentezinde kalıp olarak kullanılır. Böylece RNAi'nin ikinci döngüsünü başlatarak ikincil siRNA'lar üretilir. RNAi, mRNA degradasyonu ve siRNA üretiminin tekrarlanması ile güçlenen bir döngü şeklinde devam eder. Bu süreçte transkripsiyon sonrası gen susturulması gerçekleşerek ilgili proteinin sentez düzeyi düşmektedir (Slotkin & Keith, 2021).

2.3. Fitopatojenik Mantarlar

Fitopatojenik mantarlar, tarım sektöründe çok fazla verim kayıplarına sebebiyet veren patojenlerdir. Bu mantar patojenleri, farklılık gösteren çoğu koşulda hayatlarını sürdürebilirler ve bu durumlar için özel olarak geliştirdikleri mekanizmaları vardır (Zhang, Wang, Jiang, & Xu, 2021). Bitki-patojen arasındaki etkileşimin nasıl sonuçlanacağı, patojenin saldırısı, yayılma yolları ve bitkinin savunma mekanizması arasındaki çok ince bir denge ile yönetilmektedir. Bitkilerde önemli verim kayıplarına sebep olan fungal patojenler, toksinler üreterek veya çeşitli yıkıcı enzim ve moleküllerle konakda tutunma, yayılma ve nihayetinde hastalık gelişmesine sebep olurlar. İlk adım olan tanıma ve tutunma için bazı türler enzimatik saldırıyla ya da mekanik basınç uygulayarak doğrudan yüzeyden giriş yaparken, başka türler stoma, lentisel, vb doğal açıklıklardan konak dokularına sızar, bir başka grup ise yalnızca konak dokularındaki yaralanmaların neden olduğu açıklıklardan giriş yapar (Zeilinger, ve diğerleri, 2016). Bu aşamayı takiben, mantarların enfeksiyon döngüsü, spor çimlenmesi ve hücre altı enfeksiyon yapılarını oluşturmak üzere hif gelişimi ile devam eder. Bu süreç, tam bir yeniden hücre programlaması ve özel düzenleyici moleküler ağlar gerektirir. Spor çimlenmesinin ardından, ilk hifler polarize hücre büyümesi ile konak bitki yüzeyinde ilerler, hücre altı katmanlara doğru ilerler. Başarılı olan patojenler alt doku katmanları ve hücrelerinde ara karargâh olarak görev alacak enfeksiyon yapıları geliştirirler. Bu ara karargah yapılar aynı zamanda bitki-patojen arasında ciddi bir moleküler alış-veriş sahasıdır. Bitki savunma protein/moleküllerini patojene iletirken patojen de savunmayı baskılayacak ve hatta bitkinin metabolizma

ve gen ekspresyonunu kontrol edecek molekül ve proteinleri konak hücrelerine iletir. Ardından tam bir istila başlar ve daha hızlı biçimde konak hücresi ele geçirilerek, patojen yararına yeniden metabolizmaları düzenlenir veya ölümleri gerçekleşir (Peng, ve diğerleri, 2021). Bitki hücrelerinde kloroplast, hücre zarı gibi bölgelere etki eden patojenler bitkinin işlevini bozmaya çalışır. Aynı zamanda protein ve nükleik asit sentezini baskılayarak hücre ölümünden konağın ölümüne kadar bir seri güçlü etki yaratır (Zeilinger, ve diğerleri, 2016). Bitki-patojen etkileşimi son derece karmaşık, her katmanda çok sayıda gen ve molekülün yer aldığı metabolik ağlarla yönetilmektedir. Bu etkileşimi aydınlatmak patojen kontrolü için önemlidir ve fonksiyonel genomik çalışmalar bu açıdan çok yararlı bilgiler ortaya koymuştur.

Fitopatojenik mantarların sahip olduğu kompleks mekanizmaların araştırılması ve moleküler düzeyde anlaşılması yapılan proteomik, genomik ve transkriptomik çalışmaları ile kolaylaşmıştır. Proteomik çalışmalar ile patojenin saldırı proteinlerini, konak ile arasındaki protein-protein etkileşimlerini ve stres tepki mekanizmalarını belirlemek daha mümkün hale gelmiştir (Nathalia, Correa, Ritter, & Brandelli, 2025). Proteomik teknolojileri, mantarın bitki ile olan etkileşiminde ortaya çıkan proteinlerin ekspresyonunu tespit etmektedir (Zhou & Chen, 2011). Patojen ve konak etkileşimleri üzerinde yapılan çalışmalar ile konakçının bağışıklık tepkisini baskılamak ve mantarın patojenitesini arttırmada efektör proteinlerin belirlenmesine ilişkin bilgiler sağlanmıştır (Ludwig, ve diğerleri, 2021).

Genomik ve transkriptomik çalışmalar ile birçok bakteri, mantar ve oomist sistemlerinde patojenite ve virülansla ilgili çok sayıda patojen geni tespit edilmiştir. Bu keşifler doğrultusunda birçok bitki hastalığının moleküler tarafı aydınlanmıştır (Winnenburg, ve diğerleri, PHI-base: A new database for pathogen host interactions, 2006). Genom projeleri ile elde edilen bilgiler doğrultusunda Bitki-Konak Etkileşimi Veri tabanı (PHI-Base) oluşturulmuştur (Winnenburg, ve diğerleri, 2006). Veri tabanından elde edilen bilgiler ile fonksiyonel genomik teknikleri kullanılarak gen ifadesinin incelenmesi ve RNA interferans ile gen ifadesinin baskılanması, patojenlerin hedeflenen genlerinin veya virülans homologlarının incelenmesinde kolaylık sağlamıştır (Bakkeren, ve diğerleri, 2012).

2.4. Bitki-Fungal Patojen Etkileşimi ve Efektörler

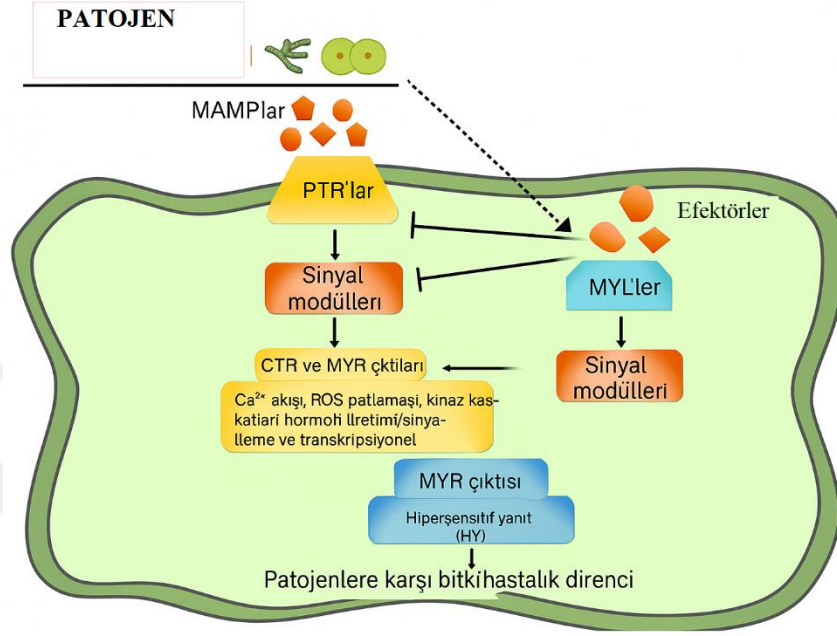
2.4.1. Bitki-Fungus Etkileşimi

Patojen tarafından üretilen efektörler, konak savunmasını baskılayan, konak hücrenin yapısını ya da fonksiyonunu kendi yararı için kullanmasını sağlayan moleküllerdir. Bu nedenle efektör proteinler, bitki ve patojenleri arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasında ve patojen kontrolü için önemli bir yere sahiptir. Fungal patojenler bitki ile karşılaştığı zaman, bitkinin savunma mekanizmasını baskılamak için çeşitli yöntemler kullanır. Bu etkiler karşısında bitki farklı savunma yanıtları ile tepki verir. Karşılıklı bu etkileşim sonucu bitki-patojen arasında iki aşamalı bağışıklık tepkisi ortaya çıkar;

Bir patojen konak bitkiye bulaştığında ilk olarak Patojen İlişkili Moleküler Desenler (PAMPs) olarak adlandırılan patojene ait kitin, filogellin veya lipopolisakkarit gibi moleküller konak tarafından algılanır. Bu moleküller konağın patojeni tanımasında etkindir. Dolayısıyla PAMP'lar konakçı hücrenin yüzeyindeki Desen Tanıyan Reseptörler (PRRs) tarafından tanınır. Bu tanıma PAMP ile tetiklenen, savunma sinyal yollarının aktivasyonunu ve gen ekspresyon değişimlerin içeren bağışıklık yanıtı aktive eder (PTI) (Jones & Dangl, 2006). Patojen, bu bağışıklık tepkisinden kaçınmak ve enfeksiyonunu mümkün kılmak için efektör olarak adlandırılan proteinleri salgılar (Hogenhout, Van der Hoorn, Terauchi, Kamoun, & Hogenhout, 2009). Efektörlerin bir kısmı konak savunmasını engelleyen proteinlerdir ve konak hücrelerinde savunma genlerinin baskılanması, hormon sinyal yollarının manipülasyonu gibi etkileri sayesinde enfeksiyon gelişimini sağlarlar.

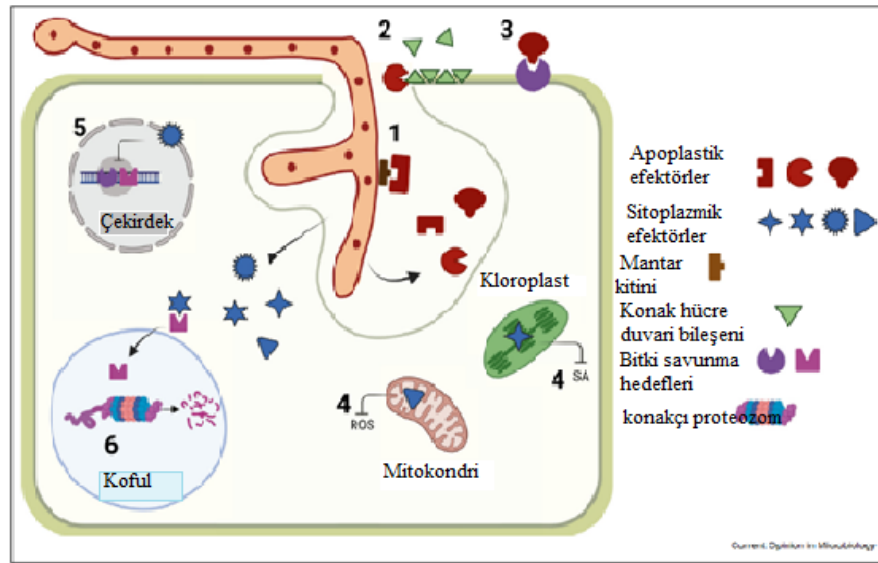
Efektörler patojen ırkına özgüdür, yüksek çeşitliliğe sahip virulans faktörlerdir aslında. Dolayısıyla patojene özgü efektörleri tanımak başarılı bir savunma için önemlidir ve konak hücrelerinde bulunan özgün reseptörler nükleotid bağlayıcı lősince zengin tekrarlar içeren reseptör (NLR'ler) tarafından algılanarak tanınırlar. Bu tanıma daha güçlü bir savunma cevabı olan “Efektör ile tetiklenen bağışıklık (ETI)” yanıtını aktive eder. ETI yanıtı, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) patlaması, savunma genlerinin aktivasyonu gibi reaksiyonları içeren güçlü, kompleks bir bağışıklık

yanıtıdır ve aşırı duyarlılık tepkisi olan programlı hücre ölümü ile enfekte hücreleri feda ederek patojeni sınırlar (Zhang, Dodds, & Bernoux, 2017).



Şekil 2.3. Bitki ve patojen etkileşiminde PTI (PAMP-Triggered Immunity) ve ETI (Effector-Triggered Immunity) savunma cevabı (Ramirez-Zavaleta, Gorgia-Barrera, Rodriguez-Verastequi, Arrieta-Flores, & Gregoria-Jorge, 2022).

Patojen saldırısına müteakip salınan efektörler, konakdaki lokalizasyonuna göre 3'e ayrılırlar. Bunlar apoplastik efektörler, sitoplazmik efektörler ve nükleer efektörlerdir. Apoplastik efektörler, etkileşimin ilk adımında rol alır ve patoje-konak hücreleri arası boşluklara salınıp konakçı proteazları ve peroksidazları inhibe ederler. Patojen ilerleyip konak hücrelerinin içine doğru gelişir ve sitoplazmik efektörleri üretip gönderir. Sitoplazmik efektörler, konak hücrenin sitoplazmik bölgesinde patojen enfeksiyonunun yayılımı için uygun koşulları oluşturur ve savunmanın gerçekleştiği sinyal yollarında görev alan proteinleri hedefler. Böylece konak hücrenin savunma mekanizmasını etkisiz hale getirir. Son olarak nükleer efektörler konak hücrelerinde çekirdeğe girer ve konakçının RNA polimerazı ile doğrudan etkileşime girerek transkripsiyonun regülasyonunu ele geçirir. Sonucunda konak hücrenin gen ekspresyonunu kendi lehine çevirir (Şekil 2.3) (Li, ve diğerleri, 2024).



Şekil 2.4. Bitki-fungus etkileşiminde efektörlerin konukçu hücrelere dağılımı ve işlevlerinin şematik gösterimi

2.4.2. Pas Fungusları ve Tarımsal Önemi

Pas fungusları 8000'den fazla tanımlanmış türleri ile en büyük mantar takımlarındandır ve çok çeşitli konak organizmaları etkilemektedir (Aime, Bell, & Wilson, 2018). Dünya genelinde tarımsal ürünleri ve biyoenerji için kullanılan tarım ürünlerinde de önemli kayıplara sebebiyet vermiştir. Pas mantarları ilk atalarından itibaren bitkinin verdiği savunma tepkisine karşı adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Lorrain, Gonçalves dos Santos, Germain, Hecker, & Duplessis, Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi, 2018). Özellikle pas mantarlarının etkisinin görüldüğü buğdayda dünya çapında yaklaşık 4-5 milyar dolarlık kayıpların olduğu bilinmektedir (Figuerola M, Hammond-Kosack KE, & PS, 2017). Pas mantarı *Phakopsora pachyrhizi*, Güney Amerika'da yaşanan salgınlardan sonra yayılan ve o dönem yaklaşık 2 milyar dolar kadar zarara sebep olmuştur (Goellner K, ve diğerleri, 2010). Yapılan genom çalışmalarında, pas mantarlarının başka bitki patojen mantarlarına göre daha büyük boyutta oldukları görülmüştür. 2.4 Gb boyuta sahip olan *Uromyces bidentis*, en büyük genoma sahip pas mantarıdır (Guan, Zhang, Park, & Ding, 2025).

Ülkemiz dünyada çapında 10. Büyük buğday üreticisidir ve özellikle buğday bitkisinde enfeksiyona sebep olan pas mantarlarının anlaşılması ülkemiz açısından

önemlidir. Buğdayda etkili üç pas mantarı vardır; i) kahverengi pas hastalığına sebep olan *Puccinia triticina* (*Pt*), ii) gövde de gerçekleşen siyah pas hastalığına sebep olan *Puccinia graminis* f. *Sp. tritici* (*Pgt*) ve iii) yaprak yüzeyinde şerit olarak kendini gösteren sarı pas hastalığına sebep olan *Puccinia striiformis* f. *Sp. tritici* (*Pst*). Bu 3 pas hastalığı dünyada buğday üretimi yapılan hemen her yerde görülmekte ve göz ardı edilemeyecek verim kayıplarına sebep olur (Figuerda, Hammond-Kosack, & Solomon, 2018). Ülkemizde de yaygın olarak gözlenen bu hastalıkların yayılımı bölgelere göre değişiklik gösterir (Guan, Zhang, Park, & Ding, 2025). Trakya Bölgesi ülkemiz buğday üretiminin %12 sini gerçekleştirmektedir ve bu bölgede *Pt* enfeksiyonların diğer pas türlerine göre daha yaygın olduğu gözlenmektedir.

2.4.3. Pas Funguslarında Efektörler

Pas fungusları diğer organizmalara göre farklı bir yaşam süreci benimsemişlerdir. Pas patojenleri, biyotrofik oldukları için konak hücreye bağımlıdır ve yaşamları için gerekli olan bütün gereksinimlerini konak bitkiden tedarik ederler. Bunun sonucu olarak konak hücrede oluşturacağı enfeksiyon için farklı iletim sistemleri oluşturmuşlardır. Biotrofik doğaları gereği konak bitki ile ortak bir evrimsel gelişim sürdürmüşler ve bu nedenle oldukça kompleks bir etkileşim ağına sahiptirler. Bu etkileşimin önemli bir bölümünü, enfeksiyon gelişimi sırasında oluşturdukları haustoria ya da appressoria gibi spesifik enfeksiyon yapıları ile gerçekleştirirler (Selin, Kievit, Belmonte, & Fernando, 2016). Bu yapılar sadece besin akışı için değil, patojenin saldırıda en etkin silahları olan ve konağın apoplastına ya da sitoplazmasına etki edecek olan efektörlerin ifadesinin gerçekleştiği ve salgılandığı dokulardır (Lorrain, Gonçalves dos Santos, Germain, Hecker, & Duplessis, Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi, 2018). Efektörler, enfeksiyon gelişimi için konak hücrelerinde hem transkripsiyonu ve hem de metabolik süreci yeniden düzenlemektedir. Bunun için de konak hücrenin birçok molekülü ile etkileşime girmektedir. Dolayısı ile efektör protein ve genlerini tanımak, patojenin enfeksiyon geliştirmedeki moleküler mekanizmalarını daha iyi anlamak, bitki-patojen etkileşim sürecindeki bileşenleri keşfetmek adına önemli bilgiler sağlar (Kanja & Hammond-Kosack, 2020).

