

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Puccinia striiformis f.sp. tritici* ADAY PATOJEN
EFEKTÖR GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE ÇOĞALTILMASI VE
KLONLANMASI**

Nasibe TEKİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR 2013

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Puccinia striiformis f.sp. tritici* ADAY PATOJEN
EFEKTÖR GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE ÇOĞALTILMASI VE
KLONLANMASI**

Nasibe TEKİNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

Prof. Dr. Mahinur S. AKKAYA

KIRŞEHİR 2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafındanAnabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ / DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvan, Adı-Soyadı

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../20..

(İmza Yeri)

Akademik Ünvan, Adı-Soyadı

Enstitü Müdürü

ÖZ

Puccinia striiformis f. sp. tritici (Pst), buğdayda sarı pas hastalığına sebep olan obligat, biyotrofik bir mantardır ve dünya çapında buğdaya en fazla zarar veren patojendir. Başta Türkiye olmak üzere dünya buğday üretimi için en büyük problemlerden birini oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında, direnç mekanizmasında rolü olduğu düşünülen Pst'ye ait aday efektör gen PstHa12j12'nin 342 baz uzunluğunda olan kısmı sentezletirilmiştir. Sentezletirilen gen fragmanının 180 baz uzunluğundaki bölüme özgün primerler dizayn edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı ve susturma vektörü olan pSL039B-1 vektörüne klonlanması amaçlandı. Daha ileriki aşamada Avocet Yr10 buğday çeşidinden enzimatik yolla protoplast hücrelerinin izolasyonu amaçlandı. PZR ile PstHa12j12 gen fragmanı çoğaltımı başarıyla gerçekleşti ve transformasyon sonucu klonlar elde edildi. Sekansa gönderilen klonların analiz sonuçlarına göre klonlama işleminin başarısız oldu, Avocet Yr10'den protoplast izolasyonu gerçekleşti fakat büyümeleri için konuldukları ortamda oluşan kontaminasyondan dolayı tek bir hücreden yeni bir bitki oluşumu gerçekleştirilemedi.

Anahtar Kelimeler: Buğday, *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, bitki immün sistemi, klonlama, protoplast.

ABSTRACT

Puccinia striiformis f. sp. tritici (Pst) is an obligate, biotrophic fungus which causes yellow rust disease and it is the major pathogen that gives destruction to the wheat around the world. Especially Turkey, one of the biggest problems for world wheat production.

In this thesis, the 342 base pair of PstHa12j12 gene, which has an important role on resistance mechanism in Pst, was synthesized. The primers specific to the 180bp of the synthesized gene fragment were designed. After amplified by PCR reaction, the gene fragment was aimed to inserted into the silence vector pSL039B-1. further studies, wheat cultivar Avocet Yr10 cells protoplast isolation with enzyme aimed. PstHa12j12 gene fragment was amplified by PCR succesfully and the clones were obtained after transformation. According to the results of clones sequence analysis the clonning process failed, protoplast isolation from Avocet Yr-10 was perfomed successfully but there was no plant growing observed since the culture medium was contaminated.

Key words: Wheat, *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, plant immune system, cloning, protoplast.

TEŞEKKÜR

Beni öğrencisi olarak kabul edip, kendisiyle çalışma şansı tanıyan ve bu süreç içerisinde bilgi ve deneyimlerini sevgi ve anlayışıyla harmanlayarak maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan, akademik hayatıma yön vermemde büyük önemi olan Prof. Dr. Mahinur S. AKKAYA'ya ve Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ'ye, çalışmamın laboratuvar aşamasında karşılaştığım güçlüklerde sabırlı ve sevecen yaklaşımıyla yardımlarını esirgemeyerek değerli fikirlerini paylaşan, sayın Yrd. Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL'e ve Yrd. Doç. Dr. Burcu ARSLAN ÇETİN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Yağmur AKSOY'a, Bayantes DAGVADORJ'a, Kutay ÖZTÜRK'e, Çağlar ÖZKETEN'e, Ayşe ANDAÇ'a ve Dilay KIZIŞAR'a teşekkür ederim.

