

ÖZET

Y. Lisans Tezi

ARABIDOPSIS THALIANA (FARE KULAĞI TERESİ)’DA KONUKÇU DIŞI DAYANIKLILIK LOKUSLARININ ERKEN YANIKLIK (ALTERNARIA SOLANI) HASTALIK ETMENİN KONTROLÜ İÇİN ARAŞTIRILMASI (*)

Çiğdem YAZAR

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Günümüzde ticari olarak üretimi yapılan tüm domates çeşitleri *Alternaria solani* hastalık etmenine karşı hassastır. Dünyada ve Türkiye’de domateste minimum %10 ürün kaybına neden olmaktadır. Gerek klasik gerekse biyoteknolojik yöntemlerle dayanıklı çeşitler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Fakat hastalık etmenin kompleks yapısından dolayı istenen dayanıklı domates çeşitleri ortaya çıkarılamamıştır. Erken yanıklık hastalığının kontrolü için konukçu dışı dayanıklılık alternatif bir çözüm olmuştur. Söz konusu bu dayanıklılığı ortaya çıkarabilmek için, *Solanaceae* familyasındaki bitkilerde hastalık oluşturan *Alternaria solani*’nin, konukçusu olmayan *Brassicaceae* familyasından bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*’yı çalışmalarımızda kullanmak üzere seçilmiştir. *Arabidopsis thaliana*’nın bir model bitki olarak bu çalışmada seçilme nedeni, genetik çalışmalarda kolaylık sağlaması ve çok sayıda mutantının bulunmasıdır. Çalışmada *A.solani*’nin 3 (6, 5 ve 2) izolatına karşı *A. thaliana*’nın 2 ekotip (Col-0, Ler,) ve 2 mutantı (*pad4-2*, *npr1*) kullanılmıştır. Hastalık etmenine karşı konukçu dışı dayanıklılık mikroskop ve moleküler çalışmalarla ortaya konulmuştur. Çalışmada *A. solani* sporlarının çimlenme sayısı ve penetre olabilme yetenekleri incelenmiştir. Çalışmada *A. thaliana* mutantlarının hastalığa daha hassas olduğu görülmüştür. Moleküler analizler *A. thaliana* ekotipleri ve mutantları arasındaki polimorfik farklılığı ortaya koymuştur. Dayanıklılık lokuslarının veya onların sinyal yolu üzerinde yapılan mutasyonlar *A. thaliana* bitkisini hastalık etmenine daha hassas hale getirmiştir. Moleküler uygulamalarda, *A.solani* ile inokule edilen *A.thaliana* ekotiplerinin ve mutantlarının dayanıklılığı sağlamasındaki farklılıkları incelenmiştir.

2008 , 38 sayfa

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, *Alternaria solani*, konukçu dışı dayanıklılık

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* (MOUSE-EAR CRESS)'S NON HOST RESISTANT LOCI TO EARLY BLIGHT DISEASE CAUSED BY *ALTERNARIA SOLANI*

Çiğdem YAZAR

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Today all economic tomato cultivars are susceptible to *Alternaria solani*. The fungal agent caused at least %10 crop loss in Turkey and Worldwide. Resistance tomato cultivars have been attempting to produce by classical breeding and biotechnological technics. However, either complex structure of fungal disease or lack of resistance sources, any resistant tomato cultivar has not been investigated yet. Hence, non host resistance has been thought as an alternative resistance source to be able to early blight disease. To investigate non host resistance, *Alternaria solani* that causes disease on *Solanacea* plant was inoculated non host *A. thaliana* plant that is a member of *Brassicaceae* family. The *A. thaliana* is a model plant, easy to apply genetic applications and has many mutants to use our purposes. In our study, there isolates of *A. solani* was inoculated on to 2 ecotypes and 2 mutants of *Arabidopsis thaliana*. The germination and penetration rates of of *A. solani* spores were investigated. The *Arabidopsis thaliana* mutants were more susceptible than ecotypes. Molecular analysis revealed that there were polymorphic differences between *A. thaliana* ecotypes and mutants. Mutation either on resistance loci or their signalling pathway cause more susceptibility to early blight disease.

2008, 39 pages

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *Alternaria solani*, non-host resistance.

1. GİRİŞ

Bir model bitki olan *Arabidopsis thaliana* lahanagiller (*Brassicaceae*) familyasındandır. *Arabidopsis thaliana* ekonomik yönden önemli bir bitki olmamasına rağmen, 40 yıldır fizyolojik, biyokimya ve genetik çalışmalarda model bitki olarak kullanılmaktadır. *Arabidopsis thaliana* yaşam döngüsü boyunca kolayca gelişerek özel iklimsel isteklerinin olmaması ve ayrıca az miktarda mineral isteği, çok sayıda tohum üretmesi, hücrelerindeki tekrarlanan DNA miktarının toplam DNA'ya olan azlığı, mutant bireylerinin varlığı ve bu organizmanın gen aktarım çalışmalarına uygunluğu gibi faktörler nedeniyle moleküler çalışmalar için model bitki olarak seçilmiştir (Anonim,1998). Ayrıca *Arabidopsis thaliana* bitkisinin belirtilen birçok özellik yanında genetik transformasyonu amaçlı çalışmalara uygunluğu, DNA polimorfizminin yüksek olması gibi başka birçok özellikler bakımından gen izolasyonunda ve diğer genom çalışmalarında kullanılması açısından mükemmel bir bitki olup laboratuvarında çalışmak için çok caziptir (Dangl ve Jonathan.,2001). Bitkilere örnek oluşturan *Arabidopsis*'in genom dizi analizi 2000 yılının sonlarında tamamlanmıştır. *Arabidopsis thaliana* dünya üzerinde genom sekansı tamamlanan ilk bitkidir. Gelecek on yıldaki hedef bu bitkideki 25 bin genin her birinin fonksiyonunun ne olduğunun moleküler düzeyde anlaşılmasıdır. *Arabidopsis thaliana* küçük genom (130 Mbp) yapısına sahip bir bitkidir. Mısır yaklaşık olarak 2400 Mbp olup *Arabidopsis* genomlarından 19 defa büyüktür. Yine buğday genomları ise yaklaşık olarak 16000 Mbp olup *Arabidopsis* genomlarından 123 defa büyüktür. İnsan genomları ise *Arabidopsis* genomlarından 5 defa büyüktür (Anonim, 2007).

Arabidopsis thaliana hem genetik hem de moleküler analizler için uygun olup bitki patojen interaksyonunun incelenmesi açısından 150 den fazla yabancı izolatı bulunması ve bu yabancı izolatlarının fenotipik analizleri için uygun bir model bitki olarak bilinmektedir. Hızlı generasyon zamanı ve küçük genom yapısı gibi özellikler yanında bitkinin boyunun küçük olması ve genlerin kolayca teşhis edilebilmesi açısından genetik haritaların kullanımında kolaylık sağlar.

Dayanıklılık genlerinin veya onun komponentinin oluşturduğu ürünlerin inaktive edilmesiyle oluşturulan mutantlar genellikle hastalık etmenlerine karşı daha hassas olmaktadır. Doğal ekotiplerde ise bu genler aktif olup konukçusu olmayan patojenle inokule edildiğinde bu genler veya onların ürünleri aktif olduğu için hastalık görülmemektedir. Fakat mutant bitkilerde bu ürünler bulunmadığından fenotipik ve genotipik olarak farklar ortaya çıkmaktadır. *Arabidopsis* ekotiplerinden klonlanan dayanıklılık genleri veya onların kontrol ettiği mekanizmalar üzerinde mutasyonlar oluşturulmuş ve dayanıklılık mekanizmasını etkileyen genler ortaya konulmuştur (Parker ., 1996; Falk ve ark., 1999; Parker ve ark., 2000).

Doğadan toplanan *Arabidopsis* ekotipleri ile bu ekotiplerin sahip olduğu gen veya genlerin kontrolü altında olan kimyasal reaksiyonlar üzerinde mutasyonlar oluşturulmuştur. Bu mutant bitkiler ile orijinal ekotiplerdeki yapılar moleküler ve mikroskopik olarak incelendiğinde *A. thaliana* bitkisinde konukçusu olmayan *A. solani*'ye karşı nasıl bir savunma mekanizması ortaya koyduğu anlaşılabılır.

Dünyada toplam domates üretimi 2005 yılında 124.748.292 ton (t) olup, Türkiye 9.700.000 t domates üretimi ile dünya domates üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2005). Dünyada ve Türkiye’de domateste minimum %10 ürün kaybına neden olan hastalık etmeni *Alternaria solani*, *Solanacea* familyasındaki bitkileri hastalandıran fakültatif saprofitik bir fungustur. Hastalık etmeni fungus yapraklarda düzensiz kahverengi-siyah lekeler olarak başlar, ilerleyen dönemlerde yaprak ve gövdelerde çökük şeklinde kahverengi ölü dokular ve bunların çevresinde hastalık etmeninin toksinlerinin oluşturduğu sarı bölgeler şeklinde görülür (Agrios, 1988). Bitki yapraklarında iç içe geçmiş nekrotik alanların yanıklığa benzer görünüm almasından dolayı hastalığa erken yanıklılık denilmektedir. Bu nekrotik alanlar bitkilerin deforme olarak ürün miktarının düşmesine, meyve kalitesinin yok olmasına neden olmaktadır (Agrios, 1988, Zhang ve ark., 2003). Hastalıktan dolayı büyük oranlarda ürün kayıpları oluşmaktadır. Ölü bitki dokularını kullanan (netrotrofik) fungal hastalık etmeni *Alternaria solani* başta domates ve patates gibi solanaceae familyası bitkileri olmak üzere sebzeleri (fasulye), süs bitkilerini (karanfil) ve meyve türlerini (elma, portakal) hastalandırmaktadır (Agrios, 1988).

Günümüzde üretimi yapılan tüm domates çeşitleri *Alternaria solani* hastalık etmenine karşı hassas olup, hastalık etmeni kültürel önlemler, uzun süreli ekim nöbetleri ve rutin fungusit uygulamalar ile kontrol altında tutulmaktadır (Fooland ve ark., 2002). Gerek klasik gerekse biyoteknolojik yöntemlerle erken yanıklığa karşı dayanıklı çeşitler geliştirmeye çalışılmakta, fakat hastalık etmeninin kompleks yapısı ve dayanıklı bitkilerdeki karmaşık genetik yapıdan dolayı istenen dayanıklı domates çeşitleri ortaya çıkarılamamıştır (Zhang ve ark., 2003). Kültür ve yabani çeşitlerinde dayanıklılığın poligenik bir yapıda olduğunu, erken yanıklık hastalığını kontrol altına alabilen monogenik bir dayanıklılığın kültür domateslerinde veya onun akrabası türlerde henüz bulunamadığı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Anonim, 2003, Zhang ve ark., 2003). Erken yanıklık hastalığının kontrolü için konukçu dışı dayanıklılık alternatif bir çözüm olup, hastalığı tamamen kontrol altına alabilecek monogenik geni ortaya çıkarabilmek için *Alternaria solani*'nin konukçusu olmayan (non-host) *Arabidopsis thaliana* çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Konukçu dışı dayanıklılık ile gen-için-gen dayanıklılığı arasında güçlü bir benzerlik vardır. Bitkilerde hastalık oluşturan organizmalar gen-için-gen teorisine göre konukçada bulunan dayanıklılık genleri tarafından tanımlanarak bu organizmaya ya da organizmanın ırkına özel dayanıklılık oluştururlar. Fakat daha az anlaşılan konukçu dışı dayanıklılıkta bütün bitkilerin tüm patojen türlerine dayanıklı olduğu görülmektedir. Konukçu dışı dayanıklılık kompleks, çok sayıda dayanıklılık faktörünün bir arada bulunduğu patojene karşı oluşturulmuş savunma sistemidir. Bir başka deyişle konukçu dışı dayanıklılık hastalık oluşturan patojenlerin konukçu bitkilerinde gelişip, çoğaldığı yetiştirme habitatına zayıf adaptasyonu olarak tanımlanabilir (Zimmerli ve ark., 2004).

Doğal olarak bitkilerde var olan savunma mekanizmalarını anlamamanın en iyi yolu dayanıklılığı kontrol eden gen veya onların ürünlerini mutasyona uğratarak elde edilen mutantlardaki değişiklikleri moleküler, biyokimyasal ve mikroskopik düzeyde incelemektir (Zimmerli ve ark., 2004). Bu amaçla *Arabidopsis thaliana* bitkisinin sahip olduğu genler ve ya onların izlediği sinyal yolu üzerinde çok sayıda mutant oluşturulmuştur (Parker ve ark., 2000). Bu mutantlar ve bozulmamış halde bulunan doğal ekotipler incelenerek genler üzerinde yapılan spesifik mutasyonların konukçu dışı

dayanıklılığı nasıl oluşturduğu incelenabilir. Erken yanıklık (*Alternaria solani*) fungal etmeninin konukçusu olmayan *Arabidopsis thaliana* bitkisindeki dayanıklılığın nedenleri ve bu dayanıklılığı kontrol eden dayanıklılık genleri ortaya konulabilir.

