

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY SARI PAS (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) EFEKTÖR
ADAYLARINA AİT RNAi PARÇALARININ BSMV VEKTÖRÜNE
KLONLANMASI

ALPEREN DİLEKLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. SEMRA HASANÇEBİ

EDİRNE-2023

ALPEREN DİLEKLİ'nin hazırladığı “BUĞDAY SARI PAS (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) EFEKTÖR ADAYLARINA AİT RNAi PARÇALARININ BSMV VEKTÖRÜNE KLONLANMASI” 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

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Dr. Öğr. Üyesi N. Bilge KAMER

Tez Savunma Tarihi: 11/07/2023

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. SEMRA HASANÇEBİ
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

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.

11/07/2023

ALPEREN DİLEKLİ

İmza

Yüksek Lisans Tezi

Buğday Sarı Pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) Efektör Adaylarına Ait RNAi Parçalarının BSMV Vektörüne Klonlanması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Mantar hastalıkları, tarımsal üretimde büyük ölçekli verim kayıplarının ana etmenlerinden biridir. Bu patojenler için mantar ilaçlarının kullanımı pratik bir çözüm olsa da daha verimli, etkili ve çevre problemlerine duyarlı yaklaşımlara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle bitki ve patojen arasındaki etkileşimleri anlamak, etkili bir mücadele yöntemi geliştirmek için patojenin virülensliğinden sorumlu molekül ve genleri tespit etmek büyük bir önem taşımaktadır. Bu yaklaşımla, son yıllarda bitki patolojisi alanındaki araştırmalar, patojenlerin virülesliğinden sorumlu olan efektör protein ve genlerine yönelmiştir. Özellikle omik teknolojileri ile çok sayıda efektör aday geni tespit edilmekte ancak doğrulamak için gerekli olan fonksiyonel analizleri aynı hızı gösterememektedir. RNAi yöntemi ile gen susturma, aday genlerin fonksiyonel analizi için oldukça etkili ve hızlı bir yöntemdir.

Dünyanın temel gıdası olan buğdayda sarı pas hastalığına neden olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) patojeni, ülkemizde de yaygın ve etkili bir patojendir. Bu tez çalışmasında, 2013 yılında tamamlanan TÜBİTAK COST projesi kapsamında (109T293) tespit edilen efektör adaylarından *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1* genlerinin fonksiyonel analizi için ilk adımın tamamlanması hedeflenmiştir. Fungal fitopatojen genlerinin fonksiyonel analizinde, Konak Aracılığıyla Gen Susturulması (HIGS) metodu oldukça etkin biçimde kullanılmaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında, *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1* efektör aday genlerine özgün DNA fragmentlerinin, buğdayda RNAi için etkin kullanılan Arpa Çizgili Mozaik Virüs (BSMV) vektörüne klonlanması

hedeflenmiş ve rekombinant HIGS vektörleri hazırlanmıştır. Böylece daha sonra yapılacak adımlarla efektör aday genleri etkin biçimde susturulup gerçek efektörler olup olmadığı, hücre içi konumu, etkileşime geçtiği konukçul faktörleri belirleyebilmek mümkün olacaktır.

Yıl : 2023

Sayfa Sayısı : 81

Anahtar Kelimeler : BSMV, Efektör, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, RNAi, Sarı pas, HIGS



Master's Thesis

Cloning of RNAi Fragments of Wheat Yellow Rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) Effector Candidates Into BSMV Vector

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Fungal diseases are one of the main factors of large-scale yield losses in agricultural production. Although the use of fungicides for these pathogens is a practical solution, more efficient, effective and environmentally sensitive approaches are needed. For this reason, understanding the interactions between the plant and the pathogen and identify the molecules and genes responsible for the virulence of the pathogen in order to develop an effective control method is of great importance. With this approach, research in the field of plant pathology in recent years has focused on effector proteins and genes responsible for the virulence of pathogens. Especially with omics technologies, in large quantities of effector candidate genes are detected, but the functional analyzes required for validation cannot show the same progress. Gene silencing by RNAi method is a highly effective and rapid method for functional analysis of candidate genes.

The pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*), which causes yellow rust disease in wheat, which is the main food of the world, is a common and effective pathogen in our country too. In this thesis, it is aimed to complete the first step for the functional analysis of the *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* and *CBH50687.1* genes, three of the effector candidates identified within the scope of the TÜBİTAK COST project (109T293), which was completed in 2013. Host Induced Gene Silencing (HIGS) method is used quite effectively to gene silencing for functional analysis of the fungal phytopathogen genes. Therefore in the thesis, it is aimed to clone *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* and *CBH50687.1* effector candidate genes belonging to *P. striiformis*

f. sp. *tritici* pathogen, to Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) vector which is effectively used for RNAi in wheat. Thus, recombinant HIGS vectors prepared to determine whether the effector candidates are true effectors, their intracellular location, and the host factors with which they interact by future study.

Year : 2023

Number of Pages : 81

Keywords : BSMV Vector, Candidate effector gene, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, RNAi, Yellow rust disease, HIGS

ÖNSÖZ

Buğday, ülkemizin temel gıda kaynakları arasında yer aldığı gibi ticari değeri yüksek bir zirai üründür. Buğdayda pas hastalıklarından kaynaklanan verim ve kalite düşüklüğü küresel bir sorundur. Bu sebeple pas hastalıklarına karşı etkili ve çevreye duyarlı mücadele stratejileri geliştirmek gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, buğdayda sarı pas hastalığına sebep olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* patojenine ait *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1* aday efektör genlerinin RNAi amaçlı BSMV vektörüne klonlanmıştır. Böylece aday efektör genlerinin fonksiyonel analizinin gerçekleştirilmesi için gerekli olan HIGS vektörleri hazırlanmıştır.

Tez çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren Prof. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye, BSMV vektörlerinin tedariği için her türlü yardımı sağlayan Doç. Dr. Figen ERSOY'a (Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü) teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans dönemim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Hüseyin DİLEKLİ ve annem Filiz DİLEKLİ'ye, her türlü desteği ile yanımda olan İlke KIZILYAR'a ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Emrah AKPINAR, Metin Burak TATLİSES, Mutlu ŞEN, Hüseyin Gökberk DÜŞOVA, Elifgül AKSU ve İlayda KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK ARDEB tarafından "1002 Hızlı Destek Programları" kapsamında desteklenmiştir. (Proje No:122O072)

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	6
2.1. Tarımda Mikrobiyal Patojenler	6
2.2. Buğday ve Sarı Pas Hastalığı	7
2.3. Hastalık Etmeni, <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> (<i>Pst</i>)	9
2.4. Bitki-Patojen Etkileşimi	12
2.5. Buğday - <i>Pst</i> Etkileşimi	15
2.6. Eftörler.....	16
2.7. Eftör Protein/Genlerini Tanımlama.....	17
2.8. Eftör Adaylarının İşlevsel Analizi ve HIGS	19
2.9. Barley Stripe Mosaic Viruse (BSMV) Dayalı Gen Susturma Sistemi.....	21
BÖLÜM 3	23
MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Klonlama Vektörlerinin Temini.....	23
3.1.2. Eftör Aday Genlerin Seçimi	23

3.2. Yöntem.....	24
3.2.1 Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentinin Tasarımı ve Klonlanması	24
3.2.2. Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentinin Alt Klonlanması	28
3.2.3. Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentlerinin BSMV (pY) Vektörüne Klonlanması	32
BÖLÜM 4	39
BULGULAR.....	39
4.1 Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentlerinin Alt Klonlanması	39
4.2. Efektör Adaylarına Ait DNA Fragmentlerinin BSMV (pY) Vektörüne Klonlanması	41
4.2.1. PacI ve NotI Enzimleri İle Kesim	41
4.2.2. pY Vektörüne Klonlama ve Doğrulama	42
BÖLÜM 5	52
TARTIŞMA VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç(bp) :	baz çifti
CaCl₂ :	Calcium Chloride (Kalsiyum klorid)
EtBr :	Etidyum Bromür
dk :	dakika
mA :	miliamper
ml :	mililitre
ng :	nanogram
rpm :	revolutions per minute (dakikada dönme sayısı)
V :	Volt
µg :	mikrogram
µl :	mikrolitre
µM :	mikromolar
≤ :	küçük eşit
% :	Yüzde
\$:	Dolar
°C :	Santigrat derece

Kısaltmalar

ABD :	Amerika Birleşik Devleti
Avr :	<i>Avirülens</i> gen
as :	antisense (antisens)
ATMT :	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Mediated Transformation (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılı Transformasyon)
BSMV :	Barley Stripe Mosaic Virus (Arpa Çizgi Mozaik Virüsü)
CHS :	<i>chalcone syntase</i>
DNA :	Deoksiribonukleik asit
dsDNA :	double stranded Deoksiribonukleic acid (çift zincirli deoksiribonükleik asit)
dsRNA :	double stranded Ribonucleic acid (çift zincirli ribonükleik asit)
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
ETI :	Effector Triggered Immunity (Efektörle tetiklenen bağışıklık)
HIGS :	Host Induced Gene Silencing – Konak Aracılı Gen Susturulması
mRNA :	messenger Ribonucleic acid (mesajcı ribonükleik asit)
NB-LRR :	Nucleotide Binding Leucine Reach Repeat (Nükleotid bağlama bölgesi ve lösün bakımından zengin tekrarlar)
NF :	Nuclease Free (Nükleaz ari)
nt :	nükleotid
PAMP :	Pathogen Associated Molecular Patern (Patojen ilişkili moleküler motif)
PCR :	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
<i>Psh</i> :	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>hordei</i>
<i>Pst</i> :	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>
PTGS :	Post Transcriptional Gene Silencing (Trankripsiyon sonrası gen susturma)

PTI :	Pathogen Triggered Immunity (Patojenle tetiklenen bağıklık)
qRT-PCR :	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R :	Resistance (Direnç)
RdRp :	Ribonucleic acid dependent Ribonucleic acid Polymerase (Ribonükleik asit bağımlı Ribonükleik asit polimeraz)
RE :	Restriction endonuclease (Restriksiyon endonükleaz)
RISC :	Ribonucleic acid interference silencing complex (Ribonükleik asit interferans susturm kompleksi)
ROS :	Reactive Oxygen Species (Reaktif oksijen türleri)
RNA :	Ribonükleik asit
RNAi :	Ribonükleik asit interferans
s :	sense (sens)
siRNA :	short interfering Ribonucleic acid
UV :	Ultraviyole
VIGS :	Virus Induced Gene Silencing (Virüs Aracılı Gen Susturulması)
Yr :	Sarı pas dayanıklılık geni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Hastalık etmeninin muhtemel göç yolları (Schwessinger, 2017).	2
Şekil 2. 1. <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> 'nin yaşam döngüsü (Zheng vd., 2013).	10
Şekil 2. 2. Jones ve Dangl (2006) tarafından açıklanan, bitki ile patojen arasındaki moleküler etkileşimin birbirini izleyen adımlarını sunan Zig zag Modeli.	14
Şekil 2. 3. Bitki patojen efektör adaylarının belirlenmesi ve fonksiyonel analizi için kullanılan yöntemler (Prasad vd. 2019).	18
Şekil 2. 4. BSMV'nin 3 parçalı RNA genom yapısı (Lee, Hammond-Kosack & Kanyuka, 2012).	21
Şekil 2. 5. Susturulması hedeflenen gene özgü DNA fragmentinin γ genomuna sense ve antisense oryantasyonlu yerleşimi (Holzberg vd., 2002).	22
Şekil 3. 1. Efektör adayı <i>PGTG_07231T0</i> gen bilgileri, kodlayıcı dizi ve RNAi fragmenti (kırmızı işaretli bölge).	25
Şekil 3. 2. Efektör adayı <i>PGTG_11681T0</i> gen bilgileri, kodlayıcı dizi ve RNAi fragmenti (kırmızı işaretli bölge).	26
Şekil 3. 3. Efektör adayı <i>CBH50687.1</i> gen bilgileri, kodlayıcı dizi ve RNAi fragmenti (kırmızı işaretli bölge).	27
Şekil 3. 4. pJET1.2/blunt klonlama vektörü haritası.	29
Şekil 3. 5. RNAi fragmentinin klonlanacağı pY vektörler (<i>PDS: Python desaturase</i> genine ait RNAi fragmenti).	34
Şekil 4. 1. Efektör adaylarına özgü tasarlanan RNAi fragmentinin pJET1/2.blunt vektöre klonlanması.	40
Şekil 4. 2. Transformasyonun kontrolü için yapılan koloni PCR ürünleri.	40
Şekil 4. 3. PacI ve NotI uçlara sahip efektör adaylarına ait RNAi fragmentlerinin eldesi.	41
Şekil 4. 4. PacI ve NotI uçlara sahip pY.s ve pY.as vektörlerin eldesi.	42

Şekil 4. 5. pY.07231s ve pY.07231as vektörlerinin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu.	42
Şekil 4. 6. Seçilen kolonilerde PCR ile doğrulama (s1 ve s2 sonucu Şekil 4.8. 'de).....	43
Şekil 4. 7. pY.11681s ve pY.11681as vektörlerinin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu.	43
Şekil 4. 8. Seçilen kolonilerde PCR ile doğrulama.	44
Şekil 4. 9. pY.CBH50687.1s ve pY.CBH50687.1as vektörlerinin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu.	44
Şekil 4. 10. Seçilen kolonilerde PCR ile doğrulama.	45
Şekil 4. 11. PGTG_07231T0 sense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.	46
Şekil 4. 12. PGTG_07231T0 antisense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.	47
Şekil 4. 13. PGTG_11681T0 sense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.	48
Şekil 4. 14. PGTG_11681T0 antisense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.	49
Şekil 4. 15. CBH50687.1 sense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.	50
Şekil 4. 16. CBH50687.1 antisense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Efektör adaylarına ait RNAi fragmentinin çoğaltımı için PCR primerleri	28
Çizelge 3. 2. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri	29
Çizelge 3. 3. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri	30
Çizelge 3. 4. Ligasyon Pozitif Kontrol Reaksiyonu Bileşenleri	30
Çizelge 3. 5. Ligasyon Pozitif Kontrol Reaksiyonu Bileşenleri	30
Çizelge 3. 6. Efektör Adaylarına Ait Koloni PCR Bileşenleri ve Koşulları	32
Çizelge 3. 7. RE Kesim Reaksiyonu İçeriği.....	35
Çizelge 3. 8. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri	36
Çizelge 3. 9. Efektör Adaylarına Ait Koloni PCR Bileşenleri ve Koşulları	37

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Buğday, insanlar için önemli besin kaynağı olması nedeniyle dünya çapında en çok tarımı yapılan, ekonomik ve ticari önemi yüksek tahılların arasında yer almaktadır.

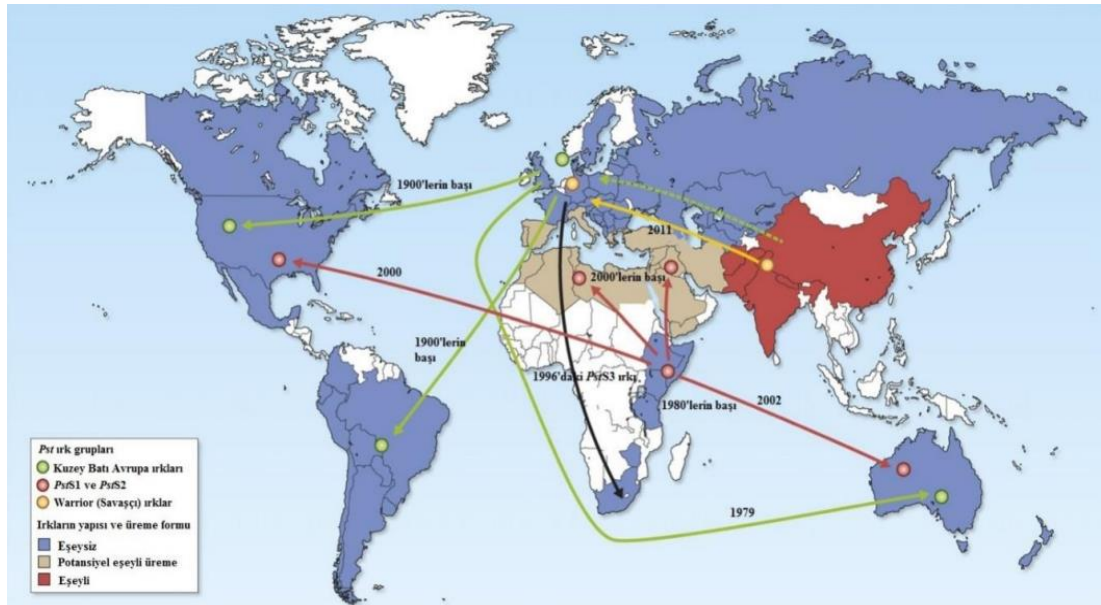
Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar dokuz milyarı aşacağı tahmin edilirken bu durum karşısında mahsul üretiminin de artırılması zorunluluğu kaçınılmazdır. Bu nedenle, yıllık tahıl üretiminin yaklaşık 1 milyar ton artması gerektiği tahmin edilmektedir (Green vd., 2016). Ancak küresel nüfusun hızlı artışı dolaylı olarak da olsa tarım alanlarının azalmasına neden olmaktadır. Böylece artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak üzere azalan tarım alanlarından daha yüksek ve kalitede verim elde etmek gerekmektedir. Bu talebi karşılamada yaşanan başlıca sorunlardan biri bitki patojenleridir. Patojenik mantarlar en ciddi verim kayıplarıyla sonuçlanan bitki hastalıklarına sebep olmakta ve küresel gıda güvenliği için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Pas patojenleri, buğdayın evcilleştirilmesinden günümüze kadar geçen süre içerisinde buğday üretimini tehdit eden biyotik zorluklardan biridir (Roelfs, 1992).

Buğdayda pas hastalıklarına sebep olan patojenler, kontrol altına alınmadığı ve hastalık önlenmediği takdirde ürün veriminin %50-100 arasında kaybına neden olabilmektedirler (Chen, 2005). Patojenlerin sebep olduğu buğdayda pas hastalıklarının verime ve dolayısıyla ekonomiye etkisi hastalığın şiddetine bağlı olarak değişebilmektedir. Pas patojenlerinden kaynaklanan küresel ekonomik kayıp yıllık 5.5 milyar ABD doları seviyelerine çıkmaktadır (Beddow vd., 2015).

Pas mantarları zorunlu biyotrofik organizmalardır yani büyümeleri ve üremeleri için tamamen konakçısı olan bitkilerinin canlı hücrelerinden elde edecekleri besin kaynaklarına bağımlıdırlar (Duplessis vd., 2011). Buğdayda *Puccinia* cinsi *Basidiomycete* ailesinin neden olduğu 3 tür pas hastalığı vardır. Bunlar; sap (kara), şerit (çizgi/sarı) ve yaprak (kahverengi) pasıdır (Dessalegn, Ayele & Tesfaye, 2019; McIntosh, Wellings & Park, 1995).

Bunlar arasında *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*)'nin sebep olduğu sarı pas hastalığı, buğdayda en ciddi verim ve kalite kayıplarıyla sonuçlanandır ve dünyada 60'tan fazla ülkede sarı pas hastalığına rastlanılmaktadır (Wellings, 2011). Bu ülkeler arasında Türkiye de yer almaktadır (Dusunceli, Cetin, Albustan & Beniwal, 1996). 2010 yılında ülkemizde özellikle Orta Anadolu'da meydana gelen salgın sonucu 10 milyon ABD doları olarak tahmin edilen verim kaybına neden olmuştur (Chen, 2020).

Sarı pas etmeni *Pst*, buğdayın tek yapraklı döneminden, yeşil aksamını koruduğu olgunluk dönemine kadar olan süreç içerisinde her zaman buğdayda enfeksiyona neden olabilmektedir. Yaprak yüzeyini kapladığından, enfekte ettiği bitkilerin yapraklarında, özellikle de bayrak yaprakta fotosentezi kısıtladığından ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Chen, 2005). Hastalığın uzun mesafelere yayılmasında en önemli etmen rüzgar olmakla birlikte insanların eşya ve kıyafetleriyle de pas sporları uzak mesafelere taşınabilmektedir (Şekil 1.1.).



Pst zorunlu biyotrof olduğundan yaşam döngüsünü konakçıları üzerinde tamamlamaktadır. Patojenin 2010 yılına kadar alternatif konukçusu bilinmezken, Jin (2010) hassas *Berberis* türlerinin patojenin alternatif konukçusu olduğunu ortaya çıkarmıştır. *Pst*, *Berberis* türleri üzerinde eşeyli üreme, mutasyonlar veya somatik hibridizasyonlar geçirerek dayanıklı olarak bilinen buğday genotiplerini hastalandırabilen yeni ırklar oluşturmaktadır (Lorrain, Gonçalves dos Santos, Germain, Hecker & Duplessis, 2019). Dolayısıyla hastalığın erken dönemde önüne geçilebilmesi için etkin ve en hızlı yöntemlerden biri, yabancı otları üretim alanlarından uzaklaştırmak; hastalık etmeninin alternatif konakçıları bertaraf etmektir.

Pas hastalıklarının kontrolü için uygulanan stratejiler esas olarak direnç ıslahına, fungusit kullanımına ve biyolojik kontrole bağlıdır. Uzun yıllar ıslahçılar bitkide dayanıklılık genleri ve mekanizmalarını hedef alan araştırmalar yürütmüşler ve bu hedefe dayalı hastalık yönetimi stratejilerini kullanarak sürekli dayanıklı yeni çeşitler geliştirmeye yönelmişlerdir. Ancak pas mantarlarının hızla evrime uğradığı ve kısa bir süre içinde geliştirilen bu yeni dayanıklı çeşitlere kolayca adapte olduğu gözlenmiştir (Prasad, Savadi, Bhardwaj, Gangwar & Kumar, 2019). Fungusit kullanımının da çevreyi kirletme, fungusitlere dirençli yeni patojen ırklarının ortaya çıkmasına sebep olma ve üretim maliyetlerinin artmasına sebep olma gibi olumsuzlukları mevcuttur.

Bir enfeksiyonun başarısı patojenin konukçusu üzerinde üremesi ve yayılmasına bağlıdır. Konukçu bitki ve patojen arasındaki karmaşık moleküler etkileşimler sonucunda patojenin evriminde konukçusu oldukça büyük bir öneme sahiptir (Möller ve Stukenbrock, 2017).

Patojenler konukçularını enfekte etmeye çalışırken bitkinin savunma cevabıyla karşılaşmaktadırlar. Bu savunma cevabını aşabilmek için patojenler *Avirülens* (Avr) genlerinin ürünü olan efektör proteinleri salgılamaktadır. Efektörler, bitki patojenleri tarafından, konak savunmasını alt etmek üzere geliştirilen virülens faktörlerdir. Efektörler, enfeksiyon gelişimi için konak hücrelerinde hem transkripsiyonu hem de metabolik süreci yeniden düzenlemektedir. Bunun için de konak hücrenin birçok molekülü ile etkileşime girmektedir. Dolayısıyla efektörleri tespit etmek, karakterize etmek her bir efektörün konakçı bitkideki moleküler etkileşimlerini anlamayı sağlayacaktır. Ayrıca, efektörleri bilmek, konakçı bağışıklığının ve fizyolojisinin

manipölasyonuna olanak tanır ve hızlı, etkin dayanıklılık ıslahı ve hastalıkla mücadele için önemli veriler sunar (Figueroa vd., 2016). Bu nedenle son yıllarda moleküler bitki-patojen etkileşimi alanındaki çalışmalar efektörleri ve kodlayıcı genlerini tespit etmeye yoğunlaşmıştır.

Farklı patojenlere ait tanımlanan efektör proteinler incelendiğinde genel olarak yapısal ve nükleotid dizi homolojisi açısından anlamlı bir ortaklık görülmemektedir. Ancak efektör proteinler için genel olarak kabul edilen ortak birkaç özellik bulunmaktadır. Bunlar; küçük boyutlu oluşları, yüksek sistein içeriğine sahip olmaları ve taksonomik özgüllük olarak sıralanabilmektedir. Bu özellikler, gerek transkriptom, gerekse proteom ve sekretom analizlerinde aday efektörleri tahminlemek için kullanılmaktadır. Salgılanan proteinleri kodlayan genler arasından aday olarak seçilenlerin sayısı kullanılan kriterlere bağlı olarak değişebilmektedir, ancak genom başına 1000 ila 2000 gen olabileceği öngörülmektedir. Bunlardan bazıları gen aileleri şeklindedir ve *Pucciniales*'e özgü aday efektörler arasında yer almaktadır (Aime, McTaggart & Duplessis, 2017). Son 10 yıllık süreçte başta genomiks, transkriptomiks, proteomiks olmak üzere efektöromiks ve sekretomiks çalışmalarla buğday pas mantarları için uzun bir aday efektör listesi oluşturulmuştur (Demirci vd., 2016). Ancak veritabanlarında yer alan mevcut bilgilerin analizi sonucu ortaya konan adayların sayısı binleri bulurken fonksiyonel olarak doğrulananların sayısı oldukça azdır. Bu nedenle aday genlerin hızlı ve etkin biçimde fonksiyonel doğrulanmasına gereksinim duyulmaktadır.