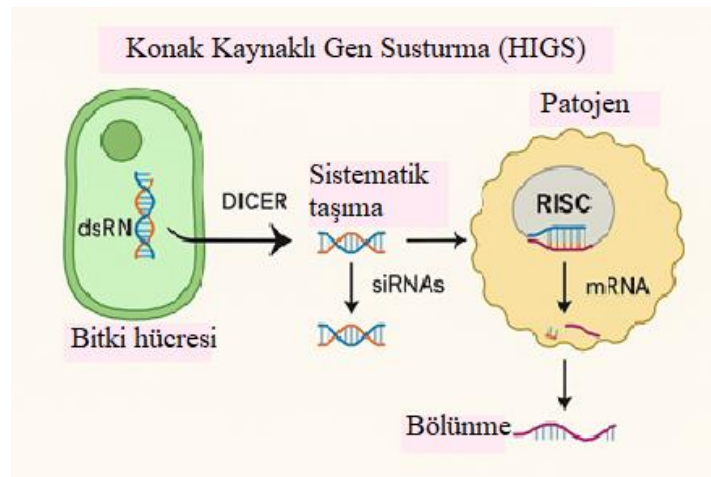
Efektörleri belirlemek üzere çok sayıda omik çalışma yürütülmüş ve sonuç olarak pas efektörlerinin korunmuş bir dizi veya motif içermediği belirlenmiştir. Biyoinformatik temelli tahminleri, bir salgı sinyalinin varlığı, küçük boyut (< 300 amino asit), sistein açısından zengin bir içerik veya taksonomik özgüllük gibi genel kriterlere dayanır (Prasad, Savadi, Bhardwaj, & Gupta, 2019); (Lorrain, Gonçalves dos Santos, Germain, Hecker, & Duplessis, 2019); (Lorrain, Petre, & Duplessis, 2018). Ancak fungal efektörler(paslar dahil) aynı tür içinde bile yüksek dizi farklılığı gösterir ve bir kısmı salınım sinyalleri olarak açıkça korunmuş motifleri de yoktur. Çeşitli veritabanları sadece bu kriterlere dayanarak incelendiğinde pas patojenlerinde binlerce efektör adayı tahmini yapılmıştır. Örneğin *Pt* ırk1'nin USA ve İngiltere'den 4 varyantı için genom temelli tahmin edilen efektör adayı sayısı 2999'dur (Prasad, Savadi, Bhardwaj, & Gupta, 2019). Efektör adaylarının belirlenmesine yönelik bir diğer genel yaklaşım, patojenin salgı proteinlerinin (sekretom) tanımlanmasıdır (Şekil 2a). Salgılanan proteinler genellikle başarılı bir enfeksiyonun oluşmasında anahtar rol oynayan proteinleri içerir. Bu nedenle bilgisayar temelli tahminlere göre aday tespitinde daha başarılıdır (Prasad, Savadi, Bhardwaj, & Gupta, 2019); (Aime M. C., 2017); (Presti, ve diğerleri, 2015). Bununla birlikte, hangi yol izlenirse izlensin tahmin edilen efektörlerden hangisinin enfeksiyonun başlama ve gelişimdeki gerçek efektörler olduğu ve sayısı bilinmemektedir. Bu sebeple, adayların doğrulama için işlevsel olarak karakterize edilmesi ve bitki-patojen etkileşimindeki rollerinin açıklığa kavuşturulması gerekmektedir (Kanja & Hammond-Kosack, 2020); (Prasad, Savadi, Bhardwaj, & Gupta, 2019); (Xia, ve diğerleri, 2017).

2.5. Konak Aracılı Gen Susturma (HIGS)- Pas Efektörlerinin Fonksiyonel Analizi

Son yıllarda giderek artan aday genlerin sayısı ve fonksiyonel doğrulama gereksinimi yeni metodların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Konak aracılı gen susturma (HIGS) bu stratejilerden biridir ve bitki tarafından patojene ait genlerin susturulmasını sağlayan RNAi tabanlı bir tekniktir (Koch & Wassenegger, 2021). Bu yöntem 2 şekilde uygulanabilmektedir; a) bitki, patojene ait genleri hedefleyecek dsRNA'ları üretecek şekilde genetik modifikasyona uğratılır ve ardından patojenle enfekte edilerek hedef genlerin susturulmasına sebep olur b) patojene ait genleri hedefleyecek dsRNA'lar in vitro üretilerek bitkiye aktarılır ve ardından patojenle

enfekte edilerek hedef genlerin susturulmasına sebep olur (Şekil 2.5) (Koeppe, Kawchuk, & Kalischuk, 2023). Tez çalışması kapsamında virus aracılı HIGS uygulanmıştır. Virus aracılı ile uygulanan HIGS’de, hedef patojen genine spesifik dsRNA, rekombinant virüs aracılığıyla konak hücreye aktarılır veya kodlayıcı dizi genomuna entegre edilerek hedef gen susturulur (Qi, ve diğerleri, 2019). HIGS, hangi yolla olursa olsun konak hücrelerinde dolaşan siRNA’lar ile patojene ait olan genlerin susturulduğu RNAi tabanlı bir işlemdir (Qi, ve diğerleri, 2019).

Pas mantarları gibi biyotrofik olarak yaşamlarını devam ettiren patojenler, yüzlerce bitki türünde önemli ölçüde hastalığa sebep olan bir gruptur (Zhang, ve diğerleri, 2005). Bu biyotrofik canlıların, çoğalma ve gelişme gibi hayatsal döngülerini gerçekleştirebilmek için bir konak canlıya ihtiyaçları vardır. Bu yüzden laboratuvar şartlarında in vitro uygulamalara uygun değildir. Bu canlılarda gen fonksiyonlarını ve geliştirecekleri saldırı stratejilerini incelemek için HIGS başarı ile kullanılmaktadır (Qi, ve diğerleri, 2019). HIGS, biyotrof patojenlerin anlaşılması için önemli bir araçtır (Panwar, Jordan, McCallum, & Bakkeren, 2018). Örneğin *Puccinia striiformis f. sp. tritici* gelerini baskılamak için yapılan bir çalışmada Arpa çizgili mozaik virüsü (BSMV) ile gen susturma gerçekleştirilmiştir. BSMV bir RNA virüsüdür. HIGS ile BSMV, RNAi yoluyla patojene ait genleri susturarak onu etkisiz hale getirmeyi hedefler (Yin, Jurgenson, & Hulbert, 2011).



Şekil 2.5. HIGS mekanizması

Bu tez çalışmasında buğday kahverengi pas hastalık etmeni *Pt*'de, proteomik yaklaşımla tanımlanan bir efektör adayının gen susturma yoluyla enfeksiyondaki etkinliği belirlenmiştir. Bir başka deyişle efektör adayı PTTG_00016'nın gerçek bir efektör olup olmadığı sorgulanmıştır. Bunun için HIGS uygulaması ile RNAi aracılı gen susturma yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde *PTTG_00016* genine özgü tasarlanan RNAi fragmenti BSMV vektörüne klonlanarak viral enfeksiyon ile konağa bulaştırılmıştır. Bitkiye aktarılan ve viral genomun replikasyonu sonucu dsRNA'lara dönüşen RNAi fragmentinin DICER enzimleri ile kesilerek siRNA'ya dönüşümü amaçlanmıştır. Ardından aynı bitkiler *Pt* ile enfekte edilerek, bitki metabolizmasında dolaşan siRNA'ların patojene aktarımı sağlanmıştır. Patojene aktarılan siRNA'ların RNAi mekanizmasını başlatarak *PTTG_00016* mRNA'sını etkisiz hale getirip genin ekspresyonunu baskılaması amaçlanmıştır. Gen ekspresyonundaki baskılanma düzeyi ve bunun *Pt* enfeksiyonunu ne düzeyde etkilediği analiz edilerek aday efektör *PTTG_00016*'nın gerçek bir efektör olup olmadığı incelenmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METODLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bitki materyali

Çalışmada Morocco buğday çeşidi kullanılmıştır. Uygulanan HIGS yöntemi sonucunda efektör adayının, enfeksiyon gelişimindeki etkisinin gözlemlenebilmesi için hassas çeşide gereksinim vardır. Morocco çeşidi, *Puccinia tritina*'ya karşı hassas özellik taşıması nedeniyle seçilmiştir. Tez kapsamında kullanılan Morocco tohumları Ahi Evran Üniversitesinden temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Patojen

Patojen olarak kullanılan fungus, buğdayda kahverengi pas hastalığı etmeni *Puccinia tritica* 1 (*Pt* ırk1)' dir. Bu patojen Kanada'dan Agriculture and Agrifood Canada, Cereal Research Center'dan Dr. Christoph RAMPITCH' in ekibinden alınmıştır.

3.1.3. Efektör adayı

Kullanılan efektör adayı, daha önce Ahi Evran Üniversitesi tarafından gerçekleştirilen AEÜ-PYO-FEN.4003/2.13.009 nolu proje sonucunda tanımlanmıştır. Söz konusu proje kapsamında *Pt* ırk1 de enfeksiyon sırasında etkin olan proteinleri belirlemek üzere bir proteomiks çalışması yapılmış ve çalışma sonucunda pek çok proteinin yanı sıra özellikle patojenin virulans faktörü olabilecek 7 efektör adayı tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan *PTTG_00016T*, tez çalışmasında RNAi aracılı fonksiyonel analiz yapılmak üzere aday gen olarak seçilmiştir.

3.2. Metotlar

3.2.1. RNAi Fragmenti Tasarımı ve Alt Klonlaması

Çalışmada kullanılan efektör adayına spesifik olan RNAi fragmentinin tasarlanması için EssemblFungi Database'den efektöre ait olan DNA dizisi ve amino asit (aa) dizisi alınmıştır. *PTTG_00016* geninin 7 eksonu ve 1485 bç'lik kodlama dizisi vardır. RNAi fragmanının tasarımı için AEÜ-PYO-FEN.4003/2.13.009 nolu projede bu genin ürünü olarak 3 peptid tanımlanmış ve alternatif splicing olasılığına karşı bu peptidlerin kodlandığı diziler RNAi için hedef olarak seçilmiştir. Belirlenen peptidlerin 3'ü de *PTTG_00016* geninin 250-750 bç aralığındaki kodlayıcı dizisi ile eşleşmiş ve bu nedenle ilk 3 eksonu içeren bu bölge hedef olarak seçilmiştir. Tasarlanan bölge için RNAi₀₀₀₁₆ fragmentinin çoğaltımı, dizilenmesi ve kontrollerinde kullanılmak üzere Prime3Plus programı kullanılarak primer tasarımı yapılmıştır. Ayrıca tasarlanan primerlerin 5' ucuna BSMV vektörüne klonlamak için PacI ve NotI enzimlerinin tanıma dizileri eklenmiştir. Tasarlanan primerler ve RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti özel bir firmadan hizmet alımı yoluyla dsDNA şeklinde sentetik olarak temin edilmiştir. RNAi₀₀₀₁₆ fragmentine ait dizi bilgisi aşağıda (Çizelge 3.1) verilmiştir.

Çizelge 3.1. *PTTG_00016* için tasarımı yapılan RNAi fragmentine özgü primerler

Efektör	RNAi Frag. Boyutu	Primerler	Başlangıç Pozisyonu	Dizi (5' - 3') (PacI ve NotI için tanıma dizisi)
<i>PTTG_00016</i>	449 bç	PTTG00016-F	254 bç	ATATTTAATTAAAGGTCCAC CAACTGTGGAAG
		PTTG00016-R	686 bç	TATGCGGCCGCTCGTGCTCG ATATTCACACC

3.2.1.1. RNAi₀₀₀₁₆ Fragmentinin Eldesi ve Çoğaltımı

RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti, özel bir firmadan sentez yoluyla temin edilmiştir. Liyofilize olarak teslim alınan ürün nükleazlardan arınmış su ile (NF) 20 ng/μL olacak

şekilde sulandırılmıştır. dsDNA'lar uygun RE kesim uçlarını oluşturmak için BSMV vektöründen önce pJET1/2. Blunt (Thermo Scientific, Cat: K1231) vektörüne klonlanmıştır ve *E. coli*'ye transfer edilmiştir. Transfer için ilk olarak ligasyon ürünü hazırlanmıştır. Bunun için 100ng RNAi₀₀₁₆ fragment DNA'sı ve 50 ng pJET1/2 vektörü, 1X Buffer ve 10U T4 ligaz enzimi olacak şekilde total 10 µl hacimde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası oluşan ligasyon ürününün (pJET.00016), 5 µl'si transformasyon için ayrılmıştır.

E. coli'ye transformasyon için CaCl₂ metodu (Chung, Niemela, & Miller, 1989) kullanılmıştır. Metodun ayrıntıları aşağıda sunulmuştur;

- 1- Transformasyon işlemine başlamadan 1 gece önce *E. coli* DH5α suşu 5 mL 1X LB sıvı besiyerine ekilerek gece boyu 120 rpm'de 37°C 'de bırakılmıştır.
- 2- Gece boyu üreyen bakteriler ertesi gün taze 1XLB besiyerine ekilerek yukarıdaki koşullarda olduğu gibi 4 saat tekrar üremeye bırakılmıştır.
- 3- 4 saat sonunda ekilen bakteriler 2 mL Eppendorf tüplere koyularak 8 dk boyunca 6000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir ve tüpün dibine çökmeleri sağlanmıştır.
- 4- Santrifüj sonrası üstte kalan besiyeri kısmı dökülerek 800 µL 50 Mm CaCl₂ eklendi ve hücreler resuspanse edilerek CaCl₂ içerisinde homojen hale getirilerek 20 dk buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.
- 5- İnkübasyon sonrası +4°C de 6000 rpm'de 8 dk santrifüj yapılmıştır.
- 6- Santrifüj sonrası sıvı dökülüp altta kalan bakterilere 125 µL 100Mm CaCl₂ eklenip tekrar resuspanse edilmiştir.
- 7- Resuspanse edilmiş olan hücrelere önceden hazırlanan pJET.00016 plazmidine ait ligasyon ürünü eklenmiştir. Homojen hale getirildikten sonra 30 dk buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır.
- 8- İnkübasyon sonrası 1 dk 42°C de ısı şoku uygulaması yapılmıştır.
- 9- 700 µL oda sıcaklığına getirilen 2X LB sıvı besiyeri hücrelerin üzerine eklenerek 37°C'de 100 rpm'de 45 dk üremeleri için inkübasyona bırakılmıştır.
- 10- 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak hücrelerin tüpün dibine çöktürme işlemi yapılmıştır.

- 11- Santrifüj sonrası besiyerinden 50 µl kalacak şekilde üst sıvı atılmış, hücreler kalan besiyerinde homojen hale getirilmiştir
- 12- Ardından LB+100 mg/L ampisilin eklenmiş katı besiyerine ekilerek 37°C 'de gece boyu üremeleri için bırakılmıştır.

3.2.1.2. Transformasyon İşlemi Sonrası Transformatların Doğrulanması

Gece boyu üremeye bırakılan bakterilerden 5 adet seçilerek koloni PCR ile doğrulanması yapılmıştır. Seçilen kolonilerin ilerideki çalışmalarda kullanılabilmesi için 100 mg/L ampisilin içeren sıvı ve katı LB besiyerlerine de ekimi yapılmıştır. Koloni PCR için öncelikle reaksiyon karışımı hazırlanmış ve olası transformant koloniler kurdan yardımı alınıp PCR karışımına daldırılarak yapılmıştır. Reaksiyon karışımında 1X konsantrasyonlu PCR Master Mix, 0.5 µM F ve R RNAi₀₀₀₁₆ primeri kullanılmıştır. Uygun PCR koşulları uygulanarak (Çizelge 3.2) PCR gerçekleştirilmiştir. PCR karışımına daldırılan kurdanlar hemen ardından sırası ile önce sıvı LB+100 mg/L ampisilin besiyerine daha sonra da katı LB+100 mg/L ampisilin besiyerine ekim için kullanılmıştır. Bu besiyerleri 37° C de gece boyu üremeye bırakılmıştır. Koloni PCR ile pJET.00016 içerdiği doğrulanan kolonilerden stok hazırlanmıştır. Bunun için sıvı besiyerinde çoğaltılan bakterilere %50'lik steril gliserol eklenerek -20 °C' derin dondurucuya kaldırılmıştır.