Geniş konukçu listesine sahip olan, ekonomik olarak her yıl büyük kayıplara neden olan, erken yanıklık hastalık etmenine karşı kültür ve yabancı patlıcangillerde bulunmayan alternatif dayanıklılık genleri, konukçu dışı dayanıklılık mekanizmalarının incelenmesiyle ortaya konulabilir. *Alternaria solani* hastalık etmenine karşı bugüne kadar bilinen dayanıklılık gen kaynaklarına ilave olarak model bitki *Arabidopsis thaliana*'da bulunan, konukçu dışı dayanıklılığı oluşturan genleri ortaya koymak bu projenin amacını oluşturmaktadır. Bu amaçla *Arabidopsis thaliana* ekotipleri ile farklı *A. thaliana* mutantları çalışmada kullanılmıştır. Bu bitkiler üzerinde patojenisite testleri, genetik testler ve mikroskopik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Tahıllarda özellikle de arpada önemli ürün kayıplarına neden olan *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) konukçusu olmayan *Arabidopsis thaliana* üzerine inokule edildiğinde hastalık etmeni fungusun büyük çoğunluğu haustorium oluşturmamakta ve fungus penetre olamamaktadır. Fakat buradaki sporların sadece %5 oranında haustorium oluşturduğu ve halen konukçu üzerinde bulunan külleme sporlarının fonksiyonel olduğu anlaşılmaktadır. Külleme hastalık etmeni fungus hiçbir zaman konukçusu olmayan *Arabidopsis thaliana* üzerinde eşeyli ya da eşeysiz spor oluşturmamaktadır. Konukçunun hastalık etmenine karşı savunma mekanizmaları araştırıldığında *Arabidopsis thaliana* ile *Bgh* arasında gen-için gen ilişkisine benzer bir etkileşimin olduğu ortaya konmuştur. Bu ilişkide konukçunun hücre duvarını güçlendiren kalloz (callose) miktarında bir farklılık bulunmuştur. Bu amaçla *Arabidopsis thaliana* üzerinde mutasyon oluşturulmuş (*Pen1* ve *Pen2*), lahananın yakın akrabası olan bu bitkide külleme etmenine karşı dayanıklılıktan sorumlu olan *PEN1* ve *PEN2* genleri ortaya çıkarılmıştır (Freialdenhoven ve ark. atfen Thordal ve Christensen, 2003).

Buğdayda toprak kökenli hastalık etmeni olan *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* hastalık etmeni fungus yulaf bitkilerinin köklerini hastalandırmamaktadır. Fakat yulaflarda hastalık oluşturan bir diğer fungal etmen *G. graminis* var. *avenae* yulaf köklerini hastalandırmaktadır. Hastalık etmeni *G. graminis* var. *avenae* içermiş olduğu avenacin A-1 enzimi ile antimikrobiyal saponin maddesini detoksifiye ederek yulaflar üzerinde hastalık yapmaktadır. Mutasyonla oluşturulan avenacin A-1 içermeyen mutant yulaf bitki kökleri üzerinde *G. graminis* var. *tritici* gelişmekte ve bu mutantlar hastalık etmenine hassaslık göstermektedir. Burada *G. graminis* var. *tritici* yulafın konukçu dışı patojeni olup, yulafta bulunan avenacin maddesini detoksifiye eden enzimi içeren mutant yulaf bitkilerinde gelişebilmektedir (Papadopoulou ve ark. atfen Thordal ve Christensen, 2003).

Arabidopsis thaliana'da konukçu dışı dayanıklılık geni *NHO1* bulunmuş ve klonlanmıştır. Kimyasal mutasyon sonucunda ortaya konan *NHO1* geni içermeyen mutant *A. thaliana* bitkileri *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas*

syringae pv. *tabaci* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerine karşı hassaslık göstermektedirler. Bu durum bitkilerin sahip oldukları tüm dayanıklılık sistemlerini potansiyel hastalık etmenlerine karşı topyekün kullandıklarını göstermektedir. Genel olarak bitkilerin sahip oldukları bu kitlesel patojen imha silahları potansiyel patojenlere karşı spesifik olmayan bir yapıda aktif hale geçirilerek, hastalık etmeninin gelişmesini sınırlamaktadır. Bitkilerde hastalığın oluşabilmesi için mikroorganizmanın tüm bitki savunma mekanizmalarını aşıp, bitkinin savunma mekanizmalarını inaktive etmesi gerekmektedir (Lu ve ark., 2001).

Konukçu dışı patojen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ile inokule edilen *A. thaliana* bitkisinde bakteriyel etmenin kontrolünde rol alan 8000 genin fonksiyonları incelenmiştir. Hastalık etmenlerine karşı bitkilerin içermiş olduğu tüm savunma mekanizmaları ve bu mekanizmalardaki genlerin görevleri hem gen-için-gen hem de konukçu dışı dayanıklılık için ortaya konmuştur (Tao ve ark. atfen Thordal ve Christensen, 2003).

Arabidopsis thaliana ekotipleri dayanıklılık genlerini orijinal olarak bulundurmaktadırlar. Fakat mutant bitkilerde farklı dayanıklılık genleri veya onların izledikleri dayanıklılık mekanizmasının bir parçası olan genler kimyasal ve X-ray ışınlarıyla mutasyona uğratılmıştır. Mutant bitkiler ve mutasyona uğratılan genler günümüzde klonlanarak karakterize edilmiştir (Jirage ve ark.,1999). *Arabidopsis thaliana* Col-0 ekotipi *RPS2* (*Resistance to Pseudomonas syringae*2), *RPS5*(*Resistance to Pseudomonas syringae* 5) ve *RPM1*(*Resistance to Pseudomonas maculicola*) genlerini içermektedir. Bu Col-0 ekotipinin etilmethonasülfanat (EMS) ile mutasyona uğratılmasıyla elde edilen *ndr1*(non race specific disease resistance) mutantı tüm *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas maculicola* bakterilerine karşı hassaslık göstermektedir. Elde edilen *ndr1* mutantı *RPS2*, *RPS5* ve *RPM1* genlerini inaktive edilmektedir. Dolayısıyla *NDR1* geni *RPS2*, *RPS5* ve *RPM1* genlerinin çalışabilmesi için gerekli olan bir gendir ve bu genlerle birlikte *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 bakterisine karşı dayanıklılığı sağlamaktadır (Century ve ark., 1995).

Eds1(Enhanced disease susceptibility) mutantı Ler ekotipinin EMS ile mutasyona uğratılmasıyla elde edilmiştir. Ler ekotipi *Perenospora parastica*'ya dayanıklı iken *eds1* mutantı aynı fungal hastalık etmenine artırılmış bir şekilde son derece hassaslık göstermektedir. EDS1 geni 623 aminoasitten oluşan sitoplazmik lipaz benzeri protein kodlar iken Ler ekopinde bulunan bu gen *eds1*'de mutasyona uğratılarak işlevselliğini yitirmiştir (Parker ve ark., 1996; Falk ve ark., 1999; Parker ve ark., 2000).

A. thaliana ekotipleri üzerinde oluşturulan mutasyonlarla fitoaleksinin içermeyen mutant *pad4* (phytoalexindeficient4) bitkiler bulunmuştur. Bu mutant bitkiler *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, *Perenospora parastica* ve *Erysiphe orontii* gibi hastalık etmenlerine son derece hassastır. *PAD4* geni lipaz benzeri bir genle birlikte *EDS1* genin yapısal özelliğine benzeyen bir gen kodlamakta ve birlikte dayanıklılık mekanizmasında fonksiyonel görev almaktadırlar (Feys ve ark., 2001; Jirage ve ark., 1999).

Bir diğer süper hassas mutant olan *eds5-1* (enhanced disease susceptibility 5-1) EMS ile elde edilmiştir. *eds5-1* mutant *Peranospora parastica* fungal ve *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 bakteriyel izolatlarına karşı son derece hassas bir bitkidir. *EDS5* geni salisilik asidin oluşturduğu dayanıklılık mekanizmasının üzerinde yer almaktadır ve salisilik asidin sağladığı farklı patojen grupları içinde bu gen dayanıklılığın oluşmasına yardımcı olmaktadır (Nawrath ve Metraux, 1999; Volko ve ark., 1998). Örneğin küllemelere karşı dayanıklılığı sağlayan *RPW8* geni *EDS5-1* genine ve Salisilik aside ihtiyaç duymaktadır (Xiao ve ark., 2001).

Salisilik asit, genellikle biyotrof patojenlerin ürettiği ve hastalıklara karşı dayanıklılık genlerinin aktive ettiği hastalıklı dokular ile sağlıklı dokular arasında koordinasyonu sağlayarak sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) oluşmasını sağlamaktadır. *nahG* transgenik bitkilerinde, salisilik asit kendisi ile yapısal olarak aynı olan fakat moleküler olarak fonksiyonel olmayan catechol'e dönüştürülmüştür. Bu bitkilerdeki *nahG* geni catechol'e dönüşümü sağlayan flavoprotein salisilatın dekarboksilasyon ve hidroksilasyonla katelizlenmesini sağlamakta ve *Pseudomonas putita* bakterisinden *nahG* bitkilerine aktarılmıştır (Gaffney ve ark.,1993; Parker et al., 2000). Sistemik kazanılmış dayanıklılık bitkilerde genel bir dayanıklılıktır. Bu SAR içerisinde

patojenisite ile ilgili bitkinin ürettiği patojen ile ilgili (pathogenesis related = PR) genleri bulunmaktadır. Bitkinin patojenin yerleşmesini önleyici bu proteinlere PR proteinleri denilmektedir ve pek çoğu enzimatik aktiviteye sahiptir, örnek olarak kitinaz 5 proteini fungusların yapısında bulunan kitin maddesini parçalamakta ve fungusun yapısını bozmaktadır. SAR mekanizması avirulent bir patojenin lokal olarak bitki hücrelerinde hipersensitif (HR) reaksiyon oluşturmamasından sonra bu dayanıklılığın salisilik asit ile tüm bitkiye yayılmasıdır (Cao ve ark., 1994).

Arabidopsis EDS1 ve *PAD4* genleri lipaz genleri gibi kodlanır, dayanıklılık genleri fonksiyonel olan R proteinlerini kodlar ve bu proteinler, temel bitki dayanıklılığını sağlar. *Eds1* ve *pad4* mutantlarının fenotipik analizleri göstermiştir ki, *EDS1* ve *PAD4* genleri R genleriyle birlikte dayanıklılığı sağlayan yardımcı genlerdir. Bu genlerin mutasyona uğratılmasıyla dayanıklılık mekanizması çalışmaz. *EDS1* bitkileri, HR için gereklidir, ayrıca *EDS1* ve *PAD4* genlerinin her ikisi birden SA birikiminde gereklidir. Bu iki gen analizi bize gösterir ki; *EDS1* geni *PAD4* geni ile interaksiyon halinde bulunabilir ve patojen bitki hücrelerini uyarır. Uyarılmış bitki hücrelerinde oluşan dayanıklılık SA ile tüm bitkinin diğer hücrelerine yayılır (Feys ve ark., 2001).

Son zamanlarda *Arabidopsis thaliana* 'da klonlanan *NPR1* geni bitkide kazanılmış dayanıklılığın regülatörüdür. Sistemik kazanılmış dayanıklılıkta genin miktarı artarken e PR genlerinin oluşumunu tetikleyen bir operatör genidir. *NPR1* (non-expressor of PR genes) geni patojene karşı PR proteinlerinin yeniden aktivasyonunu sağlayan bir genidir. Yapılan çalışmalarda (non-expressor of PR genes) geni patojene karşı PR proteinlerinin yeniden aktivasyonunu sağlayan bir genidir. Yapılan çalışmalarda *NPR1* geninin *Pseudomonas syringae* ve *Peronospora parasitica*'ya karşı dayanıklılığın sağlanmasında görev aldığı ortaya koymuştur. *NPR1* geni dayanıklılığı artırırken bitkide hiçbir farklı görünüm vermemektedir. Böylece genetik mühendisliğinde bitkilerde spesifik olmayan dayanıklılık geni bulunmuş ve ilk defa tek bir yardımcı genin miktarının artırılmasıyla dayanıklılığın sağlanabileceği hedef olarak gösterilmiştir (Cao ve ark., 1998).

Arabidopsis'de patojene karşı oluşturulan SAR, SA birikmesiyle ve PR genlerinden PR1, PR2 ve PR5 miktarının artmasıyla ortaya çıkar. Yapılan çalışmalarda SA biyosentezinin iki allel olmayan mutant üzerinde oluşmadığı ortaya konmuştur. Elde edilen sid (SA induction-deficient) mutantları, patojen inokulasyonundan sonra SA biriktirmezler ve *Pseudomonas syringae* ve *Peronospora parasitica*'nın virulent ve avirulent formlarına duyarlıdırlar. Bununla birlikte bu mutanlar SA'yi katekole indirgeyen SA hidroksilazlarıyla kodlanmış *nahG* genine sahip transgenik bitkiler kadar duyarlı değildir. *NahG* bitkilerindeki durumun tam tersine *sid* mutantları PR1 proteinini oluşturmamakta ve diğer PR2 ve PR5 proteinleri ancak patojen saldırısından sonra üretilmektedir. Bu sonuçlar SA'den bağımsız çalışan sid mutantlarının dayanıklılık yolunun *nahG* genini içeren bitkilerin yolunda bulunduğunu ve *nahG* geninden bağımsız olarak görev yaptığını göstermiştir. Mutantlardan biri eds5 ile allel iken diğer mutant ise henüz tanımlanamamıştır (Nawrath ve ark., 1999).