Efektör adaylarının fonksiyonlarının belirlenmesinde; bitki hücre ölümü testi, kalloz birikiminin gözlenmesi, enfeksiyon testi, konak aracılı gen susturulması (HIGS) yöntemi, immünolokalizasyon, yapısal homolojilerin taranması, Western Blot analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Pas mantarlarının efektörlerini araştırmak için son 5 yılda uygulanan farklı stratejiler ve yaklaşımlar arasında hızı ve etkinliği ile virüs aracılı gen susturma yöntemi öne çıkmaktadır (Lorrain, Petre & Duplessis, 2018).

Gen susturma yöntemleri efektör aday genlerinin fonksiyonlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır (Prasad vd., 2019). Bu amaçla özellikle Virüs Aracılığıyla Gen Susturma (VIGS) yöntemi, son 10 yıldır yaygın olarak kullanılmaktadır (Garg, Sharma & Ghosh, 2021). Bitki genlerinin fonksiyonel analizinin yanı sıra, son yıllarda bitki

patojen etkileşimlerinin ortaya çıkarılması ve patojen genlerinin fonksiyonlarının tespit edilmesinde de konak aracılı VIGS yaklaşımı olan HIGS kullanılmaktadır (Panwar, McCallum& Bakkeren, 2013). HIGS, Son yıllarda belirlenen efektör adaylarının gerçek efektörler olup olmadığının tespiti ve işlevlerinin ortaya konması için kullanılan yöntemler arasında bir adım öne çıkmaktadır (Panwar ve Bakkeren, 2017). HIGS yöntemi, patojen genlerine özgün olarak tasarlanan, viral genoma entegre edilen ancak bitkide üretilen küçük RNA'lar aracılığıyla bitkiyi enfekte eden patojenlerin genlerinin susturulmasını sağlayan RNAi tabanlı bir yöntemdir (Panwar vd., 2013). HIGS yöntemi, mantarların neden olduğu tahıl hastalıklarını kontrol etmek ve patojenlerin fonksiyonlarını belirlemek için etkili bir yaklaşım sağlamaktadır (Panwar, Jordan, McCallum & Bakkeren, 2018; Panwar vd., 2013).

Bu tez çalışmasında; sarı pas hastalığından kaynaklanan verim ve kalite düşüklüğüne bağlı olarak gıda güvenliği tehdidi nedeniyle, belirlenen efektör aday genlerine ait DNA fragmentlerinin buğdayda RNAi için kullanılan BSMV vektörüne yapılacak klonlama sonucunda oluşturulacak rekombinant vektörler sayesinde; efektör adaylarının fonksiyonel olarak test edilip gerçek efektörler olup olmadığı, hücre içi konumu, etkileşime geçtiği konukçul faktörleri belirleyebilmek için gerekli HIGS vektörleri hazırlanması amaçlanmıştır. Bu sayede efektör aday genlerinin tanımlanması hedeflenmiştir. Dolayısıyla başka efektör adaylarının da etkin biçimde klonlanması için gerekli yöntem ve koşullar optimize edilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan klonlama çalışmaları sayesinde efektör aday genlerinin tanımlanması için en kritik adımlardan biri olan BSMV vektörüne klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan rekombinant vektörler ile, ilgili patojenin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı yeni stratejiler geliştirilmesine başlangıç oluşturmak hedeflenmiştir. Bu yöntem temel alınarak geliştirilecek stratejiler göz önünde bulundurulduğunda; tarımda ilaç kullanımını azaltmak ve buna bağlı olarak maliyet kayıplarının önüne geçmek, ekolojik dengenin bozulmasına engel olmak gibi amaçlara ulaşılacaktır.

BÖLÜM 2

2.1. Tarımda Mikrobiyal Patojenler

Bitkiler, yaşamları süresince çeşitli mikroorganizmalar tarafından tehdit altındadır (Glazebrook, 2005). Farklı mikroorganizmalar kendi yaşamlarını sürdürmek ve çoğalmak üzere bitkileri enfekte etmek için farklı stratejiler kullanmaktadır.

Biyotrofik mikroorganizmalar yaşamlarını devam ettirebilmek için konukçularına ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle konukçularının yaşamına fazla zarar vermeden konukçularından besin ihtiyaçlarını karşılarlar. Bitki patojenlerinden paslar gibi bazı funguslar biyotrof sınıfında yer almaktadır. Nekrotrofik patojenler ise biyotrofik patojenlerin aksine konukçu oldukları bitki hücrelerini öldürerek bu hücrelerden besin ihtiyaçlarını karşılamakta ve yaşamlarını sürdürmektedirler. Nekrotrofik patojenler, bitkinin hücre duvarı polimerlerinin yıkılmasına yol açan enzimler, diğer hücrelerarası enzimler ve fitotoksinler kullanarak konukçu hücrelerin ölümüne sebep olmaktadır (Alfano ve Collmer, 1996; Walton, 1996). Hemibiyotrofik patojenler ise hem biyotrofik patojenlerin hem de nekrotrofik patojenlerin belli özelliklerini taşımaktadırlar. Hemibiyotroflar, konukçu oldukları bitkilerin infeksiyonunun başlangıcında biyotrofik formda davranmaktadır. İnfeksiyonun daha ileri safhalarında ise nekrotrofik özellik göstermektedirler (Gebrie, 2016; Perfect ve Green, 2001). Patojenik mantarlar, biyotrof, nekrotrof ya da her ikisinin de özelliklerini barındıran hemibiyotrof yaşam şekline adapte olmuşlardır (Dou ve Zhou, 2012; Guttman, McHardy & Schulze-Lefert, 2014; Pusztahelyi, Holb & Pócsi, 2015). Patojen mikroorganizmaların konukçu bitkilerinden besin temin etme şekillerindeki bu farklılıklar konukçu oldukları bitkilerin savunma yanıtlarındaki farklılıklara da yol açmaktadır.

Funguslar, ekosistemdeki en büyük ökaryotik çeşitliliğe sahip bitki patojen grubudur. Doğada yaklaşık 1.5 milyon fungus türü olduğu bilinmekte ve bunların 20 binden fazlası bitkilerde enfeksiyon oluşturmaktadır (Hawksworth, 2001).

Bitki biyotrofik fungal patojenleri, bitki patolojisi için uluslararası kabul görmüş en önemli on patojen arasındadır (Dean vd., 2012). Pas ve küllemenin de içinde bulunduğu zorunlu parazit bitki mantarları geniş bir gruptur. Pas mantarları, bilinen 8.000'den fazla türden oluşmaktadır ve en önemli mantar takımlarındandır (Aime, Toome & McLaughlin, 2014; Lorrain vd., 2019). Bu parazitler çok çeşitli bitkilere saldırarak ciddi hasarlara neden olmaktadır (Lorrain vd., 2019).

2.2 Buğday ve Sarı Pas Hastalığı

Buğday, adaptasyon yeteneğinin yüksek ve yetiştirilmesinin kolay olması sebebiyle eski çağlardan günümüze kadar kullanılan başlıca besin kaynağıdır. İnsan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında dünyada ekim alanı bakımından birinci, üretim bakımından ise mısır ve çeltikten sonra üçüncü sırada yer almaktadır.

Dünya nüfusunun hızla artması sonucunda, gıda güvenliği ve dengeli beslenme ile birlikte bitkisel ürünlere olan talep her geçen gün artmaktadır. Besin ihtiyacının karşılanması; mevcut ekim alanlarının artırılmayacağı göz önünde bulundurulduğunda, birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılmasıyla mümkün olacaktır. Üreticilerin karşılaştığı başlıca zorluklardan biri bitki patojenleridir. Patojenik mantarlar en ciddi verim kayıplarıyla sonuçlanan bitki hastalıklarına sebep olmakta, ekonomi ve küresel gıda güvenliği için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.

Buğday patojenik mantarları arasında paslar önemli bir yer tutmaktadır. Bunlardan biri olan sarı pas (çizgi pası, şerit pası) hastalığı ilk kez 1777 yılında Gadd tarafından tanımlanmıştır (Roelfs, 1992). Ancak Eriksson ve Henning (1896) bu hastalığının ayrı bir patojen tarafından meydana getirildiğini bildirmiş ve hastalık etmenini *Puccinia glumarum* olarak isimlendirmiştir. Patojenin ismi, Hylander ve ark. (1953) tarafından günümüzde de kullanılan şekliyle *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) olarak değiştirilmiştir (Singh, Duveiller & Huerta-Espino, 2012). Hastalık etmeninin sporları, coğrafi olarak birbirinden uzak olan Amerika kıtasından Avustralya'ya (Wellings, 2007), Avrupa'dan Doğu Afrika ve Batı Asya'ya, Orta

Doğu'dan Güney Afrika'ya (Boshoff vd., 2002) kadar rüzgarla kıtalar arası taşınabildiği bilinmektedir. Bu nedenle dünyada buğday üretim alanları için aynı risk söz konusudur. Sarı pas hastalığı son 15 yıl içinde, buğday üretimini sınırlandıran en önemli biyotik faktör olarak görülmekte (Schwessinger, 2017) ve dünya buğday üretiminin % 88'inin bu hastalığa karşı hassas olduğu bilinmektedir. Yıllık 5 milyon ton ürün kaybı olduğu ve bu kaybolan ürünün pazar değerinin 1 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Beddow vd., 2015; Schwessinger, 2017; Wellings, 2011). Sarı pas hastalığı, genellikle düşük sıcaklıkta ve yüksek nem koşullarında görülebilen bir hastalıktır. Ancak son yıllarda hastalığa sık rastlanılmayan, nispeten daha sıcak iklimlerde de önemli epidemilerin meydana geldiği bilinmektedir (Hovmöller vd., 2011; Mboup vd., 2009). Bu durum, *Pst*'nin yüksek sıcaklıklara adapte olan yeni bir ırk geliştirdiği yönünde değerlendirilmektedir (Markel ve Milus, 2008).

Pas mantarları zorunlu biyotroftur, yani sadece canlı konakçılarda çoğalabilmektedir. Bu nedenle biyotrofik yaşam tarzlarını sürdürmek için konakçılarıyla karmaşık etkileşimler kurmakta ve birlikte evrimleşmektedirler (Duplessis vd., 2011). Pas mantarları, yaşam döngülerini alternatif konakçılarda tamamlamaktadırlar. *Pst* alternatif konağı olan *Berberis*'de eşeyli üreme ile çoğalmakta ve bu sırada rekombinasyonlar, mutasyonlar veya somatik hibridizasyonlarla yeni ırklar oluşturacak şekilde değişikliğe uğramaktadır. Üreticiler ve bilim insanları sarı pasa dayanıklı buğday çeşitleri geliştirmeye odaklanırken, *Pst* de bu yeni çeşitlerin savunmasından kurtulacak daha virulent ırklar oluşturmak üzere evrimleşmektedir. Hızlı evrimleşme, rüzgarla çok uzak alanlara taşınma ve ekilen çeşitlerin büyük oranda hassas olması, pandemi durumunda %90'lara varan verim kayıplarının yaşanması nedeniyle *Pst*, 21. yüzyılda, küresel buğday üretimine yönelik en büyük biyotik tehditlerden biri olarak görülmektedir (Bux vd., 2012; Chen vd., 2014; Schwessinger vd., 2017).

Sarı pas hastalığının ortaya çıkması ile oluşabilecek tahribat, iklim koşullarına, patojenin ırklarının virülens özelliklerine ve konukçu genotipine bağlı olarak değişebilmektedir. Bununla birlikte, hastalığın kontrolünde, erken dönemden itibaren buğday ekim alanlarının periyodik olarak izlenmesi büyük önem taşımaktadır (Martinez vd., 2012). Bu sayede sarı pas hastalığını kontrol etmek hem daha kolay hem de daha ekonomik bir mücadele yöntemi olmaktadır. Bunun yanı sıra yabancı otlarla zamanında mücadele, tarla içerisinde veya çevrisinde, paslarda yeni ırkların oluşumunda önemli bir

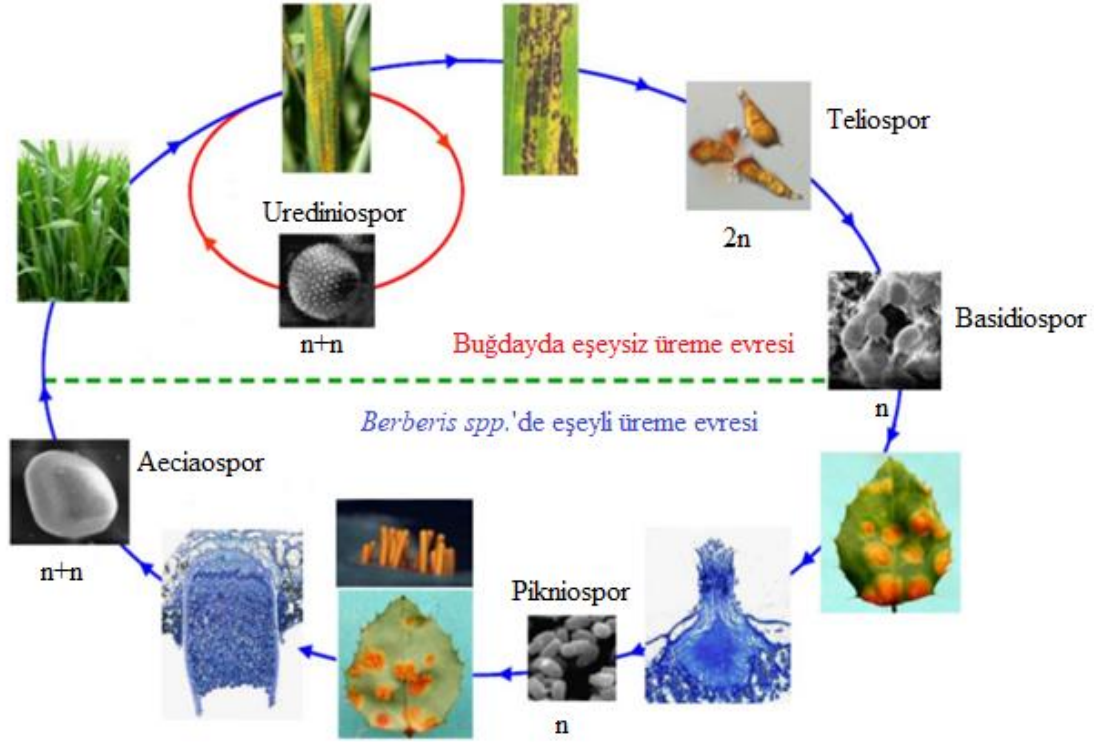
etken olan ara konukçuların (*Berberis* spp., vs.) imha edilmesi, özellikle de hastalığa dayanıklı buğday çeşitlerinin kullanılması da önemli uygulamalardır.

2.3. Hastalık Etmeni, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*)

Sarı pas hastalığı, buğdayın dışında başka tahıl türlerinde de görülmektedir ve hastalığın görüldüğü her bir bitki türüne göre etmen de farklı isimlendirilmektedir. Eriksson (1894) hastalık etmenini konukçu-patojen ilişkisine göre 5 farklı şekilde sınıflandırmıştır. Bunlar sırasıyla buğdayda *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*), arpada *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* (*Psh*), çavdarda *Puccinia striiformis* f. sp. *secalis*, yabani arpa türlerinde (*Elymus* spp.) *Puccinia striiformis* f. sp. *elymi* ve ayrıktta (*Agropyron* spp.) *Puccinia striiformis* f. sp. *agropyri*'dir. Diğer buğdaygil yem bitkilerinde de konukçuya özel patojen adlandırmaları olduğu bilinmektedir (Çat, Tekinalp, Çatal, Akan & Akar, 2017).

2010 yılına kadar *Pst*'nin ara konukçusu belirlenememiştir. Bu yüzden patojenin hayat döngüsünü, yalnızca ana konukçusu olduğu türler üzerinde urediniospor ve teliospor formlarında tamamlandığı düşünülmekteydi. Ancak *Berberis* spp. türlerinin ve *Mahonia aquifolium* türünün hastalığın ara konukçuları olduğu raporlanmıştır (Jin, Szabo & Carson, 2010; Wang ve Chen, 2013; Zhao vd., 2013). *Pst*'ye ait pikniospor ve aeciaosporların *Berberis* spp. türlerinde görüldüğü rapor edilmiştir. *Mahonia aquifolium* türünde ise *Pst*'nin eşeyli üreme dönemini geçirdiği bildirilmiştir (Wang ve Chen, 2013; Zhao vd., 2013). *Pst*'nin yaşam döngüsü göz önünde bulundurulduğunda (Şekil 2.1.) *Pst*'nin konukçusu olan bitkileri enfekte edebilmesi için bitkilerin olgunlaşması ve hastalık gelişimi için uygun iklim koşullarının olması gerekmektedir. Bu şartların sağlanmadığı mevsimlerde *Pst*'nin, daha önce enfeksiyona yol açtığı bitkiler üzerinde teliospor formuna geçtiği bilinmektedir. Uygun koşullar oluştuğunda teliosporlar çimlenerek basidiosporları oluşturmaktadırlar. Oluşan basidiosporlar, hastalık etmeni *Pst*'nin ara konukçusu olduğu rapor edilen *Berberis* spp. veya *Mahonia* spp. bitkilerini enfekte etmektedir. Daha sonra bu bitkilerin yapraklarının üst yüzünde pikniosporlar, alt yüzünde ise aeciaosporlar oluşmaktadır. Oluşan aeciaosporlar rüzgarla *Pst*'nin ana konukçusu olan buğday yaprakları üzerine taşınarak uygun sıcaklık ve nem koşullarında çimlenmekte ve urediniosporları oluşturmaktadır. Oluşan urediniosporlar da uygun iklim koşullarında konukçu bitkileri enfekte etmektedirler. Hastalığın oluşması için

uygun iklim şartlarının olmadığı durumlarda konukçu bitkilerde teliosporlar oluşmakta ve döngü tamamlanmaktadır. Eğer urediniospor formunda hastalığın oluşması için uygun iklim şartları seyrederse yeni bitkilerin sürekli enfeksiyonu sonucu küresel boyutta pandemiler meydana gelebilmektedir (Chen, 2020).



Şekil 2. 1. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin yaşam döngüsü (Zheng vd., 2013).

Pst konağına bağlı ve konağıyla birlikte olarak hızla evrimleşebilen bir patojendir. Bu nedenle sıklıkla yeni ırklar keşfedilmektedir. Küresel boyutta buğday üretiminde büyük bir tehdit haline gelen sarı pas hatalığına karşı dirençli çeşitlerin geliştirilmesi, dayanıklılık genlerinin tanımlanması ve hastalığa sebep olan patojenin hangi bölgelerde hangi ırklarının daha yoğun bir şekilde bulunduğu tespit edilmesine yönelik çalışmalar yürütülmektedir. Bu konudaki ilk çalışma Gassner ve Starib tarafından 1932 yılında Almanya'da yürütülmüştür. Çalışma sonucunda *Pst* ırklarının oluşumunda ve hızla yeni ırkların çıkmasındaki önemli sebeplerden birinin mutasyonlar olduğu ortaya konmuştur. Patojen, avirülens yapıda iken virülens hale gelme ya da bunun tam aksi durumun yarattığı farklılığın sebebi tek nokta mutasyonlarından kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Pst patojenine ait ırklar, farklı dayanıklılık genleri (*Yr*) taşıyan bitkilerden oluşan ırk ayırım setleri kullanılarak, bitki üzerindeki virülens ve avirülens analizlerine göre sınıflandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, farklı ekim alanlarının özellikleri dikkate alınarak farklı ırk ayırıcı setler geliştirilmiştir. ırk ayırıcı setlerin kullanıldığı farklı çalışmalarla birlikte patojene ait birçok ırk olduğu bildirilmiştir.

Son yıllarda bu tip çalışmalar sonucunda sarı pas hatalığına sebep olan Çin'de 54 (Zhan vd., 2012), Pakistan'da 12 (Bahri vd., 2011), Amerika'da 55 (Wan, Chen & Yuen, 2016) *Pst* ırkı belirlenmiştir.

Pst'nin hızla evrimleşmesi sonucu ortaya çıkan yeni ırklar, mevcut *Yr* genlerinin de direnç özelliklerini hızla değiştirerek bilinen genlere virülens olabilmekte ve dayanıklılık genlerinin kırılmasına neden olarak epidemilere hatta pandemilere neden olabilmektedir. Buna bağlı olarak Çin, Doğu Afrika, Orta Doğu, Pakistan, Hindistan ve Kuzey Afrika'yı da içine alan geniş bir alanda 1970'lerde büyük bir pandemi meydana gelmiştir (Saari ve Prescott, 1985). Bu pandeminin sebebi net bir şekilde açıklanamamakla birlikte McIntosh 2009 yılında yaptığı çalışmada pandemi meydana gelen bölgelerde ekimi yapılan buğday çeşitlerinin içerdiği *Yr2* dayanıklılık geninin hastalığa karşı etkinliğinin yitirmesi sonucu meydana gelmiş olabileceğini bildirmiştir. Benzer şekilde *Yr9* dayanıklılık geninin hastalığa karşı etkinliğini yitirmesi sonucu, Orta Doğu, Hindistan ve Pakistan'da ciddi verim kayıplarına sebep olduğu bildirilmiştir (Singh, William, Huerta-Espino & Rosewarne, 2004). Bu pandeminin bu kadar büyük alanı etkilemesinin sebebinin Etiyopya, Yemen ve Eritre'de 1986'larda mutasyon sonucu oluşan yeni bir hastalık ırkından kaynaklandığı düşünülmektedir (Louwers ve Sharma, 1992; Walter vd., 2016). Yine *Yr9* dayanıklılık geninin kırılması sonucu Çin'de %80'lere varan verim kayıplarının yaşandığı rapor edilmiştir (Wan vd., 2004). Batı Afrika'dan ülkemize taşınan *Pst* ırklarının 1991 yılında, *Yr9* dayanıklılık geni içeren ve ülkemizin güney kesiminde yoğun bir şekilde ekimi yapılan Seri-82 çeşidinde %50-60 oranında verim kaybına neden olmuştur ve bu epidemi sonrasında Seri-82 çeşidi üretim programlarından kaldırılmıştır (Mamluk vd., 1997). Daha yakın tarihli (2009-2010) olan ve ülkemizin Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde etkisini arttırarak Ankara, Konya, Eskişehir, Çukurova, Samsun, Amasya, Uşak gibi önemli buğday üretim alanlarında yüksek verim ve kalite kayıplarına yol açan epidemiyeye ise Suriye'den yayılan yeni bir patojenin neden olduğu rapor edilmiştir (Mert, 2010).

Sarı pas hastalığının dünya üzerinde uzun mesafelerde yayılmasının başlıca sebebi rüzgardır. Bunun yanında *Pst* sporlarının seyahat eden insanların kıyafetleri üzerinde de farklı yerlere taşındığına dair kayıtlar bulunmaktadır. 1979'da Avustralya'da, Avrupa'dan seyahat eden turistlerin eşyaları üzerinde *Pst* urediniosporlarının taşındığı tespit edilmiştir (Wellings, McIntosh & Walker, 1987).

2.4. Bitki-Patojen Etkileşimi

Bitkiler, patojen saldırılarını algılamak ve bu saldırılara karşı koymak üzere evrim süresi boyunca çeşitli savunma stratejileri ve mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar: tüylülük, mumlaşma, kütikula tabakasının kalınlaşması gibi pas sporlarının bitki yüzeyine tutunmasını ve dokulardan girişini engellemek üzere fiziksel bariyerler; patojen girişini engelleyen biyokimyasal reaksiyonlar; patojenin girişinden sonra bitkinin salgıladığı toksik bileşikler ve bitkilerin kalıtsal dayanıklılıkları şeklinde sıralanabilmektedir (Değirmenci ve Ertunç, 2010). Bazı bitkilerde, yetişkin bitki direnci, mantar patojenlerinin daha kalın ve daha sert hücre duvarlarından geçme yeteneğinin azalmasıyla bağlantılıdır (Guest ve Brown, 1997). Kütikula tabakasının kalınlaşması, yaprak yüzeyinde biriken kütin ve mumdan oluşmaktadır, bu nedenle üzerinde su tutulamaz hale gelmekte ve su yokluğunda sporların çimlenmesi engellenmektedir.

Patojenin türüne göre bitkiye giriş şekilleri de farklılık göstermektedir. Biyotrofik patojenler bitkiye, stoma ve yaralar aracılığıyla giriş yaparken, bazı funguslar özel enfeksiyon yapıları ile veya bitki hücre duvarlarını eriterek, nematodlar ise iğneye benzer styletleri aracılığı ile bitkiye giriş yapmaktadırlar.

Bitki savunma sistemi, bitki-patojen etkileşimi sonucu gelişen “uyumlu (compatible)” ya da “uyumsuz (incompatible)” tepkiye göre uyarılarak harekete geçmektedir.