Çizelge 3.2. Koloni PCR için sıcaklık koşulları

PCR Koşulları	Zaman	Döngü
94°C	3 dk	1
94°C	40 sn	35
60°C	40 sn	
72°C	40 sn	
+4°C	∞	1

3.2.2. RNAi₀₀₀₁₆ Fragmentinin BSMV Vektörüne Klonlanması

3.2.2.1. pJET.00016 ve pY.PDS Plazmidlerinin İzolasyonu

Koloni PCR yapılarak doğruluğu kesinleştirilen pJET.0016 içeren bakteriler ve pY.PDS.s, pY.PDS.as vektörlerini içeren bakteriler 5 mL LB+100 ng/L ampicilin sıvı besiyerinde 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Gece sonunda üremesi gerçekleşen bakterilerden plazmid izolasyon kiti (Qiagen, Cat. No: 27104) ile plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzlenen adımlar şunlardır:

- 1- Üremesi gerçekleşen bakteriler 2 mL’lik eppendorf tüplere aktararak 8000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- 2- Santrifüj sonrası üstte kalan besiyeri uzaklaştırılıp hücrelerin üzerine 250µL Buffer P1 eklenip homojen hale getirilmiştir.
- 3- Resuspans yapılıp homojen hale gelen karışımın üstüne 250 µL Buffer P2 eklenerek tüp birkaç defa alt üst edilmiştir.
- 4- Mevcut karışıma 350 µL Buffer N3 eklenerek tekrar tüp alt üst edilip, 10 dk 13000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.
- 5- Plazmid DNA’sının bulunduğu üst sıvıdan 800 µL alınarak spin kolona aktarılmıştır.
- 6- Kolon 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra altta bulunan toplama tüpünde toplanan sıvı atılmıştır.
- 7- Kolona 750µL yıkama solüsyonu eklenerek tekrar kısa bir santrifüj yapılmıştır.
- 8- Yıkama solüsyonunda bulunan alkolden kurtulmak amacıyla kolonlar tekrar 13000 rpm’de santrifüj yapılmıştır.
- 9- Santrifüjün ardından kolonlar steril 1.5 mL’lik tüplere yerleştirilip, 50 µL Elution Buffer eklenmiş ve 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 10- Ardından 1 dk 13000 rpm’de santrifüj yapılarak pDNA’ları geri kazanılmıştır.
- 11- İzolasyon sonrası elde edilen plazmidlerin micro hacim spektrofotometre’de konsantrasyonları ölçülmüştür. Ölçüm sonrası örnekler -20 ‘e kaldırılmıştır.

3.2.2.2. Plazmidlerin Uygun RE Uçlarının Oluşturulması

PacI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesilerek pJET.00016'dan RNAi₀₀₀₁₆ fragmentinin çıkarılması, pV vektörüne doğru pozisyonda yerleşimi için gereklidir. Diğer yandan pV.PDSs ve pV.PDSas vektörleri de aynı enzimlerle kesilerek PDS insertu çıkarılıp sense ve antisense yönlü klonlamaya uygun pV vektörü elde edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda izolasyonu tamamlanan pJET.00016, pV.PDS.as ve pV.PDS.s plazmidleri NotI ve PacI RE ile kesilmiştir. Çift enzim kesimi için kullanılacak uygun buffer üretici firmanın Double Digest Calculator uygulaması kullanılarak seçilmiştir. Bu seçim sonucunda en uygun Bufferın EcoRI olduğuna karar verilmiştir. Kullanılan protokol Çizelge 3.3'te verilmiştir. Hazırlanan reaksiyon 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kesim sonrası plazmidler %1'lik agaroz jelde elektroforezi ile görüntülenmiştir.

Çizelge 3.3. RE kesim için hazırlanan reaksiyon karışımı

	Konsantrasyon	Hacim
EcoRI Buffer	10x	5µ
PacI	5U	1 µl
NotI	5U	1 µl
Plazmid DNA	2000 ng	16 µl
NF	-	27 µl
	Total hacim	50 µ

3.2.2.3. RNAi₀₀₀₁₆ Fragmentinin Saflaştırılması

Kesim sonucunda uygun RE kesim uçlarına sahip RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti pJET vektöründen ayrılmıştır. Aynı zamanda kesimi gerçekleştirilen pV.PDS.as ve pV.PDS.s vektörleri de PDS insertunu kaybederek klonlamaya elverişli pVas ve pVs hale getirilmişlerdir. Klonlama sonrası agaroz jele yüklenen vektörler doğrulandıktan sonra jelden kesilerek Gel Extraction Kit (PureLink, K310001) ile saflaştırılmıştır. Jelden kesilen parçalar tartılarak üzerine kitte belirtildiği kadar Binding Buffer

eklenmiştir. Su banyosunda bekletilerek homojen hale getirilmiştir. Oluşan karışım spin kolona yüklenerek 10.000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. 650 µL yıkama solüsyonu eklenerek tekrar santrifüj yapılmıştır. Yıkama solüsyonunun içinde bulunan alkolden kurtulmak için tekrar boş bir santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonrası kolon yeni steril 1.5 mL’lik eppendorf tüpe alınarak üzerine 50 µL Elution Buffer eklenerek RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti, pYas ve pYs geri kazanılmıştır.

3.2.2.4. RNAi₀₀₀₁₆ Fragmentinin pYas ve pYs Vektörüne Klonlanması

Elde edilen vektörler ve RNAi fragmenti, kesim işlemi sonucunda aynı RE uçlarına sahip oldukları için T4 ligaz enzimi kullanılarak hem antisens hem de sens yönlü klonlama bölüm 3.2.3.1’ de detayları verildiği gibi yapılmıştır. Ligasyon sonrasında pY.00016as ve pY.00016s vektörleri elde edilmiştir. Elde edilen vektörler bölüm 3.2.3’te detaylandırılan CaCl₂ metodu ile *E. coli* DH5α suşuna transfer edilmiştir. Transfer sonucu katı LB+100 mg/L ampicilin besiyerine ekilen bakteriler gece boyu çoğalmaya bırakılmıştır. Ertesi gün olası transformant kolonilerden 5’er tane seçilerek, doğrulamalarını gerçekleştirebilmek için bölüm 3.2.3.1’de açıklandığı biçimde koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforezi yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.5. Dizi Analizi ve Doğrulama

Jel elektroforezi sonucu PCR ürünlerinin, RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti için beklenen 449 bp aralığında olduğu gözlenmiş ve bu şekilde doğrulanan örnekler, jelden kesilerek bölüm saflaştırılmıştır. Saflaştırma 3.2.4.3’te anlatıldığı şekilde Gel Extraction Kit (Purelink, K310001) ile yapılmıştır. Saflaştırma sonunda elde edilen örnekler çift yönlü Sanger dizileme için özel bir firmaya gönderilmiştir. Elde edilen 5’ ve 3’ yönlü dizi bilgileri BioEdit programında birlikte değerlendirilerek *PTTG_00016* geninin hedef dizisi ile hizalaması yapılmıştır.

3.2.3. HIGS Uygulaması

Bu tez çalışmasında *Pt* ırk1 için virülans etki gösterdiği öngörülen efektör aday1 *PTTG_00016* geninin RNAi aracılı susturulması ve ardından infeksiyondaki

etkisinin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu yöntemde RNAi için tasarlanan dsRNA'nın öncelikle bitki hücrelerine aktarımı gerekmektedir. Ardından *Pt* enfeksiyonu sırasında dsRNA'ların patojene taşınması gerçekleşmektedir. Bu çalışmada RNAi₀₀₀₁₆ fragmentinin bitkiye taşınımı bir RNA virüsü olan BSMV aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bu aşama için ilk olarak viral genomu oluşturmak üzere in vitro transkripsiyon yapılmıştır. Böylece BSMV'yi oluşturan α , β ve γ olmak üzere 3 parçalı RNA genomu oluşturulmuştur. Bu sırada p γ vektöre klonlanan RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti de γ genomunun bir parçası olarak RNA'ya çevrilip BSMV inokulasyonu ile bitkiye taşınmıştır. İlk viral semptomların gözleendiği 10. günde aynı bitkiler *Pt* urediniosporları ile enfekte edilmiştir. Bitki-fungus etkileşimi sırasında RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti dsRNA olarak patojene taşınmakta ve patojende hedef genin RNAi aracılı susturulması beklenmektedir. Tez kapsamında HIGS uygulaması için 3 biyolojik tekrar yapılmıştır.

3.2.3.1. pDNA'larının İn Vitro Transkripsiyon İçin İzolasyonu

BSMV α genomunu taşıyan p α , β genomunu taşıyan p $\beta\Delta\alpha\beta$ plazmidleri, γ genomunu temsilen p γ .00016s ve p γ .00016as, pozitif kontrol olarak da p γ .PDSs ve p γ .PDSas ile herhangi bir insert içermeyen p γ plazmidleri in vitro transkripsiyon için kalıp olarak kullanılmıştır. Bunun için ilk olarak bu plazmidleri taşıyan bakteriler 5 mL sıvı LB+100mg/L ampisilin besiyerine ekilerek 37°C de 120 rpm'de gece boyu üremeye bırakılmıştır. Üremesi tamamlanan bakterilerden plazmid izolasyonu için 3.2.4.1 bölümünde ayrıntılı anlatıldığı gibi plazmid DNA extraction kit (Qiagen,27104) ile gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.4.1'de yapılan izolasyondan farklı olarak RNaz enzimi kullanılmamıştır. İzole edilen plazmidlerin konsantrasyonu mikro hacim spektrofotometrede ölçülerek belirlenmiştir.

3.2.3.2. Plazmid DNA'ların Linerizasyonu

Transkripsiyon ile RNA'ya çevrilecek BSMV genom dizileri, plazmidlerde T7 promotör ve linerizasyon dizisi arasına yerleştirilmiştir. Bu nedenle izolasyonu gerçekleştirilen pDNA'ların (p α , p β , p γ), in vitro transkripsiyon öncesi terminasyon bölgelerinde bulunan RE dizisinden kesilip lineer hale getirilmesi gerekmektedir.

Bunun için vektörler ve kesim için kullanılan RE ‘lerine ilişkin bilgiler Çizelge3.4’te verilmiştir.

Linerizasyon işlemi için yaklaşık 3000 – 3500 ng pDNA kullanılmıştır. Her plasmid için ayrı ayrı kesim reaksiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyonlarda her plasmid için spesifik RE’lerinden 10 U, 1X konsantrasyonu olacak şekilde reaksiyon bufferı kullanılmıştır. Ve total hacim 40 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Kesim reaksiyonu 37°C de ve 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda, örneklerden 4 µL alınarak agaroz jele yüklenmiştir. Kesimin gerçekleştiği ve linerizasyonu doğrulanan plazmidler, transkripsiyonda kullanılmak için PCR Prufication kit (PureLink, K310001) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma için kiti üreten firmanın talimatları takip edilmiştir.

Çizelge 3.4. Vektörler ve linerizasyon için kullanılan restriksiyon enzimleri

Vektörler	Kesim için kullanılacak RE enzimleri
pα ve pY	MluI
pβΔaβ	BcuI (SpeI)
pY.00016s, pY.00016as, pY.PDSs ve pY.PDSas	BssHII

3.2.3.3. İn Vitro Transkripsiyon

Lineer hale getirilen plazmid DNA’lar, in vitro transkripsiyonda kalıp olarak kullanılmıştır. Transkripsiyon için mMESSAGE mMESSAGE ® High Yield Capped RNA Transcription Kit (ThermoFisher, AM1344) kullanılmıştır. Reaksiyon üretici firmanın önerdiği protokole göre hazırlanmıştır. Reaksiyonda 1X reaksiyon buffer, 1X NTP/CAP, 1X enzim mix ve 600 ng lineer plazmid DNA kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı için kullanılacak olan pY.00016s ve pY.00016as plazmidleri eşit miktarda karıştırılarak kullanılmıştır. Aynı şekilde kontrol olan pY.PDSs ve pY.PDSas plazmidleri de karıştırılarak kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 37°C de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her örnek için ortamda bulunan kalıp pDNA’dan kurtulmak için 2U ‘Turbo DNaseI’ eklenerek 37°C 15 dk tekrar inkübe edilmiştir. Elde edilen transkriptler LiCl₂ çöktürme yöntemi ile saflaştırılmıştır.

3.2.3.4. İn Vitro Transkripsiyon Ürünlerinin Saflaştırılması

Elde edilen transkriptler LiCl₂ çöktürme yöntemi (Walker ve Lorsch, 2013) ile aşağıda verilen adımlar takip edilerek saflaştırılmıştır.

- 1- Transkriptlerin üzerine 30 µL LiCl solüsyonu ve 30 µL NF su eklenerek homojen hale getirilmiştir. 30 dk -20°C de inkübasyona bırakılmıştır.
- 2- İnkübasyon sonunda +4 °C de maksimum hızda 10 dk santrifüj yapılmıştır.
- 3- Üst sıvı uzaklaştırılarak alt kısımda kalan peletlere 1000 µL %70'lik EtOH eklenerek 5 dk 10.000 rpm'de +4 °C de yıkama işlemi yapılmıştır.
- 4- Santrifüj sonrası üst sıvı atılıp, yıkanan transkriptler çeker ocak altında alkol kokusu gidene kadar kurumaya bırakılmıştır.
- 5- Kurutma sonunda her örneğe 25 µL NF su eklenerek çözündürülmüştür.
- 6- Çözdürülen örnekler DEPC'li TBE ile hazırlanan %1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez yapılmış ve RNA kalitelerine değerlendirilmiştir.

3.2.3.5. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve BSMV İnokülasyonu

Çalışmada kullanılan patojene hassas olan Morocco çeşidi tohumları, steril toprak ile doldurulan kapların içine 15'er tohum olacak şekilde ekilmiştir. Ardından kaplar 22 °C de 16 saat aydınlık ve 18 °C'de 8 saat karanlık, %60 nem koşullarını sağlayan iklimlendirme kabinine gelişmeye koyulmuştur. BSMV inokülasyonu için bitkilerin 2 yapraklı döneme gelmeleri beklenmiştir. Bu arada BSMV inokülasyonu sırasında kullanılacak olan FES solüsyonu (77 mM glycine, 60mM K₂HPO₄, 22 mM Na₄P₂O₇, 10H₂O, %1 (w/v) bentonite ve %1 (w/v) Celite) hazırlanmıştır (Holzberg, 2002). Her biyolojik tekrarda kullanılan bitkiler kontrol ve test olacak şekilde gruplandırılmış ve BSMV uygulama içeriği aşağıda sunulmuştur. Tek bir tekrarda her grup için 10 bitki kullanılmıştır.

Test: BSMV:00016 (Y: EA) uygulanmış bitkiler

Pozitif kontrol: BSMV: PDS (Y: PDS) uygulanmış bitkiler

Mock kontrol: BSMV:0 (Y:0) uygulanmış bitkiler

Negatif kontrol: Herhangi bir işlem yapılmamış aynı koşul ve gelişim evresindeki bitkiler

BSMV inokülasyonu için virüsü temsil eden α , β , γ transkriptleri, bir bitki için her genomda 1 μ g olacak şekilde eşit oranlarda (1:1:1) bir araya getirilerek hazırlanmıştır.

BSMV inokülasyonu başlamadan önce bitkiler 1 saat %100 neme tabi tutulmuştur. Her bir bitki için bir PCR tüpüne 22.5 μ L FES solüsyonu ve üç genomu transkript karışımı eklenmiştir. Hazırlanan FES+RNA karışımı, 2 yapraklı dönemdeki bitkinin 2. yaprağına uygulanmıştır. Uygulama için hazırlanan karışım başparmak ve işaret parmak arasına damlatılarak yapraklara dipten uca ovularak sürülmüştür. Aynı işlem teker teker tüm bitkilere uygulanarak BSMV inokülasyonu yapılmıştır. Gruplar arasında eldivenler değiştirilerek yeni steril eldiven kullanılmış ve gruplar arası bulaşıklık önlenmiştir. Bulaştırma işlemi sonrasında bitkiler yoğun nem altında olacak şekilde kutulara yerleştirilip kapatılarak 24 saat aynı büyüme koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonrasında bitkiler nem kutularından çıkartılarak iklimlendirme odasında gelişmeye bırakılmışlardır.

3.2.3.6. Pas Ürediniosporlarının Çoğaltımı

Morocco tohumları 18 saat 22°C ve %60 nem altında gündüz olacak şekilde ve 8 saat gece döngüsünde 18 °C %60 nemde büyümeye bırakılmıştır. Gelişim aşamasında 2 yapraklı döneme gelen buğdaylar Pt ırk-1 urediniosporları ile inokülasyonu yapılmıştır. Ürediniosporların bitkiye iyice tutunabilmeleri için sprey yardımıyla yapraklar ıslatılmıştır. Bu sayede patojenin bitkide daha kolay çimlenmesi için gereken nem sağlandı. İnokülasyona başlamadan önce -80°C’de muhafaza edilen Pt ırk-1 urediniosporları, 10 dakika boyunca 40°C de ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Daha sonra steril ve nemli bistiüri ucuyla nemli yaprakların iç yüzüne sürülerek dağıtılmışlardır. Pas ile buluşan bitkilere %100 nem uygulamak için steril büyük bir kabın içine 2-3 cm su eklenerek, karanlık ortamı oluşturmak için etrafı siyah poşet ile çevrelenerek 16°C de 36 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda bitkiler iklim odasında normal büyüme koşullarında pas püstülleri gelişinceye kadar tutulmuştur. 10. Günde pas püstülleri görülmeye başlamış ve bu taze urediniosporlar yeni geliştirilen bitkilere tekrar inoküle edilerek patojen çoğaltımı sağlanmıştır. Böylece 15 gün arayla

inokülasyon tekrarlanarak HIGS için gerekli taze patojen urediniosporları elde edilmiştir.