Manevi ve maddi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan ve akademik çalışmalarımı her zaman destekleyen sevgili babam Mehmet TEKİNER'e, sevgili annem Gülser TEKİNER'e, ağabeylerim Derviş TEKİNER ve Yunus TEKİNER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1 BUĞDAY.....	1
1.2. SARI PAS HASTALIĞI.....	3
1.3. SARI PAS ENFEKSİYON SÜRECİ.....	6
1.4. PSTHA12J12 GENİ.....	7
1.5. BSMV SUSTURMA VEKTÖRÜ PSL039B-1PDS	8
1.6. PROTOPLAST	9
2. KURAMSAL ÇERÇEVE.....	12
2.1. DAYANIKLILIK GENLERİ (R GENLER)	13
2.2. HİPERSENSİTİF TEPKİ.....	14
2.3. BİTKİ İMMÜN SİSTEM.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. MATERYALLER.....	17
3.1.1. Kimyasallar	17
3.1.2. Alet ve Ekipmanlar	17
3.1.3. Tampon ve Çözeltiler.....	18
3.1.4. Bitki Materyalleri ve Büyüme Koşulları.....	19
3.2. YÖNTEM.....	19

3.2.1. Pstha12j12 Gen Sekansı	19
3.2.2. Pstha12j12 Gen fragmanı İçin Dizayn Edilen Primerler.....	20
3.2.3. Primer Hazırlanması	20
3.2.4. DNA Fragmentinin Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması	21
3.2.5. Agaroz DNA Jeli Hızırlanması ve PZR ürünlerinin Görüntülenmesi.....	21
3.2.6. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	22
3.2.7. Plazmit İzolasyonu	22
3.2.8. Pstha12j12 Gen Fragmanının pSL039B-1 Vektörüne Klonlanması.....	23
3.2.8.1. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile Pstha12j12 gen fragmanının ve pSL039B-1 vektörünün kesilmesi	23
3.2.8.2. Jel ekstraksiyon kiti ile DNA saflaştırılması.....	24
3.2.8.3. Ligasyon	25
3.2.8.4. Kompetent hücre hazırlanması.....	25
3.2.8.5. Ligasyon ürününün <i>E.coli</i> DH5a kompetent hücrelerine transformasyonu	26
3.2.8.6. Pozitif kolonilerin değerlendirilmesi	27
3.2.9. Protoplast İzolasyonu	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1. DNA FRAGMENTİNİN PZR İLE ÇOĞALTILMASI	30
4.2. PZR ÜRÜNÜ SAFLAŞTIRILMASI	31
4.3. PLAZMİT İZOLASYONU.....	31
4.4. RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMLERİ İLE PSTHA12J12 GEN FRAGMANININ VE PSL039B-1 VEKTÖRÜNÜN KESİLMESİ	32
4.5. JEL EKSTRAKSİYON KİTİ İLE DNA SAFLAŞTIRILMASI.....	33
4.6. LİGASYON VE TRANSFORMASYON	34
4.2. POZİTİF KOLONİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	35