Herhangi bir patojen saldırısında konak bitki, temel dayanıklılık mekanizmasına sahip değilse; uyumlu bitki-patojen etkileşimi gerçekleşmekte ve saldırı hastalık gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Yani patojen enfeksiyonda başarılı olmaktadır. Başka bir ifadeyle, patojenin ürettiği virülens faktörler/elisitörler bitkinin savunma reseptörleri tarafından tanınmazsa hastalık gelişmektedir.

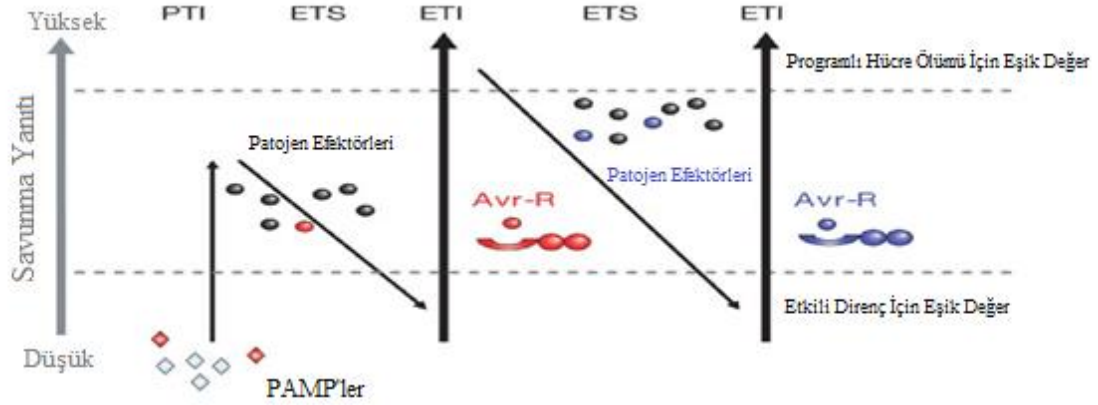
Uyumsuz bitki-patojen etkileşiminde ise patojen saldırısı durumunda, bitki savunma yolları uyarılarak aktif hale gelmekte ve patojen, bitkinin savunma reaksiyonlarını durduramamaktadır. Konukçu bitki, patojeni algılayarak kendi savunma sistemini harekete geçirmekte ve patojenin kolonizasyonu engellemektedir (Doughari, 2015).

Bitki-patojen etkileşimlerinde enfeksiyona dirençli ve hassas bitkiler arasındaki en önemli fark, patojenik sinyal moleküllerinin, virülens faktörler/elisitörlerinin konak bitki tarafından zamanında algılanması ve savunma mekanizmalarının etkin bir şekilde aktive olmasıdır.

Bitkilerde, patojen saldırılarına karşı koymak için virülens faktörler/elisitörlerinin tanınması birinci aşamadır. Bu tanımaya göre bitkiler, iki farklı bağışıklık basamağı kullanacak şekilde evrimleşmişlerdir. (Jones ve Dangl, 2006). Bitkilerde bazal savunma olarak bilinen ilk savunma cevapları, tüm potansiyel patojenlere karşı etki etmektedir ve patojenlerde korunmuş olan “patojen/mikrop ilişkili moleküler motiflerin (PAMP'ler)” tanınmasıyla başlamaktadır. PAMP'lerin tanınmasıyla savunma genlerinin ekspresyonu indüklenmektedir. Dolayısıyla “PAMP ile tetiklenen bağışıklık” (PTI) aktive edilmektedir. Ayrıca konak hücreleri tarafından enfeksiyona karşı; antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, yoğun reaktif oksijen moleküllerinin (ROS) üretimi ve birikimi gerçekleşmektedir ve hücre duvarını güçlendirmek amacıyla enfeksiyon bölgesinde kalloz birikimi olmaktadır (Jones ve Dangl, 2006).

PTI sonrası, konak bitkinin ortaya koyduğu bu savunma cevabına karşı, patojenler efektör olarak adlandırılan virülens proteinleri ile savunmayı baskılamakta veya savunmadan kaçmaktadırlar. Günümüze dek karakterize edilmiş fitopatojenik efektörlerin, konukçu savunma mekanizmasını baskılamayı hedeflediği gözlemlenmiştir. Efektörler, patojende, *Avirülens* (Avr) genleri tarafından kodlanmaktadır. Konak savunma mekanizmasının önemli bileşenlerinden biri olan dayanıklılık (*R*) proteinleri tarafından tanınan efektör proteinleri, konak *R* genlerinden kaçmak amacıyla mutasyona uğrayarak sürekli evrimleşmektedir. Efektör proteinler sentezlendikten sonra konukçu hücrelerine dağılmakta ve patojen tanımada rol alan proteinlerin ekspresyonunu baskılamak ve böylece patojenin virülensliğini arttırmak

üzere görev yapmaktadırlar (Lorrain vd., 2019). Bunun sonucunda bitkiler ise efektörleri tanıma etkili yeni reseptörler geliştirme yönünde evrimleşmişlerdir (Şekil 2.2.).



Şekil 2. 2. Jones ve Dangl (2006) tarafından açıklanan, bitki ile patojen arasındaki moleküler etkileşimin birbirini izleyen adımlarını sunan Zig zag Modeli.

Birçok efektör, bitki hücrelerinde bulunan özel nükleotid bağlama bölgesi ve lösün bakımından zengin tekrarları içeren NB-LRR proteinleri tarafından tanınmaktadır. NB-LRR proteinleri bitkilerin patojenlere karşı savunma amaçlı geliştirdikleri *R* genleri tarafından kodlanmaktadır. *R* proteinleri tarafından efektörlerin tanınması sonucu bitkide efektör ile tetiklenen daha güçlü bir savunma cevabı olan “Efektör ile tetiklenen bağışıklık” (ETI) hızla gelişmektedir (Jones ve Dangl, 2006). *R* proteinleri efektörler ile reseptör-ligand biçiminde etkileşerek bitkide o patojene özgü güçlü bir savunma reaksiyonları serisini aktive etmektedir. Bir başka deyişle belli patojen ırkları ancak o ırka özgün *R* proteini taşıyan bitkilerce tanınabilmekte ve ancak bu koşulda bitki patojen saldırısını durdurabilmektedir. Aksi takdirde bitki patojeni tanıyamamakta ve hastalık gelişmektedir (Eckardt, 2006). Bitkinin ETI'ye yol açan *R* proteinleri geliştirmesi, patojenin de yeni efektörler geliştirmesine veya ETI'yi alt etmek üzere yeni saldırı stratejileri geliştirmek üzere evrimleşmesine yol açmaktadır (Şekil2.2.) (Jones ve Dangl, 2006). Sonuç olarak birçok efektörün, patojenlerin konakçıda yerleşmesi, çoğalması ve kolonizasyonu için bitki savunma mekanizmalarını baskıladığı tespit

edilmiştir (Dou ve Zhou, 2012; Guo, Tian, Wamboldt & Alfano, 2009; Harris vd., 2020; Sohn Sohn, Lei, Nemri & Jones, 2007).

2.5. Buğday - *Pst* Etkileşimi

Bitki-patojen etkileşimleri, patojenin saldırısı, yayılma yolları ve bitkinin savunma mekanizması arasındaki çok ince bir denge ile yönetilmektedir (Biron, Nedelkov, Missé & Holzmuller, 2011). Patojenler konukçu bitkilerine giriş yapabilmek için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Paslar gibi biyotrofik patojenler, direkt yaprak yüzeyinde bulunan doğal açıklıklardan özelleşmiş yapılar aracılığıyla bitki doku ve hücrelerine giriş yapmaktadırlar.

Pst'nin urediniosporları tek hücreli ve hafiftir. Ayrıca urediniosporların dış yüzeyleri dikenli ve hidrofobik bir yüzeye kaplıdır. Urediniosporlar, rüzgar sayesinde çok uzak mesafelere taşınabilmekte ve konukçu bitkilerinin yaprak yüzeyine tutunabilmektedir. Böylece yaprak yüzeyinden doku içerisine doğru bir çimlenme borusu (Germ Tube) oluşturmakta ve çimlenme borusu, yaprak yüzeyinde ilerleyerek stoma açıklıklarına ulaşmaya çalışmaktadır (Mendgen ve Hahn, 2002). Stomalardan doku içerisine giriş yapan çimlenme borusu farklılaşarak apresoryum (Appressorium) yapısını oluşturmaktadır. Apresoryum, patojenin konak bitki hücre ve dokularının içine doğru büyümesini sağlamaktadır. Apresoryum yapısının meydana getirdiği giriş uzantıları (Penetration Peg) stoma oyukları boyunca uzayarak stoma altı kesecik ve enfeksiyon hifi oluşturmaktadır (Mendgen ve Hahn, 2002). Enfeksiyon hifi mezofil hücreleriyle temas ettiği takdirde bir hostoryal ana hücresine (Haustorial Mother Cell) farklılaşmakta ve enfeksiyon hifinden ayrılmaktadır. Sonrasında hostoryum ana hücresi de hostoryum (Haustorium) yapısını oluşturmaktadır (Kolmer, 2009). Hostorya, konukçu ile biyotrofik ilişkiyi kuran ve devam ettiren esas yapıdır ve besin alımında önemli rol oynamaktadır (Kemen vd., 2005). Bunun yanı sıra hostorya, konak ile patojen arasındaki moleküler savaşın en yoğun yaşandığı, karşılıklı sinyal moleküllerin veya transkripsiyon düzenleyicilerinin birbirlerine aktarıldığı bir yapıdır. Böylece *Pst*'nin hayat döngüsünü tamamlayabilmesi için gerekli besin ve enerji ihtiyacını karşılayacak şartlar oluştuğu için bitkideki yayılma ve çoğalmasını hızlandırmaktadır (Mendgen ve Hahn, 2002; Voegelé ve Mendgen, 2003). Patojen, yaprak yüzeyi

boyunca ilerleyerek yeni hostorya yapıları oluşturmaktadır. Böylece yaprakların üst yüzeyinde makine dikişine benzer sarı-turuncu renkte püstüller meydana gelmektedir.

2.6. Efektörler

Bitki-patojen etkileşiminin başlangıcından bu yana, patojenler ve bitkiler arasında birbirlerine üstünlük kurmak üzerine strateji yarışı bulunmaktadır. Patojen mikroorganizmalar hayatta kalmak ve üremek için konakçı hücrelerden besinleri yağmalarken; konakçı bitkiler de patojen kolonizasyonunu engellemek için çeşitli savunma stratejileri kullanmaktadır.

Efektör proteinler, patojenler tarafından konukçu bitkilerin hücre dışı ve hücre içi boşluklarına salgılanan proteinlerdir. Biyotrofik patojenler, canlı konak hücre ve dokulardan besin elde etmek, hayatta kalabilmek ve yaşam döngülerini tamamlayabilmek için konağın fizyolojik faaliyetlerini manipüle etmekte ve konak bağışıklığını bastırmak için efektörler salgılamaktadır (Lo Presti vd., 2015). Efektörler, bitki bağışıklığını baskılayarak, bitki fizyolojisini manipüle ederek veya konukçu gen ekspresyonuna müdahale ederek farklı hedefler üzerinde çeşitli yollarla konağı alt etmeye çalışmaktadırlar. Örneğin *Nicotiana benthamiana*'da kök pası aday efektörü *PSTha5a23*'ün, bitkinin en önemli savunma cevabı olan programlanmış hücre ölümünü baskıladığı rapor edilmiştir (Cheng vd., 2017). Böylece patojen istilasını, yayılmasını ve kolonizasyonunu sağlamaktadırlar (Duplessis vd., 2011). Ayrıca bazı efektörlerin konukçusu haricinde bir başka bitki üzerindeki patojenezi etkilediğine yönelik çalışmalar ve konukçu olmayan türlerde de patojenizi desteklemek üzere bitkideki süreçlere etki ettiği rapor edilmiştir (Germain vd., 2018).

Dolayısıyla efektörler, hastalık gelişiminde özel öneme sahip virülens proteinlerdir. Bir başka deyişle düşmanın en değerli saldırı silahlarıdır. Bu nedenle hastalıkla mücadele için kritik hedefler olarak görülmektedirler ve son 10 yılda yıkıcı patojenlerin efektörlerini keşfetmek bitki patologları için önemli bir çalışma sahası haline gelmiştir.

Efektör proteinler, önceden tanımlanmış proteinlerle çok az dizi homolojisi göstermektedir. Bu nedenle patojenler ve efektörlerinin yeni konukçulara nasıl adapte olduğu ve özelleştiği hakkında çok az şey bilinmektedir (Dong vd., 2015). Bununla

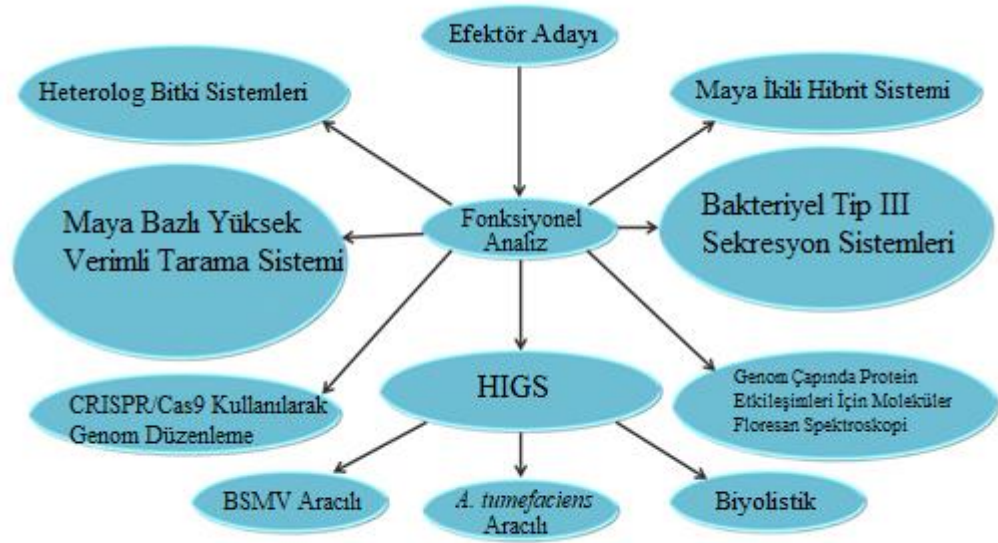
birlikte, bir patojenin efektör repertuarı, konak kolonizasyonunun ana belirleyicisidir (Sánchez-Vallet vd., 2018).

2.7. Efektör Protein/Genlerini Tanımlama

Efektör gen/proteinlerin belirlemek ve işlevini karakterize etmek, hastalık oluşumundaki rollerine ilişkin anlayışımızı geliştirecek ve patojen enfeksiyonlarla mücadele için gelecekteki stratejileri oluşturacaktır. Efektörler, yeni çeşitlerde direnç genlerini tespit etmek ya da hassas bitkilerde duyarlılık lokuslarını bulmak için kullanılabildiklerinden, bitki ıslahında önemli bir rol oynamaktadır (Vleeshouwers ve Oliver, 2014).

Son yıllarda omik teknolojileri ve biyoenformatik alanındaki gelişmeler aday efektörleri tespit için yararlı araçlar sunmaktadır ve bu sayede binlerde aday tanımlanmıştır. Ancak aday efektör tespiti için kullanılan ortak özellikler son derece geneldir. Bunlar genellikle adayın salgılanan protein olması, küçük boyutta olması ve sistein açısından zengin olması şeklinde sıralanabilir (Kanja ve Hammond-Kosack 2020; Sperschneider vd., 2015). Ancak bu ortak özellikler için bazı istisnalar da bulunmaktadır. Örneğin; salatalık antraknoz mantarı *Colletotrichum orbiculare*'de tanımlanan *NIS1* (Yoshino vd., 2012), hem *Basidiomycota* hem de *Ascomycota*'da korunmaktadır, ancak sistein içermemektedir (Irieda vd., 2019). Aday taramalarda proteinin boyutundaki küçük kavramı da genel olarak 150 ila 400 amino asit arasında değişmektedir (Bowen vd., 2009 ; Saunders vd., 2012). Ancak *P. graminis* f. sp. *tritici* efektör proteini olan *AvrSr35*, 578 amino asit uzunluğuna sahiptir (Salcedo vd., 2017).

Kısaca şu ana kadar tanımlanan efektörlerde dizi homolojisinin olmaması ve çok belirgin ortak özellikler bulunmayışı aday belirleme kriterlerini zayıflatmaktadır. Sonuç olarak zayıf kriterler nedeniyle binlerce aday tespit edilirken bunlardan kaç tanesinin gerçek efektör olduğu esas sorudur. Dolayısıyla son zamanlarda araştırmacılar, efektör adaylarının fonksiyonel analizleri üzerine çalışmalar yürütmektedirler. Şekil 2.3.'te efektör adaylarının fonksiyonel analizi için kullanılan yöntemler bulunmaktadır.



Şekil 2. 3. Bitki patojen efektör adaylarının belirlenmesi ve fonksiyonel analizi için kullanılan yöntemler (Prasad vd. 2019).

Bir aday efektörün, gerçek bir efektör olup olmadığının ve patojenitedeki rolünü belirlemenin en temel iki yolu vardır. Bunlar; heterolog bitki sistemleri veya knock-out yöntemiyle ilgili genlerin hücrelere eklenmesi veya çıkarılması yaklaşımlarıdır.

Agrobacterium tumefaciens aracılı transformasyon (ATMT), gen manipülasyonu için kullanılan yöntemlerden biridir ve bitki transformasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kanja ve Hammond-Kosack, 2020). ATMT ilk olarak 1995 yılında maya mantarlarında kullanılmıştır. Daha sonra bu teknik, *Magnaporthe oryzae* dahil olmak üzere ipliksi mantarlarda kullanılmak üzere uyarlanmıştır (Bundock, den Dulk-Ras, Beijersbergen & Hooykaas, 1995 ; Rho, Kang & Lee, 2001).

Daha güncel bir genom düzenleme sistemi olan CRISPR-Cas9 aday efektörlerin fonksiyonunun belirlenmesi için kullanılmaktadır (Kanja ve Hammond-Kosack, 2020). Bakteri ve arkelerde bağışıklık mekanizması olarak tanımlanan CRISPR-Cas9 sistemi, bitkilerde ve hayvanlarda bir genom düzenleme aracı olarak kullanılmaktadır (Nødvig, Nielsen, Kogle & Mortensen, 2015). Bu teknik kullanılarak *Phytophthora sojae* ve mantar patojeni *Ustilago maydis*'teki efektörlerin fonksiyonel analizlerinde kullanılmıştır (Fang ve Tyler, 2016; Schuster, Schweizer & Kahmann, 2018).

Bununla birlikte, zorunlu biyotroflar olan fitopatojenlerin *in vitro* üretimi ve genetik transformasyonu zordur (Lorrain vd., 2019). Bu durumlarda, RNAi mekanizması ile gen susturma tekniklerinin kullanılması daha başarılı sonuçlar vermiştir. Bitkilerde ve özellikle biyotrofik funguslarda RNAi uygulaması virüsler aracılığı (Virus Induced Gene Silencing-VIGS) ile yapılabilmekte ve genetik transformasyon konusundaki kısıt ortadan kaldırılmaktadır. Hatta konağa uygulanan virüs aracılığıyla patojen genleri susturulabilmektedir. Yöntem kısaca HIGS olarak ifade edilmekte ve son yıllarda bir çok efektör adayının fonksiyonel analizi için başarı ile kullanılmaktadır. Arpa külleme hastalığına sebep olan *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* patojenin *BEC1054* ve *BEC1011* efektörleri dahil olmak üzere birçok efektörün tanımlanmasında başarılı olarak kullanılmıştır . (Nowara vd., 2010 ; Pliego vd., 2013 ; Pennington vd.,2019; Prasad vd., 2019).

2.8. Efektör Adaylarının İşlevsel Analizi ve HIGS

Günümüzde RNA interferans (RNAi) olarak bilinen gen baskılama mekanizmasının ortaya çıkması 1980'lerin sonlarında yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Napoli ve arkadaşları petunya bitkisi üzerindeki çalışmalarında genetik modifikasyon ile petunyada pigmentasyonu katalizleyen *chalcone syntase* (*CHS*) enziminin ekspresyonunun sorumlu olan genin aktivasyonunu arttırarak daha mor renkte petunyalar elde etmeye çalışmışlardır. *CHS* genini karnabahar mozaik virüsüne ligat edip *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla petunyalara transfer etmişlerdir. Çalışma sonucunda daha mor renkte petunyalar elde etmeyi amaçlarken beyaz ve alacalı renkte petunyalar elde etmişlerdir. İleri çalışmalar sonucunda, yapraklarda meydana gelen fenotipik değişimin transkripsiyon sonrası genin baskılanması sonucu meydana geldiği bildirilmiştir (Van Blokland, Van der Geest, Mol & Kooter, 1994). Bu durum, transkripsiyon sonrası RNA degradasyonunu ifade eden transkripsiyon sonrası gen baskılama (post-transcriptional gene silencing, PTGS) olarak isimlendirilmiştir.

RNAi dayalı gen susturmanın en önemli özelliklerinden biri, hedef gene özgü çift zincirli RNA (dsRNA) moleküllerinden 21-30 nükleotid (nt) uzunluğundaki küçük RNA'ların üretilmesi ve gen ekspresyonunun diziye spesifik bir şekilde düzenlenebilmesidir. Çift zincirli RNA (dsRNA) 'dan üretilen küçük RNA'lar, transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) işlemleri için gerekli hedefleyici temel

moleküllerdir. Bu hedefleyici küçük RNA molekülleri dizi spesifik olarak hedef genin transkriptine, mRNA'ya bağlanarak translasyonunu engellemektedir.

Çeşitli genlerin fonksiyonunu belirlemek üzere, hedef gene özgü dsRNA'ları tasarlamak ve rekombinant virüsler aracılığıyla bitki hücrelerine transfer etmek ve böylece RNAi ile işlevsel analiz yapmak son 10 yıldır yaygın olarak yapılmaktadır (Garg vd., 2021).

Virüs Aracılığıyla Gen Susturma olarak isimlendirilen (VIGS) yöntem, bitkilerde viral enfeksiyonlara karşı RNAi'e dayanan doğal bir savunma mekanizmasıdır ve özellikle RNA virüslerini hedeflemektedir. Bu doğal süreç, bitki RNA virüslerinin kullanımıyla hedef genlerin susturulması yönünde kullanılarak VIGS metodunun geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Hücrelere sokulan dsRNA molekülleri, sitoplazmada “dicer” adı verilen enzimlerle 21-30 nukleotidlik parçalara ayrılıp siRNA (short interfering RNA) lar oluşmaktadır. siRNA'lar, hedef mRNA'ya bağlanmayı sağlayarak gen susturulması mekanizmasını düzenleyen nükleaz aktiviteli bir RNA multiprotein kompleksi olan RISC (RNAi silencing complex) faktörü ile etkileşerek tek zincirli hale gelmekte ve RISC faktörü ile birlikte hedef mRNA'da komplementeri olan bölgeye bağlanmaktadır. Ardından RISC faktöründe bulunan “slicer” enzimleri ile kesilerek bölünmektedir. Bölünen mRNA molekülü nükleazlar tarafından kesilmektedir. Kesilen mRNA'nın her parçası RNA bağımlı RNA polimeraz ile çift zincirli hale getirilmekte ve tekrar tekrar kesilerek yeni siRNA'lar oluşturularak diğer hücrelere yayılmaktadır.

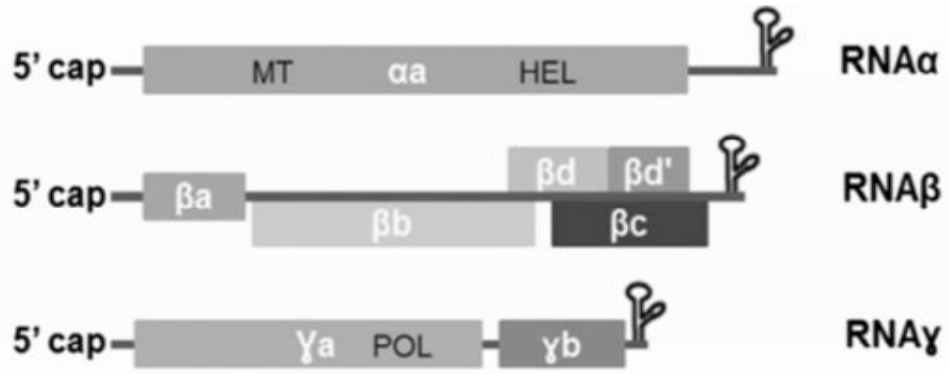
Bitki patojenlerinde efektör adaylarının fonksiyonel analizi için bu yöntem başarılı biçimde kullanılmaktadır. Özellikle buğday pas mantarları gibi, biyotrofik yaşam tarzına sahip patojenlerin *in vitro* çoğaltma ve *in vitro* manipülasyonlar yapmak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle efektör aday genlerinin çoklu işlevsel taramalarına olanak sağlayacak daha hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemlere gereksinim duyulmuştur. Bu yöntemler arasında, mayaya dayalı yüksek hacimli tarama yöntemleri, konak aracılı gen susturma (HIGS) ve geçici ekspresyon uygulamaları gibi geniş bir yelpazede birçok yaklaşım, efektör adaylarının fonksiyonel karakterizasyonunu hızlandırmak için uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında RNAi aracılı gen susturma

yöntemleri uygulama kolaylığı ve etkinliği ile bir adım öne çıkmaktadır (Prasad vd., 2019).