3.2.3.7. Patojen İnokülasyonu ve *PTTG_00016* Geninin Susturulması

BSMV inokülasyonu işleminin üstünde 10 gün geçtikten sonra, bitkilerde gözlemlenen beyaz çizgi şeklindeki lezyonlar BSMV inokülasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. Bu aşamada bitkilere *Pt* ırk-1 taze urediniosporları ile patojen inokülasyonu yapılmıştır. Bunun için, BSMV semptomlu bitkilerin 3 ve 4. yapraklarına, bitki üstünde yeni gelişen urediniosporlar sürülerek yapılmıştır. İnokülasyon Bölüm 3.2.5.6 da anlatıldığı biçimde gerçekleştirilmiştir. Ardından bitkiler 36 saat, %100 nem, 16°C sıcaklık ve karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası pas bulaştırılan bitkiler normal gelişim koşullarına alınmıştır.

Pas inokülasyonunun 3. gününde bitkilerin 3 ve 4. yapraklarından qRT-PCR ve 5. günde de mikroskop incelemeleri için örnekler alınmıştır. qRT-PCR için alınan örneklerle, RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir. Mikroskop için alınan örnekler ise doğrudan boyama işlemine tabii tutulmuşlardır. Pas inokülasyonunun 10-12. günlerinde ise enfeksiyon şiddeti incelenmiştir.

3.2.4. Gen Susturma ve Enfeksiyon Gelişimine Etkisinin Değerlendirmesi

3.2.4.1. Gen Ekspresyon Düzeyinin qRT-PCR ile Analizi

Moleküler düzeyde gen ekspresyonunun doğrulanması için test ve kontrol gruplarının ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile gözlemlenmiştir. *PTTG_00016* genine spesifik qRT-PCR primerleri 143 bp çoğalacak şekilde tarafımızca tasarlanmıştır. Referans gen için literatür taraması yapılmış ve *Pt Succinate dehydrogenase* genin önerildiği belirlenmiştir (Panwar vd. 2013). qRT-PCR analizinde kullanılan primerlere ilişkin bilgiler Çizelge 3.5’ da verilmiştir.

Çizelge 3.5. qRT-PCR analizlerinde kullanılan primerler

Primerler	Primer Dizisi	PCR ürünü
Pt sdh- qRT-PCR-F	GGTTCCAGCGATAGATCGAG	285 bp
Pt sdh- qRT-PCR -R	CAACTACGACCAGCCACTCA	
PTTG_00016_qRT-PCR -F	TCATCGCCGTCAAGGTTTGTG	143 bp
PTTG_00016_qRT-PCR- R	AACACTGCCTTTGTGCTTGG	

3.2.4.1.1. Total RNA İzolasyonu

qRT-PCR analizleri için pas inokülasyonu sonrası tüm örnek gruplarından 3.günde alınan yaprak örneklerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için HigherPurity Plant RNA Purification Kit (Canvax, Cat no: AN0102) kullanılmıştır. RNA izolasyon adımları aşağıdaki gibidir:

- 1- Alınan yaprak örnekleri (yaklaşık 50 mg) sıvı azot ile dondurularak Retch MM400 titreşimli parçalayıcı ile toz haline getirilmiştir.
- 2- Toz halindeki dokuların üzerine 500µL, %1 oranında β-mercaptoethanol içeren L2 buffer eklenmiştir.
- 3- 5 dk oda sıcaklığında inkübasyonun ardından karışım 2mL'lik filtreli kolonlara aktarılmıştır.
- 4- 1 dk maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- 5- Kolonun altında kalan sıvı yeni 1.5 mL'lik steril tüpe aktarılmıştır. Üzerine 1ml %70'lik ethanol eklenerek vorteks yapılmıştır.
- 6- Ardından bütün sıvı, RNAPrep spin colum'a aktararak 10.000 xg 'de 90 saniye santrifüj yapılmıştır.
- 7- Kolonun üzerine 500µL WB1 buffer eklenerek yıkama işlemi maksimum hızda 1 dk santrifüj yapılarak gerçekleştirilmiştir.

- 8- 750 µL WB2 solüsyonu eklenerek maksimum hızda 1 dk santrifüj yapılarak 2. yıkama adımı gerçekleştirilmiştir.
- 9- 8. adım tekrarlanmıştır. Tekrar aşamasından sonra alkol kalıntısından kurtulmak için 3 dk maksimum hızda santrifüj yapılmıştır.
- 10- Santrifüj sonrası kolon yeni steril 1.5'luk tüpe koyularak üzerine 50 µL RNase-Free su eklenmiştir. 1 dk santrifüj sonrası kolondan çözdürülen örneklerde DNA kalıntısı kalma durumuna karşın DNaz eklenerek 37°C 'de inkübasyon yapılmıştır.
- 11- İnkübasyon sonrası DNaz aktivitesini sonlandırmak için 1 µL EDTA ekleyerek 10 dk 65°C' de inkübasyon yapılmıştır.
- 12- Örnekler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak ve aynı zamanda RNA'nın bütünlüğünü ve stabilitesini korumak için -80°C'ye kaldırılmıştır.
- 13- Örneklerin konsantrasyonu mikrohacim spektrofotometrede ölçülmüş ve kalitesi agaroz jel elektroforezi ile gözlenmiştir.

3.2.4.1.2. cDNA Sentezi

Elektroforez sonrası kalitesinin iyi olduğu belirlenen RNA'ların yaklaşık 1500 ng'ı, cDNA sentezi için kullanılmıştır. Sentez için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, K1622) kullanılmıştır. Reaksiyon hazırlanırken ilk olarak RNA'lara 1µM Oligo dT eklenmiştir. Daha sonrasında karışımın üzerine sırası ile 1X Reaksiyon Bufferı, 20U RNase İnhibitör, 1mM dNTP mix ve 200U RevertAid M-MuLV RT eklenerek total hacim 20 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı cDNA sentezi için 42°C'de 60 dk, 25°C'de 5 dk olacak şekilde inkübe edilmiştir.

3.2.4.1.3. qRT-PCR Analizi

qRT-PCR her örnek için 3 tekrar olacak şekilde hem *PTTG_00016* hem de internal kontrol *SDH* geni için hazırlanmıştır. qRT_PCR için 2X Master Mix (Ampliqon, Cat: A313402) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımına 1X Master Mix, 0,5µl F ve R primeri, 2 µL sentezlenen cDNA eklenmiş ve son hacim 10µl olacak şekilde su

ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım, PikoReal cihazında aşağıdaki koşulları (Çizelge 3.6) sağlayarak amplifikasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.6. qRT-PCR'ın gerçekleşmesi için kullanılan koşullar

Derece	Dakika	Döngü
95°C	7dk	1
95°C	10sn	50
65°C	30sn	
72°C	30sn	

qRT-PCR analizi sonrası elde edilen Ct sonuçları, ekspresyon düzeyini belirlemek üzere $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanmıştır. Formülün açıklaması aşağıda sunulmuştur;

$$\Delta Ct (\text{normal koşul}) = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

$$\Delta Ct (\text{test koşulu}) = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{test koşulu}) - \Delta Ct (\text{Normal koşul})$$

$$\text{Gen ekspresyon düzeyi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.2.4.2. Enfeksiyon Gelişiminin Mikroskopik İncelemesi

Pas inokülasyonu sonrası 5. günde alınan örnekler Tripan Blue Metodu (Chia vd, 2006) kullanılarak boyanmıştır. Alınan yaprak örneklerinin boyanma aşamaları aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1- Pas inokülasyonu gerçekleşmiş olan 3.ve 4. Yapraklardan yaklaşık 2 cm olacak şekilde örnek alınmıştır.
- 2- Her örnek için 2 mL temizleme solüsyonu A (asetik asit:etanol=1:3) eklenerek oda koşullarında 100 rpm'de gece boyu çalkalanmalı inkübatörde bırakılmıştır.

- 3- Ertesi gün temizleme solüsyonu A atılmış ve yerine 2 mL temizleme solüsyonu B (asetikasit:etanol:gliserol 1:5:1v) eklenmiştir. Örnekler aynı koşullarda 3 saat beklenmiştir.
- 4- Süre sonunda, solüsyon B dökülmüş ve 1 mL boya solüsyonu (dH₂O'da 0,3 mL %1 tripan mavisi, 10 mL laktik asit, 10 mL fenol ve 10 mL dH₂O) eklenmiştir ve gece boyu çalkalayıcıda aynı koşullarda bırakılmıştır
- 5- İşlem sonunda boya solüsyonundan dökülmüş ve örneklerin üzerine %60 gliserol eklenerek çalkalayıcıda 2 saat 100 rpm'de bırakılarak boyama işlemi tamamlanmıştır.

Son aşamada yapraklar lam ve lamel arasına alınarak mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.4.3. Enfeksiyon Şiddetinin Değerlendirilmesi

Pt inokülasyonunun yaklaşık 7-8. günlerinde bitkilerde ilk pas püstülleri gözlemlenmiştir. Enfeksiyon şiddetini değerlendirmek için pas püstüllerinin tam olarak belirgin olduğu 12. gün tercih edilmiştir. Bu aşamada her grupta yer alan bitkilerde enfeksiyon şiddeti Cobb skalasına göre (Roelfs, Singh, & Saari, 1989). % cinsinden belirlenmiş ve yapraklardaki pas püstüllerinin yoğunluğu fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

BÖLÜM 4

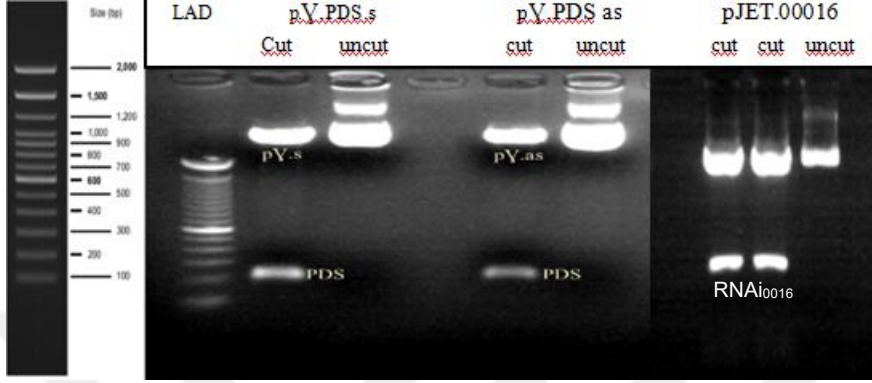
BULGULAR

4.1. RNAi₀₀₀₁₆ Fragmenti

4.1.1. RNAi₀₀₀₁₆ Fragmentinin Tasarımı

Tez çalışması sürecinde üzerinde durulan ve fonksiyonu üzerinde çalışmalar yapılan PTTG_00016 efektör adayı, AEÜ-PYO-FEN.4003/2.13.009 numaralı proje kapsamında *Pt* ırkl (BBBD)'de tanımlanmıştır. Efektör adayı *PTTG_00016*'ya ait amino asit ve DNA dizi bilgisi Essembl Fungi Database'den temin edilmiştir (<https://fungi.essembl.org/index.html>). *PTTG_00016* geni, 7 eksona sahiptir ve 1485 bç'lik kodlayıcı dizisi ile 494 aa'lık bir protein kodlamaktadır (Şekil 4.1). Oluşabilecek alternatif splicing ihtimaline karşı projede tespit edilen peptidlerin yer aldığı bölgeler, RNAi fragment tasarımı için hedef gen bölgesi olarak tercih edilmiştir. AEÜ-PYO-FEN.4003/2.13.009 projesinde bu gen için 3 peptid tanımlanmıştır. *PTTG_00016* kodlayıcı dizisi ile tanımlanan peptidlerin aa dizilerinin, SnapGene programı ile hizalaması yapılmıştır. Yapılan hizalamada tanımlanan peptidlerin 3'ünün de 250-750 bç aralığındaki dizi tarafından kodlandığı belirlenmiş ve RNAi fragmentinin tasarımı için ilk 3 ekson hedeflenmiştir (Şekil 4.2). Bu değerlendirme doğrultusunda genin 254-686 bç'lik bölgesini kapsayacak şekilde 449 bç boyutunda olan RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti tasarlanmıştır. Tasarımı yapılırken fragmentin çoğaltımı göz önünde bulundurularak iki ucuna primer tasarlanmıştır. İleri primeri 5' ucuna PacI ve geri primeri 3' ucuna da NotI enzimlerinin tanıma dizileri eklenerek klonlamalarda kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

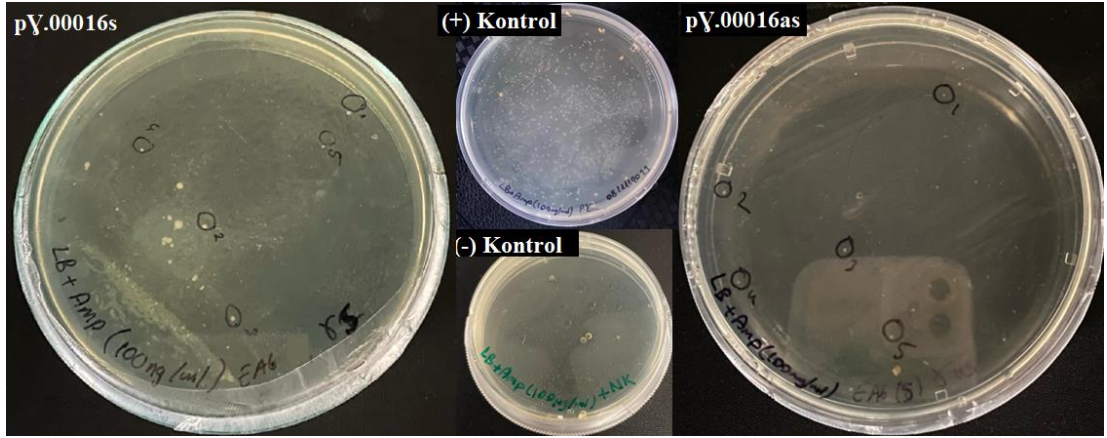
ve kesilmemiş pDNA'lar olacak şekilde yüklenerek, insertlerin plazmidlerden ayrıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Kesim sonrası ayrılan RNAi₀₀₁₆ fragmenti ile pYs ve pYas vektörleri jelden kesilip ayrılarak saflaştırılmıştır.



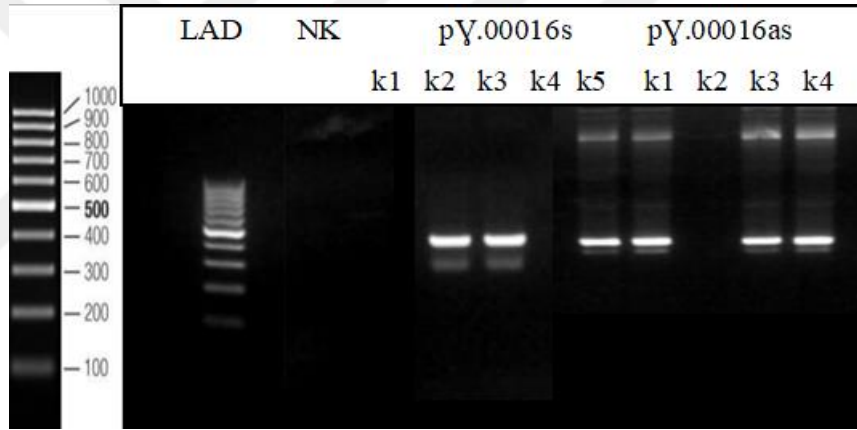
Şekil 4. 5. PacI ve NotI enzimleri kullanarak pDNA'ların kesilmesi pJET.00016'dan RNAi fragmentinin ayrılması ve pY.PDSs ve pY.PDSas plazmidlerinden pYs ve pYas vektörlerinin ayrılması

4.2.2.2. pY Vektörüne RNAi₀₀₀₁₆ Fragmentinin Klonlanması

RE ile kesim işleminden sonra elde edilen RNAi fragment DNA'sı, T4 ligaz enzimi kullanılarak pYs ve pYas vektörlerine ayrı olarak ligasyonla bağlanmıştır. Ligasyon sonucu oluşan pY.00016s ve pY.00016as plazmidlerinin *E. coli* DH5α suşuna transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon sonrası oluşan olası transformant koloniler Şekil 4.6'de sunulmuştur. Gece boyu büyüyen olası transgenik kolonilerden 5'er tanesi seçilerek doğrulaması için koloni PCR yapılmıştır. Jel elektroforezi sonucu 449 bp'lik RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti gözlenen koloniler arasından 2'er tanesi seçilmiştir (Şekil 4.7). Seçilen koloniler dizi analizi için özel bir firmaya gönderilmişlerdir.