Arabidopsis ve biyotrofik oomycete *Peronospora parasitica* arasındaki ilişki uygun konukçu patojen sistemi sunmaktadır. Bu sistem içerisinde konukçunun hastalık etmenin özel genotiplerine karşı kazanmış olduğu moleküler bileşenleri tanımlamaktadır. Ws-0 üzerinde mutasyon sonucunda oluşturulan ve RPP (Resistance to *Peronospora parastica*) genleri olarak adlandırılan genlerin veya onların sinyal yolu üzerinde mutasyonlar oluşturulmuştur. *EDS1* (*enhanced disease susceptibility*) bulunarak, kromozom 3 ve kromozom 4 üzerinde bulunan RPP genlerini kazandırdığı ortaya konmuştur. Fenotipik olarak Ws-eds1 mutant bitkileri üzerine inokule edilen *Peronospora parasitica* izolatları yüksek sporlanma gösterirler. *Peronospora parasitica* izolatlarının her biri WS-0 yabani tipinde sporlanacak yeteneğe sahip değildir. Ws-eds1 tohumları *Peronospora parasitica* izolatlarına karşı yabani bir tip olan Col ve Ws ekotipinin eds1 mutantın karşılaştırıldığı zaman daha çok hassaslık göstermektedirler. Fakat Ws-eds1 kotiledonları ve *Brassica oleracea* 'de *Peronospora parasitica*'nın 5 no'lu izolatına karşı düşük sporlanma gösterir. Bu izolatlar Ws-0 'in yabani tipinde içeren *Arabidopsis*'in 100 den fazla ekotipinde sporlanma gösteremezler. *B.oleracea* 'den izole edilen *Albugo candida* Ws-eds1 mutantı üzerinde sporlarının geliştiği fakat diğer konukçulardan izole edilen birkaç oomycete fungusları inokule edildiği zaman mutantların fenotiplerinde hiçbir değişme olmamıştır. RPM1 bakteriyel dayanıklılık

genine sahip olan Ws- eds1 bitkilerine avrB geni içeren *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* bakterileri inokule edildiğinde Ws-eds1 bitkilerinde herhangi bir fungus gelişimi görülmemiştir. Kimyasal olarak kazanılmış sistemik dayanıklılığı sağlayan 2,6-dichloroisonicotinic asit ile Ws-eds1 tohumları muamele edilmişler, Ws-0- uyumlu olan Emwal ve Ws-0-uyumsuz olan Noco2 *Peronospora parasitica* izolatlarına karşı bitkiler dayanıklılık kazanmaya başlamıştır. Özet olarak *Arabidopsis*'de *EDS1* geni pek çok RPP tarafından dayanıklılığı sağlamak için gereklidir ve dayanıklılık yolunun üst kısmında fonksiyonunu göstermektedir (Parker ve ark.,1996).

Bir diğer çalışmada patojen saldırılarını sınırlayan bitkilerdeki savunma mekanizmalarını keşfetmek için, virulent bakteri patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 ile inokule edilmiş EMS *A. thaliana* mutant bitkileri tarandı. Yapılan araştırmalar sonucunda 12 tane hassaslığı artırılmış mutant elde edilmiştir. Bu mutantlar klonlandığında fitoaleksinin sentezini etkileyen iki gen bulunmuştur. Bu mutantlara *pad2* ve *pad4* (*phytoalexin deficient*) mutantları denilmiş ve bu mutantların hastalık etmenine karşı herhangi bir fitoaleksinin oluşturmadıkları bulunmuştur (Nawrath ve Metraux, 1999; Volko ve ark., 1998).

Bir başka çalışmada birincil konukçusu olmayan *A. thaliana*'nın 360 ekotipi *Erysiphe cichoracearum* (UCSC1) ve *Erysiphe cruciferarum* (UEA1) külleme sporları ile inokulasyon gerçekleştirilmiştir. İnokule edilen *A. thaliana* ekotiplerin 84 tanesi UEA1 ve UCSC1 küllmelerine farklı derecelerde dayanıklılık gösterirken 213 tanesi ise her iki külleme türüne hassaslık göstermiştir. Farklı iki külleme türüne karşı dayanıklılığı sağlayan bir tane gen klonlanmıştır (Adam ve ark., 1999).

Çoğu ticari domates türü (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Amerika ve dünyanın tüm yerinde domatesin tahripkar hastalığı olan erken yanıklığa (*Alternaria solani*) hassastırlar. Halen, sanitasyon, uzun ürün rotasyonu ve rutin fungusit uygulamaları çok yaygın hastalık kontrol muameleleridir. Kültüre alınan domates türlerinde genetik dayanıklılık kaynağı bilinmese de, dayanıklılık kaynakları yabani türlerle teşhis edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, selektif genotip yaklaşımının kullanılmasıyla *L.hirsutum* Humb. ve Bonp1 yabani domates türlerinin (P1126445), erken yanıklık

dayanıklılığını veren QTL s yi değerlendirmek ve teşhis etmektir. P1126445 ve erken yanıklılığa hassas domatesten üretilen hat (NC84173; anaç ve yinelenen ebeveyn) arasındaki çaprazların tüm 820BC1 bitkileri serada yetiştirilmiştir. Son tohum verme aşaması boyunca bitkiler *A.solani* izolatlarıyla inokule edilmiştir ve daha sonra erken yanıklılık (*A.solani*) simptomları değerlendirilmiştir. En dayanıklı (% 9.1=75 bitki) ve en hassas bitki (%9.8=80 bitki) seçilmiştir ve daha sonra bitkiler erken yanıklılık hastalık etmeninin doğal enfeksiyonunun şiddetli olduğu araziye dikilmiştir. Bitkiler gelişmiştir ve son hastalık seviyesi değerlendirilmiştir. En yüksek dayanıklılığı gösteren 75 dayanıklı bitkiden 46 tanesi (tüm bitkilerin %5.6'sı) ve en yüksek hassasiyeti gösteren 80 hassas bitkiden 30 tanesi (tüm bitkilerin %3.7'si) seçilmiştir. Seçilmiş 76 bitki, 145 RFLP markörü ve 34 dayanıklı gen analogu (RGAs) için genotip edilmiştir. Ortalama 7.3 cM markör uzunluğuyla 12 kromozomunun yaklaşık 1298 cM'ne bağlanan genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Birkaç RGAs lokasyonu *A.solani*'nin QTLs lokasyonu ile çakışmıştır yada dayanıklılık geni (R geni) olarak bilinir ve bu RGAs'lerin hastalık dayanıklılığıyla ilişkili olduğu ileri sürülür. Dahası, çok sayıda R gen familyası için birkaç RGAs lokusunun kümeler halinde teşhis edilmesi benzerdir (Zhang ve ark., 2003).

A. alternata f.sp lycopersici fungal patojenine ve patojen tarafından üretilen konukçuya özelleşmiş toksinlere (AAL-toksinleri) karşı dayanıklılığı sağlayan *Alternaria* gövde kanser dayanıklılık lokusu (Asc-lokus), genetik olarak domates genomunda haritalanmıştır. Hassaslık ve dayanıklılık, yaprak biyotestlerinde AAL toksinlerine hassaslık için F2 populasyonunun ayrımıyla test edilmiştir. Hassas ve dayanıklı genotiplerde AAL toksin hassasiyeti farklı bitki hücre gelişimi seviyeleri boyunca konukçusu olmayan (non-host dayanıklılık) *Nicotiana tabaccum*'da AAL- toksin hassasiyeti ile karşılaştırılmıştır. Hassas ve dayanıklı domates genotiplerinde engelleyici etkileri, yaprakları hariç tüm seviyelerde görülmüştür. Ancak polen ve kök gelişimi boyunca hassas genotipler üzerindeki engelleyici etkileri, dayanıklı genotipler üzerinden daha büyüktür. Konukçu olmayan *Nicotiana tabaccum*'da AAL toksinlerin herhangi bir etkisi görülmemiştir. Görünüşte hücrel bir hedef bölge domateste mevcuttur fakat *Nicotiana tabaccum*'da yoktur. 1) konukçu hassasiyetine hassas, 2) konukçu hassasiyetine dayanıklı, 3) konukçusu olmayan hassasiyet halinde 3 tane AAL toksin

hassasiyet seviyesinin var olduğu ve domateste kontrol edilen dayanıklılık mekanizmasının *Nicotiana tabaccum*'dan kontrol edilenden farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Witsenboer ve ark., 1989).

Bitki savunma sistemindeki bazı elisitörler, hastalık oranının azalmasını sağlayan biyokimyasal değışikliklere neden olabilir, ancak, ot yiyen böcekler üzerinde neden olduğu tepkiler konusunda çok az bilgi bulunmaktadır. Domateste (*Lycopersicon esculentum*) birkaç abiyotik savunma sistemi elisitörleriyle, dış kaynaklı arazi uygulamaları yapılarak bu probleme yaklaşılmıştır. Pestisit yoğunluğunu azaltan ve otçul böcekler ve patojenlere karşı çapraz koruma sağlayan elisitörlerin (benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic asit (S)-methyl ester (BTH, Actigard); Probenazole; chitosan; salisilik asit; KeyPlex 350; KeyPlex DP2; ve KeyPlex DP3) özellikleri değerlendirilmiştir. Yalnızca BTH çapraz koruma sağlamıştır ve bakteriyel leke (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), erken yanıklık (*Alternaria solani*), yaprak küfü (*Fulvia fulva*), ve yaprak kemirgeni larva (*Liriomyza* spp.) yoğunluğunu önemli derecede azaltmıştır. Yaprak kemirgeni larva üzerindeki etkilerinin, bitki gelişiminin ilk aşaması boyunca daha çok olduğu söylenebilir. Beyaz sinek (*Bemisia argentifolii*) ve powdery mildiyö (*Oidium* sp.) yoğunluğunu azaltıcı eğilimi, aynı zamanda BTH uygulanan bitkiler üzerinde bulunmuştur. Diğer elisitörler böcek popülasyonu üzerinde etkiye sahip değildir fakat Probenazole ve KeyPlex 350 önemli ölçüde bakteriyel leke ve erken yanıklık hastalık oranını azaltmıştır (Inbar ve ark., 2004).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hastalık Etmeninin İzolasyonu

Erken yanıklık hastalık etmeni *Alternaria solani* 2004 sonbahar döneminde Tokat ile Turhal arasında sırik ve yer domatesi yetiştirilen tarlalardan toplanan bitki örnekleri laboratuvara getirilmiştir. Hastalıklı 25 örnek içerisinde 2, 5 ve 6 no'lu örneklerden hastalık etmeni izole edilmiştir. İzole edilen bu 2, 5 ve 6 no'lu ırkların kültürleri domates besi ortamında 20-25 günde düzenli olarak tazelenmiştir. Hazırlanan otoklav edilmiş domates besi ortamı steril kabinde içerisinde 9 cm çapındaki steril Petrilere ~20 ml olacak şekilde dökülmüştür. Hastalık etmeni *Alternaria solani*'n teşhisi, Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Yusuf YANAR tarafından yapılmıştır.

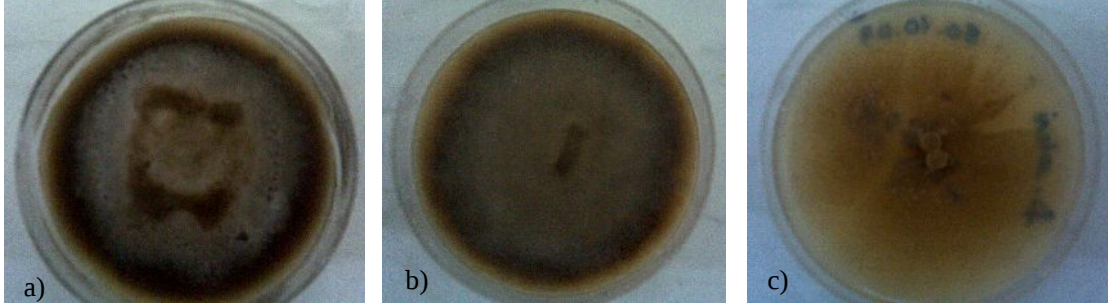
3.2. Domates Agarının Hazırlanışı

Ticari olarak üretilen (DİMES, Tokat) %100 domates suyundan 30 ml alınarak 270 ml çeşme suyu ilave edilerek 300 ml besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan domates suyunun pH'sı ölçülerek 5.5-6.0 olması için seyreltik HCl ilave edilmiştir. Bu domates ortamının katılaşması için %1.5 agar olacak şekilde 4.5 gr agar agarı (Lab M, İngiltere) ilave edilerek 121⁰C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklav edildikten sonra steril besi ortamı hazırlanmıştır.

3.3. Hastalık Etmeninin Agar Ortamında Yetiştirilmesi

Petrilere dökülen besi ortamları üzerine *Alternaria solani* hastalık etmeninin miselyumları 5 mm çapında en güçlü gelişimin olduğu yerden kesilerek tam ortasına ters olarak bırakılmıştır. İnokule edilen Petrilere oda sıcaklığında gelişmeye bırakılmıştır. Böylece hastalık etmeni saf olarak üretilip patojenisite testlerinde kullanılmıştır (Şeki I). Çalışma kapsamına alınan 2, 5 ve 6 no'lu *Alternaria solani* izolatları içerisinde 2 no'lu

izolatın daha çok sayıda spor oluşturmaları nedeniyle inokulasyon işleminde daha fazla kullanılmıştır.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan 3 farklı erken yanıklık hastalık etmeni *Alternaria solani*'n besiy ortamında gelişimi a) 6 no'lu, b) 5 no'lu, c) 2 no'lu *A.solani* izolatları

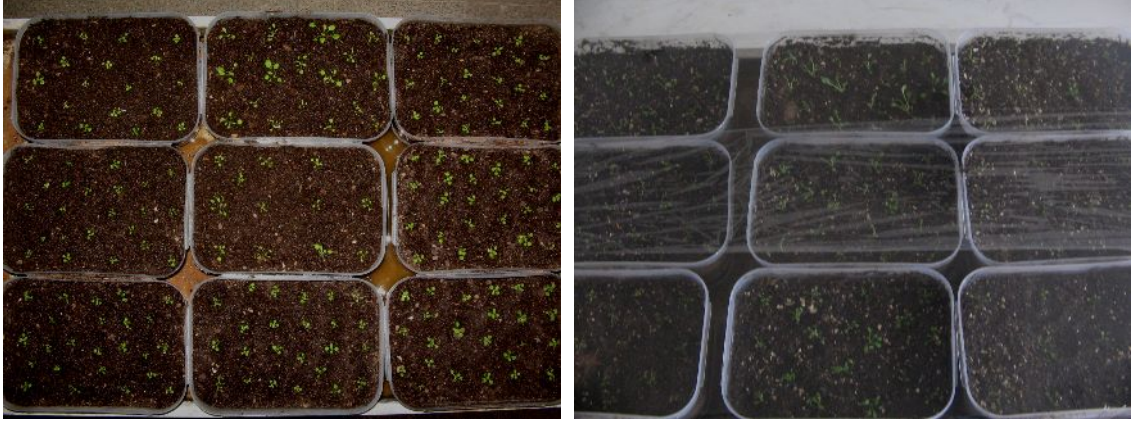
3.4. Bitkiler İçin Toprak Hazırlanması

Model bitki *Arabidopsis thaliana*'nın gelişebilmesi için, 2 hacim toprak, 2 hacim grit (küçük çakıl), 2 hacim torf ve 1 hacim vermikulit ile özel toprak karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan *Arabidopsis thaliana* toprağı ısıya dayanıklı fırın torbalarına konularak 121⁰C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir.