2.9. Barley Stripe Mosaic Viruse (BSMV) Dayalı Gen Susturma Sistemi

Bitkilerde hedef genlere özgü dsRNA'ları aktarmada ve RNAi mekanizmasını başlatmada RNA virüsleri başarılı biçimde kullanılmaktadır. Arpa Çizgili Mozaik Virüsü (BSMV) arpa, buğday ve akraba türlerde bu amaçla kullanılan önemli bir vektör sisteminin kaynağıdır. BSMV, buğday, arpa ve çeltik gibi monokotil bitkilerde özellikle gen fonksiyonları, bitki patojen etkileşimlerinin ortaya çıkarılması ve bitkilerde bakteriyel, fungal ve viral patojen hastalıklarına direncin tespit edilmesi amaçlanan çalışmalarda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bennypaul vd., 2012).

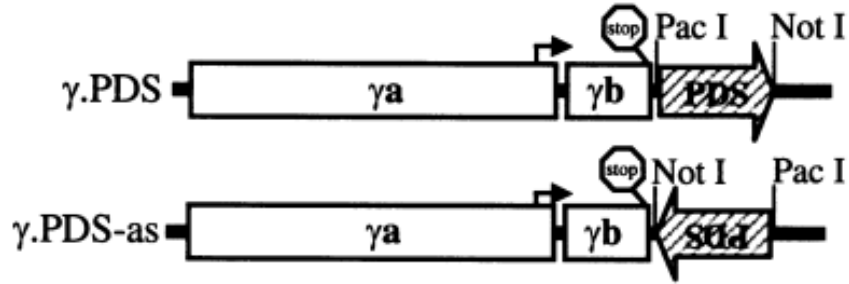
BSMV vektörünün RNA'sı α , β ve γ olmak üzere 3 parçalı bir genoma sahiptir (Şekil 2.4.). Genomik RNA'lar 5' ucunda metilasyonlu cap yapısına, 3' ucunda ise tRNA yapısına benzeyen trozin ile biten bir poliadenilat sekansına sahiptir. BSMV α genomu, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp)'nin metiltransferaz/helikaz alt birimini, β genomu, kılıf proteinini ve virüsün hücreler arasındaki hareketini sağlayan *TGB1*, *TGB2*, *TGB3*'den oluşan (*TGB*) proteinlerini, γ genomu ise RdRp'nin polimeraz alt birimini kodlayan γa ve viral enfeksiyonun artırıcı γb proteinini kodlayan genleri içermektedir (Jackson, Lim, Bragg, Ganesan & Lee, 2009; Yuan vd., 2011).



Şekil 2. 4. BSMV'nin 3 parçalı RNA genom yapısı (Lee, Hammond-Kosack & Kanyuka, 2012).

BSMV'nin γ genomuna, susturulmak istenen hedef gene özgün kısa (300-500 bp) bir parça ligate edilmektedir (Şekil 2.5.). Ardından vektöre ait α , β ve γ genomları *in*

vitro transkripsiyon ile RNA biçiminde konakçı bitkiye virus enfeksiyonu gerçekleştirmek üzere hazır hale getirilmektedir. Enfeksiyon gerçekleştirildikten sonra, viral RNA'ların bir kısmı bitki hücrelerinde doğrudan translasyona uğramaktadır. Böylece α genomunda kodlanan RdRp enzimi sentezlenerek RNAi için gerekli olan dsRNA sentezinde rol oynamaktadır. Yani, bitki hücrelerinde viral genom kopyalanırken α , β ve γ genomları dsRNA moleküllerine dönüşmektedir. Dolayısıyla γ genomuna yerleştirilen hedef gene özgü kısa gen dizileri de dsRNA molekülleri halinde bitki hücrelerine aktarılmış olmaktadır (Holzberg, Brosio, Gross & Pogue, 2002). Bitki hücresinde oluşturulan kısa gen spesifik dsRNA'lar, hücrelerde RNAi aracılı gen susturma reaksiyonunu tetiklemektedir. Bu sayede hedef genlerin susturulması sağlanarak, fonksiyonları 1 ay gibi kısa bir süre içinde incelenebilmektedir (Scofield, Huang, Brandt & Gill, 2005).



Şekil 2. 5. Susturulması hedeflenen gene özgü DNA fragmentinin γ genomuna sense ve antisense oryantasyonlu yerleşimi (Holzberg vd., 2002).

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Klonlama Vektörlerinin Temini

Efektör adaylarını klonlamak üzere BSMV vektörleri, Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Figen Ersoy' dan alınmıştır.

3.1.2. Efektör Aday Genlerin Seçimi

Buğday-*Pst* etkileşimi sırasında bitki ve patojen kaynaklı protein profillerinin tanımlanması amacıyla araştırma grubumuzun 2013 yılında tamamladığı proteomiks projesi kapsamında (COST 109T293) *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1* efektör özelliği taşıyan adaylar olarak rapor edilmiştir (Demirci vd., 2016). Bu adaylar tez çalışması kapsamında BSMV vektörüne klonlamak üzere seçilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1 Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentinin Tasarımı ve Klonlanması

3.2.1.1. *Pst* Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentinin Tasarımı ve Temini

PGTG_07231T0 ve *PGTG_11681T0* efektör adaylarına ait amino asit ve DNA dizi bilgisi EssemblFungi Database veritabanından, *CBH50687.1* efektör adayına ait amino asit ve DNA dizi bilgisi ise UniProt veritabanından temin edilmiştir. Literatürde RNAi aracılı gen susturma için efektif RNA parça uzunluğunun 300-500 bp aralığında olması önerilmektedir (Panwar ve Bakkeren, 2017). Buradan yola çıkılarak veritabanından indirilen, efektör adaylarına ait kodlayıcı dizi (mRNA) kullanılarak 300-500 bp boyutunda PCR ile çoğaltılabilir nitelikte bölge seçilmiş (Şekil 3.1., Şekil 3.2., Şekil 3.3.) ve 5' uca *PacI*, 3' uca ise *NotI* enzimi için tanıma dizileri eklenmiştir. Seçilen bölge için eş zamanlı olarak PCR primerleri de tasarlanmış ve 5' uçlarına *PacI* ve 3' uçlarına ise *NotI* enzimleri için tanıma dizileri eklenmiştir (Çizelge 3.1). Hem RNAi fragmenti dsDNA şeklinde hem de primerler sentez ettirilerek temin edilmiştir.

EnsemblFungi HMMER | BLAST | BioMart | Tools | Downloads | Help & Docs | Blog

Search Ensembl Fungi

Puccinia graminis (ASM14992v1)

Location: supercont2.16.517.022-518.562 Gene: PGTG_07231 Trans: PGTG_07231:EPF80979

Transcript-based displays

- Summary
- Sequence
 - Exons
 - cDNA
 - Protein
- Protein information
 - Protein summary
 - Domains & features
 - Variants
 - PD3D protein model
 - AlphaFold predicted model
- Genetic Variation
 - Variant table
 - Variant image
 - Population comparison
 - Comparison image
- External References
 - General identifiers
 - Oligo probes
 - Supporting evidence
- ID History
 - Transcript history
 - Protein history

Configure this page

Custom tracks

Export data

Share this page

Bookmark this page

Transcript: EPF80979 PGTG_07231:EPF80979

Description: hypothetical protein

Location: SuperContig supercont2.16.517.022-518.562 forward strand

About this transcript: This transcript has 8 exons and is annotated with 1 domain and feature

Gene: This transcript is a product of gene PGTG_07231

Show/hide columns (1 hidden)

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt	RefSeq	Flags
PGTG_07231:EPF80979	EPF80979	825	274aa	Protein coding	E3K9Y4@	-	Ensembl Canonical

Summary

Export image

PGTG_07231:EPF80979 - EPF80979 > protein coding

Statistics: Exons: 8, Coding exons: 8, Transcript length: 825 bps, Translation length: 274 residues

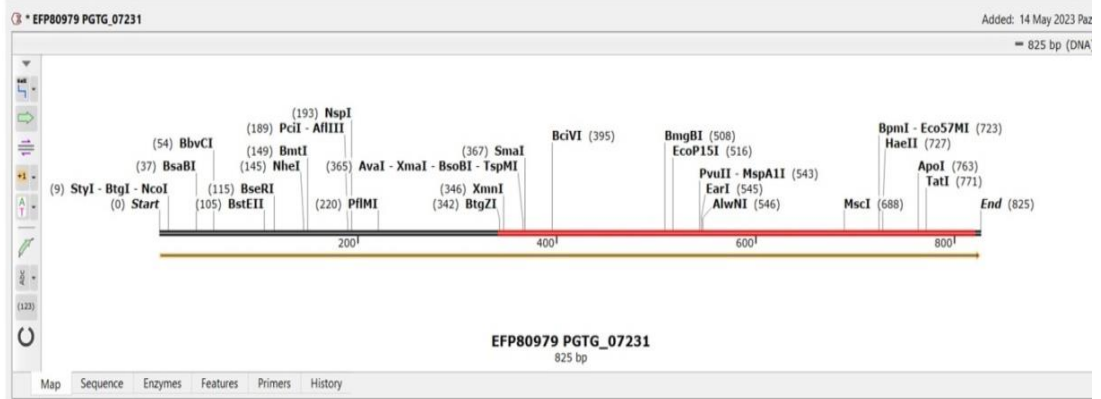
Version: EPF80979

Type: Protein coding

Annotation Method: Protein coding genes annotated in ENA@

>PGTG_07231, mRNA

ATGTTTCTCCATGGCGGTGCGCTGGTCACGCTGATGGTAATCATCTCCCAATCCTCAGCAGCATCTCCCGGCAA
CAGTGTGTGGAAACGCGCGCTCTAGAGGAGGTGACCTCCCCCACTTATGTTTCACTGCTCCGGACCCCGCTA
GCCTCTCACTCTCCTTCCACTGCATTAGAGAAAGGATCACATGTGGACAGACTCATGGGAATGCCATTCAAT
GGGCCGAAAGATTCTAAGGATGCTATGGTGGAGACACGCGACGGACCAGGAGCACACACCCGCGTCACTAGG
ACTCCACAACTTTAATCCAGTACCACAAGGGAAGACAATATCGTTGAAACAGTTCCGGATCATCGCTCCCCG
GGTGACGGGCATAAACCTGTCGATATTCGTCGGATACTTAGGGGTTTTGAATCACGGTCCCACAGAAATCAG
AGGTTTGTGTGCTCTCAGAGATAATTGATGTCGTGTTAAGTTGGATGGCGGCCAGCGAGCACCCACGCTCTCC
AGAAATAGCATCGAAAGGTCATAACAGCTGCTGGAAGAGTGGGCTTCACAGTTCGACTATATGCACTTTGAT
GAAATGCTTGAATACTCCCGTCCCGAACTATCAGGAAGTAAAAAGACTTACATCAAAGATTGCAATTGGGGA
ATGGCGAAAGAAATGAATACCACTTGCCCACTCAAACCTCACTGGAGTCATGCAAAGGTCGAGGCGCTCTACGA
AGAATGGAAGCAAGCCACAAGTCTTTCAAATTTATGTAAGTGGGACTTTTGGGAAGGTTTCTGAGCTTGTCA
AAAGAAAGCCGAGTGA



Şekil 3. 1. Efektör adayı *PGTG_07231T0* gen bilgileri, kodlayıcı dizi ve RNAi fragmenti (kırmızı işaretli bölge).

EnsemblFungi | HMMER | BLAST | BioMart | Tools | Downloads | Help & Docs | Blog

Search Ensembl Fungi...

Puccinia graminis (ASM14992v1)

Location: supercont2.36.562.676-563.865 | Gene: PGTG_11681 | Trans: PGTG_11681/EPF85925

Transcript-based displays

- Summary
- Sequence
 - Exons
 - C-DNA
 - Protein
- Protein Information
 - Protein summary
 - Domains & features
 - Variants
 - PDB 3D protein model
 - AlphaFold predicted model
- Genetic Variation
 - Variant table
 - Variant image
 - Population comparison
 - Comparison image
- External References
 - General identifiers
 - Oligo probes
 - Supporting evidence
- ID History
 - Transcript history
 - Protein history

Transcript: EPF85925 PGTG_11681/EPF85925

Description: hypothetical protein

Location: SuperContig supercont2.36.562.676-563.865 forward strand

About this transcript: This transcript has 5 exons and is annotated with 2 domains and features.

Gene: This transcript is a product of gene PGTG_11681

Show/hide columns (1 hidden) | Filter

Name	Transcript ID	bp	Protein	Biotype	UniProt	RefSeq	Flags
PGTG_11681/EPF85925	EPF85925	878	130aa	Protein coding	E:3KNQ04	-	Ensembl Canonical

Summary

Export image

1.19 kb

Forward strand

PGTG_11681/EPF85925 - EPF85925 > protein coding

Statistics: Exons: 5, Coding exons: 5, Transcript length: 878 bps, Translation length: 130 residues

Version: EPF85925

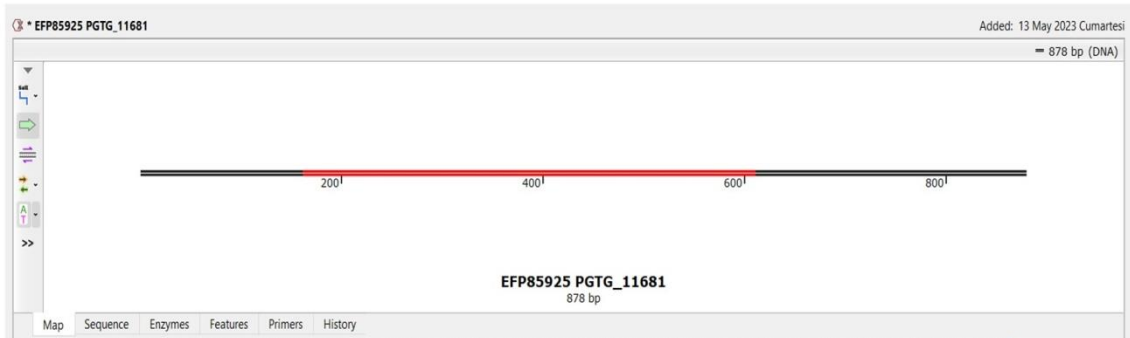
Type: Protein coding

Annotation Method: Protein coding genes annotated in ENA

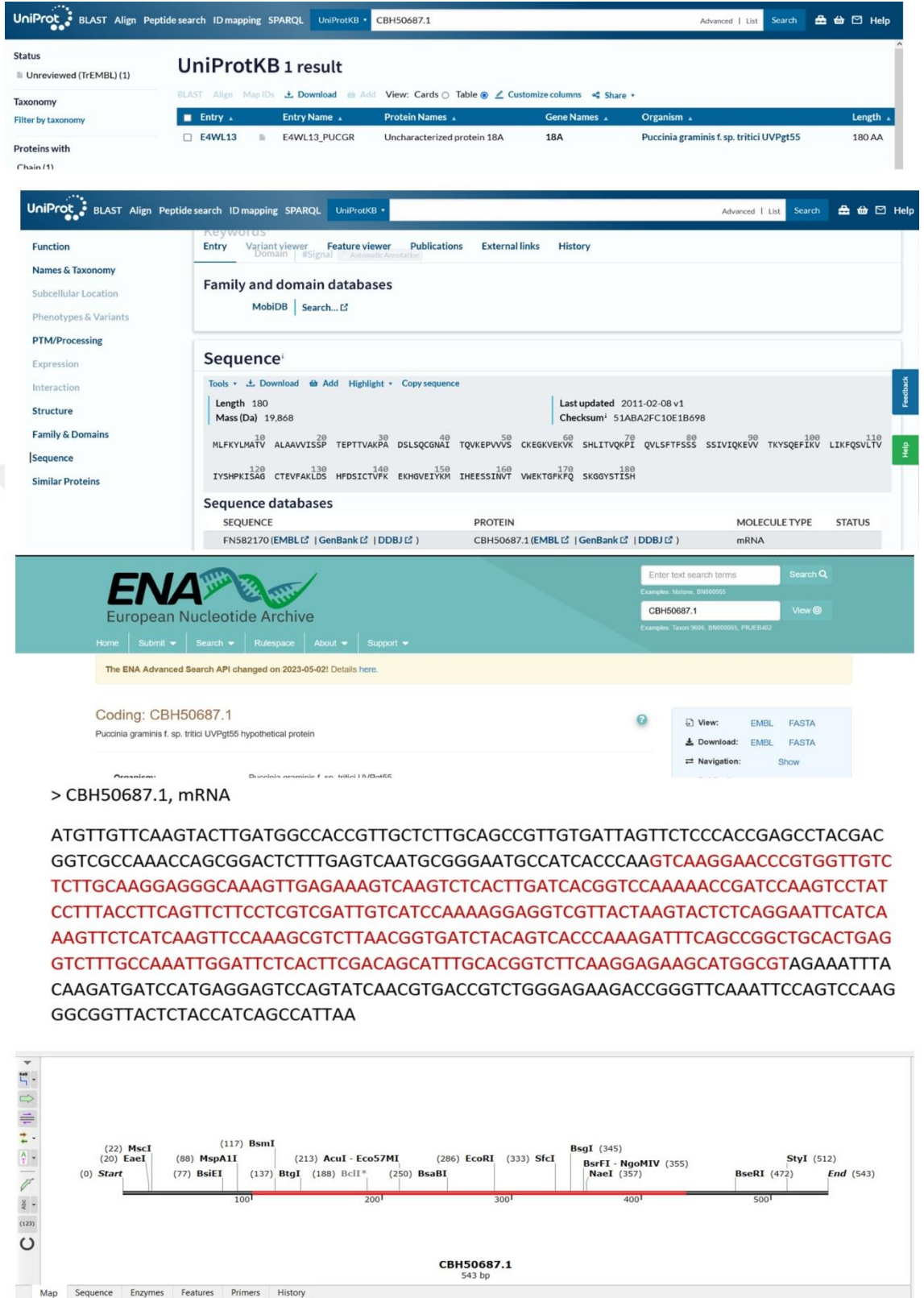
Ensembl Fungi release 96 - Feb 2023 © EMBL-EBI

>PGTG_11681, mRNA

CGCAGTTGCAAATGGAGATCCAAGTTCTCACAGATGTTGCACCGTATATGTAGTGCAGTCCATTCACTGCTGAT
TGTGCGGGGCTAAAAGAGCCTGTCAAGGCGATGCTGGTGTGGGTGCCTGCTTGGACTGAGCTTTTCTAATTGC
ATCCAGAGCATAAAAGGGGCCAGGTCTTCTTCATCCATTTGTCCGTTCTTTCCGTCCCCAACAAATCCCGCCG
TCCCATTTAACACCATCCAATCGTAGCATCTTTCAGCCAACTTCCAAGCATCACCAGACGACAATGGCTTTCTCG
GTCTATGTGTTACTCTGCTTAGCCGCCACGCTCGCCATCATCCAAGCGCAATTATTGCCATCGTCGATCTTATGT
GCGCCTGCTTCAGGCCCTCTGATCACCAGAGACGACTGCAAAAAGGCCTTATCCAAATTCTCTCTGAGAGCAA
CGTCGTTTTCTGGACTGACAAGGTTGATTCCCATTCTTGTGGAACATGCAAGTTGGCCATCACTAAACCGAGCA
TACCCAACCTAGTACACCACGCTGCTGTCCGTGGAGACGCGTTGACCGCCATGCATCAAGGCATCGACAAATG
TCAGGGCAAACCAACCAATGCGACCATCGGCAACTTCCAACCCATCTCCGTGTTGTTAGACAGTGGCAATGGC
GAGAAATGTTAGATTGTTTCGAAAACCTGCTTCACAGAAGGGCCACGACATCCATGACTCGAACTTCCATCAT
GCATCTTAATCAATAGACATTCTAAATTTGTACTCTCTAATTTGAGAGCTTTATCAGACAAAGAAAATATTAC
CAACCACATTGTGATTGCAAAAACCCATGCACTGAGAAACAAGCCAACATCTTGAACAGGTC



Şekil 3. 2. Efektör adayı *PGTG_11681T0* gen bilgileri, kodlayıcı dizi ve RNAi fragmenti (kırmızı işaretli bölge).



Şekil 3. 3. Efektör adayı *CBH50687.1* gen bilgileri, kodlayıcı dizi ve RNAi fragmenti (kırmızı işaretli bölge).

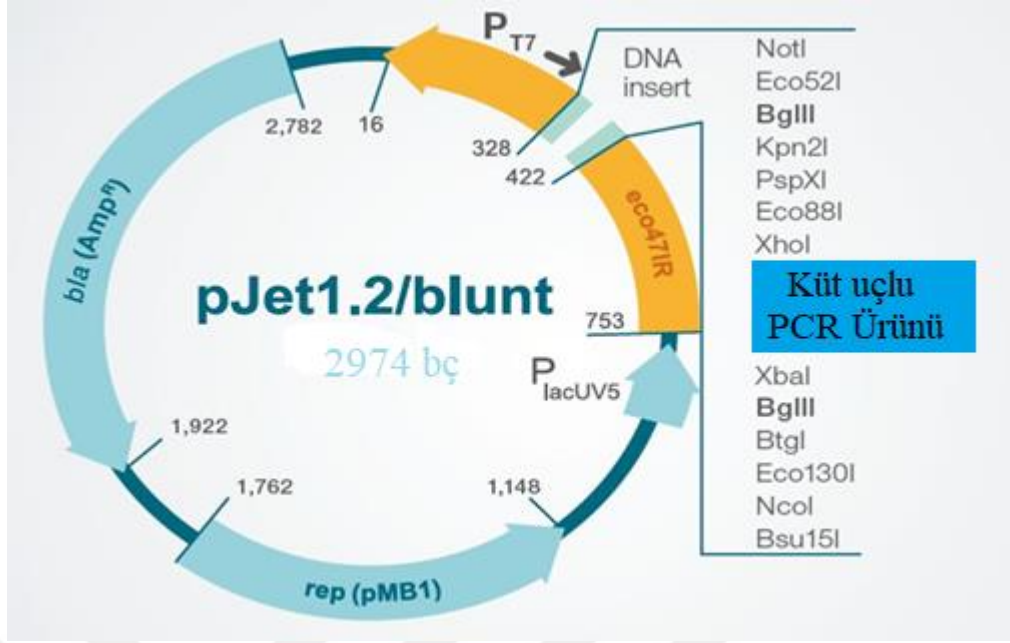
Çizelge 3. 1. Efektör adaylarına ait RNAi fragmentinin çoğaltımı için PCR primerleri

RNAi Fragmenti ve Boyutu	Primer adı	Dizi (5'-3') (renkli diziler RE tanıma dizileri)
<i>PGTG_07231T0</i> (478 bç+RE dizileri)	<i>PGTG_07231T0.Fw</i>	ATA TTA ATT AAG GAAACAGTTCCGGATCATCG
	<i>PGTG_07231T0.R</i>	TAT GCG GCC GC CGGCTTTCTTTGAACAAGC
<i>PGTG_11681T0</i> (447 bç+RE dizileri)	<i>PGTG_11681T0.Fw</i>	ATA TTA ATT AAG AAGGGCCAGGTCTTCTTCAT
	<i>PGTG_11681T0.R</i>	TAT GCG GCC GC GTTGGTTTGCCCTGACATT
<i>CBH50687.1</i> (334 bç+RE dizileri)	<i>CBH50687.1.Fw</i>	ATA TTA ATT AAG TCAATGCGGGAATGCCATC
	<i>CBH50687.1.R</i>	TAT GCG GCC GC ACGCCATGCTTCTCCTTGAA

3.2.2. Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentinin Alt Klonlaması

3.2.2.1. Ligasyon ve Transformasyon

In vitro sentez yoluyla temin edilen dsDNA şekllndeli efektör adaylarına ait RNAi fragmentleri, çoğaltmak ve gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere öncelikle bir klonlama vektörü olan pJET1.2/blunt vektörüne klonlanması hedeflenmiştir (Şekil 3.4.). Bunun için firma tarafından sentezlenip liyofilize olarak gönderilen 300 ng sentetik DNA fragmentleri, öncelikle 20 ng/μl olacak şekilde nuclease free (NF) su ile çözündürülmüş ve daha sonra pJET1.2/blunt klonlama vektörüne ligasyonla bağlanmıştır.



Şekil 3. 4. pJET1.2/blunt klonlama vektörü haritası

Ligasyon için pJET1.2/blunt (ThermoFisher, Cat no: K1231) kiti kullanılmıştır. Ligasyon işlemi her bir efektör aday geni için Çizelge 3.2.’de sunulan içerikte ve aşağıdaki adımlar takip edilerek yapılmıştır.