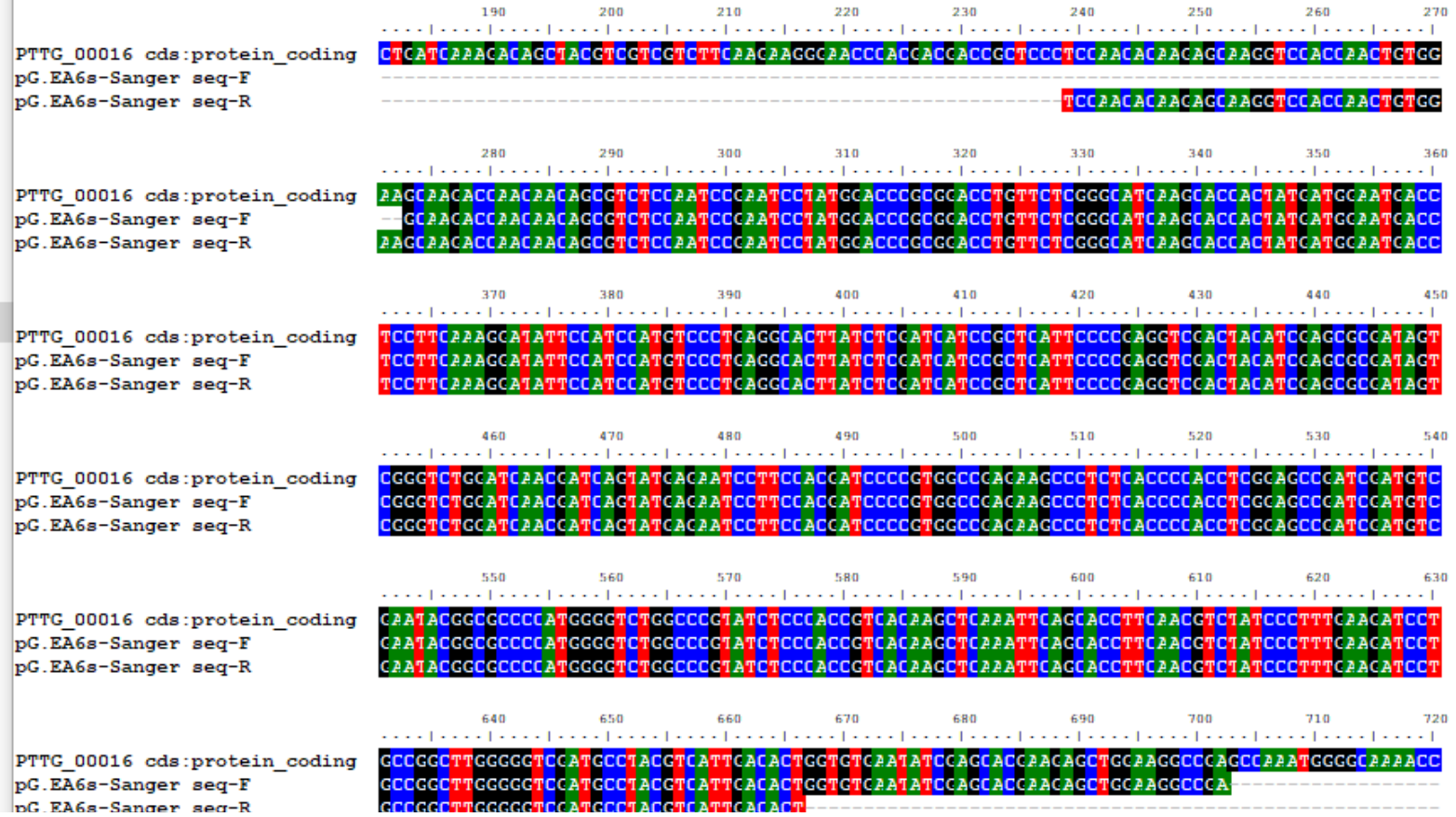


Şekil 4.6. Transformasyon sonrası üremeye bırakılan plazmidlerin görüntüsü

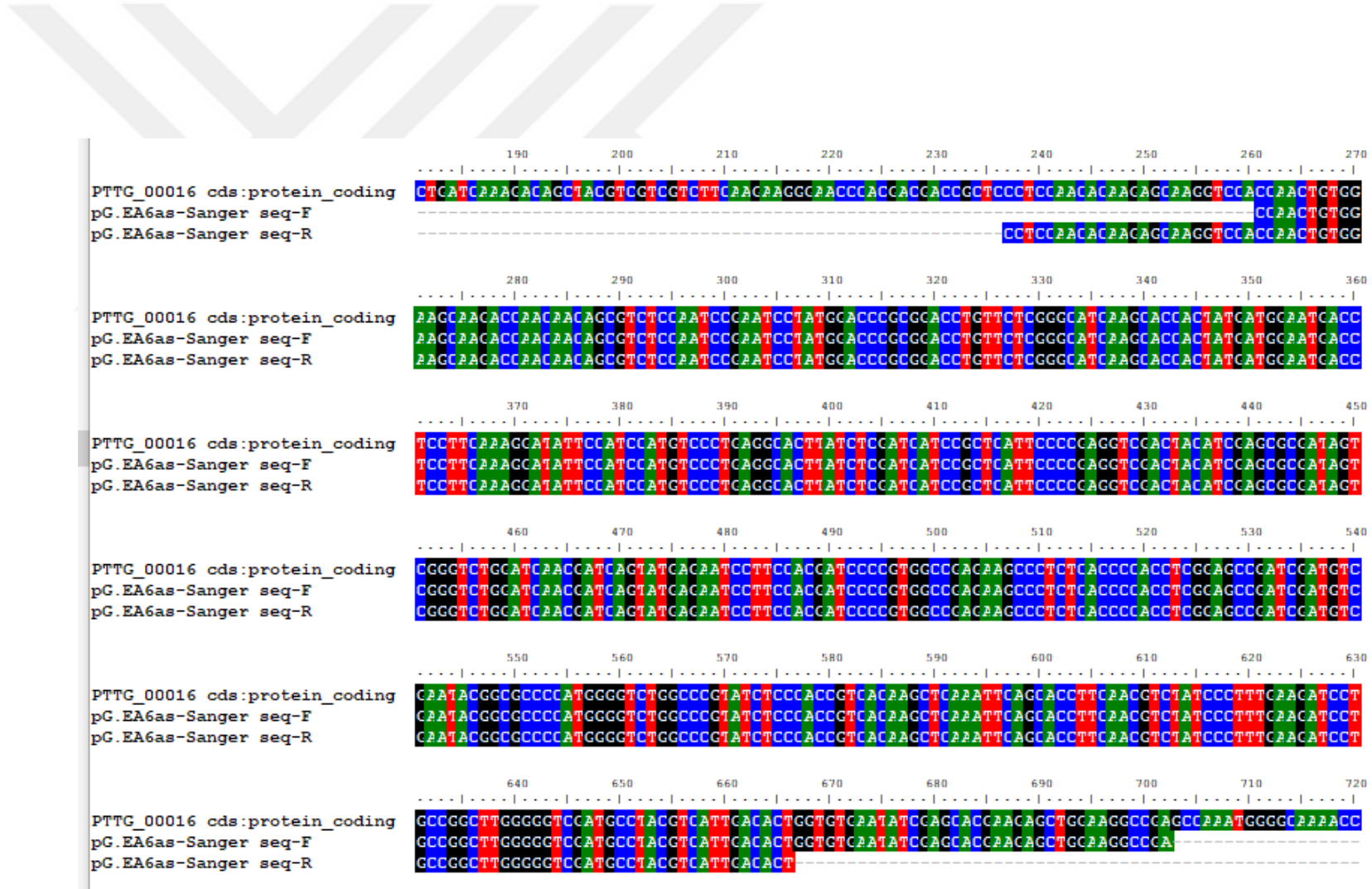


Şekil 4.7. pY.00016s ve pY.00016as plazmidlerinin koloni PCR sonucu (k:koloni)

pY.00016s ve pY.00016as plazmidlerinin RNAi fragmenti ve dizi eşleşmesi, dizi analizine gönderilerek çift yönlü hizalaması yapılmıştır. Dizi analizi sonucu elde edilen iki yönlü veriler BioEdit uygulaması kullanılarak eşleştirilmiştir. Farklı okunan nükleotidler kromatogram yardımıyla doğrulanmıştır. Elde edilen diziler, *PTTG_00016* gen dizi ile de hizalaması yapılarak doğrulanmıştır.



Şekil 4.8. Seçilen kolonilerden elde edilen pY.00016s 'ya ait dizilerin BioEdit uygulaması ile hizalanması

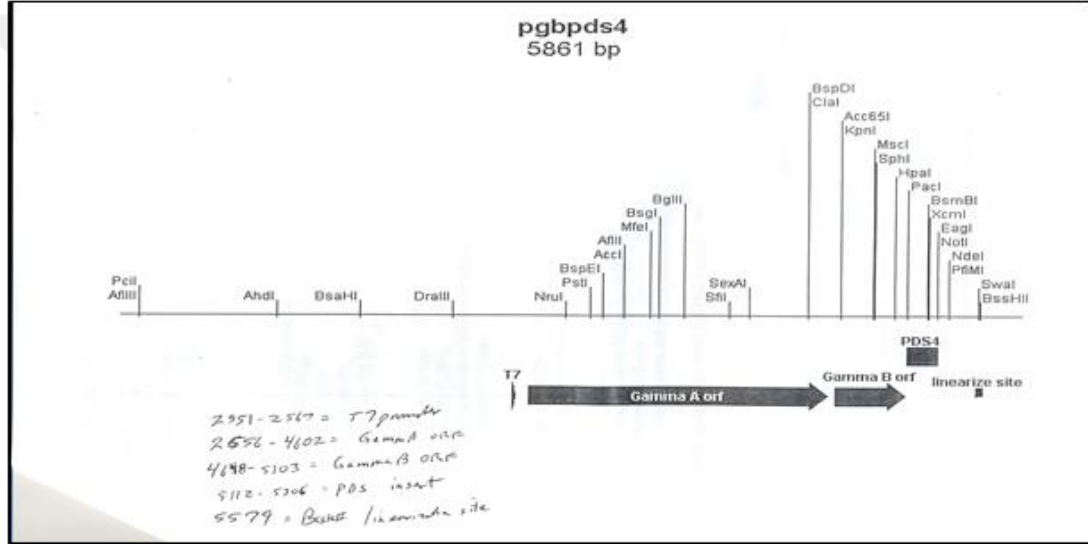


Şekil 4.9. Seçilen kolonilerden elde edilen pY.00016as 'ya ait dizilerin BioEdit uygulaması ile hizalanması

4.3. HIGS Uygulaması: BSMV ve Pas İnokülasyonu

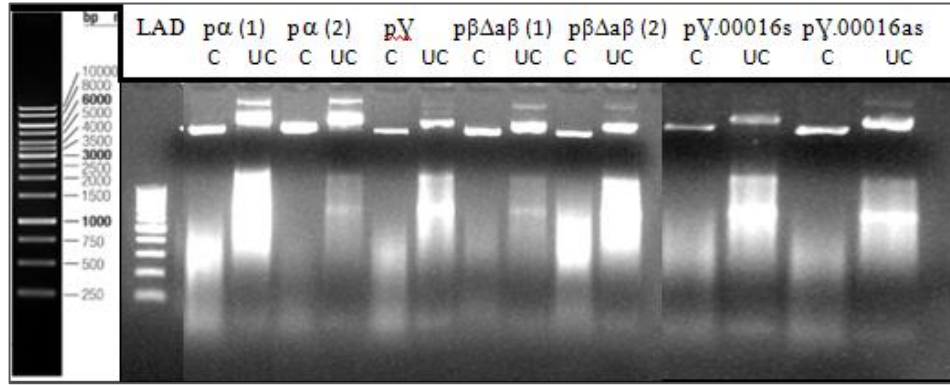
4.3.1. Kalıp DNA'ların Hazırlanması

İn vitro transkripsiyon aşamasının yapılabilmesi için önce plazmidlerin lineer hale getirilmeleri gerekmektedir. Bunun için ilk olarak plazmidleri içeren bakterilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası mevcut plazmidler RE ile kesim yapılarak transkripsiyonun sonlanacağı bölgeden kesilmişlerdir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. pY plazmidinde transkripsiyon ve lineerizasyon bölgesi

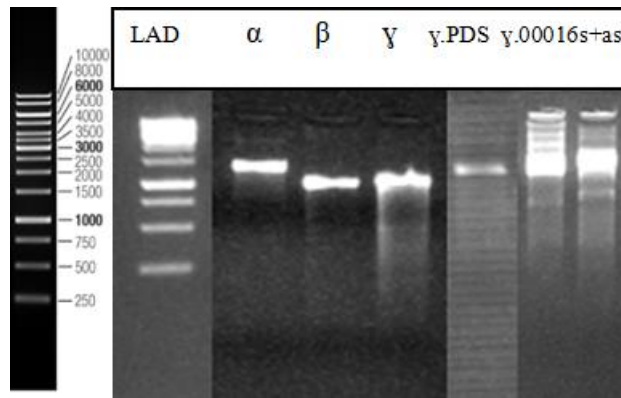
İn vitro transkripsiyon öncesi lineerizasyon için pY ve pα plazmidlerinin MluI enzimi, pβΔaβ plazmidinin BcuI (SpeI) enzimi ve pY.00016s, pY.00016as, pYPDS.s ve pYPDS.as plazmidlerinin de BssHII enzimi ile kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Kesim işlemi sonrası plazmidler agaroz jele yüklenilerek jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmiştir. (Şekil 4.11). Lineer yapısı doğrulanan plazmidler in vitro transkripsiyonda kullanılmak üzere saflaştırılmıştır.



Şekil 4.11. Linner hale getirilen pDNA'lar (C: kesilmiş (cut), UC: kesilmemiş (Uncut))

4.3.2. pDNA'ların İn Vitro Transkripsiyonu

İn vitro transkripsiyon için mMESSAGE mMACHINE® High Yield Capped RNA Transcription Kit kullanılarak BSMV RNA genomu sentezi yapılmıştır. Transkripsiyonda pY.00016s ve pY.00016as ait pDNA'lar kendi içinde pYPDS.s ve pYPDS.as 'lerde kendi içinde eşit miktarda karıştırılarak kullanılmıştır. Reaksiyon sonunda elde edilen transkripsiyon ürünleri LiCl₂ yöntemi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen transkript ürünleri agaroz jele yüklenerek analiz edilmiştir (Şekil 4.12). Agaroz jelde kalitesine bakılarak incelenmiş ve sentezlenen RNA'lar BSMV inokülasyonunda kullanılmıştır.



Şekil 4.12. in vitro transkripsiyon ile sentezlenen RNA'lar

4.3.3. Bitkilerde BSMV İnokulasyonu

RNAi fragmentini bitki hücrelerine taşımak ve dsRNA halinde hücrelere yaymak için BSMV kullanılmıştır. Bu amaçla BSMV genomunu temsilen sentezi yapılan RNA'lar (α , β , γ), karşılaştırılarak FES solüsyonu eşliğinde bitkilerin 2. Yapraklarına sürülmüştür. FES solüsyonunun kuma benzer bir yapıda olması sayesinde, yapraklar hafif yara alarak BSMV bu yara açıklıklarından yaprak hücrelerine girmesi sağlanmıştır.

Gerçekleştirilen BSMV inokülasyonunda test bitkisi γ genomunda efektör adayına ait RNAi₀₀₀₁₆ fragmentini taşımaktadır (BSMV:00016) ve viral genom replike olurken dsRNA'lar şeklinde çoğaltılarak bitki hücrelerine yayılmaktadır. Pozitif kontrol olan örneklerde γ genomunda PDS genine özgü RNAi fragmenti bulunmaktadır (BSMV:PDS) ve aynı şekilde dsRNA olarak bitki hücrelerine taşınmaktadır. PDS geninin susturulması ile bitkilerde klorofil yıkılarak bitkilerde yaprakların beyazlaması ile kendini belirtir. Bu da BSMV aracılığıyla ile gen susturulmasının fenotipik olarak gözlenmesine olanak tanır. Herhangi bir ek fragment içermeyen γ genomunun (BSMV:0) kullanıldığı mock kontrol örneklerde ise yapraklarda sarı-beyaz çizgiler şeklinde normal viral semptomlar gözlenmelidir.

Tez çalışması kapsamında bitkilerin 2. yapraklarına yapılan BSMV inokülasyonunu takiben 10 günde beklentilere uygun sonuçlar gözlenmiştir (Şekil 4.13);

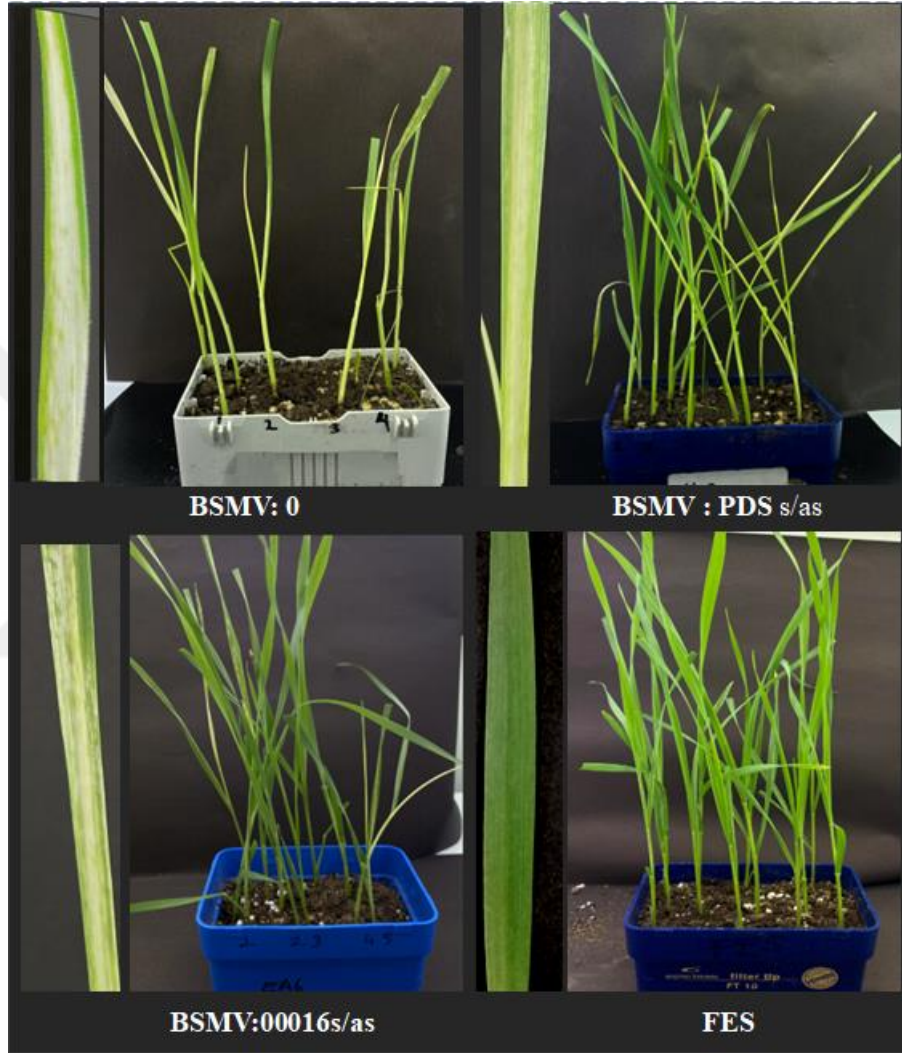
Mock kontrol grubu: BSMV:0 ile inoküle edilen bitkilerin ortalama olarak %80'inde 3 ve 4. yapraklarında sarı-beyaz çizgiler şeklinde viral semptomlar gözlenmiştir.