3.5. *Arabidopsis thaliana* Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Hazırlanan steril toprak karışımı saksılara konulduktan sonra çeşmeye takılan bir hortum vasıtasıyla saksılardaki toprak üzerine birkaç defa darbeler uygulayarak yüzeyin pürüzsüz bir halde olması sağlanmıştır. Otoklavdan çıkan toprak, nemini kaybettiği için bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Tohum ekimi sırasında herhangi bir bulaşmanın önlenmesi açısından bir arada bulunan ekime hazır saksılar tek tek tepside dışarı alınarak ekim yapılmıştır. Ependorf tüplerde bulunan *Arabidopsis thaliana* tohumlarından avucumuza bir miktar alınarak, toprak üzerinde homojenliğin sağlanması için saksının her yerine gelecek şekilde itina ile ekim yapılmıştır. Daha sonra bu saksılar bir tepsi içerisine konulmuş, sulaması alttan olacak şekilde, haftada üç defa su ilave edilerek saksılar sulanmıştır. Tohum ekilen saksıların üzeri ise ilk 48 saat nemi

muhafaza etmek için streç film ile kaplanmıştır. Tohum ekimi yapılan saksılar, homojen bir çimlenme için 24 saat soğuk hava deposunda (8-9°C) bekletildikten sonra, 22±5°C'deki iklimlendirme odasına yerleştirilmiştir. Tohumlar 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde kısa gün şartlarında %55-60 nispi nemde gelişmeye bırakılmıştır.



Şekil 2. Saksılara şaşırtılmış 2 gerçek yapraklı *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin görünümü

Çalışmada *Arabidopsis* ekotipleri yanında kimyasal ve X-ray ışınlarıyla farklı dayanıklılık genlerinin ya da onların sinyal yolları üzerinde yapılan mutasyonlarla geliştirilmiş hassas *Arabidopsis* mutant tohumları da hazırlanan toprak ortamına ekilmiştir. Ekotip bitkileri ve mutantlar aynı şartlarda gelişmeye bırakılmıştır

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları

Bitkinin Adı		Bitki Tipi
Bitkinin Orijini	Bitki Adının Kısaltması	
Colombia-0	Col-0	Ekotip
Landsberg	Ler	Ekotip
Phytoalexin deficient	<i>Pad4-2</i>	Mutant
Non expressor of pathogenesis-related genes1	<i>Npr1</i>	Mutant

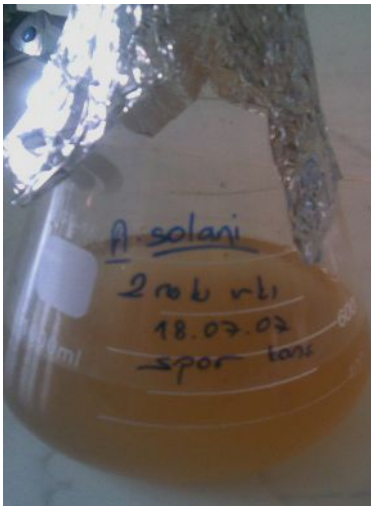
3.6. Hastalık İnokulasyonu

3.6.1. Spor İnokulasyonu

Besi ortamında yetiştirilen *Alternaria solani* izolatlarına distile su ilave edilerek sporlar toplanmıştır. Haemocytometer (Thoma lamı) ile sayımı yapılmıştır. Spor konsantrasyonu 2×10^6 spor ml^{-1} olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 3A). Hazırlanan spor konsantrasyonuna 5-6 damla Tween 20 ilave edildikten sonra yaprağın tamamı ıslanacak şekilde püskürtme yapılmıştır. Spor konsantrasyonu aynı gün iki defa tekrarlanmıştır.

3.6.2. Miselyum İnokulasyonu

Arabidopsis thaliana bitkilerine uygulanan bir diğer inokulasyon metodudur. Besi ortamında yetiştirilen *Alternaria solani* miselyumlarının güçlü olduğu uç kısımlarından cork-borer ile 5 mm çapında kesilerek miselyum diskleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu miselyum diskleri ters çevrilerek iğne ile delinmiş *Arabidopsis* yaprakları üzerine bırakılmıştır. Miselyum disklerinin kurumaması için bitkiler 7 gün boyunca torba ile kapatılarak nem muhafaza edilmiştir. Hastalığın gelişimi 7 gün sonra incelenmiştir.



(A)



(B)

Şekil 3. A: Spor inokulasyonu için hazırlanmış spor solüsyonu. B: *Arabidopsis thaliana* yaprakları üzerine bırakılmış miselyum diskleri

3.7. DNA İzolasyonu ve Genetik Varyasyonun Saptanması

Her bitkiden genç yapraklar alınarak ve buz torbaları ile ısı muhafazası sağlanarak laboratuvara getirilmiştir. Fermentas Kıt DNA İzolasyonu yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır.

1. 100-150 mg ağırlığında (4-5 cm uzunlukta) bir yaprak ependorf tüpde likit nitrojen içerisinde 1 ml mavi uç kullanılarak iyice öğütülür.
2. 100 µl 1xTE içinde vortekste karıştırılır.
3. 200 µl LYSIS çözeltisi eklenerek, flip şekilde karıştırılır.
4. 65°C su banyosunda 5-10 dakika tutularak arada iki defa flip şekilde karıştırılır,.
5. Derhal 600 µl kloroform (veya 24:1 kloroform:izoamil alkol) eklenerek, yaklaşık 10 kez yavaşça alt-üst ederek karıştırılır.
6. 10,000 RPM'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı yeni bir tüpe alınır.
7. 400 µl yeni hazırlanmış PRECIPITATION çözeltisi eklenir (her örnek için orijinal 10X çözeltiden 40 µl'ye 360 µl steril ddH₂O eklenerek hazırlanır).
8. 1-2 dakika alt-üst ederek karıştırılır.
9. 10,000 RPM'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra peleti tamamen kurutmadan sıvı uzaklaştırılır.
10. Pelet üzerine 2 µl RNase (10mg/ml) enzimi eklenir.
11. Pelet 100 µl 1.2 M NaCl çözeltisi içerisinde eritilir. Peleti eritmek için 65°C su banyosunda 20-30 dakika tutmak gerekebilir. Bu esnada her 5-10 dakikada bir flip şekilde karıştırılır.
12. 300 µl soğuk % 96 etanol eklenerek, birkaç kez alt üst ederek karıştırılır.
13. Buzdolabında -20 °C'de 10 dakika tutularak DNA çöktürülür. Sonra çıkarılarak oda sıcaklığında 1-2dakika bekletilmelidir.
14. 10,000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı dökülür.
15. % 70 soğuk etanol ile yavaşça yıkanır.
16. Pelet 100 µl steril ddH₂O veya 1xTE içinde çözülür.

3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla suni şartlarda DNA'nın bir parçasının üretilmesidir. Bitkilerden DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra Röder et al. (2002)'a göre PZR reaksiyonları yapılmıştır. Toplam 20 µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı;

- dH₂O 9.7 µl
- 10x Buffer 2.0 µl
- dNTP 2.0 µl
- Primer 1.5 µl
- MgCl₂ 2.5 µl
- Taq 0.3 ul
- DNA 2.0 µl olacak şekilde buz üzerinde hazırlanmıştır.

Hazırlanan PCR örnekleri “Thermo” marka sıcaklık döngü (Şekil 4) aletinde 94 °C’de 5 dakika bekletme işleminden sonra arka arkaya birbirini takip eden 94 °C’de 45 saniye denatürasyon, primere bağlı olarak 35-37 °C arasında 45 saniye yapıştırma ve 72 °C’de 1 dakika uzatma işlemlerini içeren 40 sirkülasyondan sonra 72 °C’de 5 dakika son uzatma safhasından oluşmaktadır. Her bir örnek için ve bütün primerler açısından bu işlem yürütülmüştür. Reaksiyonda kullanılan kimyasalların kontaminasyonuna veya jel sisteminde karşılaşılan sorunlara bağlı olarak reaksiyonlar tekrarlanmış ve reaksiyon sayısı artırılmıştır.



Şekil 4. PZR’de kullanılan termocycle

Bitkiler arasında konukçu dışı dayanıklılıktan sorumlu olan genler ile ilişkili markörlerin araştırılması amacıyla 10 baz çiftinden oluşan Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) primerleri kullanılmıştır. Bu primerler tesadüfen seçilmiş olup nukleotid sıralamaları aşağıda verilmiştir (Tablo 2).

Çizelge 2. PZR’da kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Tipi	Nükleotid sıralaması
B5	RAPD	5'- TGCGCCCTTC - 3'
E3	RAPD	5'- CCAGATGCAC - 3'
E4	RAPD	5'- GTGACATGCC - 3'
E5	RAPD	5'- TCAGGGAGG T - 3'
G3	RAPD	5'- GAGCCCTCCA - 3'
H5	RAPD	5'- AGTCGTCCCC – 3'

3.9. Agarose Jel Elektroforezi

PCR sonucunda elde edilen sonuçları görüntülemek için, UV ışığı altında floresan etki gösteren Ethidiumbromide (EtBr) boyası kullanılmıştır. PCR ürünlerini görüntüleyebilmek için örnekler hazırlanan%1 lik agaroz jelde elektroforez edilmiştir..

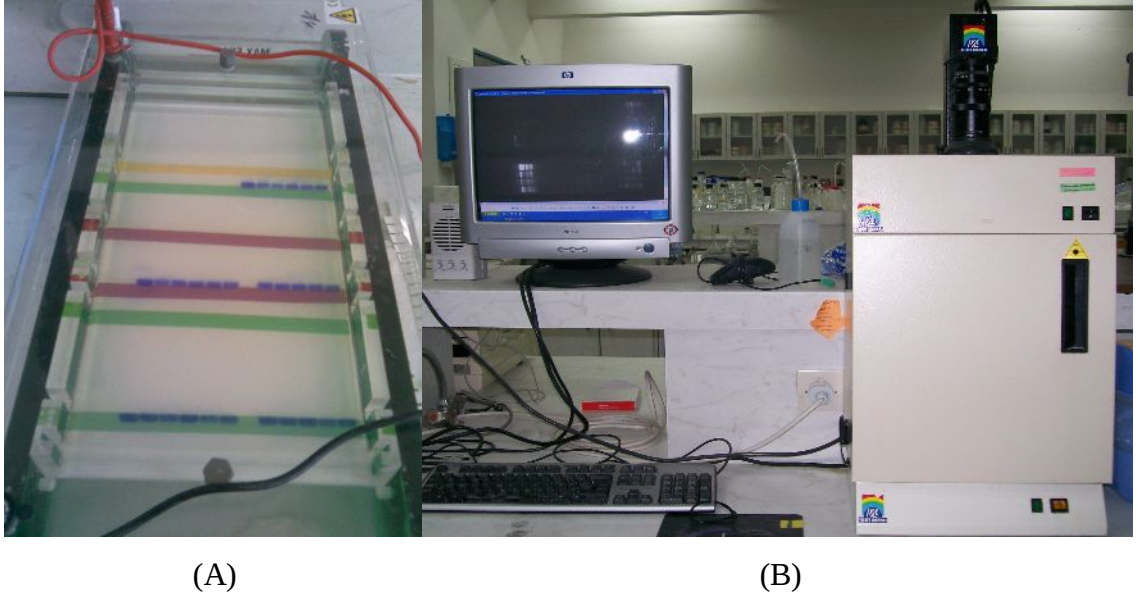
%1’lik Agaroz Jelin hazırlanması;

- 176 ml dSu
- 44 ml TBE
- 2.25 gr Agaroz tartılarak solusyon mikrodalga fırında tamamen eritilmiştir.

Eritilen jele 14 µl ethidium bromid ilave edilerek solusyon 80⁰C jel tepsisine dökülmüş ve donuncaya kadar oda sıcaklığında bırakılmıştır.

PCR ürünleri, DNA kuyucuklarına yüklemeyden önce loading boyası ilave edilerek toplam 24 µl örnek kuyucuklara yüklenerek elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde ethidium bromidin DNA bağları arasına bağlanarak 300-360 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesi sonucu floresan etki göstermesi ile DNA jelde görünür hale gelmiştir. 135V 2,5-3 saat koşma işlemi sonunda elektrik bağlantısı kesilip jel tankı, ultraviyole ışın veren cihaza konularak jel içerisindeki DNA bantları görüntülenmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. Kullanılan genomik DNA ise keskin bir bant ve yukarı doğru biraz yayılan bir görüntü verecektir.