- 1- Sentezlenen DNA fragmentlerinin uçlarının küt olduğundan emin olunamadığı için ligasyon için “Sticky End” protokolü kullanılmıştır. Böylece başarılı bir ligasyon işlemi için DNA fragmentlerinin uçları küt hale getirilmiştir.

Çizelge 3. 2. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
2X Reaksiyon Buffer	5 µl
DNA Fragmentleri (20 ng/µl)	2 µl
DNA Blunting Enzim	0.5 µl
Toplam Hacim	8 µl

2. Vortekslenmiş ve 5 sn santrifüj yapılmıştır.
3. 5 dk 70°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon için BIO-RAD T-100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Ardından reaksiyon karışımı buza alınmıştır ve işleme buz üzerinde devam edilmiştir. Karışımlara Çizelge 3.3.’de sunulan bileşenler eklenmiştir.

Çizelge 3. 3. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
pJET1.2/blunt (50 ng/μl)	1 μl
T4 DNA Ligaz	1 μl
Toplam Hacim	10 μl

4. Vortekslenmiş ve 5 sn santrifüj yapılmıştır.
5. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Transformasyonun başarısını kontrol etmek amacıyla pJET1.2/blunt (ThermoFisher, Cat no: K1231) kiti içeriğinde bulunan ve Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.'de sunulan reaksiyon içeriğine sahip "Pozitif Kontrol" kullanılmıştır.

Çizelge 3. 4. Ligasyon Pozitif Kontrol Reaksiyonu Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
2X Reaksiyon Buffer	10 μl
Kontrol PCR Product (24 ng/μl)	2 μl
DNA Blunting Enzim	1 μl
NF Su	5 μl
Toplam Hacim	18 μl

1. Vortekslenmiş ve 5 sn santrifüj yapılmıştır.
2. 5 dk 70°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon için BIO-RAD T-100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. Ardından buza alınmıştır.

Çizelge 3. 5. Ligasyon Pozitif Kontrol Reaksiyonu Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
pJET1.2/blunt (50 ng/μl)	1 μl
T4 DNA Ligaz	1 μl
Toplam Hacim	20 μl

3. Vortekslenmiş ve 5 sn santrifüj yapılmıştır.
4. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Ligasyon sonucu elde edilen pJET.07231T0, pJET.11681T0 ve pJETCBH50687.1 plasmidleri, CaCl₂ metodu ile DH5α *E. coli* hücrelerine aşağıdaki adımlar takip edilerek transfer edilmiştir (Chung, Niemela & Miller, 1989).

- 1- 5ml 1X LB Sıvı Besiyerine 100µl *E. coli* DH5α eklenmiştir.
- 2- 1 tüp Negatif Kontrol olarak hazırlanmıştır. (Bakteri yok.)
- 3- DAIHAN Scientific ThermoStable IS-20 çalkalayıcı inkübatör cihazında 120 rpm, 37°C’de gece boyu üremeye bırakılmıştır.
- 4- Gece boyu üremeye bırakılan DH5α hücreleri sabah taze besiyerine (5ml 1X LB Sıvı Besiyeri + 200µl bakteri) ekilmiştir. Yaklaşık 4 saat 130 rpm, 37°C’de DAIHAN Scientific ThermoStable IS-20 çalkalayıcı inkübatör cihazında üremeye bırakılmıştır.
- 5- Süre sonunda bakteriler 2ml’lik tüplere alınmıştır.
- 6- 6.000 rpm’de 8dk santrifüj edilip hücrelerin tüpün dibine çökmesi sağlanmıştır.
- 7- Besiyeri atılıp 800µl 50mM CaCl₂ ile hücreler resüspanse edilip 20 dk buzda inkübe edilmiştir.
- 8- Süre sonunda +4°C 6.000 rpm’de 8 dk santrifüj edilip çöktürülmüş hücreler buza alınmıştır.
- 9- Üst sıvı atılarak hücreler 125µl 100mM CaCl₂ ile resüspanse edilmiştir.
- 10- Hücrelerin üzerine 5µl “Ligasyon Ürünleri” eklenmiştir. Karıştırılıp 30 dk buzda inkübe edilmiştir. Bu sırada 37°C 2X LB Sıvı Besiyeri ısıtılmıştır.
- 11- Hücrelere AOSHENG THERMO-SHAKER cihazında 42°C’de 1 dk ısı şoku uygulanmıştır.
- 12- Hücrelerin üzerine 700µl ısıtılmış 2X LB Sıvı Besiyeri eklenmiş ve 45 dk 100 rpm, 37°C’de DAIHAN Scientific ThermoStable IS-20 çalkalayıcı inkübatör cihazında üremeye bırakılmıştır.
- 13- Süre sonunda hücreler 5.000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çökmesi sağlanmıştır.
- 14- Üst sıvı atılmıştır. Tüpün dibinde yaklaşık 50µl besiyeri bırakılarak hücreler resüspanse edilmiştir.

Transformasyonu takiben hücreler, LB+100 mg/L ampisilin içeren besiyerlerine yayılarak DAIHAN Scientific ThermoStable IS-20 çalkalayıcı inkübatör cihazında 37°C de gece boyu büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün gözlenen koloniler seçilerek, RNAi fragmentleri için tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile test edilmiştir.

3.2.2.2. Transformantların Doğrulaması

Doğrulama için yapılan koloni PCR'ın reaksiyon bileşenleri ve koşulları Çizelge 3.6'da sunulduğu gibi hazırlanmış ve gerçekleştirilmiştir. Petrilerde gözlenen kolonilerden 5 tanesi seçilmiş ve kürdan yardımıyla petriden alınan bakteriler, hazırlanan PCR karışımına daldırılmıştır. PCR işlemi Çizelge 3.6.'da sunulan içerik ve koşullarda gerçekleştirilmiştir ve PCR işlemi için BIO-RAD T-100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. PCR ürünleri %1 konsantrasyonlu 10 mg/ml Etidyum Bromür (EtBr) içeren agaroz jelde 120V, 80mA akımda elektroforez yapılarak beklenen boyutta olup olmadıkları değerlendirilmiştir. Doğrulan kolonilerden LB+100 mg/L ampisilin içeren sıvı besiyerinde üretilerek gerektiğinde kullanılmak üzere gliserol stokları hazırlanıp -20°C'de stoklanmıştır.

Çizelge 3. 6. Efektör Adaylarına Ait Koloni PCR Bileşenleri ve Koşulları

PCR Bileşenleri	Hacim	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
2X Master Mix	10 µl	94°C	3 dakika	1
Primer_F (10µM)	1 µl	94°C	45 saniye	35
Primer_R (10µM)	1 µl	60°C	1.5 dakika	
NF Su	8 µl	72°C	1.5 dakika	
Toplam Hacim	20 µl	72°C	10 dakika	1
		4°C	∞	1

3.2.3. Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentlerinin BSMV (pY) Vektörüne Klonlanması

3.2.3.1.Plazmid İzolasyonu

HIGS amaçlı kullanılacak BSMV vektörü 3 genomdan (α , β ve γ) oluşmaktadır. Bunlardan α ve β genomu, vektörün bir virüs gibi davranarak bitkide yayılmasını kontrol eden genleri taşımaktadır. γ genomu ise susturulmak istenen hedef

gene özgü DNA fragmentinin klonlanacağı genomdur. Her bir genom laboratuvarımızda ayrı ayrı *Escherichia coli* (*E. coli*) 'ye aktarılmış halde bulunmaktadır.

Bu nedenle efektör adaylarına ait RNAi fragmentlerinin pY vektörüne klonlanması gerekmektedir. Klonlama işlemi için öncelikle pJET.07231T0, pJET.11681T0, pJET.CBH50687.1 ve Y genom kaynağı olarak pY.PDSs ve pY.PDSas plazmidleri izole edilmiştir. Bunun için plazmidleri içeren ve -20°C'de saklanan bakteri stoklarından 100 µl'si 5 ml LB+100 mg/L ampicilin içeren besiyerine ekim yapılmıştır. Bakteriler gece boyu 37°C'de ve 120 rpm çalkalamalı inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Plazmid izolasyonu PlasmidExtraction Kit (Qiagen, Cat no: 27104) kullanılarak, üretici firmanın aşağıda sunulan adımları takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

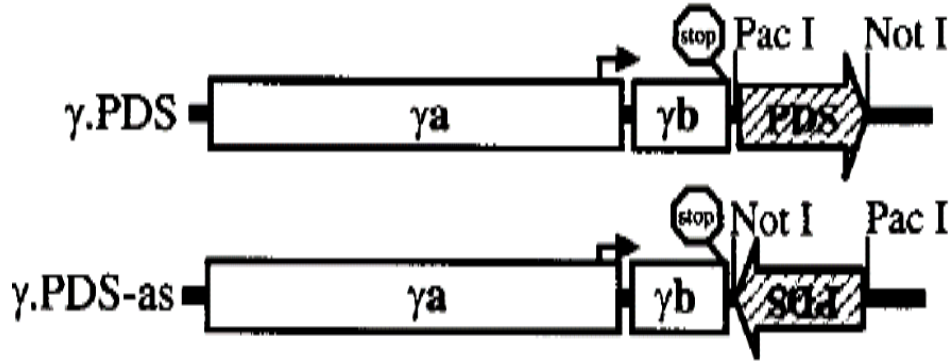
1. 5ml gece boyu kültürlenmiş besiyeri 2ml'lik tüplere alınarak 13.000 rpm'de, 3dk, oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
2. Besiyeri dökülerek, 2ml'lik tüplerden tamamen temizlenmiştir. Böylece gece boyu üremeye bırakılan transforme bakteriler tüpün dibinde toplanmıştır.
3. 250 µl P1 Buffer ile hücreler resüspanse edilmiştir.
4. 250 µl P2 Buffer eklenmiş ve solüsyon berrak hale gelene kadar tüp ters yüz edilmiştir.
5. 350 µl Buffer N3 eklenmiş ve ters yüz edilerek karıştırılmıştır.
6. 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır.
7. 800 µl süpernatant pipetlenerek QIAprep 2.0 Spin kolon'a aktarılmıştır.
8. 1 dk santrifüj yapılmış ve tüpte biriken solüsyon atılmıştır.
9. Kolon, 750 µl Buffer PE ile yıkanmıştır.
10. 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak tüpte biriken solüsyon atılmıştır.
11. Kolonun solüsyondan arınması ve kuruması için 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
12. Kolon 1.5ml'lik yeni tüpe yerleştirilmiş ve üzerine 50 µl Elution Buffer eklenerek 10dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

13. Süre sonunda 13.000 rpm’de 1dk santrifüj yapılmıştır.

İzole edilen plazmitlerin konsantrasyonu OPTIZEN NanoQ mikro hacim spektrofotometrede ölçülmüştür ve kalitesi %1 konsantrasyonlu 10 mg/ml Etidyum Bromür (EtBr) içeren agaroz jelde 120V, 80mA akımda elektroforez yapılarak kontrol edilmiştir.

3.2.3.2. Plazmidlerin Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi

Bu aşamada, efektör adaylarına ait RNAi fragmentlerinin pY vektörüne sense ve antisense pozisyonunda doğru yerleştirilmesi için uçlarının PacI ve NotI enzimleri ile kesilmesi hedeflenmiştir. Bunun için izolasyonun ardından 3’er µg pJET.07231T0, pJET.11681T0, pJET.CBH50687.1, pY.PDSs ve pY.PDS.as (Şekil 3.5.) DNA’ları, PacI ve NotI enzimleri ile kesilmiştir. Kesim reaksiyonları, 50 µl toplam hacimde Çizelge 3.7.’de sunulduğu biçimde hazırlanmıştır. Kesim reaksiyonu iki enzim ile eş zamanlı kesilmek üzere hazırlanmıştır. “Double Digest Calculator” kullanılarak iki enzimin de %50-100 aktivite gösterdiği “EcoRI Buffer” kesim reaksiyonunda kullanılmıştır. Reaksiyon karışımları BIO-RAD T-100 Thermal Cycler cihazında 37°C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kesim reaksiyonu içeriği %1 konsantrasyonlu 10 mg/ml Etidyum Bromür (EtBr) içeren agaroz jelde 120V, 80mA akımda elektroforez yapılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 5. RNAi fragmentinin klonlanacağı pY vektörler (PDS: *Python desaturase* genine ait RNAi fragmenti).

Çizelge 3. 7. RE Kesim Reaksiyonu İçeriği

	pJET.07231T0/ 11681T0/ CBH50687.1	pY.PDSs	pY.PDSas
Plasmid DNA	3 µg	3 µg	3 µg
10XBuffer (EcoRI)	5 µl	5 µl	5 µl
PacI (10 U/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
NotI (10 U/ µl)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
NF su	20-34 µl	20-34 µl	20-34 µl
Toplam	50 µl	50 µl	50 µl

3.2.3.3. RNAi Fragmentinin pY Vektörüne Ligasyonu

Kesim reaksiyonu sonucu pJET.07231T0, pJET.11681T0, pJET.CBH50687.1, pY.PDSs ve pY.PDS.as plasmidlerinin insertleri vektörden ayrılmıştır. Bunun üzerine pJET.07231T0 örneğinden *PGTG_07231T0*, pJET.11681T0 örneğinden *PGTG_11681T0*, pJET.CBH50687.1 örneğinden *CBH50687.1* insert (RNAi fragment) DNA'ları, pY.PDSs ve pY.PDS.as örneklerinden ise pY vektör DNA'ları jelden kesilerek ayrılmıştır. Daha sonra Gel Extraction Kit (ThermoFisher, Cat no: K210012) kullanılarak ve aşağıdaki adımlar takip edilerek temizlenmiştir.

- 1- 2ml'lik tüplerin içerisine kesilen jel parçaları eklenmeden, tüpler SHIMADZU ATX224 hassas terazide tartılmış ve her bir tüpün kütlesi not edilmiştir.
- 2- DNR MiniBIS Pro jel görüntüleme cihazında agaroz jelde gözlemlenen insert DNA ve vektör DNA'larına ait bantlar UV ışık altında bistüri ile kesilerek 2ml'lik tüplere alınmıştır.
- 3- Daha önceden SHIMADZU ATX224 hassas terazide ölçülüp kütlesi not edilen tüpler, içerisine kesilen jel parçaları eklendikten sonra tekrar hassas terazide tartılmıştır.
- 4- Ölçüm sonucu kesilen her 1 mg jel kütlesi için 1 µl hacimde Binding Buffer eklenmiştir.
- 5- WISD – Wise Bath su banyosunda 60°C'de 10dk inkübe edilmiştir.
- 6- DNA fragmentleri ≤500 bp olduğu için her mg jel kütlesi için 1:1 oranında µl hacimde izopropanol eklenmiştir.

- 7- 13.000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 8- 700 µl Wash Buffer eklenerek 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- 9- Kolonda solüsyon kalmaması için kolonu kurutma amacıyla 13.000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 10- Collection tüp atılarak kolon 1.5 ml’lik yeni tüpe alınmıştır.
- 11- 50 µl Elution Buffer kolon üzerine eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 12- Süre sonunda 13.000 rpm’de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 13- Örnekler -20°C’de saklanmıştır.

Daha sonra saflaştırılan vektör ve insert DNA’lar konsantratör cihazı ile konsantre edilmiş ve 10 µl NF Su ile sulandırıldıktan sonra ligasyon için kullanılmıştır. PacI ve NotI ile kesilip temizlenen pY.s ve pY.as ile *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1*’e ait RNAi fragmentleri, artık aynı RE uçlara sahip olduğu için insert DNA’lar istenen oryantasyonda vektöre bağlanabilmektedir. Ligasyon işlemi T4 DNA Ligaz enzimi kullanılarak yapılmıştır. Bunun için Çizelge 3.8.’de sunulan standart ligasyon reaksiyon protokolü kullanılmıştır. Yaklaşık 50 ng vektör DNA’sı ile 100-120 ng insert DNA kullanılmıştır.

Çizelge 3. 8. Ligasyon Reaksiyonu Bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim	Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
2X Reaksiyon Buffer	10 µl	2X Reaksiyon Buffer	10 µl
insert DNA’lar	100 ng	insert DNA’lar	100 ng
pY.s	50 ng	pY.as	50 ng
T4 DNA Ligaz	0.5 µl	T4 DNA Ligaz	0.5 µl
NF Su	-	NF Su	-
Toplam Hacim	20 µl	Toplam Hacim	20 µl

Ligasyon sonucu elde edilen pY.07231s, pY.07231as, pY.11681s, pY.11681as, pY.CBH50687.1s ve pY.CBH50687.1as vektörleri, CaCl₂ yöntemi kullanılarak Bölüm 3.2.2.1.’de açıklandığı biçimde *E. coli* DH5α suşuna aktarılmıştır.

Transformasyonu takiben hücreler, LB+100 mg/L ampisilin içeren besiyerlerine

yayılarak DAIHAN Scientific ThermoStable IS-20 çalkalayıcı inkübatör cihazında 37°C’de gece boyu büyümeye bırakılmıştır.

3.2.3.4. Transformatantların PCR İle Doğrulanması

Ertesi gün petrilerde gözlenen kolonilerden 5 tanesi seçilmiş ve doğrulama için koloni PCR yapılmıştır. Bunun için Çizelge 3.9.’da sunulan içeriğe sahip PCR karışımları hazırlanmış ve kürdan yardımıyla seçilen kolonilerden alınan bakteriler hazırlanan PCR karışımına daldırılmıştır. PCR işlemi için BIO-RAD T-100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır. PCR ürünleri, %1’lik agaroz jelde elektroforez yapılarak analiz edilmiştir. Doğrulan koloniler, LB+100 mg/L ampicilin içeren sıvı besiyerinde üretilerek gliserol stokları hazırlanmıştır. Stoklar sonraki adımlarda kullanılmak üzere -20°C’de saklamaya alınmıştır.

Çizelge 3. 9. Eftör Adaylarına Ait Koloni PCR Bileşenleri ve Koşulları

PCR Bileşenleri	Hacim	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
2X Master Mix	10 µl	94°C	3 dakika	1
Primer_F (10µM)	1 µl	94°C	45 saniye	35
Primer_R (10µM)	1 µl	60°C	1.5 dakika	
NF Su	8 µl	72°C	1.5 dakika	
Toplam Hacim	20 µl	72°C	10 dakika	1
		4°C	∞	1

3.2.3.5. Transformantların Sanger Dizileme İle Doğrulanması

Elektroforez sonucu beklenen boyutta gözlenen bantlar, DNA dizi analizi için jelden kesilerek aşağıdaki adımlar takip edilerek saflaştırılmıştır. Jelden kesilen örneklerin saflaştırılmasında, Gel Extraction Kit (ThermoFisher, Cat no: K210012) kullanılmıştır. Saflaştırılan örnekler Sanger Dizileme için hizmet alımı yapılmıştır.

1- 2ml’lik tüplerin içerisine kesilen jel parçaları eklenmeden SHIMADZU ATX224 hassas terazide tartılmış ve her bir tüpün kütlesi not edilmiştir.

2- DNR MiniBIS Pro jel görüntüleme cihazında agaroz jelde gözlemlenen vektör DNA’sına ait bantlar UV ışık altında bistüri ile kesilerek 2ml’lik tüplere alınmıştır.

- 3- Daha önceden hassas terazide ölçülüp kütlesi not edilen tüpler, içerisine kesilen jel parçaları eklendikten sonra tekrar hassas terazide tartılmıştır.
- 4- Ölçüm sonucu kesilen her mg jel kütlesi için 1:1 oranında μ l hacimde Binding Buffer eklenmiştir.
- 5- Su banyosunda 60°C’de 10dk inkübe edilmiştir.
- 6- DNA fragmenti ≤ 500 bp olduğu için her mg jel kütlesi için 1:1 oranında μ l hacimde izopropanol eklenmiştir.
- 7- 13.000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 8- İşlem sonunda örnekler dizi analizi yapılacağı için kolona 100 μ l Binding buffer eklenerek 13.000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 9- 700 μ l Wash Buffer eklenerek 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- 10- Kolonda solüsyon kalmaması için kolonu kurutma amacıyla 13.000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır.
- 11- Collection tüp atılarak kolon 1.5 ml’lik yeni tüpe alınmıştır.
- 12- 50 μ l Elution Buffer kolon üzerine eklenerek 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 13- Süre sonunda 13.000 rpm’de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj yapılarak DNA geri kazanılmıştır.

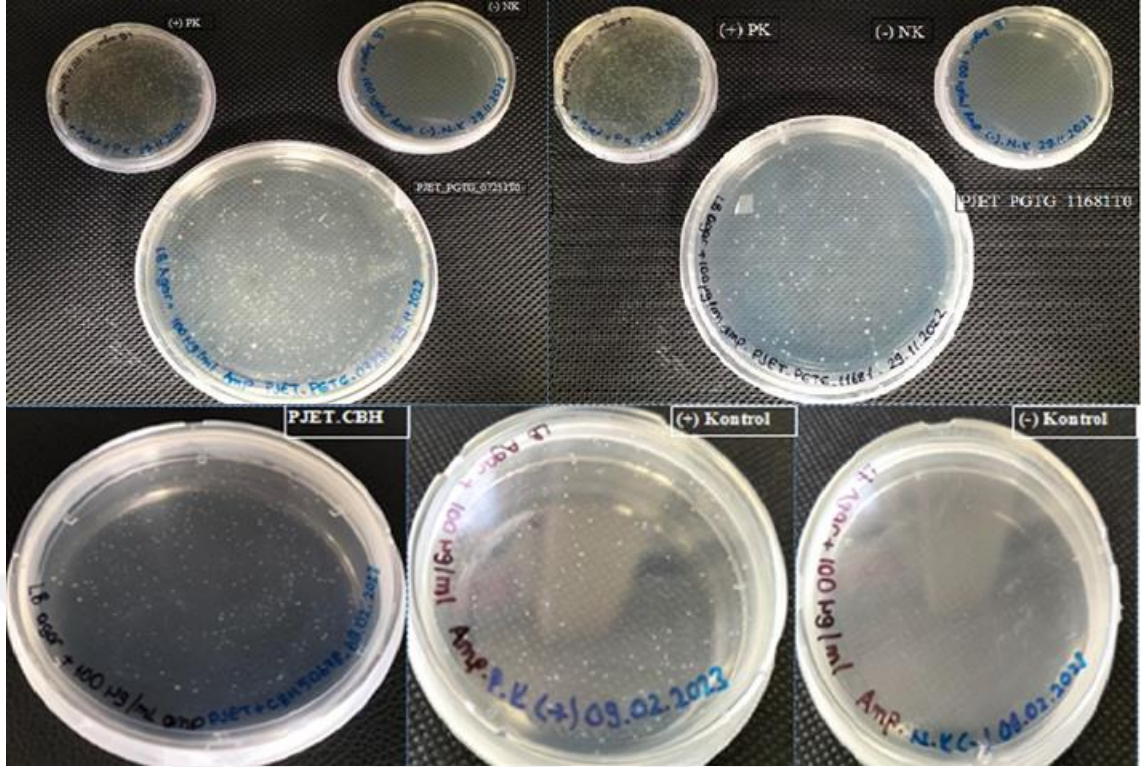
Daha sonra örnekler, konsantrasyon tayini yapılarak Sanger dizileme hizmeti veren özel bir firmaya gönderilmiştir.

BÖLÜM 4

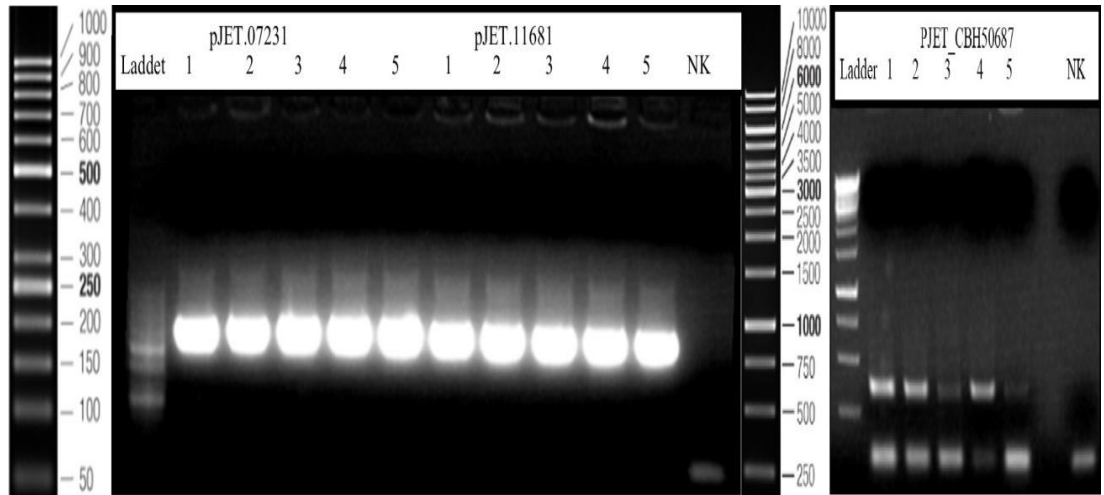
BULGULAR

4.1 Efektör Adaylarına Ait RNAi Fragmentlerinin Alt Klonlaması

Efektör adaylarına ait sentez yoluyla temin edilen ve uçlarında PacI ve NotI enzim tanıma dizileri bulunan yaklaşık 350-500 bp büyüklüğündeki DNA fragmentleri, öncelikle alt klonlama yapılmak üzere pJET1.2/blunt vektörüne ligasyonla bağlanmıştır. Ligasyon ürünleri pJET.07231T0, pJET.11681T0 ve pJET.CBH50687.1 *E. coli*'ye transforme edilmiştir (Şekil 4.1). Daha sonra petrilerde gözlenen olası kolonilerden, PCR ile doğrulama yapılmıştır. Bunun için petriden en 5 koloni seçilmiştir ve *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1* RNAi fragmentleri için tasarlanan primerler kullanılarak koloni PCR yapılmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4. 1. Efektör adaylarına özgü tasarlanan RNAi fragmentinin pJET1/2.blunt vektöre klonlanması.