Pozitif kontrol grubu: BSMV:PDS/as ile inoküle edilen bitkilerin ortalama olarak %70'inde 3 ve 4. yapraklarında yaygın beyazlaşma semptomları gözlenmiştir.

Test grubu: BSMV:00016s/as ile inoküle edilen bitkilerin ortalama olarak %75'inde 3 ve 4. yapraklarında sarı-beyaz çizgiler şeklinde semptomlar gözlenmiştir.

Negatif kontrol grubu: sadece FES solüsyonu bulaştırılan tüm örneklerde herhangi bir semptom gözlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlar efektör adayına özgün olarak tasarlanan RNAi₀₀₀₁₆ fragmentinin dsRNA olarak çoğaldığını ve viral yayılıma paralel olarak yeni gelişen yapraklarda gözükmemektedir.



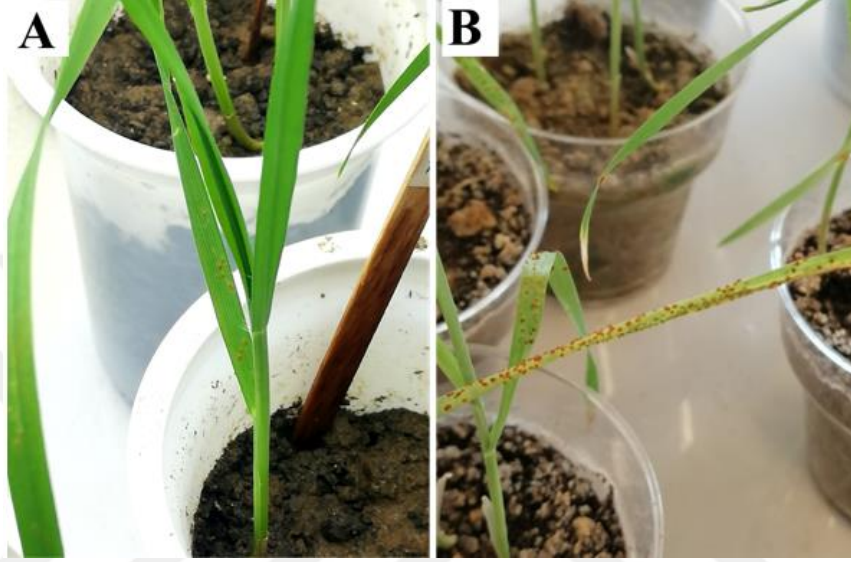
Şekil 4.13. BSMV inokülasyonu sonrası yapraklarda gözlemlenen semptomlar

4.3.4. Pas inokülasyonu

4.3.4.1. Patojene ait Urediniosporların Çoğaltılması

Tez çalışmasında kullanılan patojen *Pt* ırk-1 urediniosporları, Kanada’da bulunan Dr. Christoph RAMPITCH’in çalışma grubundan temin edilmiştir. *Pt* ırk-1 urediniosporları, iki yapraklı dönemde olan Morocco buğday fidelerine bulaştırılarak

canlılık kazandırılmıştır. -80 °C’ de muhafaza edilen patojen urediniosporları HIGS uygulaması yapılana kadar 15 günde bir canlı toplanarak, düzenli olarak yeni yetiştirilen bitkilere inokülasyonu yapılmıştır (Şekil 4.14). Böylelikle HIGS uygulaması yapılırken taze pas püstülleri kullanılmıştır.



Şekil 4.14. *Pt-irk1*’in inokülasyonla çoğaltılması (A.-80oC de 1 yıl muhafaza edilmiş urediniosporlarla inokülasyon B. Bitki üzerinde bulunan canlı urediniosporlarla inokülasyon sonucu çoğaltım)

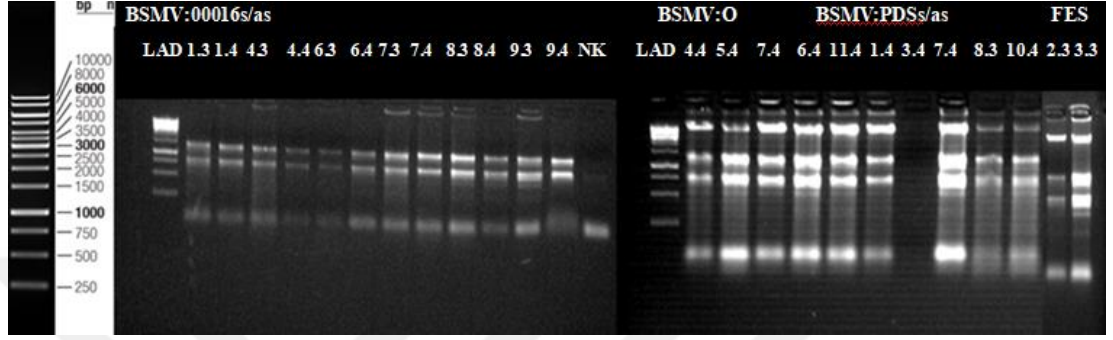
4.4. *PTTG_00016* Genin Susturulması ve Enfeksiyon Gelişimine Etkisinin Analiz

BSMV inokülasyonu sonrası bitkilerde görülen beyaz-sarı semptomlar, yapılan inokülasyonun başarılı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.13). Bu başarı doğrultusunda efektör adayına özgü dsRNA’ların patojene taşınması için sonraki adım olarak *Pt* ırk1 ile inokülasyon yapılmıştır. BSMV ile enfekte bitkilerin 3. ve 4. yapraklarına 10.günde *Pt* Irk1 urediniosporları bulaştırılmıştır. Yapraklarda devam eden fungal gelişim evrelerinin tamamlanabilmesi için bitkiler, 12 gün iklimlendirme odasında takip edilmişlerdir. Bu sırada 3. günde qRT-PCR ile *PTTG_00016* genin ekspresyon seviyesi, 5. günde mikroskopik olarak spor gelişimi ve 12. gün de ise enfeksiyon şiddeti incelenmiştir.

4.4.1. qRT-PCR Analizleri ve Sonuçları

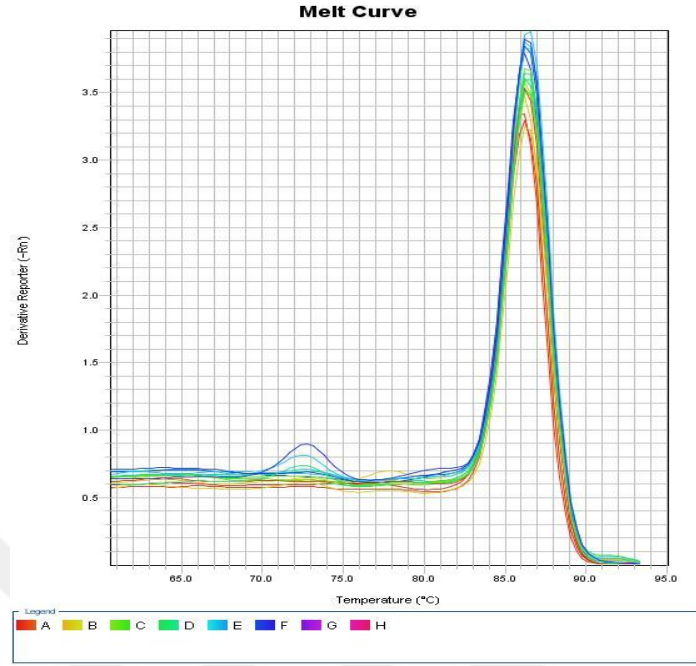
qRT-PCR analizleri için pas inokülasyonu sonrası 3. günde alınan 3 ve 4. yaprak örnekleri kullanılmıştır. Bu yaprak dokularına ilk olarak RNA izolasyonu

yapılmış ve tüm örneklerde uygun kalitede RNA'lar elde edilmiştir (Şekil 4.15). RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA'lardan 1100 ng kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA'lar ile yapılan qRT-PCR ile *PTTG_00016*'nın gen ekspresyon seviyesi belirlenmiştir.

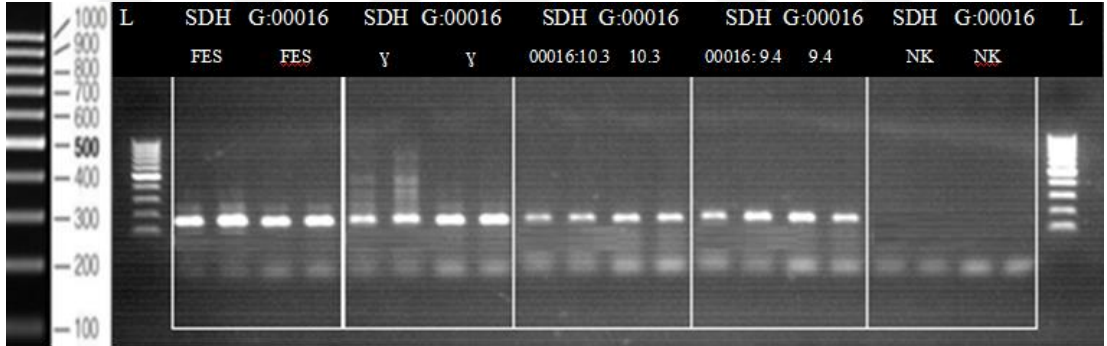


Şekil 4.15. BSMV:00016s/as için HIGS uygulaması yapılan bitkilerden elde edilen total RNA izolasyonu (Örnek açıklaması: 1.3 ve 1.4 olarak adlandırılan yaprak örneklerinde 1, 1. bitki olduğunu; 3 ve 4, 3. Ve 4. yaprakları olduğunu belirtmektedir.)

qRT-PCR analizinde BSMV semptomları gözlenen bitkilerin 3. ve 4. yaprakları örnek olarak kullanılmıştır. Analiz sonucunu karşılaştırmak için BSMV:0 (Y:0) kullanılmıştır. Hedef genin Y:0 göre ekspresyon düzeyi $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. qRT-PCR analizleri sonucu elde edilen, BSMV:00016'ya ve kontrollere ait Melting Curve grafiği (Şekil 4.16) çoğaltılan DNA fragmentlerinin doğru olduğunu göstermiştir. Ayrıca gerçekleştirilen qRT-PCR'ın görsel olarak değerlendirilmesi için örnekler agaroz jel elektroforezi yapılarak da görüntülenmiştir (Şekil 4.17)

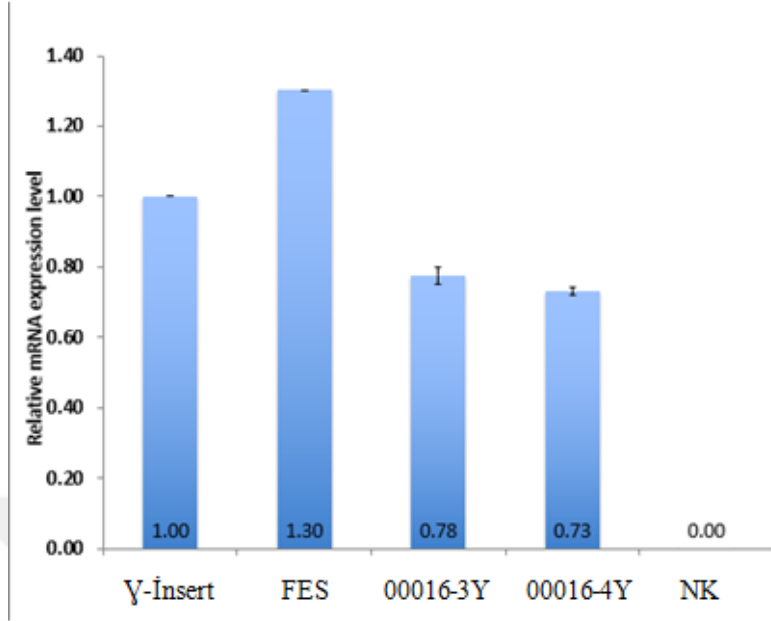


Şekil 4.16. qRT-PCR analizde Melting Curve grafiği



Şekil 4.17. qRT-PCR sonrası örneklerin agaroz jel görüntüsü

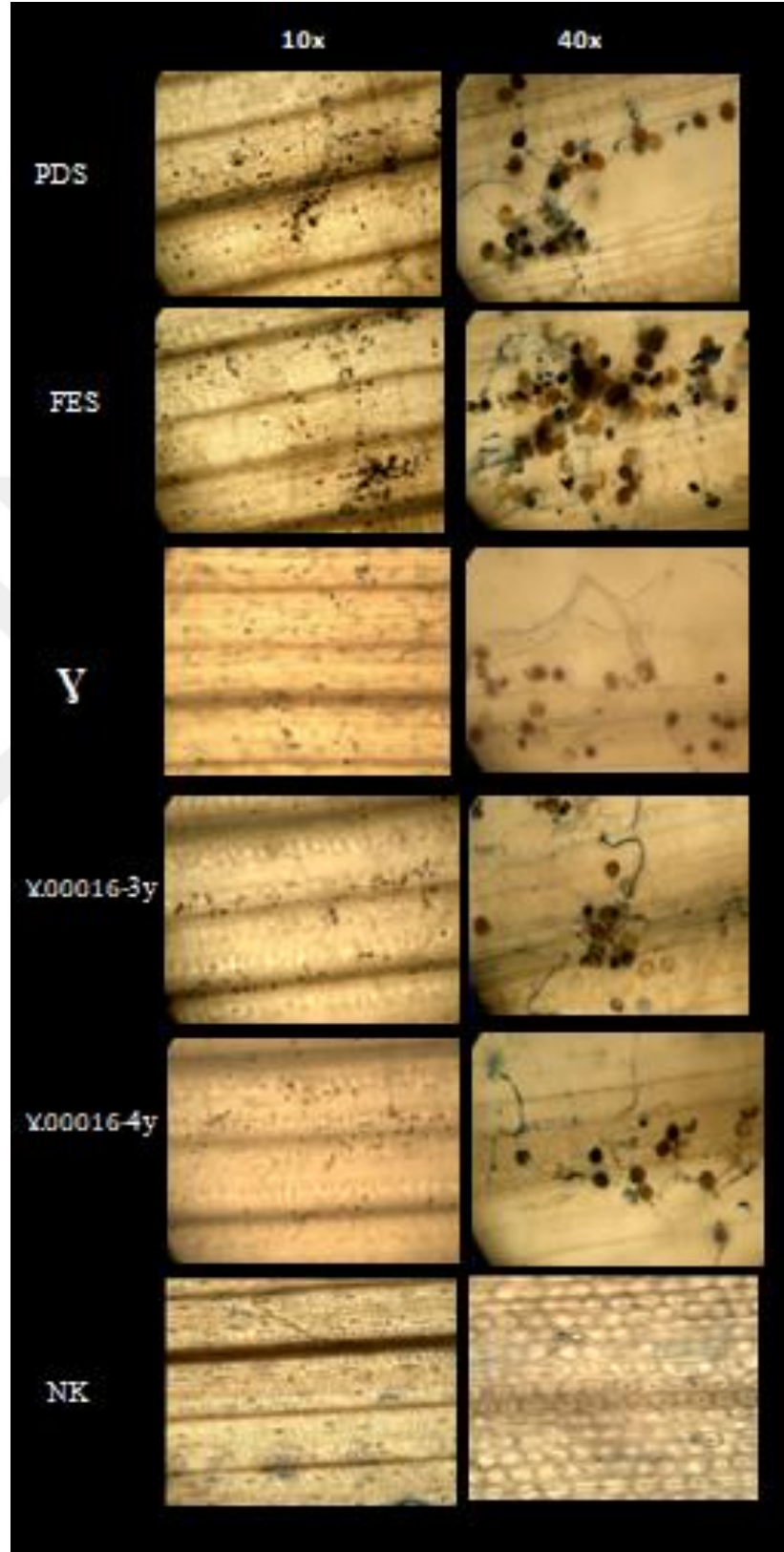
Elde edilen bulgular gen susturma işleminin başarılı olduğunu göstermiştir. HIGS metodu ile susturulması yapılan *PTTG_00016* geninin, yapılan uygulamalar sonucu gen ekspresyonunun herhangi bir insert içermeyen boş BSMV:0'ya göre ortalama olarak 3. Yapraklarda %22, 4. Yapraklarda ise %27 oranında azaldığı görülmüştür (Şekil 4.18). FES uygulanan örneklerde ise BSMV:0'ya göre yaklaşık %30 düzeyinde artış gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Efektör adayına ve kontrol gruplarına ait değerlerin ortalamalarının karşılaştırılması