Şekil 5. (A) Çalışmada kullanılan ve 24 µl PZR ürünlerinin yüklendiği elektroforez tankı, (B) Elektroforez edilen PZR ürünlerinin görüntülediği jel görüntüleme sistemi

3.10. Mikroskop Uygulamaları

Işık mikroskopunda *Arabidopsis* bitkilerine inokule edilen *Alternaria solani* 2 no'lu izolatının sporlarının penetrasyonu incelenmiştir. Ayrıca mikroskop çalışmalarımızın diğer aşaması olan *Arabidopsis* bitkilerine inokule edilen *Alternaria solani* sporlarının görüntülenmesi ve hastalık etmeni ile konukçusu arasındaki ilişkileri ortaya koyabilmek için, öncelikle *Alternaria solani*'nin iki nolu izolatı ile inokulasyon yapılmıştır. Daha sonra *Arabiopsis* yaprakları Diaminobenzidin (DAB) kimyasalı içinde her 12 saatte bir olacak şekilde üç gün boyunca bekletilmiştir. Her 12 saat sonunda alınan yaprakların bir kısmı klorofillerinin uzaklaştırılması için %100'lük etil alkolde bekletildikten sonra Trypan blue boyama yapılmış ve diğer bir kısım yaprak ise 3-3 Dihaxyloxacarbocyanin

iodide (DIOC6) kimyasalı içinde 20 sn kadar bekletildikten sonra UV ışık altında mikroskopta incelenmiştir. Her iki boyama işlemlerinin mikroskopta incelenmesinin ardından resimleri çekilmiştir.



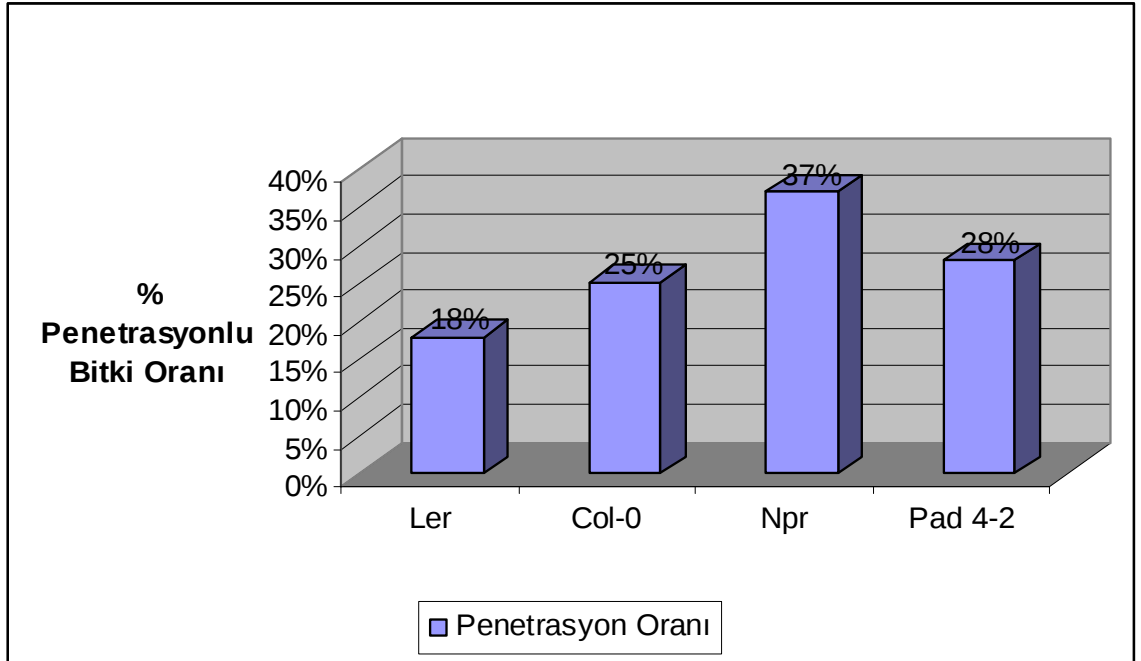
Şekil 6. Mikroskop Çalışmalarında Kullanılan Nikon E600 faz kontrast mikroskop

Çalışmada kullanılan Diaminobenzidine (DAB) solusyonu hazırlanırken 1mg ml^{-1} olacak şekilde DAB tartılmış ve dH_2O ilave edilmiştir. DAB solusyonunun pH'sı seyreltik HCl asit ile 3.3-3.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Trypan blue boyamada $250\mu\text{g ml}^{-1}$ Trypan blue tartılarak eşit miktarda glycerol ve dH_2O bulunan 100 ml'lik ortama ilave edilmiştir. DIOC6 kimyasalı 0.5 mg ml^{-1} olacak şekilde tartılarak etil alkol içerisinde çözümlenerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Mikroskopa Nikon UV Light sistemi entegre edilerek digital kamerayla fotoğraflar çekilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Mikroskopik Uygulamalar

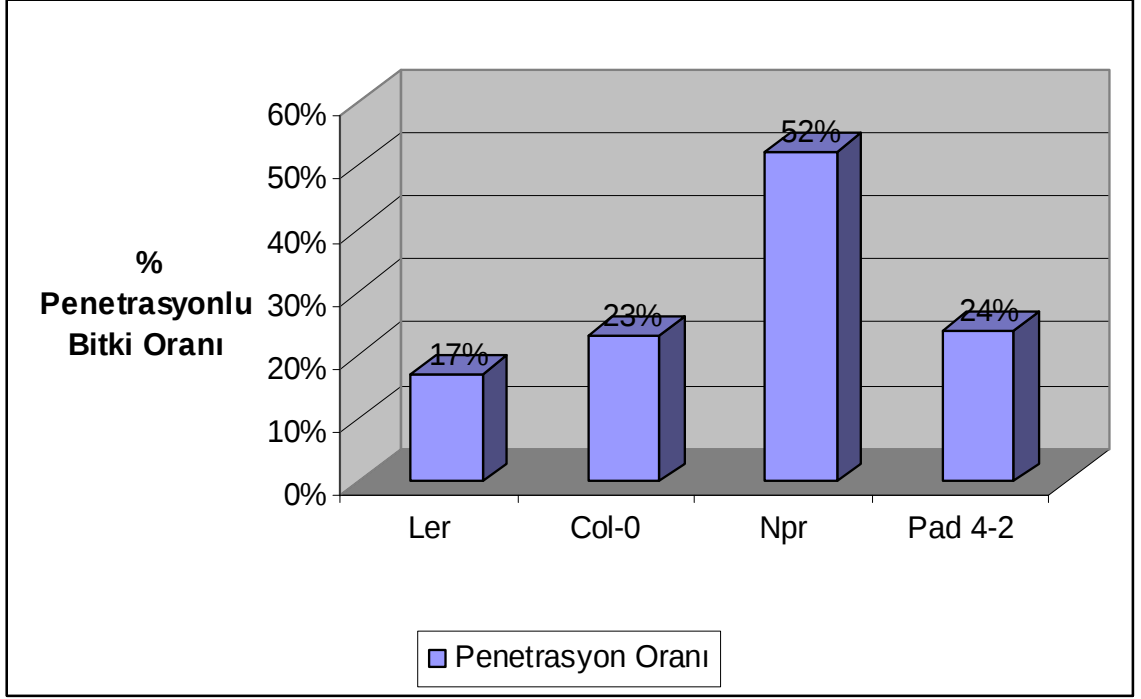
Yapılan miselyum inokulasyonlarından sonra ışık mikroskopunda *Arabidopsis* bitkilerinin yaprakları üzerinde *Alternaria solani* izolatlarının bitki üzerindeki gelişimi ve penetrasyonu incelenmiştir. Sonuçlar Ek 1’de verilmiştir. Yapraklar üzerine bırakılan miselyum disklerinin yaprakta oluşturduğu semptomlar fungus disklerinin kaldırılıp, iğne ile açılan yaradan etmenin bitki dokusuna girişleri ışık mikroskopunda tespit edilmiştir.



Şekil 7. *Arabidopsis* bitkilerinde *Alternaria solani* 6 no’lu izolatı ile yapılan inokulasyonda hastalık gelişimi.

Arabidopsis bitkilerinde *Alternaria solani*’n 6 no’lu izolatı ile yapılan miselyum disk inokulasyonunda, Ler ve Col-0 ekotipinde, *Npr* ve *Pad-4-2* mutantına göre hastalık etmeninin dokulara girişinde ciddi farklar ortaya konmuştur (Şekil 7). Elde ettiğimiz sonuçlar incelendiğinde *npr1* mutantında % 38 ve *pad4-2* mutantında % 28 oranında hastalık gelişimi bulunurken bu oranlar Ler ekotipinde % 18 ve Col-0 ekotipinde %25

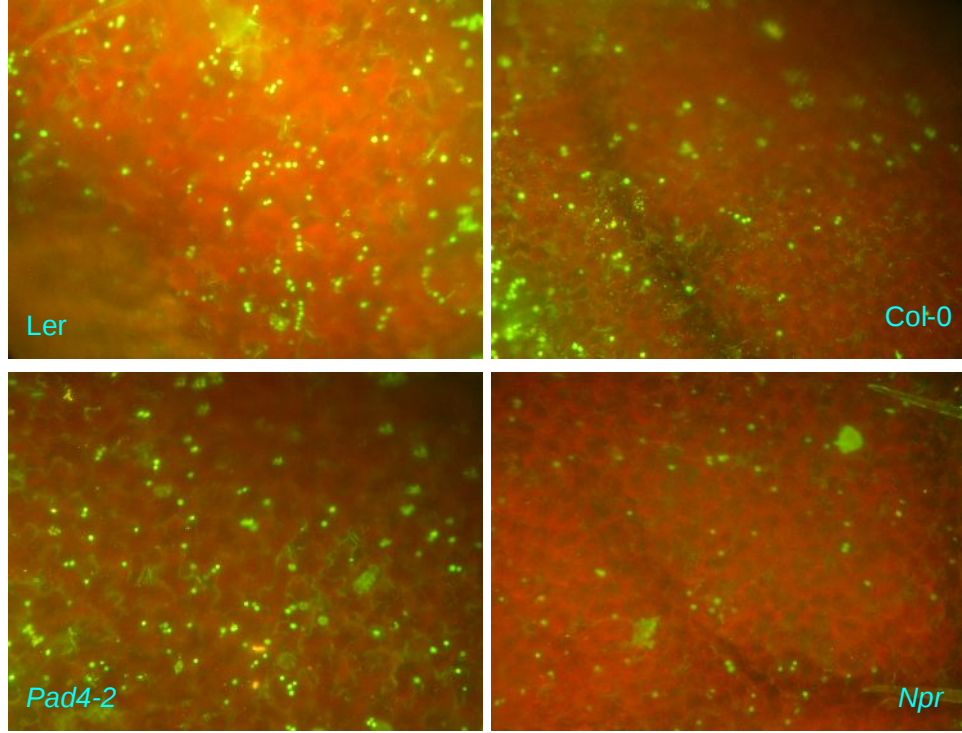
olarak bulunmuştur. *Npr1* mutantı diğer ekotiplere göre *A. solani*'n 6 no'lu izolatına çok daha hassas olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 8. *Arabidopsis* bitkilerinde *Alternaria solani* 2 no'lu izolatı ile yapılan inokulasyonda hastalık gelişimi

Aynı paralelde gerçekleştirilen miselyum disk inokulasyonunda *Arabidopsis* bitkilerinin *Alternaria solani*'n 2 no'lu izolatı bırakılmıştır. Miselyum disklerinin *npr1* mutant bitkilerinde % 52 oranında geliştiği bulunmuştur. Fitoaleksini oluşturmamayan *pad4-2* mutant bitkilerinde hastalık gelişimi % 24 olurken Ler ve Col-0 ekotiplerinde sırasıyla % 17 ve % 23 oranlarında *A. solani*'n gelişimi bulunmuştur (Şekil 8).

Arabidopsis ekotip ve mutantları üzerine 2×10^6 spor/ml konsantrasyonunda püskürtülen *A. solani* konidiosporlarının gelişimi yaprak üzerinde incelenmiştir. *Arabidopsis* yapraklarına inokule edilen spordan tesadüfen 100 sporun çimlenme, penetrasyon sayıları kayıt edilmiştir. İnokule edilen bitkiler Diaminobenzidin (DAB) kimyasalı ile boyanmıştır. DAB ile boyanan *Arabidopsis* yaprakları 3-3 Dihexyloxacarbocyanin iodide (DIOC6) kimyasalı içinde 30 sn kadar bekletildikten sonra, UV ışık altında konidiosporların germinasyon ve penetrasyonu 72 saat boyunca araştırılmıştır.