4.8. SEKANS ANALİZİ.....	37
4.9. PROTOPLAST İZOLASYONU.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
6. KAYNAKLAR	42
EKLER.....	48
1. pSL039B-1 PLAZMİT SEKANSI.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.1. Ekmeklik buğdayın bilimsel sınıflandırması.....	2
Tablo 1.2. Dünyada buğday üretimi.....	3
Tablo 1.3. Pst'in bilimsel sınıflandırması.....	4
Tablo 1.4. Pst'ye ait haustorya cDNA kütüphanesindeki genler ve tahmini olarak kodladığı proteinlerin homolojileri.....	8
Tablo 2.1. Konukçu bitki-patojen ilişkileri.....	12
Tablo 3.1. Kimyasallar ve üretici firmalar.....	17
Tablo 3.2. Kullanılan alet ve ekipmanlar.....	17
Tablo 3.3. PstHa12j12 gen fragmanına özgün primerler.....	20
Tablo 3.4. PZR bileşenleri ve miktarları.....	21
Tablo 3.5. PZR koşulları.....	21
Tablo 3.6. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim reaksiyon karışımı.....	24
Tablo 3.7. Ligasyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar.....	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Dünyada sarı pas hastalığının dağılımı.....	3
Şekil 1.2. Buğday yaprağı ve başaklarında sarı pas.....	4
Şekil 1.3. Pst'ye ait yaşam döngüsü.....	5
Şekil 1.4. Pst'nin gelişimi ve bitkinin hücrel tepkisi.....	6
Şekil 1.5. pSL039B-1 vektörünün haritası.....	9
Şekil 2.1. Bitki immün sistemi gösteren zikzak modeli.....	16
Şekil 3.1. PstHa12j12 gen sekansı.....	20
Şekil 3.2. Avocet Yr10 buğday türünden protoplast izolasyon aşamaları.....	29
Şekil 4.1. pBSK-PstHa12j12 gen fragmanının PZR ile amplifikasyonu sonucu agaroz jel görüntüsü.....	30
Şekil 4.2. PZR ile çoğaltılan PstHa12j12 gen fragmanının saflaştırılması.....	31
Şekil 4.3. pSL039B-1 vektöründen plazmit izolasyonu.....	32
Şekil 4.4. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamele edilmiş PstHa12j12 gen fragmanının PZR ürünü ve pSL039B-1PDS vektörünün jel görüntüsü.....	33
Şekil 4.5. Agaroz jelden geri kazanılmış restriksiyon enzim kesim ürünleri.....	34
Şekil 4.6. LB-Agar/Amp'li besiyerinde pSL039B-1-Pstha12j12 geninin taşındığı tahmin edilen rekombinant <i>E.coli</i> kolonileri.....	35
Şekil 4.7. Transformantlardan elde edilen plazmit DNA konsantrasyonlarının NanoDrop sonuçları.....	36
Şekil 4.8. PstHa12j12 gen fragmanını taşıdığını varsaydığımız transformantların restriksiyon kesim analiz sonucu agaroz jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.9. Sekans analiz sonuçları.....	38

Şekil 4.10. Avocet Yr10 buğday türünden elde edilen protoplast hücreleri.....39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Pst: *Puccinia striiformis tritici*

PZR: Polimeraz zincir reaksiyon

RNA: Ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

cDNA: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit (Complementary deoksiribonucleic acid)

EST: Dizi ifade etiketi (Expression sequence tag)

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit (Messenger ribonucleic acid)

BMSV: Arpa çizgi mozaik virüs (Barley stripe mosaic virus)

VIGS: Virüs indüklenmesi sonucu gen susturulması (Virus induced gene silencing)

HR: Hipersensitif tepki (Hypersensitive response)

R: Dayanıklılık (Resistance)

NBS: Nükleotit bağlanma bölgesi (Nucleotide binding site)

LRRs: Lösin zengin tekrarları (Leucine rich repeats)

LB: Luria bertani

Amp: Ampicilin

mL: Mililitre

g: Gram

mg: Miligram

ng: Nanogram

µg: Mikrogram

pmol: Pikamol

M: Molar

μ M: Mikromolar

mM: Milimolar

μ L: Mikrolitre

w/v: Ağırlık/hacim (Weight/volume)

bp: Baz çifti (Base pair)

kb: Kilobaz

Dpi: Gün sonra inokülasyon (Day post inoculation)

PDS: Phytoene desaturase

Taq: *Thermus aquaticus*

pBSK: PBlueScript

KOH: Potasyum hidroksit

EtBr: Etidyum bromür

MgCl₂: Magnezyum klorür

CaCl₂: Kalsiyum klorür

PTI: Patojenin tetiklediği immünite

MAMP: Mikrop ilişkili moleküler motifler

PAMP: Patojen ilişkili moleküler motifler

PRRs: Patojen tanıma reseptörleri

TTSS: Tip üç salgı sistemi

ETI: Efektörün tetiklediği immünite

ETS: Efektörün tetiklediği hassaslık

RI: Ribonükleaz inhibitör

Vir: Virülan

Avr: Avirülan

U: Ünite

ATP: Adenozin 5'-trifosfat

GTP: Guanozin 5'-trifosfat

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat

MES: 2-N-morfolin etanosulfonik asit

MS: Murashige ve Skoog

1. GİRİŞ

Tahıllar insanoğlunun varolmasından günümüze kadar tüketilen başlıca besin kaynaklarından biridir. Tahıllar içerisinde ekim alanı ve besin değeri en fazla olan bitki buğdaydır.