4.4.2. Mikroskopik Analizler

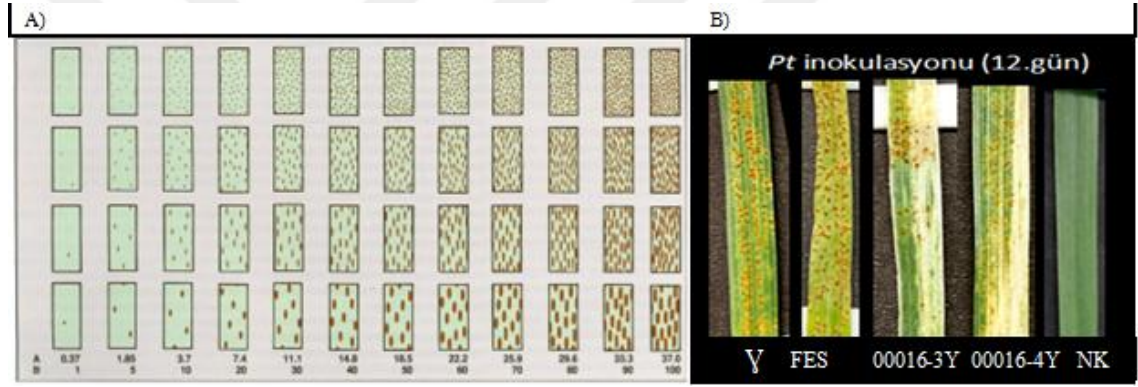
BSMV sonrası pas inokülasyonu uygulanan bitkilerden 5. günde alınan 3. ve 4. yaprak dokularına, mikroskopik analiz için boyama işlemi uygulanmıştır. Dokular tripan mavisi ile boyanmıştır. Boyama işlemi sonrası bitki yapraklarındaki urediniosporların germinasyonu ve enfeksiyon hiflerinin oluşumu mikroskopik olarak incelenmiştir. Bu incelemede BSMV:0 ve FES ile muamele örneklerde yoğun hif gelişimi gözlenirken, hiçbir işlem görmemiş negatif kontrol bitkilerde herhangi bir patojen varlığı gözlenmemiştir. BSMV:00016s/as test örneklerinde ise pas gelişiminin bir miktar azaldığı ancak hif gelişiminin FES inokule ve BSMV:0'a benzer şekilde etkin biçimde gerçekleştiği gözlenmektedir (Şekil 4.19). Özellikle FES uygulanan örneklerde enfeksiyon hif gelişiminin daha da yoğun olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. Pt inokülasyonu sonrası 3.günde yaprak örneklerinin ışık mikroskobu görüntüsü

4.4.3. Enfeksiyon Şiddetinin Belirlenmesi

BSMV + *Pt* ırk1 urediniosporları ile inokule bitkilerde, *Pt* inokülasyonundan yaklaşık 8 gün sonra ilk pas püstülleri görülmeye başlanmış ama tam olarak belirgin hale gelmeleri için 12. güne kadar beklenmiştir. 12. günde enfekte yapraklar fotoğraflanmış ve modifiye Cobb skalası (Roelfs, Singh, & Saari, Rust diseases of wheat: Concepts and methods of disease management, 1992) kullanılarak enfeksiyon şiddeti tespit edilmiştir (Şekil 4.23). Buna göre BSMV:0 örneklerde enfeksiyon şiddeti ortalama olarak %60 düzeyinde iken BSMV:00016 test örneklerinde ise %50 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.20). FES uygulanan örneklerde ise enfeksiyon şiddetinin bir miktar artış gösterdiği, yaklaşık olarak %70 civarında meydana geldiği gözlenmiştir.

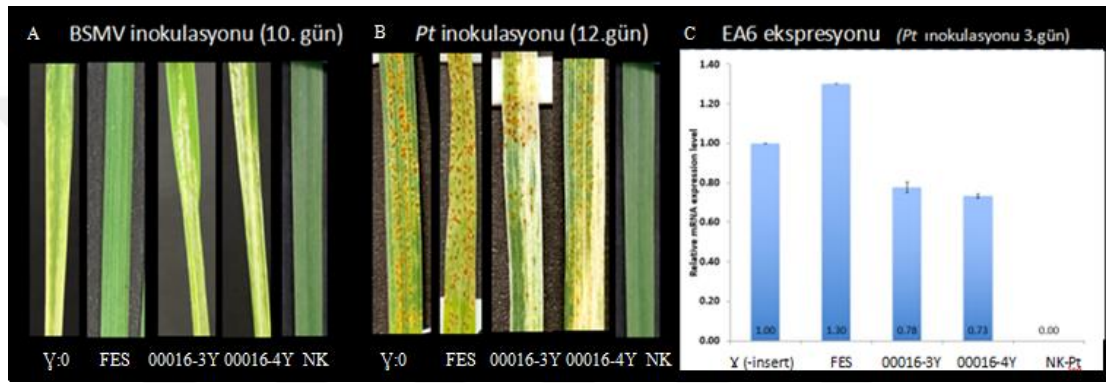


Şekil 4.20. Modifiye edilmiş Cobb skalası. A. enfeksiyon şiddeti skalası (%) (Roelfs, Singh, & Saari, 1992) B. Tez çalışması sonucu örneklerde gözlenen enfeksiyon şiddeti

4.5. Değerlendirme

Tez kapsamında, buğday kahverengi pas hastalığı etmeni *Pt* de, virulanslığında etkin olabilecek efektör adayı, *PTTG_00016* geni, HIGS yöntemi kullanılarak susturulmaya çalışılmış ve gen ekspresyonundaki baskılanmanın enfeksiyon gelişimine etkisi değerlendirilmiştir. RNAi aracılı gen susturma için dsRNA'lar virüs (BSMV) aracılığı ile önce bitki hücrelerine aktarılmıştır. Bitki hücrelerinde viral çoğalma dağılıma paralel olarak gene özgü dsRNA'lar da çoğaltılıp dağıtılmıştır. Ardından aynı bitkilere *Pt* ırk1 ile inokülasyon yapılarak patojen bulaştırılmıştır. Patojenin germinasyonu ve hif gelişimi sırasında dsRNA'ların alması ve *PTTG00016* geninin RNAi mekanizması ile susturulması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, HIGS uygulamasında BSMV inokülasyonunun ortalama olarak %75 oranında başarı ile gerçekleştiğini ancak *PTTG_00016* genindeki susturmanın düşük düzeyde

(ortalama %25) meydana geldiğini ve bu durumun enfeksiyon şiddetinde anlamlı bir gerilemeye neden olmadığını göstermektedir (Şekil 4. 21). Ayrıca mikrobik inceleme sonucu elde edilen gözlemler de bu sonuçları destekler niteliktedir. BSMV ve pas inokülasyonu yapılmayan negatif kontrol bitkilerinde beklendiği gibi hiçbir enfeksiyona rastlanmamıştır. FES uygulanan kontrol grubu bitkilerde ise hem gen ekspresyon düzeyi hem hif gelişim düzeyi ve hem de enfeksiyon şiddetinde artışlar gözlenmiştir.



Şekil 4.21. HIGS uygulaması ve *Pt* enfeksiyon şiddeti A) BSMV semptomları B) *Pt* semptomları C) Ekspresyon grafiği

Sonuçlar tez kapsamında HIGS uygulamasının başarı ile gerçekleştirildiğini, *PTTG_00016* genin ekspresyonunda RNAi aracılı susturmanın sağlandığını ancak gen susturma düzeyinin enfeksiyon gelişiminde anlamlı bir değişime neden olmadığını göstermektedir. Elde edilene sonuçlar doğrultusunda *PTTG:00016*'nın gerçek bir efektör olduğu yönünde güçlü kanıtlar elde edilememiştir

BÖLÜM 5

SONUÇ VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında buğday patojenlerinden biri olan ve kahverengi pas hastalığına neden olan *Pt* ırk-1'den elde edilen *PTTG_00016* efektör adayının HIGS yöntemi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için ilk olarak EssemblFungi Database'den *PTTG_00016*'nın DNA dizi bilgisi incelenmiştir. İnceleme sonucu hedef RNAi gen parçası seçilmiştir. Seçilen hedef RNAi₀₀₀₁₆ fragmenti p.JET1/2 Blunt klonlama vektörüne klonlanarak, HIGS çalışmasında kullanılacak olan BSMV vektörü ile aynı RE uçlarına sahip olması sağlanmıştır. Ardından sense ve antisens oryantasyonlu pY vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir. Klonlama sonrası elde edilen pY.00016.s ve pY.00016.as vektörleri, α ve β genomlarını içeren vektörler ve kontrol grupları in vitro transkripsiyon ile mRNA'ya dönüştürülerek BSMV inokülasyonunda kullanılmak için hazırlanmıştır. Elde edilen transkriptler ile patojene hassas olan bitkiler iki yaprakları döneme geldikleri zaman BSMV inokülasyonu yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak Y:PDS, mock kontrol için insert içermeyen Y:0, negatif kontrol olarak FES ve test grubu Y:00016 olarak ayrılmıştır. Klonlamanın ardından bu plasmidlerden in vitro transkripsiyon ile RNA'lar üretilmiş, test ve kontrol grubu için BSMV genomunu oluşturmak üzere birleştirilmiştir. Karıştırılan RNA fragmentleri FES solüsyonu ile homojen olarak karıştırılıp bitkinin 3. ve 4. yapraklarına inoküle edilmiştir.

BSMV semptomları gözlemlendikten sonra (BSMV inokülasyonunun 10. Günü) *Pt* itk1'e ait urediniosporları ile pas inokülasyonu yapılmıştır. Pas inokülasyonu takibinde RNAi₀₀₀₁₆ fragmentinin patojen hücrelerine geçişi sağlanarak ilgili genin susturulması hedeflenilmiştir. Bunun için 3. günde yaprak dokularından mikroskopik

ve moleküler analizler için örnek alınmıştır. 10 gün boyunca pas gelişimi gözlemlenmiştir.

Gen ekspresyonu analizi, qRT-PCR sonucunda, RNAi₀₀₀₁₆ fragmentini içeren BSMV:00016 örneklerinde, herhangi bir insert içermeyen boş BSMV:0'ya göre gen ekspresyonunun 3. yapraklarda %78, 4. yapraklarda ise %73 oranında olduğu görülmüştür. Bir başka deyişle test örneklerde *PTTG_0016* geninde, insert içermeyen boş BSMV:0 ile karşılaştırıldığında ortalama olarak %25 düzeyinde susma sağlandığı gözlemlenmiştir. Bu durum *PTTG_00016* geni ekspresyonunun tamamen baskılamadığı, sadece kısmi bir azalma sağlandığını göstermektedir. Bu örnekler enfeksiyon şiddeti açısından değerlendirildiğinde, BSMV:00016 örneklerinde, pas yoğunluğunun gen ekspresyonu düzeyinde beklendiği ölçüde azalmadığı, enfeksiyon şiddetinin BSMV:0'a kıyasla her iki yaprakta da yaklaşık %10 düzeyinde gerilediği görülmüştür. Hiçbir uygulama yapılmayan Negatif Kontrol bitkilerinde ise beklendiği gibi *PTTG_00016* ekspresyon düzeyi 0 olarak görülmüş ve herhangi bir enfeksiyon belirtisi gözlenmemiştir. Mikroskopik incelemede BSMV:00016'ya ait yaprak örneklerinde, BSMV:0 ile karşılaştırıldığında, hif gelişiminin az miktarda azalmakla birlikte etkin biçimde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Sadece FES uygulanan örneklerde ise hem *PTTG_00016* gen ekspresyon düzeyi hem de enfeksiyon şiddeti ile hif gelişimi BSMV:0'a kıyasla daha yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Yapılan tüm biyolojik ve teknik tekrarlarda gözlenen bu durum, dsRNA'yı bitkiye aktarmak için kullanılan BSMV'un yarattığı fizyolojik koşul ve semptomların, *Pt* enfeksiyonunu negatif yönlü olarak etkilediğini düşündürmektedir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen qRT-PCR analizleri sonucunda *PTTG_00016* geninin ekspresyon düzeyinde kontrollere kıyasla %22 ve %27 oranında azalma görülmektedir. Ekspresyon düzeyinde gözlenen düşüş HIGS metodunun başarı ile uygulandığını ancak gen susturma da beklenen etkinliğin gerçekleşmediğini düşündürmektedir. HIGS uygulaması yapılan çalışmalara bakıldığında %10-90'lara varan geniş bir aralıkta gen susturma etkinliğinin gerçekleştiği gözlenmektedir. Bu durumun sebebi olarak patojene, hedef gene, konak bitkiye, tasarlanan RNAi fragmentine ve RNA taşınım yöntemine bağlı olarak çok sayıda faktörün etkili olduğu belirtilmektedir. (Nowara vd. 2010);(Ray vd. 2022). Tez çalışmamızda tasarlanan

RNAi₀₀₀₁₆ fragmentinin ilgili gen üzerinde beklenen etkiyi göstermeme nedeni, hedef genin enfeksiyon döngüsünde kritik zamana denk gelmemesine bağlı olarak susturma etkinliğinin zayıf kalmış olabileceği düşünülmektedir ((Panwar V. M., 2013) , (Koch A. K., 2016) , (Nowara, 2010)) .

Tuo Qi ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada HIGS yöntemiyle buğdayda sarı pas hastalığı etmeni *Puccinia Striiformis f. Sp. Tritici*'nin PsCPK1 geni hedeflenmiştir. BSMV vektörü kullanılarak yapılan bu çalışmada, PsCPK1 geninin ekspresyon düzeyi ortalama %25-50 olarak belirtilmiştir. Bu azalma sonucu hastalık belirtilerinde kısmi direnç belirlenmiştir.

2022 yılında Wei ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *Puccinia triticina*'nın Pt13024, aday efektör geninin HIGS yöntemi ile susturulması hedeflenmiştir. Pt13024 bitkilerde houstoryum oluşumu sırasında anlamlı şekilde regülasyonu gerçekleşen ve patojenin konak savunma mekanizmasını baskılayacağı düşünülen bir efektör aday genidir. Genin klonlanma aşamasından sonra qRT-PCR yöntemi ile enfeksiyon sürecinde ekspresyon düzeyi analizi gerçekleştirilmiştir. Fonksiyonel analizi yapılan Pt13024 efektör adayının *Nicotiana benthamiana* bitkisinde BAX ve INF1 tarafından hücre ölümünü durdurma yeteneği test edilmiştir. HIGS uygulaması doğrultusunda BSMV vektörü aracılığıyla Lr30 direnç geni içeren buğday hatlarında susturulması gerçekleşmiştir. Ancak HIGS sonucu ekspresyon düzeyi %25-40 olarak gözlemlenmiştir. Lr30 direnç genine sahip hatlarda da hastalığın belirtileri kısmi olarak azalmaya sebep olmuştur.

Nowara ve arkadaşları 2010 yılında *Blumeria graminis f. Sp. Tritici (Bgt)* patojenine ait üç farklı efektör gen üzerinde yaptığı çalışmada (SvrPm3, Bgt_Bcg-6, Bgt_Bcg-7) HIGS yöntemi kullanarak bu genlerin ekspresyon düzeylerinin %16 ve %58 arasında değişen oranlarda azaldıklarını raporlamışlardır. Bu azalma seviyesi, hastalık belirtilerinde kısmi direnci göstermiştir. Fakat genlerin susması sınırlı düzeyde kalmıştır. Bu da hedef genlerin enfeksiyon süreçlerinde sınırlı rolü olduğunu belirtmiştir.

Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda HIGS yönteminin, hedef genin susturulması üzerinde patojenin virülens özelliğini azalttığı ve konak üzerindeki

hastalık belirtilerinin azalması yönünde başarısı görülmektedir. Bu başarı hedef genin doğru seçimi, RNAi mekanizmasının ve kullanılan vektörlerin verimliliği, konak bitkide oluşan ekspresyonun düzenliliği gibi faktörlere bağlıdır. RNAi'ye daha az duyarlı olan patojenler de göz önünde bulundurulmalıdır (Gaffar, F. Y., & Koch, A., 2019). Çalışmada kullanılan BSMV temelli vektör ile gerçekleştirilen HIGS yöntemi, bitki hücrelerinde etkin bir şekilde ifade edilmiştir. BSMVs ve BSMVas'ın birlikte kullanımı ile elde edilen semptomlar şiddetli ve net olarak gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda BSMV'ni yüksek oranda başarı ile konak hücrelere taşıdığı ve RNAi yanıtını tetikleyerek dsRNA üretiminin gerçekleştiğini göstermektedir.