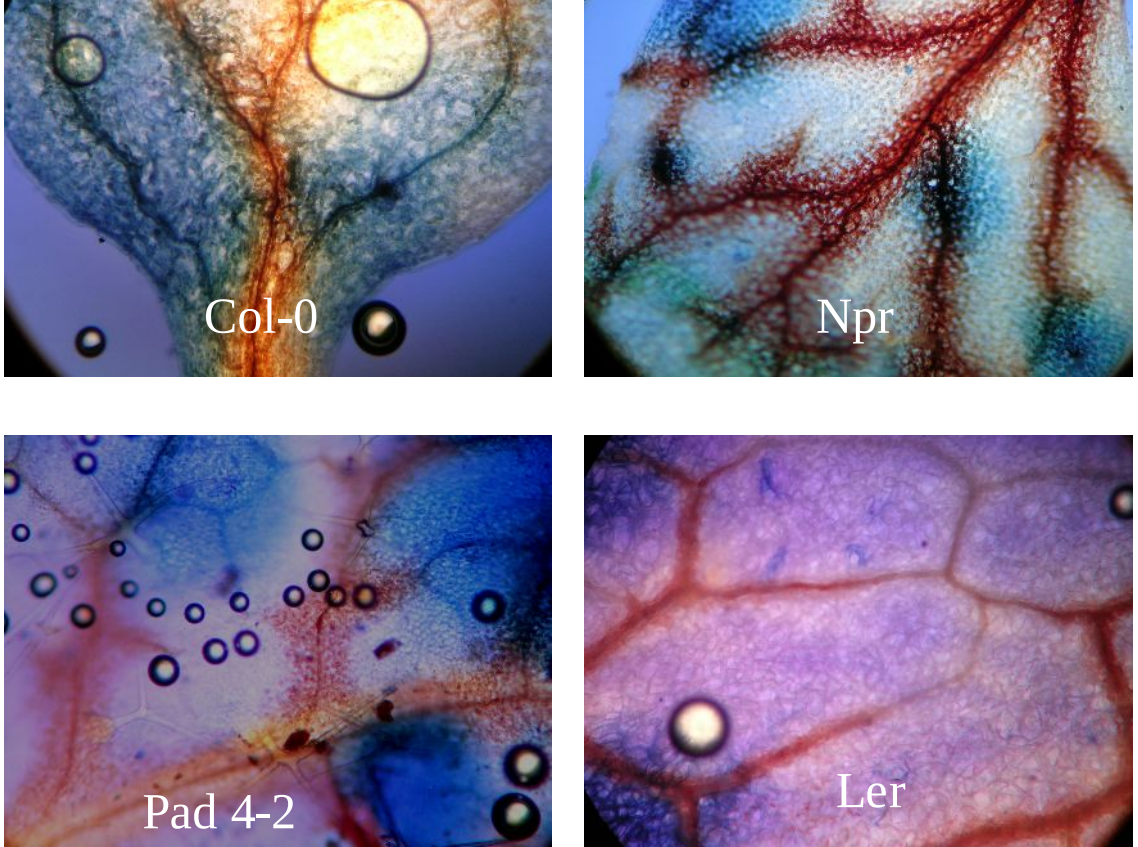
Şekil 9. 3-3 Dihexyloxacarbocyanin iodide (DIOC6) ile boyanan *Arabidopsis* ekotip ve mutantlarının 72 saat sonra görünümü (20x10 büyütmede)

DIOC6 fluorescent boya ile boyanan yapraklarda sağlıklı klorofil içeren hücreler kırmızı, DAB solusyonu ve hücre ölümü gerçekleşenler ise siyah alanlar olarak bulunuyorken *Alternaria solani* sporları parlak sarı-yeşil renkte görüntülenmiştir (Şekil 9). Ekotip ve mutant *Arabidopsis* yapraklarında tesadüfen sayılan 100 konidiospordan çimlenme ve penetrasyon gerçekleşmemiştir (Çizelge 3).

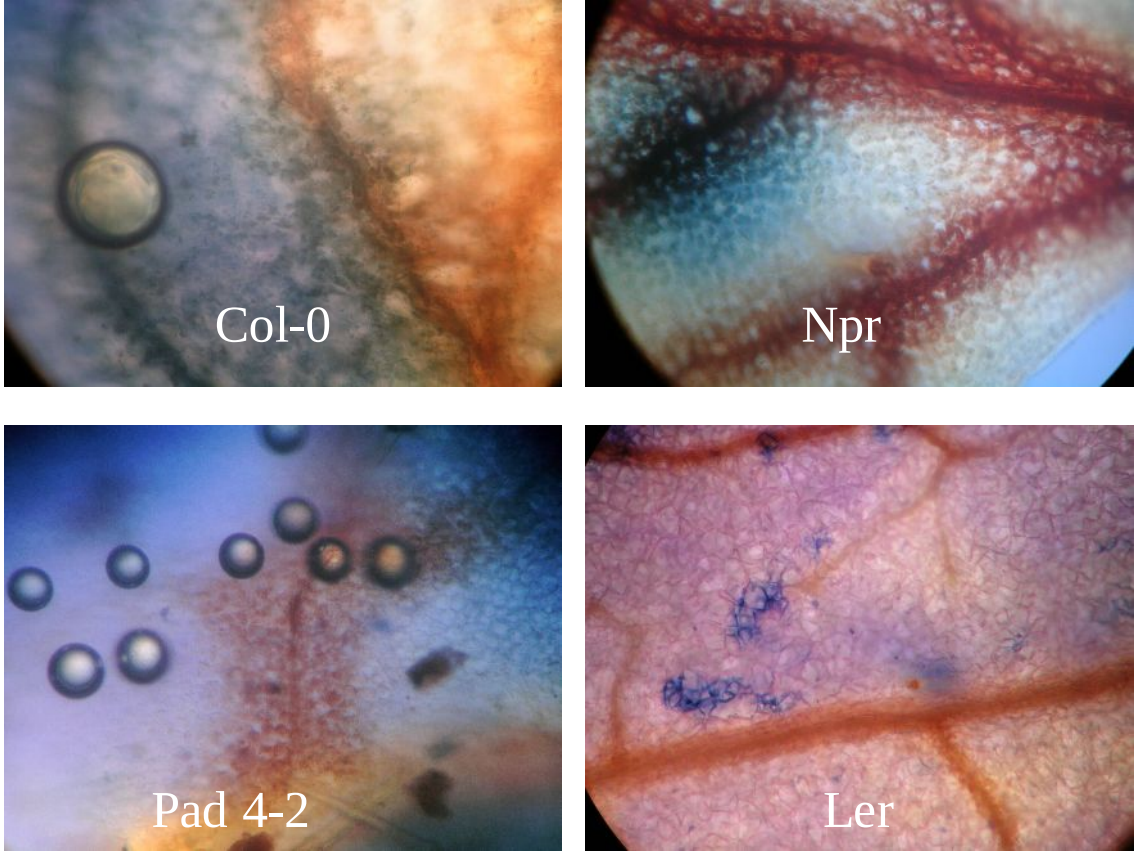
Çizelge 3. DIOC6 ile boyanan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde *Alternaria solani* konidiosporların gelişim durumu

Bitki	Çimlenme	Penetrasyon	Toplam spor sayısı
Ler	-	-	100
Col-0	-	-	100
<i>Npr</i>	-	-	100
<i>Pad4-2</i>	-	-	100

DAB ile boyanan bitki yapraklarındaki hücre ölümlerini ve hastalık etmeni konidiosporları arasındaki ilişkiyi ortaya koyabilmek için bitki örnekleri Trypan blue ile boyanmıştır. *Arabidopsis* yapraklarındaki damarlar kırmızı- kahverengi DAB solusyonu ile boyanırken hücrelerde herhangi bir DAB oluşumu bulunmamıştır. DAB ile boyanan klorofili uzaklaştırmak için örnekler %96 etil alkole konulduğu için aynı görüntülerde mavi konidiosporlar görüntülenememiştir. Etil alkol yaprak üzerinde çimlenemeyen ve penetre olmayan tüm konidiosporların yüzeyden uzaklaşmasına neden olmuştur. Dolayısıyla *Arabidopsis* hücrelerindeki ani hücre ölümü ile konidiospor penetrasyonu arasında bir ilişki görülmemektedir (Şekil 10). Trypan blue sadece ölü yada zarar görmüş hücreleri boyamaktadır.



Şekil 10. Zaman çalışmasına tabi tutulan *Arabidopsis* bitkilerinde 72 saat sonra DAB ve Trypan blue boyama sonucunda bitkilerin görünümü (10X10 büyütmede)

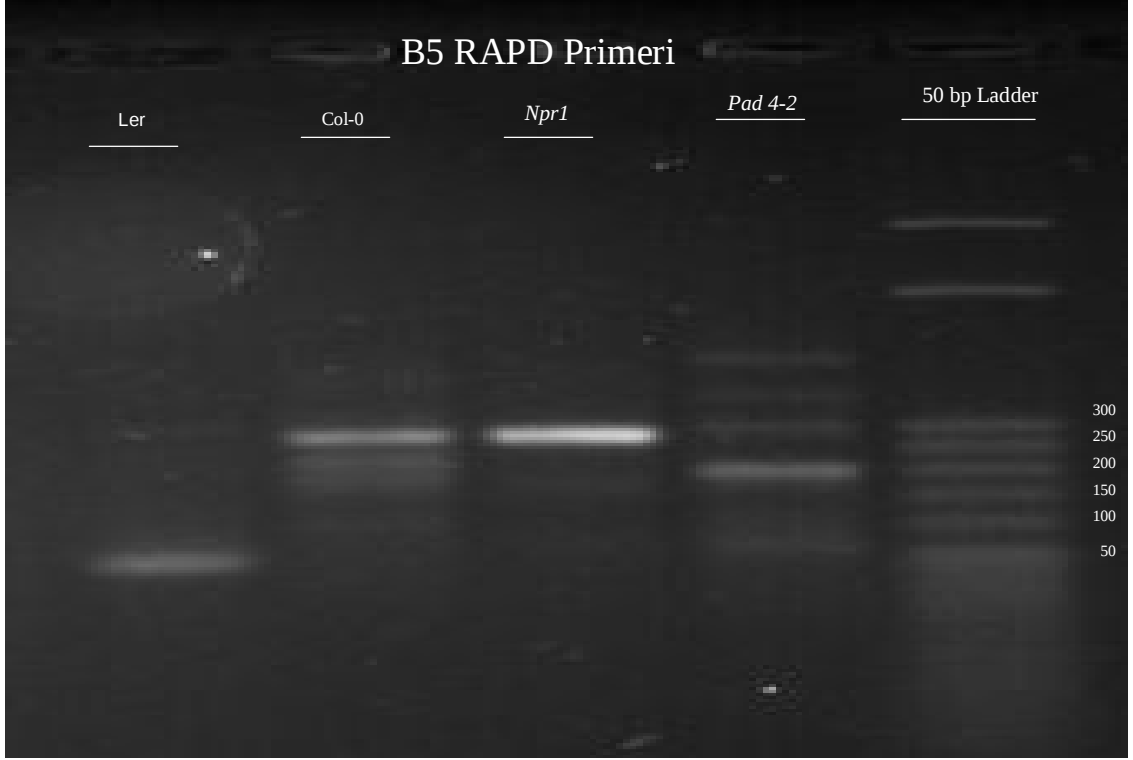


Şekil 11. *A. thaliana* bitkilerinde 72 saat sonunda DAB ve Trypan blue boyama (20X10 büyütmede)

Yaptığımız zaman çalışmasında *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutant bitki yaprakları üzerinde hiçbir konidiospor çimlenmemiş ve penetre olmamıştır. Mikroskopik boyama yöntemleri konidiosporların çimlenmediğini ve hücrelere penetre olmadığını göstermektedir (Şekil 11).

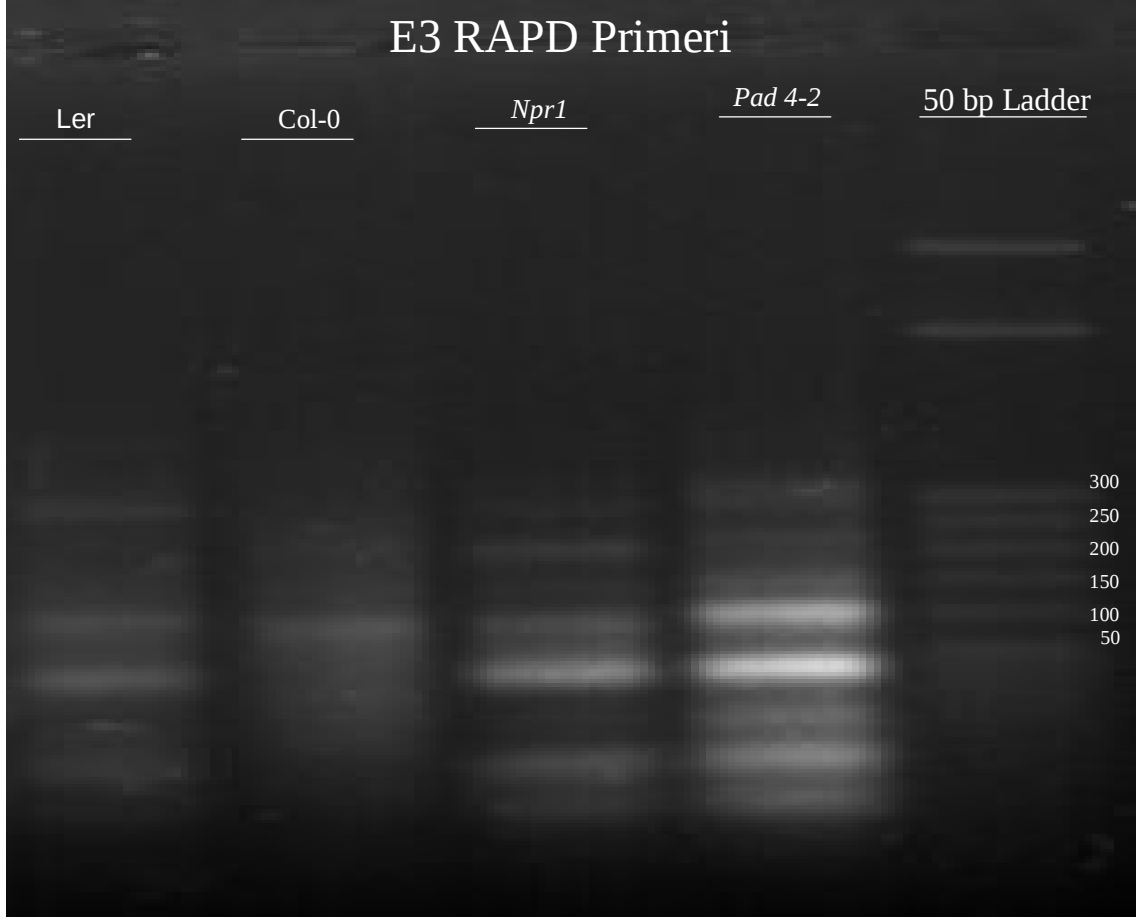
4.2. Moleküler Çalışmalar

Arabidopsis thaliana ekotip ve mutantları arasında *A. solani*'ye karşı konukçu dışı dayanıklılığı moleküler düzeyde ortaya koyabilmek için 5 tane RAPD primeri kullanılmıştır. Bu primerlerle elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforez edilerek ekotip ve mutantlar arasındaki polimorfizm belirlenmeye çalışılmıştır.