Şekil 4. 2.Transformasyonun kontrolü için yapılan koloni PCR ürünleri.

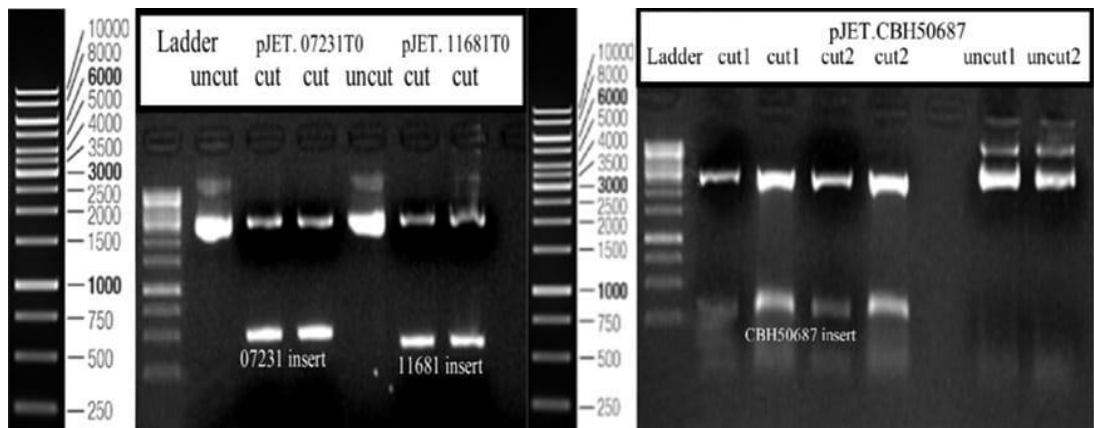
Efektör adayları için seçilen 5 koloniden de doğru boyutta DNA fragmenti üretildiği Şekil 4.2.'den de görüleceği üzere gözlenmiştir. Seçilen ve doğrulanan kolonilerden 2'ser koloni daha sonraki çalışmalar için kullanılmıştır. Diğer koloniler ise gliserol stok yapılarak gerektiğinde kullanılmak üzere -20°C'de stoğa alınmıştır.

4.2. Efektör Adaylarına Ait DNA Fragmentlerinin BSMV (pY) Vektörüne Klonlanması

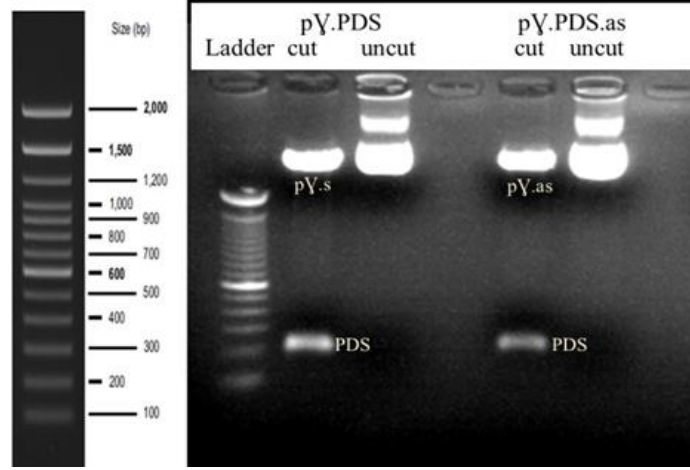
Alt klonlama ile pJET vektörüne klonlanan efektör adaylarına özgü RNAi fragmentleri bu aşamada kesilip uygun RE uçları kazandırılarak BSMV pY vektörüne klonlanmıştır.

4.2.1. PacI ve NotI Enzimleri İle Kesim

RNAi inserterinin pY vektörüne sense ve antisense pozisyonunda yerleşebilmesi için hem vektörün hem de insert DNA'nın uçlarının aynı RE enzimleri ile kesilmiş olması gerekmektedir. pY.PDSs ve pY.PDS.as vektörlerinde PDS insertlerin yerleştiği bölgenin bir ucunda PacI ve diğer ucunda ise NotI RE dizileri bulunmaktadır. Bu nedenle RNAi insertlerinin uçlarına da aynı RE için tanıma dizileri eklenmiştir. Bu aşamada, pJET.07231T0, pJET.11681T0, pJET.CBH50687.1, pY.PDSs ve pY.PDS.as plasmidlerini taşıyan bakterilerden, öncelikle plazmid izole edilmiştir. Yaklaşık her bir plasmidden 3 µg DNA eş zamanlı olarak PacI ve NotI enzimleri ile gece boyu kesime bırakılmıştır. Kesim ürünleri %1'lik Agaroz jelde elektroforez yapılarak ayrılmıştır. Örnekler jele kesilmiş ve kesilmemiş plazmid DNA'ları yanyana olacak şekilde yüklenmiştir. Tam bir kesim reaksiyonu sonucunda PDS ve efektör adaylarına ait insert DNA'ların plazmitlerden ayrılması beklenmektedir. Elektroforez sonucu bu beklenti doğrulamıştır (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.) ve daha sonra efektör adaylarına ait insert DNA'lar ile pY.s ve pY.as (PDS inserti çıkarılmış) vektörleri jelden kesilerek saflaştırılmış ve geri kazanılmıştır.



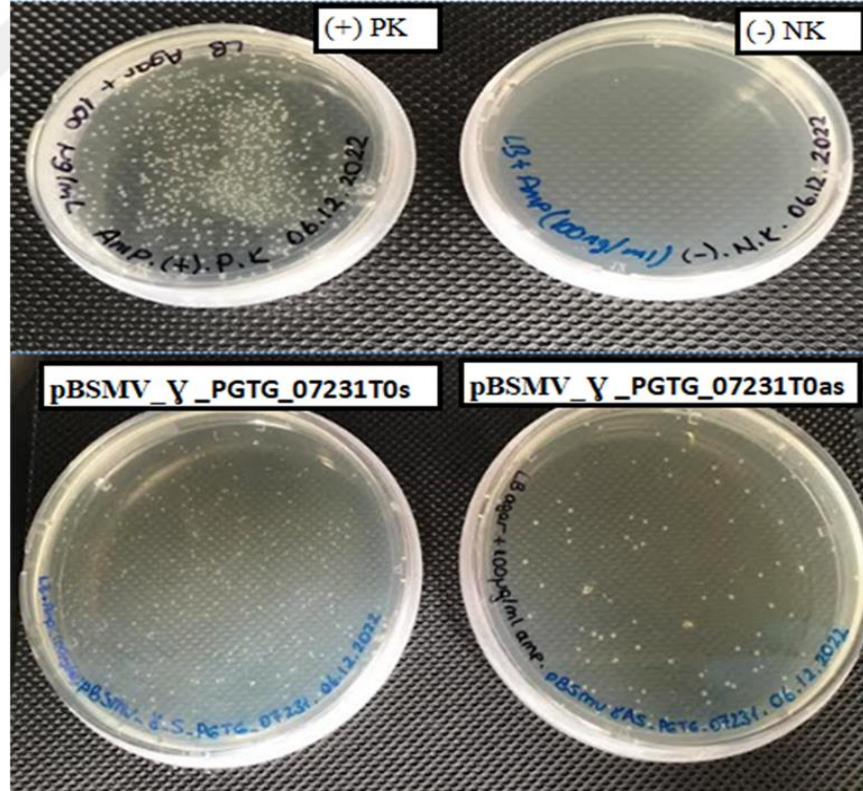
Şekil 4. 3. PacI ve NotI uçlara sahip efektör adaylarına ait RNAi fragmentlerinin eldesi.



Şekil 4. 4. PacI ve NotI uçlara sahip pY.s ve pY.as vektörlerin eldesi.

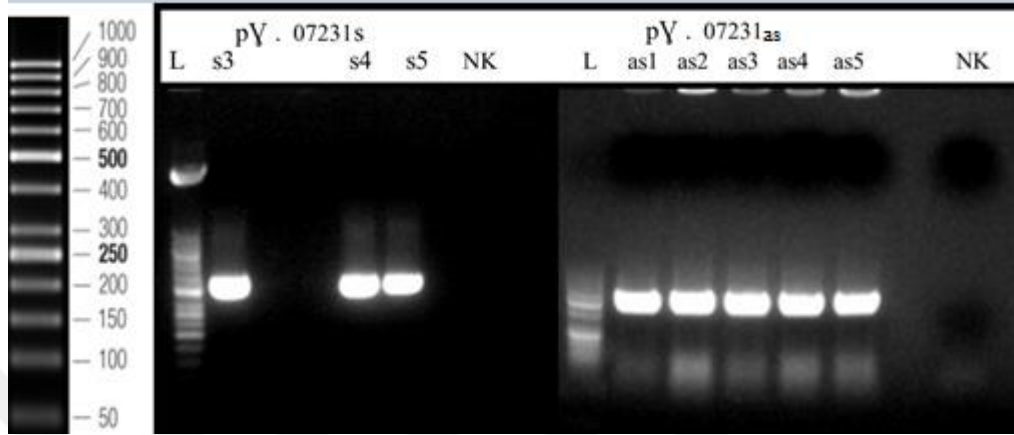
4.2.2. pY Vektörüne Klonlama ve Doğrulama

Geri kazanılan *PGTG_07231T0*, *PGTG_11681T0* ve *CBH50687.1* RNAi fragmentleri PDS'i çıkarılan pY.s ve pY.as vektörlere ligasyonla bağlanmıştır ve *E. coli*'ye transforme edilmiştir (Şekil 4.5., Şekil 4.7. ve Şekil 4.9.).

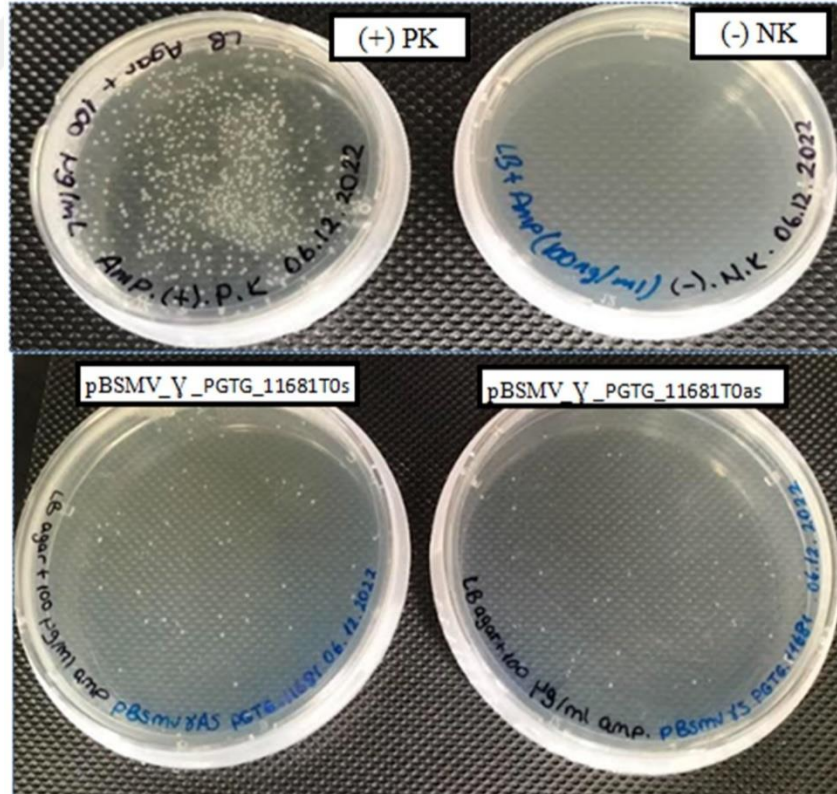


Şekil 4. 5. pY.07231s ve pY.07231as vektörlerinin *E. coli*'ye transformasyonu.

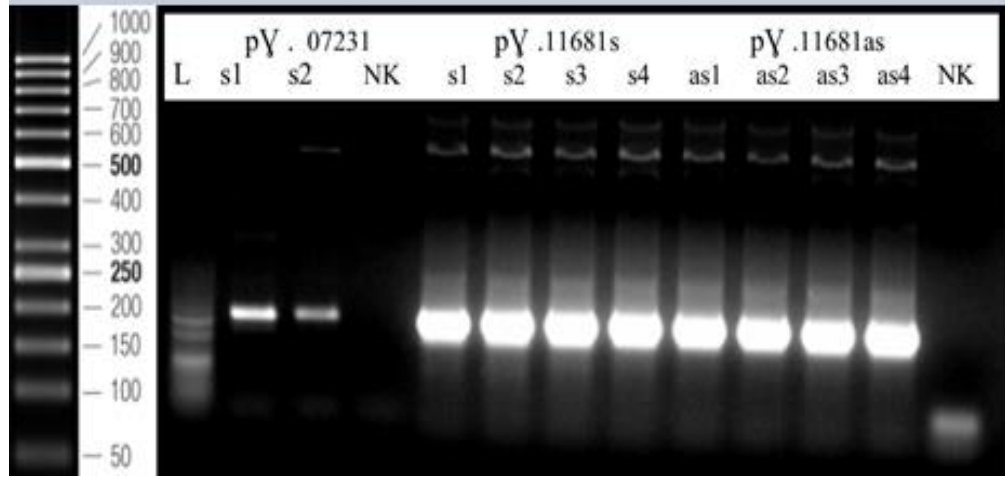
Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerden 5 tanesi seçilmiştir ve efektör adaylarına özgü primerler ile koloni PCR yapılarak doğrulama yapılmıştır (Şekil 4.6., Şekil 4.8. ve Şekil 4.10.). PCR ile doğrulanan kolonilerden 2'sine ait PCR ürünleri saflaştırılarak geri kazanılmış ve Sanger dizileme yaptırılarak doğrulanmıştır.



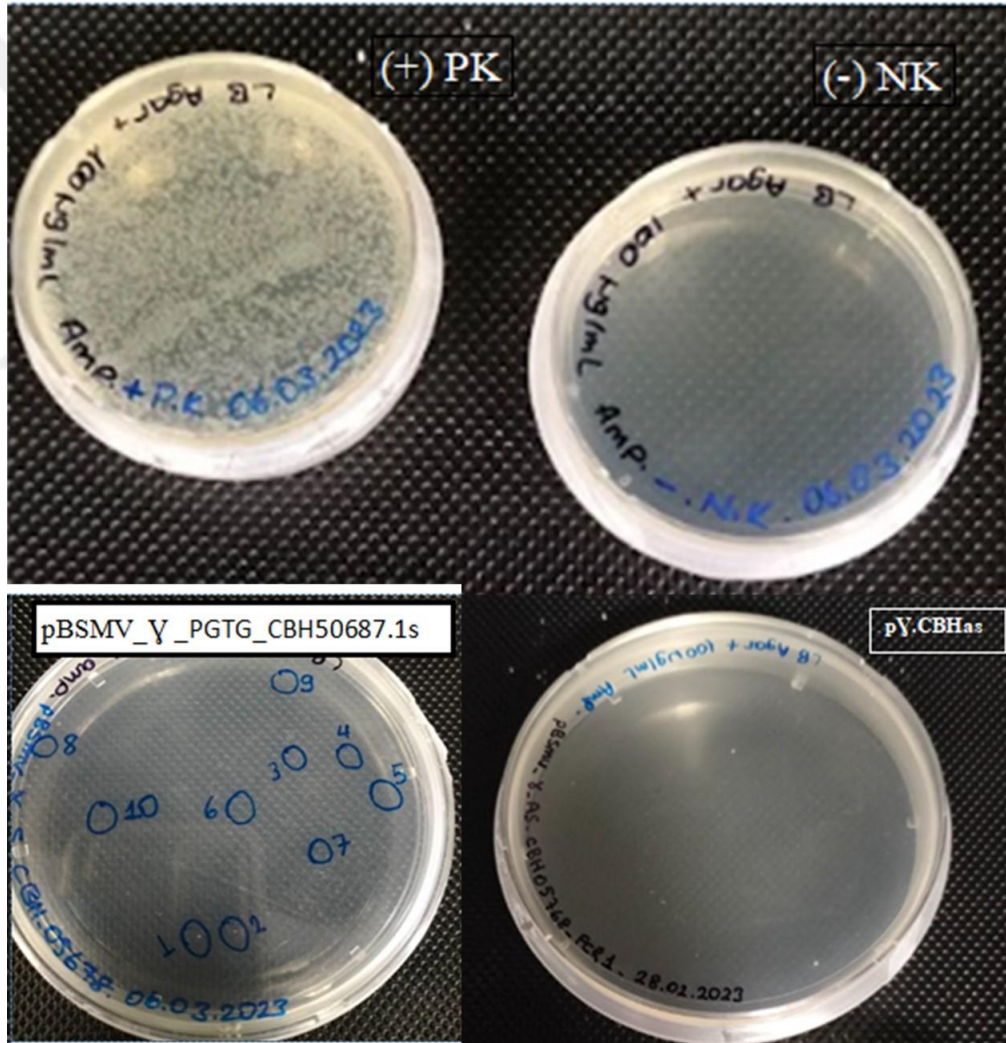
Şekil 4. 6. Seçilen kolonilerde PCR ile doğrulama (s1 ve s2 sonucu Şekil 4.8. 'de).



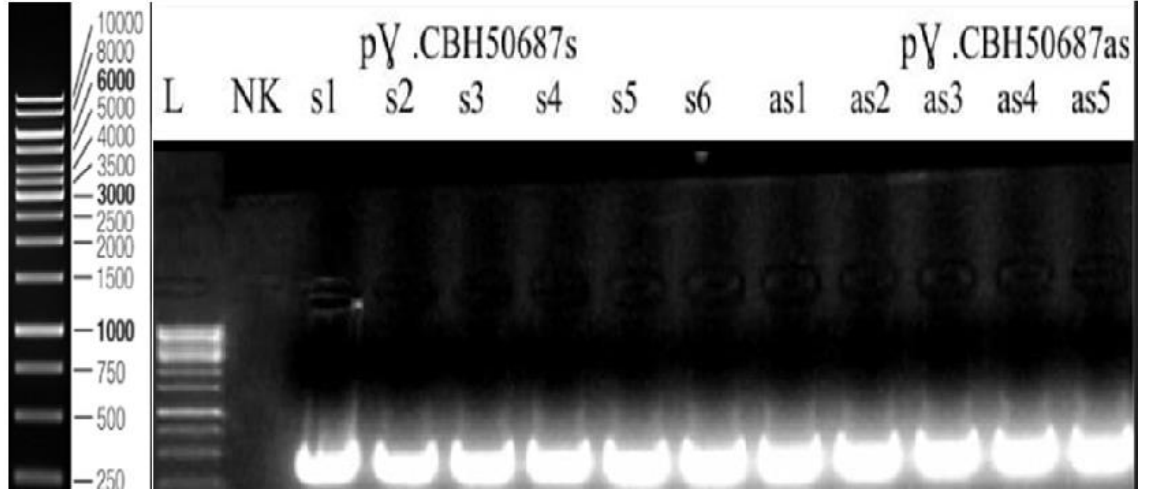
Şekil 4. 7. pY.11681s ve pY.11681as vektörlerinin *E. coli*'ye transformasyonu.



Şekil 4. 8. Seçilen kolonilerde PCR ile doğrulama.



Şekil 4. 9. pY.CBH50687.1s ve pY.CBH50687.1as vektörlerinin *E. coli*'ye transformasyonu.

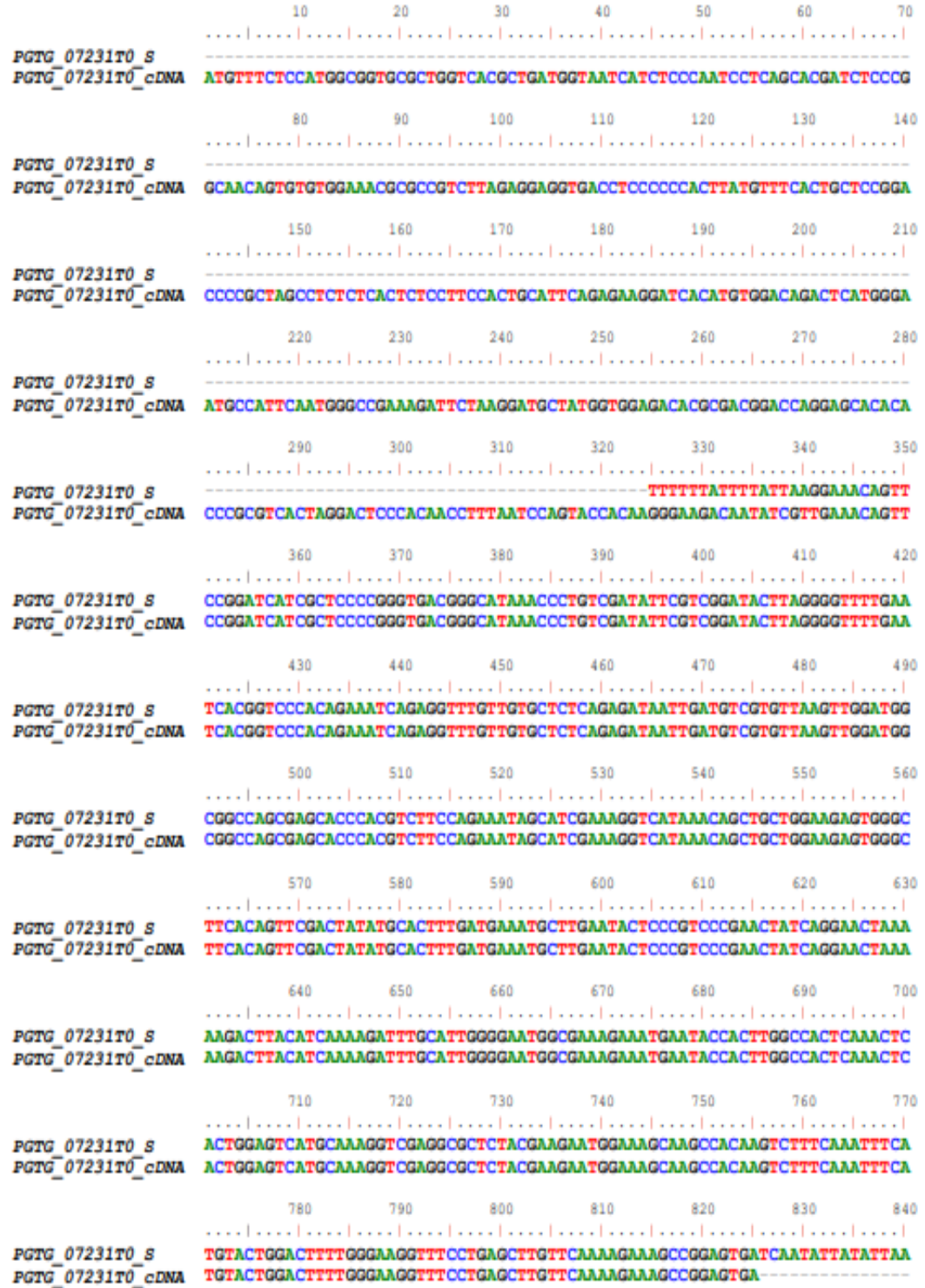


Şekil 4. 10. Seçilen kolonilerde PCR ile doğrulama.

Dizi analizine gönderilen örneklerde yapılan iki yönlü dizileme sonucunda pY.07231T0s ve pY. 07231T0as, pY.11681s, pY.11681as, pY.CBH50687.1s, pY.CBH50687.1as plasmidlerinde RNAi fragment varlığı ve dizilimi teyit edilmiştir. “Forward” ve “Reverse” yönlü okunan nükleotid dizileri BioEdit programında hizalanıp kromotogramları da dikkate alınarak tüm dizi elde edilmiştir (Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16.).

Hizalamalarda, uçlarda bulunan yanlış eşleşmelerin sebebi; PacI ve NotI RE dizilerinin varlığıdır. Bunun haricinde: PGTG_07231T0 sense ve antisense RNAi fragmentleri, “EFP80979” kodlu *PGTG_07231T0* efektör aday genine ait cDNA dizisi ile hizalanması sonucu tam uyum göstermiştir; PGTG_11681 sense ve antisense RNAi fragmentleri, “EFP85925” kodlu *PGTG_11681T0* efektör aday genine ait cDNA dizisi ile hizalanması sonucu tam uyum göstermiştir; CBH50687.1 sense ve antisense RNAi fragmentleri, “E4WL13” kodlu *CBH50687.1* efektör aday genine ait cDNA dizisi ile hizalanması sonucunda 4 yanlış eşleşme olduğu saptanmıştır. Bu durum, PCR işleminde kullanılan TaqDNA polimeraz enziminin hata oranından kaynaklanmaktadır.