Bitkiler doğada diğer canlılar ile etkileşim halinde olmakla birlikte yararlarının yanında zararlarına da maruz kalabilmektedirler. Konak olarak buğdayı seçen ve hastalıklara sebep olabilen bakteri, virüs, nematod ve mantarlar vardır. *Puccinia striiformis tritici*'de bunlardan biridir ve sarı pas hastalığına sebep olur. Bu mantarı diğerlerinden ayıran özelliği yaprak, sap ve başak kısımlarında sarı renkli çizgi şeklinde püstüller oluşturmalarıdır. Konak bitki patojenin saldırısına uğradığı zaman patojenden salgılanan efektör molekülleri bitkide bulunan dirençlilik genleri (R genler) tarafından tanınır ve sinyal iletimi ile immün sistem aktif hale gelir.

Bitkilerde hastalıkları önlemek amacıyla kimyasal yöntemler uygulanmıştır fakat kimyasalların çevreye ve insan sağlığına olan zararlarından dolayı pek tercih edilmemektedir. Bunun yerine biyoteknolojik yöntemlerden yararlanarak hastalık oluşturan patojen ve konak bitki arasındaki ilişkiyi anlayıp çözümler üretilerek daha başarılı ve sağlıklı sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu sebeple bu tez çalışmasında bitki direnç mekanizmasında rolü olduğunu düşündüğümüz aday efektör geni olan PstHa12j12 gen fragmanını PZR ile çoğaltılıp susturma vektörü olarak kullanılan pSL039B-1 vektörüne klonlanması amaçlanmıştır. Daha sonraki aşamada ise Avocet Yr10 buğday protoplast hücrelerinin izole edilip PstHa12j12 gen fragmanının protoplast hücrelerine aktararak bitkide meydana getirdiği değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1 BUĞDAY

Tahıllar dünyada kültüre alınan ilk bitkilerdendir ve ekonomik anlamda en yaygın olarak kullanılan çiçekli bitkiler içerisinde yer almaktadır¹. Ülkemizde işlenen tarım alanları içerisinde tahılların oranı % 52'dir ve insanlar tarafından tüketilen başlıca besin kaynağıdır. En fazla ekim alanı ile buğday tahıllar arasında ilk sırada yer almaktadır².

İnsanoğlu buğdayı 10.000 yıldan beri yetiştirmesine rağmen ancak M.Ö. 8000 yıllarında kültüre alınmıştır³. Buğday bitkisinin kökeni Güneybatı Asya kabul edilen Anadolu'nun doğusudur. Ayrıca Türkiye, Suriye, Irak ve Kafkasya'da yabani buğday türleri bulunduğundan dolayı bu bölgenin gen merkezi olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmektedir⁴.

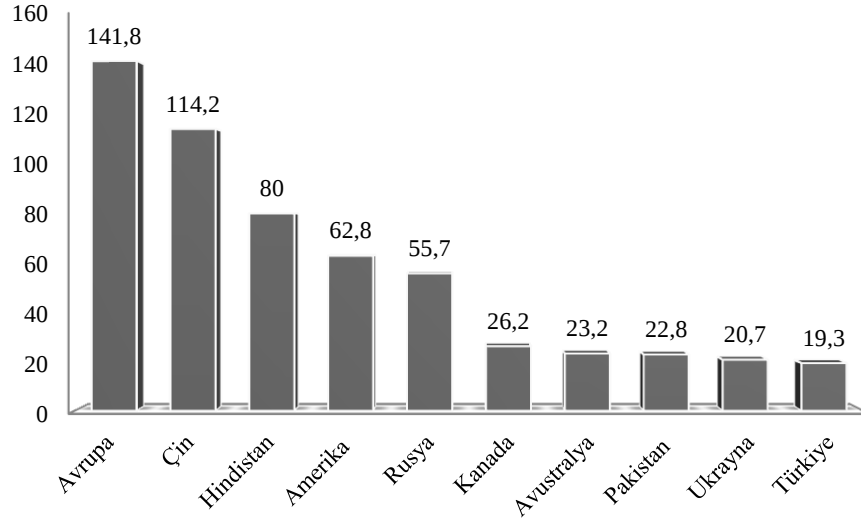
Tablo 1. 1. Ekmeklik buğdayın bilimsel sınıflandırması