Biyotrof mantarlar, yaşam döngülerinin tamamını canlı konak hücrelerinde sürdüren ve konaktan bağımsız olarak kültürde çoğaltılamayan patojen organizmalardır. Bu nedenle yapılacak olan fonksiyonel gen analizleri ve genetik manipülasyonlar canlı bir konak üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu mantarlar üzerinde yapılan fonksiyonel genomik çalışmalarında kullanılan en etkili yöntem HIGS'dir. Ancak laboratuvar ortamında HIGS metodunun kullanımının bazı olumsuzlukları bulunmaktadır. Bunlar konak bitkiyi yetiştirme zorlukları, transferler sonrası bitkinin olumsuz etkilenmesi gibi durumlardır. Aynı zamanda bitkinin gelişim evrelerini takip edip, o döngülere göre inokülasyonların yapılması zaman açısından olumsuzluk oluşturmaktadır. Özellikle HIGS metodunda RNAi'nin hedefi olan patojen geni doğru seçilmelidir. Aksi takdirde susturma gerçekleşmez ve bitkinin kendi genlerine de zarar verilebilir.

İleride yapılacak olan çalışmalar için çok sayıda tanımlanmış patojen üzerinde HIGS metodunun uygulanabilirliği, tarımsal biyoteknolojide önemli bir araç olacaktır. HIGS yönteminin hedef gene yönelik çalışılması, doğal mikrobiyal dengeyi bozmadan patojeni baskılamayı hedeflediği için sürdürülebilir tarım uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Bu yöntemin daha geniş çapta tarım uygulamalarına entegrasyonu sonucu önemli çevre dostu bir alternatif olduğu görülecektir. Moleküler Dünyada da tanımlaması gerçekleştirilen efektörler ile bitki- patojen etkileşimlerinin daha derinlemesine anlaşılmasını sağlar. Efektörün hedeflediği bitki proteinleri belirlenebilir ve efektörün direnç genleri ile etkileşim mekanizması açıklanabilir

HIGS yöntemi ile *Pt*'de başka efektör adayları ve virölans genlerinin fonksiyonel analizi yapılmıştır. Bunlardan biri Pt13024'tür. Bu efektör, Haustoryum oluşumu sırasında regüle edilen ve patojenin konak savunmasını baskılayan önemli bir efektör adaydır (Wei, ve diğerleri, 2022). Pt1641'de Konak savunmasını baskıladığı tespit edilen bir efektördür. HIGS metodu ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda Lr1 genine sahip buğday hatlarında etkisiz hale getirildiği ve bu sayede bitkinin savunma sisteminin etkinleştirildiği gösterilmiştir (Zhang, Yang, & Liu, 2022). Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda HIGS önemli derecede yeni efektörlerin tespiti için etkili bir metod haline gelmiştir



KAYNAKÇA

- Ahmed H. El-Sappah, K. Y.-T. (2021). Comprehensive Mechanism of Gene Silencing and Its role in Plant Growth and Development.
- Aime, M. C. (2017). Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 19–25.
- Aime, M. C., Bell, C. D., & Wilson, A. W. (2018). Deconstructing the evolutionary complexity of rust fungi (Pucciniales) and their plant hosts. *Studies in Mycology*, 89, 143–152.
- Bakkeren, G., Song, X., Panwar, V., Linning, R., Wang, X., Rampitsch, C., . . . Saville, B. (2012). Functional genomic approaches in cereal rusts. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(1), 3-12.
- Bhadauria, V., Banniza, S., Wei, Y., & Peng, Y.-L. (2009). Reverse Genetics for Functional Genomics of Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. s. 1-11.
- Blanco, A., Cenci, A., Simeone, R., Gadaleta, A., Pignone, D., & Galasso, I. (2002). The cytogenetics and molecular characteristics of a translocated chromosome 1AS.1AL-1DL with a Glu-D1 locus in durum wheat. *Cell. Mol. Biol.*, 7, 559–567.
- Brittany T. Truong, K. B. (2020). The Power of Zebrafish Models for Understanding Craniofacial and Limb Disorders. *genesis*.
- Chang, J. J. (2024). A thaumatin-like effector protein suppresses the rust resistance of wheat and promotes the pathogenicity of Puccinia triticina by targetin TaRCA. *New Phytologist* , 1947-1960.
- Chang, Y. J. (2024). Wheat leaf rust fungus effector protein Pt1641 is avirulent to TcLr1. *Plants*, 1-13.

- Chen W., C. R. (2014). Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Molecular Plant Pathology*(15(5)), 433-446.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2172-2175.
- Daria M. Motorina, Y. A. (2024). Systems for Targeted Silencing of Gene expression and Their Application in Plants and Animals. *International journal of Molecular Sciences*, 1-26.
- Desai, P., Shrivastava, N., & Padh, H. (2010). Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 28(4), 427-435.
- EMBL. (2025). what is functional genomics:
(<https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-i-introduction-and-design/what-is-functional-genomics/>) adresinden alındı
- Evelien, R., Bunnik, M., & Le, K. G. (2013). An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. *TECHNOLOGY ADVANCES*, 491-498.
- Evelina, G., & Vaidutis, K. (2017). The most common technologies and tools for functional genome analysis. *ACTA MEDICA LITUANICA*, 1-11.
- Fang, X., & Qi, Y. (2016). RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *The Plant Cell*, 28(2), 272–285.
- FAO. (2025). FAO: <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/> adresinden alındı
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245–246.
- Figuerda, M., Hammond-Kosack, K. E., & Solomon, P. S. (2018). A review of wheat diseases-perspective. *Molecular Plant Pathology*(19(6)), 1523-1536.

- Figuerola M, Hammond-Kosack KE, & PS, S. (2017). A review of wheat diseases – a field perspective. *Molecular Plant Pathology*, 19, 1523–1536.
- G. Popova, L. E. (2023). Yeast Heterologous Expression Systems for the Study of Plant Membrane Proteins.
- Gabaldón, T., & Koonin, E. V. (2013). Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nature Reviews Genetics*, 14(5), 360–366.
- Gaffar, F. Y., & Koch, A. (2019). Gene silencing in fungi using RNA interference. *Molecular Plant Pathology*, 20(8), 1237–1254.
- Garnica, D. N. (2014). The ins and outs of rust houstoria. *pLoS Pathog.*
- Genuth, N., & Barna, M. (2018). Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nature Reviews Genetics*, 431-451.
- Goellner K, Loehrer M, Langenbach C, Conrath U, Koch E, & U., S. (2010). Phakopsora pachyrhizi, the causal agent of Asian soybean rust. *Molecular Plant Pathology*, 11, 169–177.
- Guan, H., Zhang, P., Park, R. F., & Ding, Y. (2025). Genomics Research on the Road of Studying Biology and Virulence of Cereal Rust Fungi. s. 1-22.
- H., G., A., R., E.L., D., T.J., B., & Hussey, R. (2006). Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *103*, s. 14302–14306.
- Hammond, S. M. (2001). Argonaute, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*(293), 1146-1150.
- Hernan G. Rosli, E. S. (2021). Genome-wide analysis uncovers tomato leaf lncRNAs Transcriptionally active upon Pseudomonas syringae pv. tomato challenge. *Scientific Reports* , 1-13.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., Kamoun, S., & Hogenhout, R. A. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant associated organisms. s. 115-122.

- Holzberg, S. G. (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, 315-327.
- Huaimin Geng, Y. Z. (2024). Puccinia triticina effector Pt-1234 modulates wheat immunity by targeting transcription factor TaNACO69 via its C subdomain. *The Crop Journal*.
- J.R., K., J.C., S., D.N., M., M.V., G., J.M., J., B., O., . . . M.W., C. (2012). A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell*, 150(2), 389-401.
- Jibril Lubega, M. F. (2024). Comparative Analysis of the Avirulence Effectors Produced by the Fungal Stem Rust Pathogen of Wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*(37), 171-178.
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The Plant Immune System. *Nature*, 323.
- Jorgensen, R. (2006). Plant, RNAi and Nobel Prize. *Science*, 1242-1243.
- Kanja, C., & Hammond-Kosack, K. E. (2020). Proteinaceous effector discovery and characterization in filamentous plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 21(10), 1353–1376.
- Kim E. Hommond-Kosack, C. K. (2020). Proteinaceous effector discovery and characterisation in filamentous plant pathology. *Molecular Plant Pathology*(21(10)), 1353-1376.
- Koch, A. K. (2016). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase–encoding genes confers strong resistance to Fusarium species. *Plant Biotechnology Journal* (s. 597–606). içinde
- Koch, A., & Wassenegger, M. (2021). Host-induced gene silencing - mechanisms and applications. (231), s. 54-59.
- Koeppel, S., Kawchuk, L., & Kalischuk, M. (2023). RNA interference past and future applications in plants. *International Journal of Molecular Science*, 24(9755), 1-18.

- Li, G., Newman, M., Yu, H., Rashidzade, M., Martínez-Soto, D., Caicedo, A., . . .
Ma, L.-J. (2024). Fungal effectors: past, present, and future. *Host-Microbe interactions: Fungi*, 81, 1-7.
- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., & Duplessis, S. (2018). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. 222, s. 1190-1206.
- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., & Duplessis, S. (2019). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, 222(4), 1190–1206.
- Lorrain, C., Petre, B., & Duplessis, S. (2018). Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 19–25.
- Ludwig, N., Reissmann, S., Schipper, K., Gonzales, C., Assmann, D., Glatter, T., & Morett, M. (2021). A cell surface-exposed protein complex with an assential virulence in *Ustilago maydis*. *Natural Microbial*, 6, 722-730.
- Ma, W., Dong, F. F., Stavrinides, J., & Guttman, D. S. (2012). Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in *Xanthomonas*. *PLoS Genetics*, 8(9), 1-12.
- Mackie, A. R. (1991). Molecular differentiation in pea powder-mildew houstoria. *Planta*(183), 399-408.
- Marshall, W. E., & A., M. (1989). Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *Science*, 244(4910), 1313-1317.
- Montpetit, J., Vivancos, J., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Rémus-Borel, W., Belzile, F., . . . Bélanger, R. R. (2012). Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene. *Plant Molecular Biology*, 79, 35–46.
- Motorina, D. M. (2024). Systems for targeted silencing of gene expression and their application in plants and animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5231.

- Nathalia, A., Correa, R., Ritter, A. C., & Brandelli, A. (2025). Proteomic Strategies on the Management of Phytopathogenic Fungi. *Journal of Fungi*((11),306), 1-16.
- Nowara, D. G. (2010). HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* (s. 3130–3141). içinde
- Panwar, V. M. (2013). Host-induced gene silencing of *Puccinia triticina* pathogenicity genes through transgenic expression of RNAi sequences in wheat. *Plant Molecular Biology* (s. 595-608). içinde
- Panwar, V., Jordan, M., McCallum, B., & Bakkeren, G. (2018). Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNAi sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. *Plant Biotechnology Journal*(16(5)), 1013-1023.
- Pedersen, M. T., Hansen, B. G., Furlan, M. F., Sørensen, J. L., & Mortensen, U. H. (2020). Engineering of yeast for the production of the polyketide bostrycoidin. *Metabolic Engineering*, 57, 130–139.
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, Y., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., . . . Xu, B. L. (2021). Research Progress on Phytopathogenic Fungi and Their Role as Biocontrol Agents. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-12.
- Peter M. Dracatos, J. L.-M. (2023). Resistance that stacks up: engineering rust and mildew disease control in the cereal crops wheat and barley. *Plant Biotechnology Journal* .
- Pramad Prasad, S. S. (2019). Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding. *Planta*(250), 1-22.
- Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., & Gupta, P. K. (2019). The progress of leaf rust research in wheat.
- Presti, L. L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., . . . Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513–545.

- Qi, T., Gua, J., Peng, H., Liu, P., Kang, Z., & Guo, J. (2019). Host- induced gene silencing: A powerful strategy to control diseases of wheat and barley. *International Journal of Molecular Science*, 1-15.
- Qi, Y. L. (2023). Wheat leaf rust fungus effector Pt13024 is avirulent to TcLr30. *Frontier Plant Science* .
- Ramirez-Zavaleta, C. Y., Gorcia-Barrera, L. J., Rodriguez-Verastequi, L. L., Arrieta-Flores, D., & Gregoria-Jorge, J. (2022). An overview of PRR- and NLR-mediated immunities: conserved signaling components across the plant kingdom that communicate Both pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12974), 1-26.
- Roelfs, A. P., McCallum, B., McVey, D. V., & Groth, J. V. (1997). Comparison of virulence and isozyme phenotypes of Pgt-QCCJ and great plains races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. 87, s. 910–914.
- Roelfs, A. P., Singh, R. P., & Saari, E. E. (1992). *Rust diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Roelfs, M. A., Singh, R. P., & Saari, E. E. (1989). *Rust diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172), 1-17.
- Rössner, C., Lotz, D., & Becker, A. (2022). VIGS goes viral: how VIGS transforms our understanding of plant science. *Annual Review of Plant Biology*(73), 703-728.
- Sang, H. K. (2020). Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by HIGS and SIGS. *Plant Biotechnology Reports*, 14(1), 1-8.
- Selin, C., Kievit, T. R., Belmonte, M. F., & Fernando, D. (2016). Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. *Frontiers in Microbiology*.

- Slotkin, Y.-H. H., & Keith, R. (2021). The initiation of RNA interference (RNAi) in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 61, 1-9.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J., & Hamer, J. E. (1993). Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 1575–1590.
- Tuo Qi, X. Z. (2017). Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor PsCPK1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant Biotechnology Journal* (s. 797-807). içinde
- V., K. E., & Y., G. M. (2003). Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics. *Springer*, 1-10.
- van Opijnen, T. &. (2013). Transposon insertion sequencing: A new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 435–442.
- Vanessa Chow, M. W. (2022). Lend Me Your EARs: A Systematic Review of the Broad Functions of EAR Motif-Containing Transcriptional Repressores in Plants . *genes*.
- Voinnet, N. G. (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Plant Biology*, 65, 473-503.
- Watt, A., S. S., Watts, A., & Raipuria, R. K. (2021). Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and Tools. *Meta Gene* 29.
- Watt, A., Sankaranarayana, S., Watts, A., & R.K., R. (2021). Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. *Meta Gene*, 29, 1-12.
- Wei, J., Qi, L., Zhang, Z., Chang, Z., Shen, D., Zhang, X., . . . Yang, X. (2022). Wheat leaf rust fungus effector Pt13024 is avirulent to TcLr30. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-12.
- Wei, Z. W. (2022). Wheat leaf rust fungus effector Pt13024 is avirulent to TcLr30. *Frontiers in Plant Science*.

- Wilhelm, B. T., & Landry, J. R. (2009). RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63.
- Winnenburg, R., Baldwin, T. K., Urban, M., Rawlings, C., Koehler, J., & Hammond-Kosack, K. E. (2006). The Pathogen-Host Interactions Database (PHI-base) Provides Insights into Generic and Novel Themes of Pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1295-1469.
- Winnenburg, R., Baldwin, T. K., Urban, M., Rawlings, C., Kohler, J., & Hammond-Kosack, K. E. (2006). PHI-base: A new database for pathogen host interactions. *Nucl. Acids Res*, 34, 459 – 464.
- Xia, Y., Fei, B., He, J., Qiu, M., Ma, Z., Lin, Y., & Zhang, X. (2017). Transcriptome analysis reveals the host selection fitness mechanisms of the *Rhizoctonia solani* AG11A pathogen. *Scientific Reports*, 7, 10120.
- Xiaolei Wen, H. L. (2025). The *Puccinia triticina* effector Pt3372 suppresses wheat innate immunity by targeting wheat TaERP3 in TcLr2a and TaLr18. *Phytopathology Research*, 1-15.
- Y.J. Zhang, H. G. (2021). Functional analysis of wheat NAC transcription factor TaNAC069, in regulation resistance of wheat to leaf rust fungus. *Frontiers in Plant Science*.
- Yin, C., Jurgenson, J. E., & Hulbert, S. H. (2011). Development of a host induced RNAi system in the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Molecular Plant Microbe Interactions*(24), 554-561.
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, S. S., . . . S., C. N. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 182-207.
- Zhang, X., Dodds, P. N., & Bernoux, M. (2017). What do we know about NOD-like receptors in plant immunity? *Annual Review of Phytopathology*(55), 205-229.

- Zhang, X., Wang, Z., Jiang, C., & Xu, J. (2021). Regulations of biotic interactions and responses to abiotic stresses by MAP kinase pathways in plant pathogenic fungi. *Stress Biology*.
- Zhang, Y., Yang, W., & Liu, D. (2022). Wheat leaf rust fungus effector protein Pt1641 is avirulent to TcLr1. *Frontiers in Plant Science*, 13, 2255.
- Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T. L., Thomas, B. J., Skamnioti, P., & Gurr, S. J. (2005). Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionally. *Molecular Plant Pathology*, 561-575.
- Zheng, P. M. (2023). Stripe rust effectors Pst21674 compromises wheat resistance by targeting transcription factor TaASR3. *Plant Physiology*(193), 2806-2824.
- Zhou, Y., & Chen, W. N. (2011). iTRAQ-Coupled 2-D LC-MS/MS analysis of membrane protein profile in *Escherichia coli* incubated with *Apidaecn* IB. *pLoS One*, 6, 1-8.
- Zhu, L. (2021). Targeted Gene Knockouts by Protoplast Transformation in the Moss *Physcomitrella patens*.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokul ve ortaöğretimini Edirne'nin Merkez ilçesinde tamamladı. Lise eğitimini Edirne Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesinde 2018 yılında tamamladı. 2019 yılında Trakya Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde eğitime başladı. 2023 yılında mezun olarak aynı yıl Trakya Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.