Böylece klonlama çalışmaları tamamlanarak, pY.07231s, pY.07231as, pY.11681s, pY.11681as, pY.CBH50687.1s, pY.CBH50687.1as vektörleri elde edilmiştir.



Şekil 4. 11. PGTG_07231T0 sense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.

```

      10      20      30      40      50      60      70
PGTG_07231T0_AS .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PGTG_07231T0_cDNA -----AGTGAGGCCGAAAGAAAACCTGTTGAGTCCTTTGGAAAGGGTTTTCAGGTCATGT

      80      90     100     110     120     130     140
PGTG_07231T0_AS ACTTTAACTTTCTGAACACCGAACGAAAGGTAAGAAGCATCTCGCGAGCTGGAAACGTA CTGAGGTCA
PGTG_07231T0_cDNA ACTTTAACTTTCTGAACACCGAACGAAAGGTAAGAAGCATCTCGCGAGCTGGAAACGTA CTGAGGTCA

      150     160     170     180     190     200     210
PGTG_07231T0_AS CTCAACTCACCCTTCACCATTAAGTAAAGAAAGCGGTAAAGGGTTACGTTTAGAAAAC TACATT CAGAA
PGTG_07231T0_cDNA CTCAACTCACCCTTCACCATTAAGTAAAGAAAGCGGTAAAGGGTTACGTTTAGAAAAC TACATT CAGAA

      220     230     240     250     260     270     280
PGTG_07231T0_AS AAATCAAGGACTATCAAGCCCTGCCCTCATTAAGTTCGTAAGTAGTTTCACGTATATCAGCTTGACACTT
PGTG_07231T0_cDNA AAATCAAGGACTATCAAGCCCTGCCCTCATTAAGTTCGTAAGTAGTTTCACGTATATCAGCTTGACACTT

      290     300     310     320     330     340     350
PGTG_07231T0_AS CGGGTGAGAAAGTTCGTCGACAAATACTGGAAAGCTACGATAAAGAACCTTCTGCACCCACGAGCGAACCGGC
PGTG_07231T0_cDNA CGGGTGAGAAAGTTCGTCGACAAATACTGGAAAGCTACGATAAAGAACCTTCTGCACCCACGAGCGAACCGGC

      360     370     380     390     400     410     420
PGTG_07231T0_AS GGTAGGTTGAATTGTGCTGTAGTTAATAGAGACTCTCGTGTGTTTGGAGACTAAAGACACCCCTGGCACT
PGTG_07231T0_cDNA GGTAGGTTGAATTGTGCTGTAGTTAATAGAGACTCTCGTGTGTTTGGAGACTAAAGACACCCCTGGCACT

      430     440     450     460     470     480     490
PGTG_07231T0_AS AAGTTTTGGGATT CATAGGCTGCTTATAGCTGTCCCAATACGGG CAGTGGGCCCTCGCTACTAGGCC
PGTG_07231T0_cDNA AAGTTTTGGGATT CATAGGCTGCTTATAGCTGTCCCAATACGGG CAGTGGGCCCTCGCTACTAGGCC

      500     510     520     530     540     550     560
PGTG_07231T0_AS TTGACAAAGGAATTATTTTATTTT
PGTG_07231T0_cDNA TTGACAAAGTTGCTATTAACAGAAAGGGAACCATGACCTAATTTCCAACACCCCTCAGGATCACTGCGCCC

      570     580     590     600     610     620     630
PGTG_07231T0_AS -----
PGTG_07231T0_cDNA ACACACGAGGACCAAGCAGCGCACAGAGGTGGTATCGTAGGAATCTTAGAAAGCCGGTAACTTACCCTA

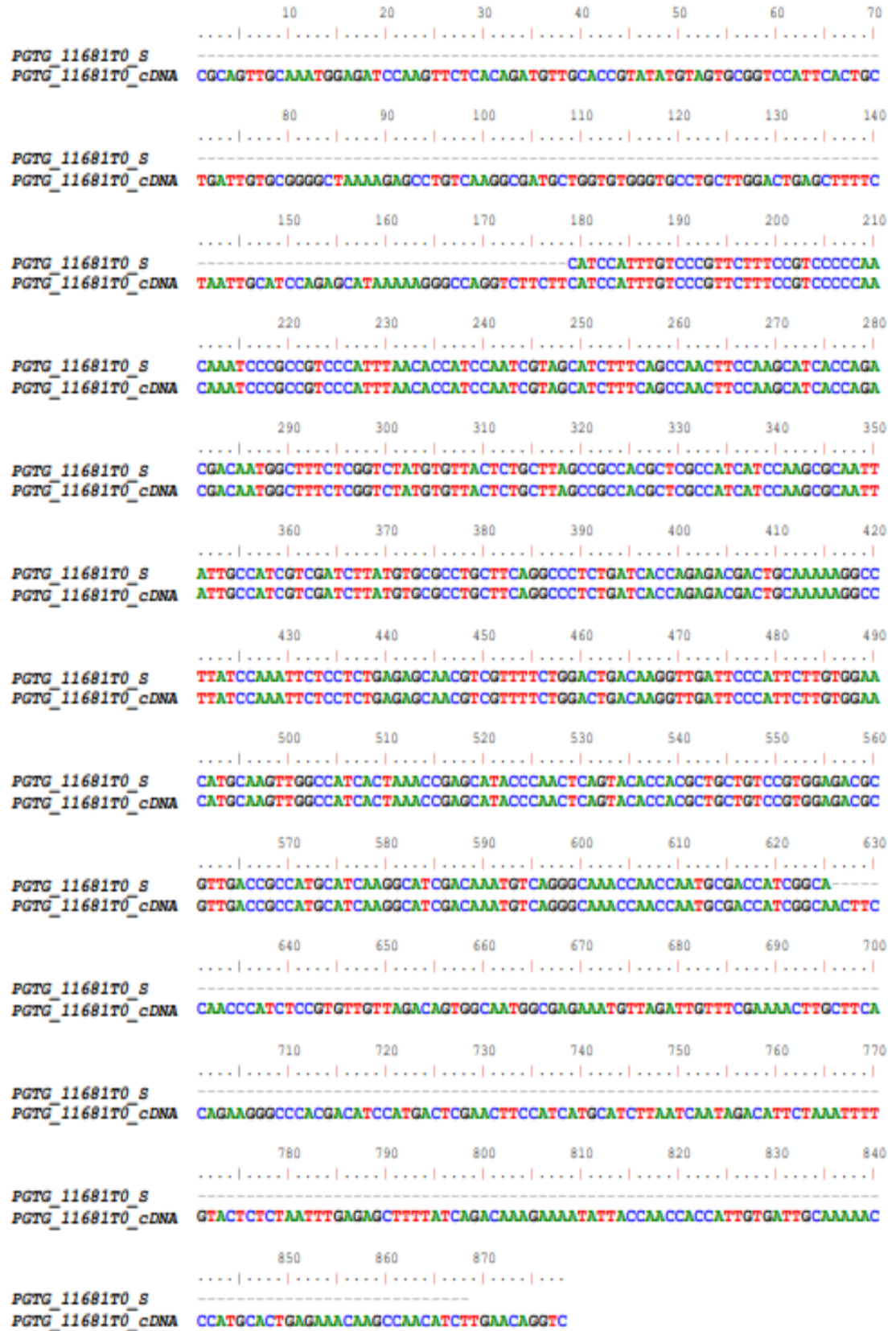
      640     650     660     670     680     690     700
PGTG_07231T0_AS -----
PGTG_07231T0_cDNA AAGGTACTCAGACAGGTGTACACTAGGAAGAGACTTACGTCACCTTCCTCTCACTCTCTCCGATCGCCCC

      710     720     730     740     750     760     770
PGTG_07231T0_AS -----
PGTG_07231T0_cDNA AAGCCTCGTCACCTTTGTATTACCCCCCTCCAGTGAAGGAGATTCTGCCCGCAAGGTGTGTGACAAAG

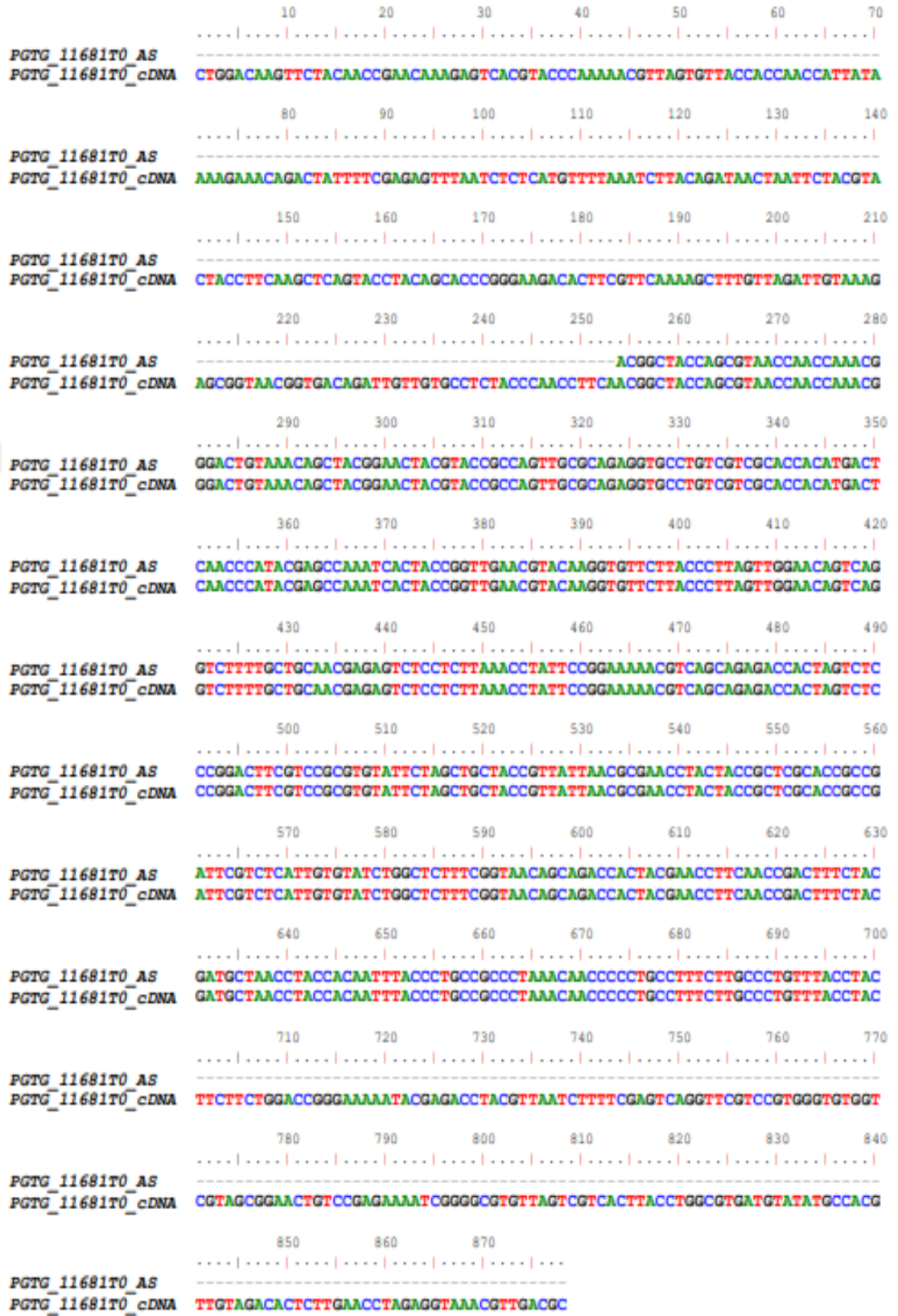
      780     790     800     810     820     830     840
PGTG_07231T0_AS -----
PGTG_07231T0_cDNA GCCCTCTAGCACGACTCCTAACCCCTCTACTAATGGTAGTCGCACCTGGTCGCGTGGCGGTACCTCTTTGTA

```

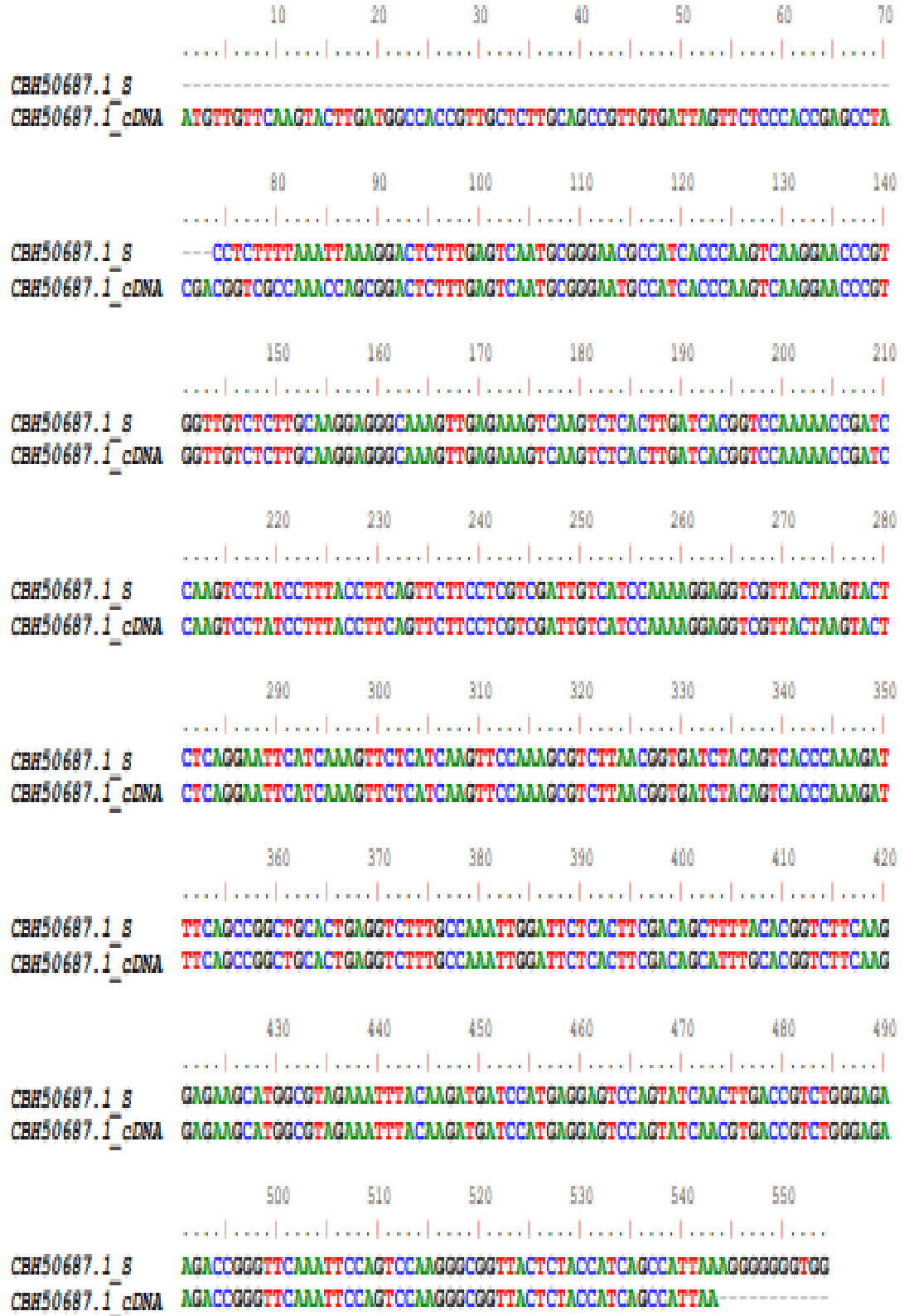
Şekil 4. 12. PGTG_07231T0 antisense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.



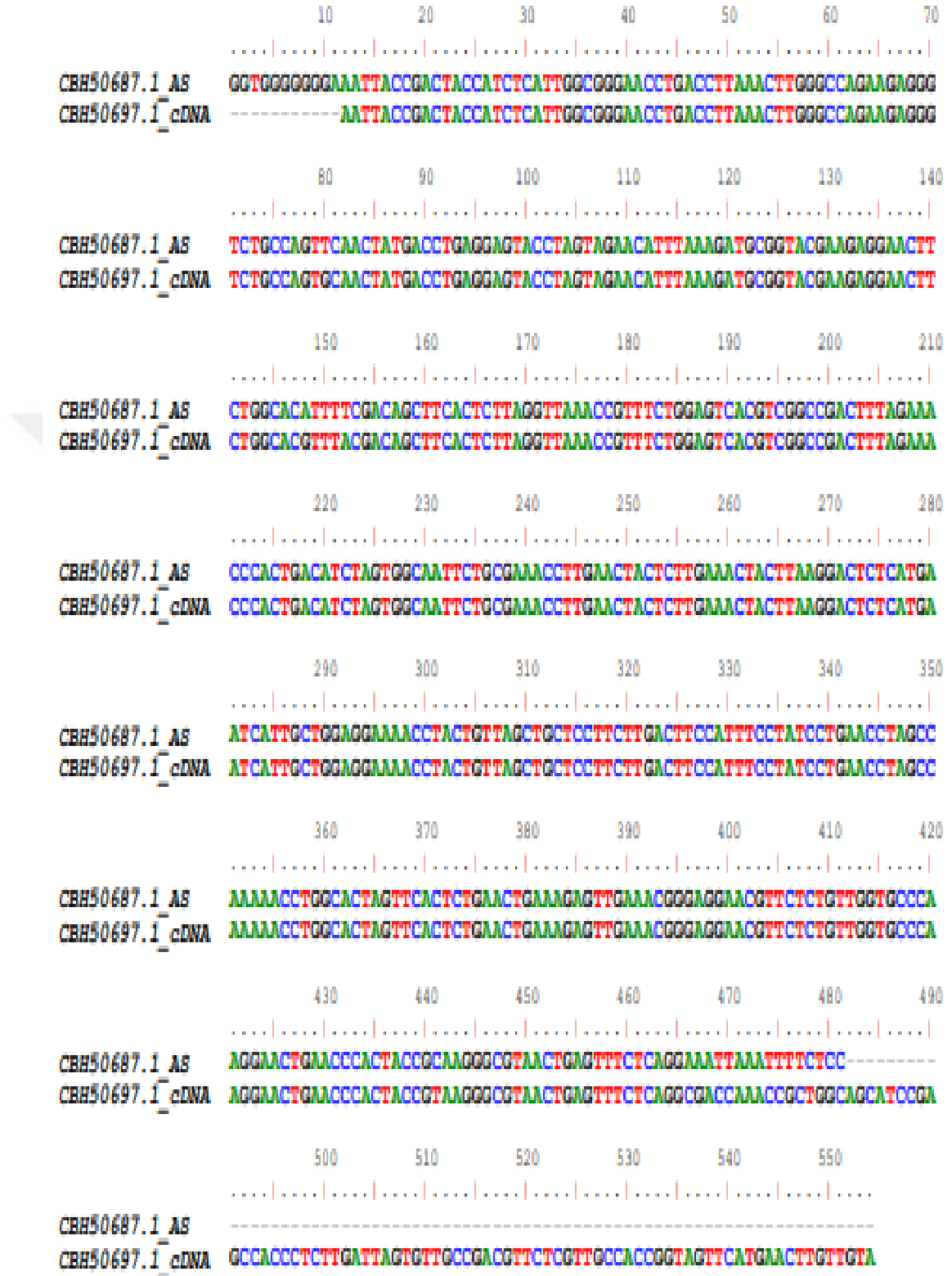
Şekil 4. 13. PGTG_11681T0 sense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.



Şekil 4. 14. PGTG_11681T0 antisense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.



Şekil 4. 15. CBH50687.1 sense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.



Şekil 4. 16. CBH50687.1 antisense RNAi fragentinin dizi analizi sonucu BioEdit programı kullanılarak sentezlenen gen ile dizi hizalaması.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Küresel buğday üretiminde verim ve kaliteyi sınırlayan biyotik stres faktörleri arasında *Puccinia* türlerinin neden olduğu pas hastalıkları büyük bir önem taşımaktadır. Buğday üretiminde verim ve kalitenin düşmesi; tarımsal ekonomiyi ve beslenme kaynağı buğday olan ülkelerin gıda güvenliğini tehdit etmektedir. *P.striiformis*'in neden olduğu sarı pas hastalığı, buğdayda en ciddi verim ve kalite kayıplarının yaşandığı pas hastalığıdır. Pandemi durumunda bu kayıp %90 seviyelerine ulaşabilmektedir. Küresel buğday üretiminin %88'inin bu hastalığa karşı hassas olduğu düşünüldüğünde hastalığın yarattığı tahribatın önüne geçmek büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle hastalık etmeni *Pst* ile mücadelede etkili stratejiler geliştirmek gerekmektedir.

İlk tarım faaliyetlerinden günümüze, biyotik etmenlerle mücadele etmek için; direnç ıslahı veya biyolojik ve kimyasal kontrol çalışmaları uygulanmıştır. Tarımda patojenlerle mücadelede, mantar ilaçlarının kullanımı kısa vadede bir çözüm sunmaktadır. Bunun yanı sıra fungusitlerin ve diğer zirai kimyasal ilaçların çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi tartışma konusu olmuştur. Bu nedenle çevreye ve insan sağlığına duyarlı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda geleneksel ıslah çalışmaları da ilaçlara dayanıklı, dirençli çeşitlere virulent patojen çeşitlerinin hızla ortaya çıkması, mahsul hastalıklarının bolluğu ve çeşitlilik göstermesi sebebiyle yetersiz kalmaktadır.

Bu mücadele yöntemlerinin yanında RNAi'nin tarım alanındaki potansiyeli oldukça yüksektir. RNAi, zirai zararlıları ve ekonomik önemi yüksek tarımsal bitki hastalıklarını kontrol etmenin yanında yeni özellikler kazandırılmış bitkilerin geliştirilmesinde ve tarımda verimi attırmada etkili bir yaklaşımdır. Bilim insanları, RNAi kullanarak, kafeinsiz kahve, nikotinsiz tütün ve besin takviyeli mısır gibi çeşitler geliştirmişlerdir. Bununla beraber bitkilerde doğal RNA susturma mekanizmalarından uyarlanan yeni stratejiler geliştirilmiştir. Bunun sonucunda RNAi, bitkilerde böcek zararlıları, parazitik nematodlar, fungal hastalıklar ve virüslerle mücadelede kullanılmıştır (Fletcher, Reeves, Hoand & Mitter, 2020). Mevcut kimyasal ilaçların çevreye ve dolayısıyla insan sağlığına zararını en aza indirmek amacıyla son 10 yılda yapılan çalışmalar sonucu zirai zararlılarla mücadelede RNAi teknolojisine yönelim artmıştır. Bu teknoloji kullanılarak geliştirilecek stratejilerin “Yeni Yeşil Devrim”e yol açacağı düşünülmektedir (Borah ve Konakalla, 2021). Tarımda RNAi uygulamalarının mevcut zirai ilaçlara alternatif olacağı düşünülmektedir. Etkili ve hedefe yönelik tasarlanacak RNAi tabanlı zirai ilaçlar, mevcut kimyasal ilaçlardan daha güvenli ve çevre dostu olacaktır. Bunun yanında RNAi tabanlı zirai ilaçların piyasada yer almasındaki engellerin başında RNA üretim maliyetleri gelmektedir. Ancak son yıllarda birkaç şirketin gram başına 1\$ gibi düşük bir maliyet vaat etmesi, RNAi tabanlı zirai ilaçların geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. RNAi tabanlı zirai ilaçların piyasada yer almasındaki engellerden en önemlisi de hedef alınacak zararlı ya da patojen genlerinin belirsizliğidir (Borah ve Konakalla, 2021). Bu sebeple bitki ve patojen arasındaki moleküler etkileşimleri anlamak, patojenler tarafından kodlanan efektör gibi enfeksiyon gelişiminde etkili protein/genlerini tespit etmek patojenlere karşı daha etkili bir mücadele yöntemi geliştirmek için büyük bir önem taşımaktadır. Omik teknolojileri ile bu yönde aday virülens genleri belirlemek hedef belirlemede ilk adım, adayların fonksiyonel analizi ise esastır.

Aday efektörlerin fonksiyonlarının araştırılması, fungal hastalıklara karşı dayanıklılık sağlayacak yeni kaynakların oluşturulmasını sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, fonksiyonu bilinmeyen efektörlerin sayısı oldukça fazladır. Genellikle heterolog bitki sistemleri, aday efektör fonksiyonlarını araştırmak için tercih edilmektedir. Ancak pas mantarları gibi zorunlu biyotrof funguslarda *in vitro* manipülasyonların neredeyse olanaksız oluşu, aday efektörlerin bu yolla fonksiyonel

analizini zorlaştırmaktadır. Bu zorlayıcı duruma karşın, aday pas efektörlerinin daha etkili işlevsel karakterizasyonu ve bitki hücrelerindeki rolleri hakkında hipotezler oluşturmaya yardımcı olacak etkin yöntemler geliştirilmektedir.