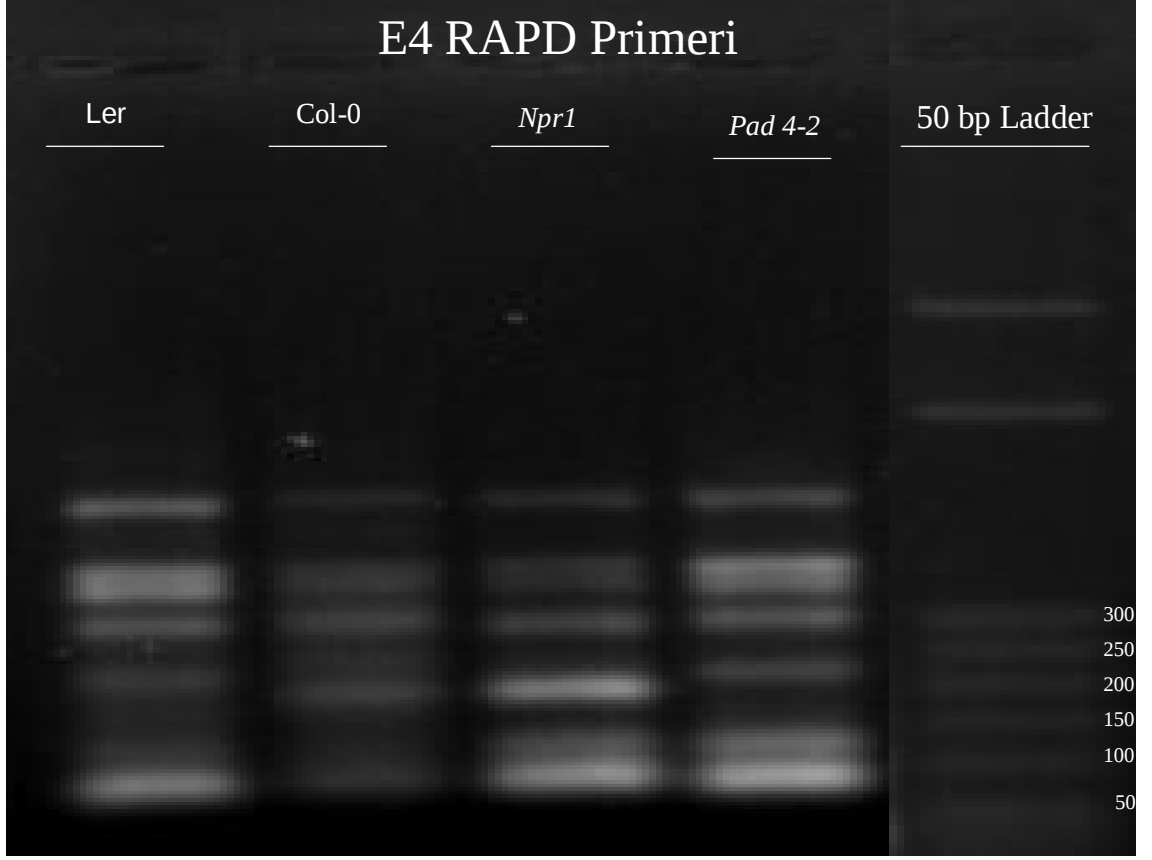
Şekil 12. Ekotip ve mutantlar arasındaki polimorfiz (B5 RAPD primeri)

B5 RAPD primeri hem ekotipler hem de mutantlarda fazla amplifike ürünü oluşturmamıştır. Bu primer Ler ekotipinde 1 adet (55bp), Col-0 3 adet (215bp, 235bp, 300bp), *Npr1* mutantında 2 adet (175bp, 300bp) ve *Pad4-2* mutantında 5 adet (50bp, 235bp, 295bp, 337bp, 387bp) band göstermiştir. 300bp band Col-0 ekotip ve *Npr1* mutantında ortakken, 235bp band Col-0 ekotip ve *Pad4-2* mutantı arasında ortaktır. Ekotip ve mutantların kendi içinde ortak olduğu amplifikasyonların ürünü bu primerden elde edilmiştir.



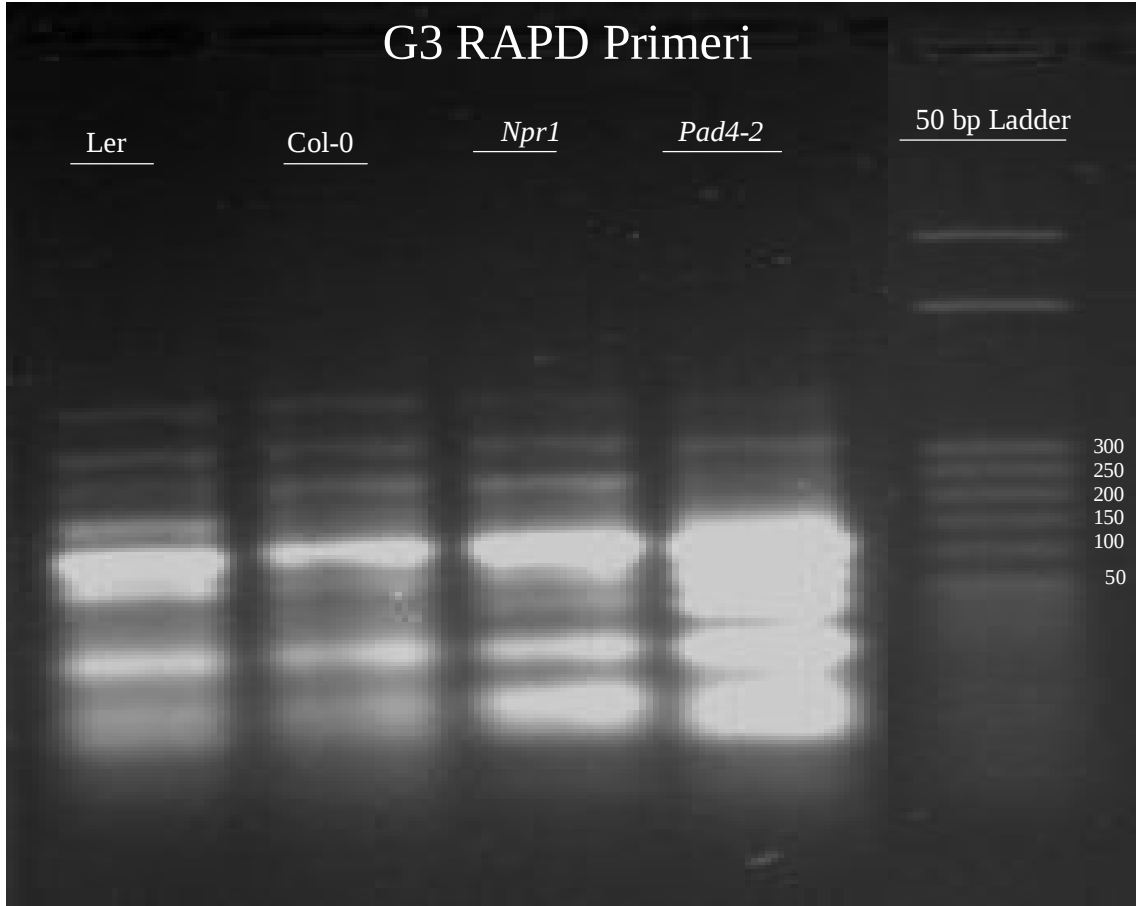
Şekil 13. *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları arasındaki polimorfizm (E3 RAPD primeri)

Zayıf amplifikasyon ürünlerinin fazla olduğu E3 RAPD primerinin kullanıldığı bu PZR çalışmasında ekotip ve mutantlardan elde edilen amplifikasyon miktarı yine daha önceki başka araştırmacılar tarafından yapılan RAPD çalışmalarına nazaran düşüktür. Col-0 ekotipi 3 adet (124bp, 237bp, 375bp) band verirken, *Pad4-2* mutantı 6 adet (30bp, 35bp, 47bp, 100bp, 175bp, 225bp, 350bp) amplifikasyon ürünü oluşturmuştur. 175bp bandı Ler ekotipi ve iki mutantta ortak olmuştur. *Pad4-2* mutantında sadece kendisinde bulunan 3 adet zayıf band görülmüştür.



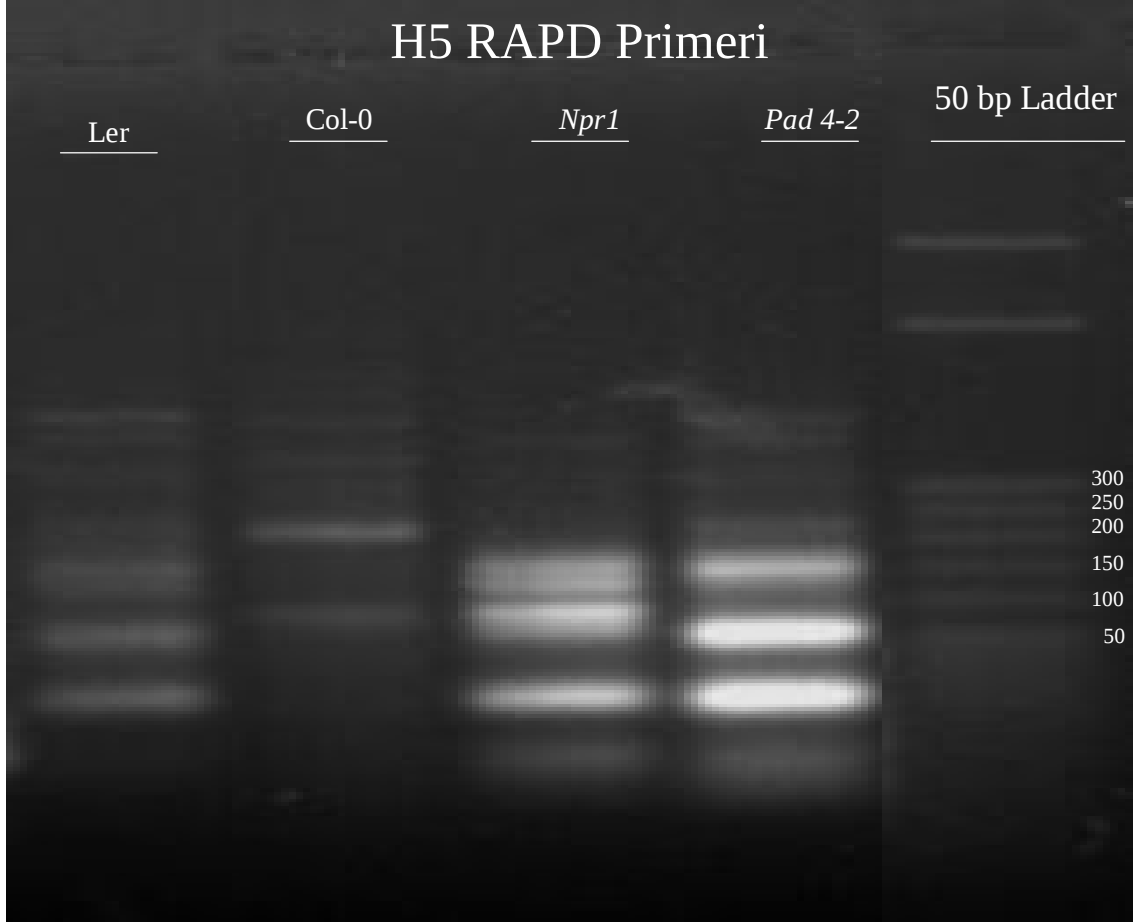
Şekil 14. *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları arasındaki polimorfizm (E4 RAPD primeri)

E4 RAPD primeri ekotip ve mutantlarda 2 ile 4 band arasında amplifikasyon ürünü oluşturmuştur. Ler ekotipi ve *Pad4-2* mutantı 175bp'lık band dışında ayrı amplifikasyon ürünlerine sahiptir. Yani aralarındaki polimorfizm oranı çok düşüktür. *Npr1*'in band ürünlerinin ikisi (175bp, 287bp), Col-0 ekotipi ve *Pad4-2* mutantında ortaktır.



Şekil 15. *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları arasındaki polimorfizm (G3 RAPD primeri)

G3 RAPD primerinin kullanıldığı bu PZR çalışmasında zayıf bandlar fazla sayıda olmasına rağmen, amplifikasyon ürünü tüm ekotip ve mutantlarda 7-8 band şeklinde görülmüştür. Tüm ekotip ve mutantlar tarafından ortak olan band ürünleri yanında, daha çok Ler ekotipi ile *Pad4-2* mutantı ve Col-0 ekotipi ile *Npr1* mutantı arasında benzerlik göstermektedir. Col-0 ekotipi ve *Npr1* mutantı arasında hiç polimorfizm yokken bunlardan olmayan Ler ekotipinde 3 adet (50bp, 68bp, 127bp) band, *Pad4-2* mutantında 3 adet (58bp, 78bp, 127bp) band vardır. Ler ekotipi ve *Pad4-2* mutantı arasında 1 adet (127bp) band ile polimorfizm mevcut olup bu band Col-0 ekotipinde mevcut değildir.



Şekil 16. *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları arasındaki polimorfizm (H5 RAPD primeri)

H5 RAPD primeri tüm ekotip ve mutantlarda fazla sayıda spesifik olmayan zayıf bandlar oluşturmuştur. Kuvvetli bandlar dikkate alındığında Ler ekotipinin 2 band ürünü (71bp, 175bp) *Npr1* ve *Pad4-2* mutantlarında da ortaktır. *Npr1* mutantındaki farklı bandlardan 1 adet bandı Ler ekotipinden 1 adedini ise Col-0 ekotipinde de olmaktadır. *Pad4-1* 'deki ortak olmayan tek band (300bp) Ler ekotipi ile ortaktır.

Doğadan toplanan *A. thaliana* ekotiplerinde dayanıklılık genleri aktif olarak çalışırken mutasyona uğratılan bu genler veya onların ihtiyaç duyduğu orijinal yardımcı genlerin mutasyonu ile elde edilen mutantların ekotiplere göre daha hassas olacağı varsayılır. Yapılan mikroskopi çalışmalarında misel inokulasyonunda *A. thaliana* ekotip ve mutantları üzerinde bir misel gelişmesi bulunmuş, fakat konidiospor inokulasyonunda hastalık etmeninin gelişimi ortaya konamamıştır. Misel inokulasyonunda yaprak üzerine

yapılan iğne ile delme işlemi, patojenin yerleşmesine yardımcı olmuş ve misellerin hala besi ortamında gelişmesine devam ediyor olması hastalık etmeninin konukçuya yerleşmesi için başarıyı artırmış olabilir. *Npr1* mutant bitkilerinin *pad4* mutantlarına ve ekotiplere göre hastalık etmenine daha hassas olması bu bitkilerin patojene karşı özel PR proteinlerini oluşturmamasından kaynaklanıyor olabilir. Fakat yapılan spor inokulasyonlarında *npr1* bitkileri üzerinde spor gelişimi ve penetrasyonun olmaması burada *A. solani*'ye karşı bitkinin savunma mekanizmasının hala aktif olduğunu işaret etmektedir. Bu konuda daha sonra yapılacak çalışmalar için farklı ekotip ve mutant tohumları kullanılması tavsiye edilebilir.

Moleküler çalışmalar inokulasyon çalışmalarına paralel yapılmıştır. Bitkilerin DNA ları üzerine tesadüfen yapışan RAPD primerleri kullanılarak ekotip ile mutant bitkiler arasındaki polimorfizm ortaya konmaya çalışılmıştır. RAPD primerler ile yapılan PZR reaksiyonlarında polimorfik olan bantlar işaretlenmiş ve aralarındaki farklar ortaya konulabilmiştir. Col-0 ile onun *npr1* mutantı ve Ler ile onun mutantı *pad4-2* arasında yukarıda belirtilen polimorfizmler bulunmasına rağmen mutantlarda hastalık gelişmemesi bu polimorfizmlerin dayanıklılık ile ilgili olmadığı konusunda soru işareti doğurmaktadır. Genelde yaygın görüş, RAPD primerlerinin güvenilir bir markör olmayışı, sonuçların tekrarlanma oranının düşük olması gibi faktörler göz önüne alındığında çalışmaya spesifik SSR, CAPS, SNP markörlerinin ilave edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmada misel inokulasyonunun spor inokulasyonuna göre daha üstün olduğu anlaşılmaktadır. Sporların çimlenme ve penetrasyonu 72 saat boyunca takip edilmiş fakat belirtilen zaman diliminde konidiospor gelişimi olmamıştır. Konidiosporların çimlenme süresi uzun olabileceği için çalışmanın zamanlamasının 7 güne çıkarılması ve pozitif kontrol olarak domates bitkilerinin kullanılması önerilebilir.

4. SONUÇ

Bu çalışma, geniş konukçu listesine sahip olan, ekonomik olarak her yıl büyük kayıplara neden olan ve domateste yaygın olarak görülen erken yanıklık hastalık etmeni *Alternaria solani* hastalığına karşı dayanıklı bitkilerin oluşturulması çalışmalarının bir başlangıç oluşturmak amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla *Alternaria solani* hastalık etmeninin hastalık oluşturmadığı *Arabidopsis thaliana* ekotipleri ve mutantları çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada konukçu dışı dayanıklılık mekanizmalarının incelenmesiyle dayanıklılık genlerinin çalışma mekanizmalarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın planlanmasında *Arabidopsis thaliana* ekotiplerinin patojene karşı hastalık oluşturmayacağı bunun aksine dayanıklılık mekanizması mutasyona uğratılan mutantlarda hastalık görüleceği varsayılmıştır. Değişik *Alternaria solani* izolatlarının farklı mutantlardaki hastalık gelişim oranı ve seyri incelenip, bitkilerin bu patojene karşı oluşturduğu dayanıklılık mekanizmasının aralanması ve konukçu patojen arasındaki ilişkileri tanımlaması amacına karşın, *Arabidopsis thaliana* mutantlarında beklenen hastalık gelişimi yaygın bir şekilde gözlenememiştir. Dolayısıyla ekotip ve mutantlar arasında hastalık etmenine karşı açık şekilde farklılık görülmemesi nedeniyle moleküler düzeyde ekotip ve mutantlar arasında oluşan polimorfizmlerin dayanıklılık mekanizmasıyla ilişkileri de yeterli düzeyde yorumlanamamıştır. Ekotip ve mutantlar arasında dayanıklılık açısından fazla fark olmamasına karşın moleküler düzeyde polimorfizm oluşması, dayanıklılık lokusları dışında başka bölgelerin de mutasyona uğraması ve polimorfizmin bundan kaynaklanabileceği ya da dayanıklılık mekanizmasında mutasyona uğratılan bölgeler dışında diğer başka genlerin de etkili olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu konuda ileride yapılacak çalışmalarda farklı ve fazla sayıda mutant ve ekotiplerin çalışma kapsamına alınması konunun biraz daha açıklığa kavuşturulmasında yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Adam, L., Ellwood, S., Wilson, I., Saenz, G., Xiao, S., Oliver, R. P., Turner, J. G. and Somerville, S. 1999.** Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a Survey of 360 *Arabidopsis thaliana* Accessions for Resistance to These Two Powdery Mildew Pathogens. The American Phytopathological Society. MPMI Vol. 12, No. 12, 1999, pp. 1031–1043.
- Agrios, G.N. 1988.** Plant pathology. *Academic Pres*, San Diego
- Anonim, 1998.** Arabidopsis: model plant in research. The abiotech infosource.
- Anonim, 2007.** *Arabidopsis*: The Model Plant. [www. nsf. gov/ pubs/ 2002/ bio 0202/201 Oreport_8.pdf](http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/201Oreport_8.pdf)
- Anonim, 2005.** <http://www.fao.org>
- Anonim,2003.** Aps net education center- Plant Disease Lessons. LessonsPlantPath/PotatoTomato/mngmnt.htm.
- Cao, H., Bowling, SA., Gordon, AS., and Dong, X. 1994.** Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. DCMB, Department of Botany, Box 91000, Duke University, Durham, North Carolina 27708-1000.
- Century, K., Holub, E.B. and Staskawicz, B.J. 1995.** NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and fungal pathogen. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **92**. 6597-6601.
- Dangl, J. L. and Jonathan, D. G. J. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature international weekly journal of science. Nature* **411**, 826-833
- Feys, B. J., Moisan, L. J., Newman, M. A. and Parker, J. E. 2001.** Direct interactions between the *Arabidopsis* disease resistance signalling proteins. EDS1 and PAD4. *The European Molecular Biology Organisation Journal* **20**: 5400-5411.
- Fooland, M. R., Zhang, L. P., Khan, A., Nino-Liu, D and Lin, G. Y. 2002.** Identification of QTLs for early blight (*Alteraria solani*) resistance in tomato using backcross poulation of a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. *Theoretical and Apllied Genetics*. **122**: 870-895.
- Gaffney, T., Friedrich, I., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessman, H., Ryals, J. 1993.** Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754-756.

- Jirage D., Tootle, T.L., Reuber, T. L., Frost, L. N., Feys, B. J., Parker, J. E., Ausubel, F. M. And Glazebrook, J. 1999.** *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signalling. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A* **96**:13583-13588.
- Lu, M., Tang, X., and Zhou J.M. 2001.** *Arabidopsis NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *The Plant Cell* **13**:437-4447.
- Nawrath, C and Metraux, J. P. 1999.** Salicylic acid induction- deficient mutants of *Arabidopsis* wxpressPR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation *The plant Cell* **11**: 1393-1404.
- Parker, J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk, A., Gunn, N. D. And Daniels, M. J. 1996.** Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *The plant Cell* **8**: 2033-2046.
- Parker, J.E., Feys, B. J., Van Der Biezen, E. A., Noel, L., Aarts, N., Austin, M. J., Botella, M. A., Frost, L. N., Daniels, M. J. and Jones, J. D. G. 2000.** Unravelling *R* gene-mediated disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol.* **1**:17–24.
- Parker, J.E., Feys, B. J., Van Der Biezen, E. A., Laurent, N., Aarts, N., Austin, M. J., Botella, M., Frost L. N., Daniels, M. J. And Jones, J. D. G. (2000).** Unravelling *R* gene mediated disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology* **1**: 17-24.
- Thordal-Christensen, H. 2003.** Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 351-357.
- Volko, S. M., Boller, T. and Ausubel, F. M. 1998.** Isolation of new *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility to *Pseudomonas syringae* by direct screening. *Genetics* **149**: 537-548.
- Witsenboer, H. M.A., Griend, E.G., Tiersma, J.B., Nijkamp, H.J.J. and Hile, J. 1989.** Tomato resistance to *Alternaria* stem canker: localization in host genotypes and functional expression compared to non-host resistance. *Theor Appl Genet*, **78**:457- 462.
- Xiao S., Calis, O., Patrick, E., Zhang, G., Charoenwattana, P., Muskett, P., Parker, J. E., Turner, J. G. 2001.** The atypical resistance gene, RPW8, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, Volume **42**, Number **1**.
- Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J. G. 1998.** COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094.

- Zhang, L.P. Lin, G.Y. Nino-Liu, D. and Foolad M. R. 2003.** Mapping QTLs conferring early blight (*Alternaria solani*) resistance in a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross by selective genotyping. *Molecular Breeding* 12: 3-19.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Somerville, S. 2004.** Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 40: 633-646.

Ek 1:**Çizelge 4.** *Arabidopsis* ekotiplerinde *Alternaria solani*'n 6 no'lu izolatu ile yapılan inokulasyon

BİTKİLER	Ler										Col-0									
	1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU					1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-	-		-		-		-	+	-	-	-				-	+			
2	-	-	-			-	-		-		-	-				+	+	-		
3	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	-				+	-		-	
4	+	-	-	-		-	+			-	-					-	-			
5	+	-	-	-		+	-	+	-		-	-	+	-	-	+	+	+		-
6	-	-	+	-		-	-		-	+	+	-				-	-	-		
7	-	-	-	-							-	-				-				
8						-					-	-								

Çizelge 4'e bakıldığında *Arabidopsis thaliana* Ler ekotipinde $9/50 = 0.18$ ve Col-0 ekotipinde $9/36 = 0.25$ olarak sayılmıştır.

Çizelge 5. *Arabidopsis* mutantlarında *Alternaria solani* 6 nolu izolatu ile yapılan inokulasyon

BİTKİLER	Npr										Pad 4									
	1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU					1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-	-	-			+	+				-	-	+	-		-	+	-		+
2	+	-				-	-				+				+	+	-	-		-
3	+	-	+			-	-	+	+		-	-	-				+	-	-	-
4				+	-	-	-			-	-	-	-			-	+		-	-
5	-					-	+			-	+	-			+				-	
6	-					-	-				-			-		-	-			-
7	+	+				-	+				-	+		-				-		
8	+	-				+	-									+	-			

Çizelge 5'e bakıldığında *Arabidopsis thaliana* Npr mutantında $14/38 = 0.37$ ve Pad 4 mutantında toplam $12/43 = 0.28$ olarak gözlenmiştir.

Çizelge 6. *Arabidopsis* ekotiplerinde *Alternaria solani*'n 2 no'lu izolatu ile yapılan inokulasyon

BİTKİLER	Ler										Col-0									
	1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU					1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	-	-	+	-		+		+		-	-	-			-	-		-	+	
2	-	-		-		-	-		-		+	+				-	-	-	+	
3	+	-	-		-		-	-	-	-	-	-		-		+		-	-	-
4	-	-	-	-		-	-		+	-	-			+		-			-	
5	+		-	-		-	-	-	-	+	-				-		+			
6	-	-		-		-	-		-		-	-	-				+			-
7	-	-	-	-	+		+	-								-		-	-	
8			-			-						-								

Çizelge 6'a bakıldığında *Arabidopsis* Ler ekotipinde toplam $9/52 = 0.17$ ve Col-0 ekotipinde toplam $8/35 = 0.23$ olarak gözlenmiştir.

Çizelge 7. *Arabidopsis* mutantlarında *Alternaria solani* 2 nolu izolatu ile yapılan inokulasyon

BİTKİLER	Npr										Pad 4									
	1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU					1. SAKSI İNOKULASYONU					2. SAKSI İNOKULASYONU				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	+					-	+	+			-	-	-	-		-	+	-	+	
2	+			+		-	+	+		-	-		+		-		-	-		-
3	-					-			-		-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
4	+		-			+				+	+	-	-	-		-	-	-	-	-
5	-			+		+	+		-	-	-	-			-		+		-	
6	-						-	-			-			-		-	-	-		-
7				+		+				+	-	+	+	-		+		-		-
8								-					-		-		-		-	

Çizelge 7e bakıldığında *Arabidopsis* Npr mutantında toplam $16/31 = 0.52$ ve Pad4-2 mutantında toplam olarak $13/55 = 0.24$ olarak gözlenmiştir.