HIGS yöntemi son yıllarda efektör adaylarının gerçek efektörler olup olmadığının tespiti ve işlevlerinin ortaya konması için diğer yöntemler arasında bir adım öne çıkmaktadır (Panwar ve Bakkeren, 2017).

Literatür incelendiğinde, HIGS metodu, *P. striiformis* f. sp. *tritici* ve *P. triticina*'nın gen fonksiyonları için başarıyla kullanılmıştır (Panwar vd., 2018).

Zhu ve arkadaşları (2017), *P. striiformis* f. sp. *tritici*'nin virülansında rol alan *PsFUZ7* genini HIGS yöntemi ile manipülasyona uğratarak, sporlarda enfeksiyon hız gelişiminin baskılandığını ve hastalığın gelişiminin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (Zhu vd. 2017).

Qi ve arkadaşları (2018), *PsCPK1* geninin *Pst* enfeksiyonundaki rolünü belirlemek amacıyla enfeksiyondan sonra belli saat aralıklarıyla bitkiden alınan örneklerdeki *PsCPK1* transkript seviyesini test etmek için kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) uygulamışlardır. qRT-PCR sonuçlarına göre *PsCPK1* geni enfeksiyonun erken aşamalarında yüksek oranda ifade edildiğini rapor etmişlerdir. Bunun sonucunda *PsCPK1* genini HIGS amacıyla BSMV vektörüne klonlayarak sürdürmüş ve *Pst* enfeksiyonunun bitki üzerindeki belirtilerinin ciddi oranda azaldığını rapor etmişlerdir (Qi vd., 2018).

Kalsinörin, mantarların çoğunda morfogenez, patogenez ve ilaç direncinde önemli rol oynamaktadır. Ancak kalsinörin genlerinin *Pst*'deki işlevi belirlenmemiştir (Zhang vd., 2012). Zhang ve arkadaşları (2012), yaptıkları çalışma sonucu *Pst*'deki kalsinörin genleri olan *PsCNA1* ve *PsCNB1*'i tanımlayarak karakterize etmişlerdir. qRT-PCR analiz sonuçları, *PsCNA1* ve *PsCNB1* ekspresyonunun, *Pst* ile inokülasyondan sonra hostoryum oluşumu aşamasında en yüksek seviyede olduğunu göstermiştir. Bu genler BSMV vektörü aracılığıyla manipülasyona uğratıldığında, enfeksiyon hızlarının daha yavaş uzamasına ve urediniospor oluşumunun azalmasına yol açmıştır.

Puccinia triticina buğdayda yaprak pası hastalığına sebep olmaktadır. *PtMAPK1* ve *PtCYC1* genlerinin, funguslarda fizyolojik süreçlerin ve patojenitenin

düzenlenmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir. Bu genlerin, HIGS yöntemi ile susturulması sonucu hastalığa direnç artırılmıştır (Panwar vd., 2018).

Blumeria graminis f. sp. *tritici* buğdayda, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* arpada külleme hastalığına sebep olan biyotrofik mantar patojenleridir (Nowara vd., 2010; Pliego vd., 2013). Nowara ve arkadaşları (2010) patojenitede rol alan *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* efektörü *Avra10*'u HIGS metodu kullanarak susturmuşlardır. *Avra10*'un susturulması sonucu bitki yapraklarında hastalık gelişiminin etkilerinin azaldığı rapor edilmiştir (Nowara vd., 2010). Ayrıca *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*'nin 50 tane efektörü HIGS metodu kullanılarak fonksiyonel analizleri gerçekleştirilmiş ve bu efektörlerden 8 tanesi susturulduğunda hastalık gelişiminin etkilerinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Pliego vd., 2013).

Magnaporthe oryzae pirinç patlaması hastalığına sebep olan patojenik mantardır. Çeltikte önemli verim kayıplarına sebep olmaktadır (Dean vd., 2012). Bu hastalığa karşı 100'den fazla direnç geni tanımlanmış ve hastalığa karşı birçok dirençli çeltik çeşidi geliştirilmiş olmasına rağmen ortaya çıkan yeni virulent *Magnaporthe oryzae* ırkları sebebiyle başarı sağlanamamıştır (Wang, Ebbole & Wang, 2017; Zhu vd., 2017). Zhu ve arkadaşları (2017) brom mozaik virüs (BMV) aracılı bir HIGS yöntemi kullanarak patojenite ile ilgili *MoABC1*, *MoMAC1* ve *MoPMK1* genlerini susturmuşlardır (Zhu vd., 2017b). Her bir fungal genin susturulması sonucu konakçı bitkide hastalık gelişiminin engellendiği rapor edilmiştir (Zhu vd., 2017).

Aspergillus flavus'un sebep olduğu aflatoksin kontaminasyonu mısırdaki yıkıcı etkilere sebep olmaktadır. İnsan ve hayvan beslenmesinde ciddi sağlık sorunlarına sebep olan küresel bir sorundur (Thakare, Zhang, Wing, Cotty & Schmidt, 2017). Mısırdaki aflatoksin kontaminasyon seviyesini azaltmak için *aflR* ve *aflC* genleri HIGS yöntemi ile susturulmuştur (Masanga, Matheka, Omer, Ommeh, Monda & Alakonya, 2015; Thakare vd., 2017). *aflR*'nin susturulması sonucu *Aspergillus flavus* enfeksiyonu sonucu 14 kat daha düşük aflatoksin seviyesi rapor edilmiştir (Masanga vd., 2015).

Bu tez çalışmasında; sarı pas hastalığına sebep olan ve hastalık sonucunda verim ve kalite düşüklüğüne bağlı olarak gıda güvenliğini tehdit eden *Pst* patojeninin efektör aday genlerine ait DNA fragmentleri, buğdayda RNAi için kullanılan BSMV vektörüne klonlanmıştır. Bu sayede; tez çalışmasında kullanılan aday efektörlerin fonksiyonel

olarak test edilip gerçek efekt6rler olup olmadığı, h6cre içi konumu, etkileşime geçtiği konukçul fakt6rleri belirlenerek aday genlerin tanımlanması gerçekleştirilebilecektir. Yapılan klonlama sonucunda başka efekt6r adaylarının da etkin biçimde klonlanması için gerekli y6ntem ve koşullar optimize edilmiştir. Tez alışması kapsamında yapılan klonlama çalışmaları sayesinde efekt6r aday genlerinin tanımlanması için en kritik adımlardan biri olan BSMV vekt6r6ne klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan rekombinant vekt6rler ile, ilgili patojenin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı yeni stratejiler geliştirilmesine başlangıç oluşturmak hedeflenmiştir. Bu y6ntem temel alınarak tespit edilecek hedef genler g6z 6n6nde bulundurulduğunda; tarımda kimyasal ilaç kullanımını azaltmak ve buna bağlı olarak maliyet kayıplarının 6n6ne geçmek, gıda g6venliği sağlanarak insan sağlığının korunması ve evre sağlığının korunması hedeflenerek ekolojik dengenin bozulmasına engel olmak gibi amaçlara ulaşılması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.
- Çat, A., Tekinalp, M., Çatal, M., Akan, K., & Akar, T. (2017). Buğdayda sarı pas hastalığı ve dayanıklılık ıslahı çalışmaları.
- Aime, M. C., McTaggart, A. R., Mondo, S. J., & Duplessis, S. (2017). Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. *Advances in genetics*, 100, 267-307.
- Aime, M. C., Toome, M., & McLaughlin, D. J. (2014). 10 Pucciniomycotina. *Systematics and Evolution: Part A*, 271-294.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *The Plant Cell*, 8(10), 1683.
- Bahri, B., Shah, S. J. A., Hussain, S., Leconte, M., Enjalbert, J., & de Vallavieille-Pope, C. (2011). Genetic diversity of the wheat yellow rust population in Pakistan and its relationship with host resistance. *Plant Pathology*, 60(4), 649-660.
- Beddow, J. M., Pardey, P. G., Chai, Y., Hurley, T. M., Kriticos, D. J., Braun, H. J., ... & Yonow, T. (2015). Research investment implications of shifts in the global geography of wheat stripe rust. *Nature Plants*, 1(10), 1-5.
- Bennypaul, H. S., Mutti, J. S., Rustgi, S., Kumar, N., Okubara, P. A., & Gill, K. S. (2012). Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat. *Functional & integrative genomics*, 12, 143-156.
- Biron, D. G., Nedelkov, D., Missé, D., & Holzmüller, P. (2011). Proteomics and Host—Pathogen Interactions: A Bright Future?. In *Genetics and Evolution of Infectious Disease* (pp. 263-303). Elsevier.
- Borah, M., & Konakalla, N. C. (2021). RNAi Technology: A novel platform in crop protection. *Emerging Trends in Plant Pathology*, 561-575.
- Boshoff, W. H. P., Pretorius, Z. A., & Van Niekerk, B. D. (2002). Establishment, distribution, and pathogenicity of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici in South Africa. *Plant Disease*, 86(5), 485-492.
- Bowen, J. K., Mesarich, C. H., REES-GEORGE, J. O. N. A. T. H. A. N., Cui, W., Fitzgerald, A., Win, J., ... & Templeton, M. D. (2009). Candidate effector gene identification in the ascomycete fungal phytopathogen *Venturia inaequalis* by expressed sequence tag analysis. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 431-448.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., & Hooykaas, P. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 14(13), 3206-3214.
- Bux, H., Ashraf, M., Hussain, F., Rattu, A. U. R., & Fayyaz, M. (2012). Characterization of wheat germplasm for stripe rust ('*Puccinia striiformis*' f. sp. 'tritici') resistance. *Australian Journal of Crop Science*, 6(1), 116-120.
- Chen, X. (2020). Pathogens which threaten food security: *Puccinia striiformis*, the wheat stripe rust pathogen. *Food Security*, 12(2), 239-251.

Chen, X. M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Canadian journal of plant pathology*, 27(3), 314-337.

Chen, W., Wellings, C., Chen, X., Kang, Z., & Liu, T. (2014). Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular plant pathology*, 15(5), 433-446.

Chen, W. Q., Wu, L. R., Liu, T. G., Xu, S. C., Jin, S. L., Peng, Y. L., & Wang, B. T. (2009). Race dynamics, diversity, and virulence evolution in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust in China from 2003 to 2007. *Plant Disease*, 93(11), 1093-1101.

Cheng, Y., Wu, K., Yao, J., Li, S., Wang, X., Huang, L., & Kang, Z. (2017). PST ha5a23, a candidate effector from the obligate biotrophic pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, is involved in plant defense suppression and rust pathogenicity. *Environmental Microbiology*, 19(5), 1717-1729.

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.

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

Değirmenci, K., & Ertunç, F. (2010). Virüs Enfeksiyonları ile Mücadelede Gen Susturulması ve Uygulamaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Derg. TR*, 8, 35-52.

Demirci, Y. E., Inan, C., Günel, A., Maytalman, D., Mert, Z., Baykal, A. T., ... & Hasançebi, S. (2016). Proteome profiling of the compatible interaction between wheat and stripe rust. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 941-962.

Dessalegn, Y., Ayele, A., & Tesfaye, S. (2020). Varieties Reaction for Wheat Rust Diseases in Hadiya Zone, Ethiopia.

Dong, Y., Li, Y., Zhao, M., Jing, M., Liu, X., Liu, M., ... & Zhang, Z. (2015). Global genome and transcriptome analyses of *Magnaporthe oryzae* epidemic isolate 98-06 uncover novel effectors and pathogenicity-related genes, revealing gene gain and lose dynamics in genome evolution. *PLoS pathogens*, 11(4), e1004801.

Dou, D., & Zhou, J. M. (2012). Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell host & microbe*, 12(4), 484-495.

Doughari, J. (2015). An overview of plant immunity. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 6(11), 10-4172.

Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y. C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., ... & Martin, F. (2011). Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9166-9171.

Dusunceli, F., Cetin, L., Albustan, S., & Beniwal, S. P. S. (1996, September). Occurrence and impact of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis*) in Turkey in 1994/95 crop season. In *Proceedings 9th European and Mediterranean Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference*, Lunteren, the Netherlands (p. 309).

- Eckardt, N. A. (2006). Identification of rust fungi avirulence elicitors.
- Fang, Y., & Tyler, B. M. (2016). Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular plant pathology*, 17(1), 127-139.
- Figuerola, M., Upadhyaya, N. M., Sperschneider, J., Park, R. F., Szabo, L. J., Steffenson, B., ... & Dodds, P. N. (2016). Changing the game: using integrative genomics to probe virulence mechanisms of the stem rust pathogen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 205.
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T., & Mitter, N. (2020). A perspective on RNAi-based biopesticides. *Frontiers in plant science*, 11, 51.
- Garg, A., Sharma, S., Srivastava, P., & Ghosh, S. (2021). Application of virus-induced gene silencing in *Andrographis paniculata*, an economically important medicinal plant. *Protoplasma*, 258, 1155-1162.
- Gebrie, S. A. (2016). Biotrophic fungi infection and plant defense mechanism. *J. Plant Pathol. Microbiol*, 7(378), 10-4172.
- Germain, H., Joly, D. L., Mireault, C., Plourde, M. B., Letanneur, C., Stewart, D., ... & Séguin, A. (2018). Infection assays in *Arabidopsis* reveal candidate effectors from the poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens. *Molecular plant pathology*, 19(1), 191-200.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.
- Green, H., Broun, P., Cakmak, I., Condon, L., Fedoroff, N., Gonzalez-Valero, J., ... & Roulin, A. (2016). Planting seeds for the future of food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1409-1414.
- Guest, D., & Brown, J. (1997). Plant defences against pathogens. *Plant pathogens and plant diseases*, 263, 286.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., & Alfano, J. R. (2009). The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(9), 1069-1080.
- Guttman, D. S., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2014). Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 797-813.
- Harris, J. M., Balint-Kurti, P., Bede, J. C., Day, B., Gold, S., Goss, E. M., ... & Alvarez, M. E. (2020). What are the top 10 unanswered questions in molecular plant-microbe interactions?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(12), 1354-1365.
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1·5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., & Pogue, G. P. (2002). Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, 30(3), 315-327.
- Hovmøller, M. S., Sørensen, C. K., Walter, S., & Justesen, A. F. (2011). Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses. *Annual review of phytopathology*, 49, 197-217.

- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., Yamada, K., Oshikawa, Y., Saitoh, H., ... & Takano, Y. (2019). Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(2), 496-505.
- Jackson, A. O., Lim, H. S., Bragg, J., Ganesan, U., & Lee, M. Y. (2009). Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 385-422.
- Jin, Y., Szabo, L. J., & Carson, M. (2010). Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of *Berberis* as an alternate host. *Phytopathology*, 100(5), 432-435.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Kanja, C., & Hammond-Kosack, K. E. (2020). Proteinaceous effector discovery and characterization in filamentous plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 21(10), 1353-1376.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., & Voegelé, R. T. (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(11), 1130-1139.
- Kolmer, J. A., Chen, X., & Jin, Y. (2009). Diseases which challenge global wheat production—the cereal rusts. In *Carver BF (ed) Wheat: Science and trade* (pp. 89-124). NJ, USA: Wiley Press Hoboken.
- Lee, W. S., Hammond-Kosack, K. E., & Kanyuka, K. (2012). Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. *Plant Physiology*, 160(2), 582-590.
- Lo Presti, 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.
- Louwens, J., & Sharma, S. (1992). Postulation of resistance genes to yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) in advanced wheat lines from Nepal. *Vortraege fuer Pflanzenzuechtung (Germany)*.
- 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(3), 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.
- Martinez, A., Youmans, J., & Buck, J. (2012). Stripe rust (Yellow Rust) of wheat. *Collage og Agricurtular and Environmental Sciences, College of Family and Consumer Sciences*.
- Mamluk, O. F., Çetin, L., Braun, H. J., Bolat, N., Bertschinger, L., Makkouk, K. M., ... & Düsünceli, F. (1997). Current status of wheat and barley diseases in the Central Anatolian Plateau of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 167-181.

Masanga, J. O., Matheka, J. M., Omer, R. A., Ommeh, S. C., Monda, E. O., & Alakonya, A. E. (2015). Downregulation of transcription factor aflR in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. *Plant cell reports*, 34, 1379-1387.

Mboup, M., Leconte, M., Gautier, A., Wan, A. M., Chen, W., de Vallavieille-Pope, C., & Enjalbert, J. (2009). Evidence of genetic recombination in wheat yellow rust populations of a Chinese oversummering area. *Fungal Genetics and Biology*, 46(4), 299-307.

McIntosh, R. A., Wellings, C. R., & Park, R. F. (1995). *Wheat rusts: an atlas of resistance genes*. CSIRO publishing.

Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in plant science*, 7(8), 352-356.

MERT Z., Ülkesel Serin İklim Tahıl Hastalıkları Araştırmaları Projesi, Serin İklim Tahılları Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı, Antalya-Türkiye, (2010).

Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 756-771.

Nødvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E., & Mortensen, U. H. (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PloS one*, 10(7), e0133085.

Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., ... & Schweizer, P. (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22(9), 3130-3141.

Panwar, V., Jordan, M., McCallum, B., & Bakkeren, G. (2018). Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNA i sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. *Plant biotechnology journal*, 16(5), 1013-1023.

Panwar, V., & Bakkeren, G. (2017). Investigating gene function in cereal rust fungi by plant-mediated virus-induced gene silencing. *Wheat Rust Diseases: Methods and Protocols*, 115-124.

Panwar, V., McCallum, B., & Bakkeren, G. (2013). Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. *Plant molecular biology*, 81, 595-608.

Pennington, H. G., Jones, R., Kwon, S., Bonciani, G., Thieron, H., Chandler, T., ... & Spanu, P. D. (2019). The fungal ribonuclease-like effector protein CSEP0064/BEC1054 represses plant immunity and interferes with degradation of host ribosomal RNA. *PLoS pathogens*, 15(3), e1007620.

Perfect, S. E., & Green, J. R. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular plant pathology*, 2(2), 101-108.

Pliego, C., Nowara, D., Bonciani, G., Gheorghe, D. M., Xu, R., Surana, P., ... & Spanu, P. D. (2013). Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(6), 633-642.

- Prasad, P., Savadi, S., Bhardwaj, S. C., Gangwar, O. P., & Kumar, S. (2019). Rust pathogen effectors: perspectives in resistance breeding. *Planta*, 250, 1-22.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 573.
- Rho, H. S., Kang, S., & Lee, Y. H. (2001). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, Magnaporthe grisea. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 12(3).
- Qi, T., Zhu, X., Tan, C., Liu, P., Guo, J., Kang, Z., & Guo, J. (2018). Host-induced gene silencing of an important pathogenicity factor P s CPK 1 in Puccinia striiformis f. sp. tritici enhances resistance of wheat to stripe rust. *Plant biotechnology journal*, 16(3), 797-807.
- Roelfs, A. P. (1992). *Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. Cimmyt.
- Saari, E. E., & Prescott, J. M. (1985). World distribution in relation to economic losses. In *Diseases, distribution, epidemiology, and control* (pp. 259-298). Academic Press.
- Salcedo, A., Rutter, W., Wang, S., Akhunova, A., Bolus, S., Chao, S., ... & Akhunov, E. (2017). Variation in the AvrSr35 gene determines Sr35 resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science*, 358(6370), 1604-1606.
- Saunders, D. G., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., & Raffaele, S. (2012). Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PloS one*, 7(1), e29847.
- Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F. E., Soyer, J. L., Tellier, A., & Croll, D. (2018). The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 56, 21-40.
- Schuster, M., Schweizer, G., & Kahmann, R. (2018). Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 112, 21-30.
- Schwessinger, B. (2017). Fundamental wheat stripe rust research in the 21st century. *New Phytologist*, 213(4), 1625-1631.
- Scofield, S. R., Huang, L., Brandt, A. S., & Gill, B. S. (2005). Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant physiology*, 138(4), 2165-2173.
- Singh, R. P., Duveiller, E., & Huerta-Espino, J. (2012). Virulence to yellow rust resistance gene Yr27: a new threat to stable wheat production in Asia. In *Meeting the Challenge of Yellow Rust in Cereal Crops* (p. 25).
- Singh, R. P., William, H. M., Huerta-Espino, J., & Rosewarne, G. (2004, September). Wheat rust in Asia: meeting the challenges with old and new technologies. In *Proceedings of the 4th international crop science congress* (Vol. 26, pp. 1-13). Brisbane, Australia: Published in CDROM.

- Sohn, K. H., Lei, R., Nemri, A., & Jones, J. D. (2007). The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 19(12), 4077-4090.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS pathogens*, 11(5), e1004806.
- Thakare, D., Zhang, J., Wing, R. A., Cotty, P. J., & Schmidt, M. A. (2017). Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing. *Science Advances*, 3(3), e1602382.
- Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J. N. M., & Kooter, J. M. (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *The Plant Journal*, 6(6), 861-877.
- Vleeshouwers, V. G., & Oliver, R. P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular plant-microbe interactions*, 27(3), 196-206.
- Voegele, R. T., & Mendgen, K. (2003). Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, 159(1), 93-100.
- Walter, S., Ali, S., Kemen, E., Nazari, K., Bahri, B. A., Enjalbert, J., ... & Justesen, A. F. (2016). Molecular markers for tracking the origin and worldwide distribution of invasive strains of *Puccinia striiformis*. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2790-2804.
- Walton, J. D. (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *The plant cell*, 8(10), 1723.
- Wan, A., Chen, X., & Yuen, J. (2016). Races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the United States in 2011 and 2012 and comparison with races in 2010. *Plant disease*, 100(5), 966-975.
- Wan, A., Zhao, Z., Chen, X., He, Z., Jin, S., Jia, Q., ... & Yuan, Z. (2004). Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China in 2002. *Plant Disease*, 88(8), 896-904.
- Wang, B. H., Ebbole, D. J., & Wang, Z. H. (2017). The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: diversity and interaction of Avr and R genes. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2746-2760.
- Wang, M. N., & Chen, X. M. (2013). First report of Oregon grape (*Mahonia aquifolium*) as an alternate host for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) under artificial inoculation. *Plant Disease*, 97(6), 839-839.
- Wellings, C. R. (2011). Global status of stripe rust: a review of historical and current threats. *Euphytica*, 179(1), 129-141.
- Wellings, C. R. (2007). *Puccinia striiformis* in Australia: a review of the incursion, evolution, and adaptation of stripe rust in the period 1979–2006. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(6), 567-575.

Wellings, C. R., McIntosh, R. A., & Walker, J. (1987). *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in eastern Australia-possible means of entry and implications for plant quarantine. *Plant pathology*, 36(3), 239-241.

Yoshino, K., Irieda, H., Sugimoto, F., Yoshioka, H., Okuno, T., & Takano, Y. (2012). Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(5), 625-636.

Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A. O., Liu, Z., Han, C., ... & Li, D. (2011). A high throughput barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PLoS One*, 6(10), e26468.

Zhao, J., Wang, L., Wang, Z., Chen, X., Zhang, H., Yao, J., ... & Kang, Z. (2013). Identification of eighteen *Berberis* species as alternate hosts of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* and virulence variation in the pathogen isolates from natural infection of barberry plants in China. *Phytopathology*, 103(9), 927-934.

Zhan, G. M., Chen, X. M., Kang, Z. S., Huang, L. L., Wang, M. N., Wan, A. M., ... & Jin, S. L. (2012). Virulence and molecular comparison of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* populations in China and the United States. *Fungal Biol*, 116, 643-653.

Zhang, H., Guo, J., Voegelé, R. T., Zhang, J., Duan, Y., Luo, H., & Kang, Z. (2012). Functional characterization of calcineurin homologs PsCNA1/PsCNB1 in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* using a host-induced RNAi system. *PLoS One*, 7(11), e49262.

Zheng, W., Huang, L., Huang, J., Wang, X., Chen, X., Zhao, J., ... & Kang, Z. (2013). High genome heterozygosity and endemic genetic recombination in the wheat stripe rust fungus. *Nature communications*, 4(1), 2673.

Zhu, L., Zhu, J., Liu, Z., Wang, Z., Zhou, C., & Wang, H. (2017). Host-induced gene silencing of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* pathogenicity genes mediated by the brome mosaic virus. *Genes*, 8(10), 241.

Zhu, X., Qi, T., Yang, Q., He, F., Tan, C., Ma, W., ... & Guo, J. (2017). Host-induced gene silencing of the MAPKK gene PsFUZ7 confers stable resistance to wheat stripe rust. *Plant physiology*, 175(4), 1853-1863.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğretim ve ortaöğretimini Tekirdağ'ın Muratlı ilçesinde tamamladı. Lise eğitimini Tekirdağ Anadolu Lisesi'nde 2016 yılında tamamladı. 2020 yılında Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nden TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı'nın desteğiyle lisans tezini tamamlayıp mezun oldu. 2020 yılında Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.