Alem	<i>Plantae</i> – Bitkiler
Şube	<i>Magnoliophyta</i> – Çiçekli bitkiler
Sınıf	<i>Liliopsida</i> – Tek çenekli bitkiler
Ordo	<i>Cyperales</i>
Familiya	<i>Poaceae</i> – Buğdaygiller
Cins	<i>Triticum</i> – Buğday
Tür	<i>Triticum aestivum</i>

Buğday tanesinin içeriğindeki glutenden dolayı makarna, bisküvi ve unlu mamüllerin üretiminde^{3a}, alkollü içeceklerin kaynağı olarak, sentetik kauçuk ve patlayıcı maddelerin yapımında kullanılmaktadır. Buğday tanesi öğütüldükten sonra geriye kalan kepek kısmı ise hayvanların beslenmesinde kullanılır. Ayrıca yetiştirme şartları göz önüne alındığında kolay yetiştirilebilmesi, çevre şartlarına uyum sağlayabilmesi, depolanmasının kolay olması ve besin yönünden zengin maddeler içermesi buğdayın önemli bir bitki olmasını sağlayan özelliklerdendir⁵.

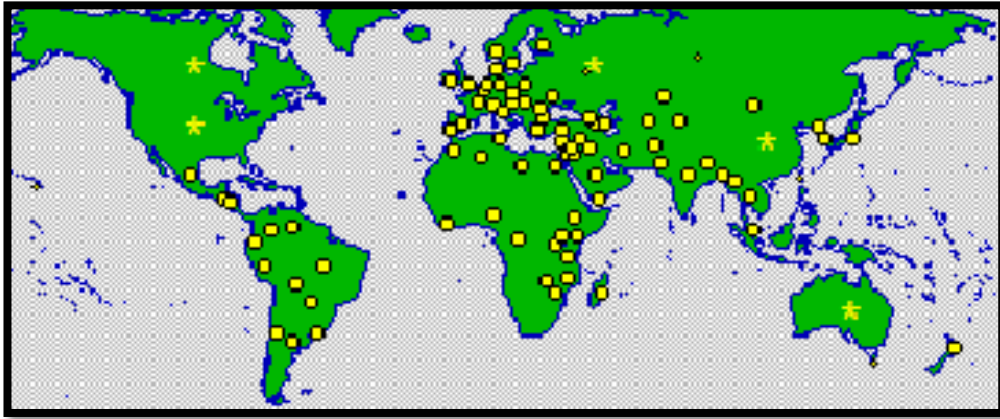
Dünyada yıllık buğday üretimi 600 milyon tonun üzerindedir ve 2020'ye kadar bu miktarın yaklaşık 1000 milyon tonu aşması tahmin edilmektedir. Türkiye'nin bu üretime katkısı FAO'nun (Food and agriculture organization) verilerine göre 19.3 milyon tondur ve ilk 10 ülke arasında yer almaktadır (Tablo 1.2).

Tablo 1. 2. Dünya’da buğday üretimi (www.fao.org, 2011)



1.2. SARI PAS HASTALIĞI

Sarı pas hastalığı Pst’nin tahrip edici etkisi nedeniyle dünya çapında önemli bir pas hastalığıdır. Antartika hariç 60’tan fazla ülkede sarı pas hastalığına rastlanmamıştır⁶.



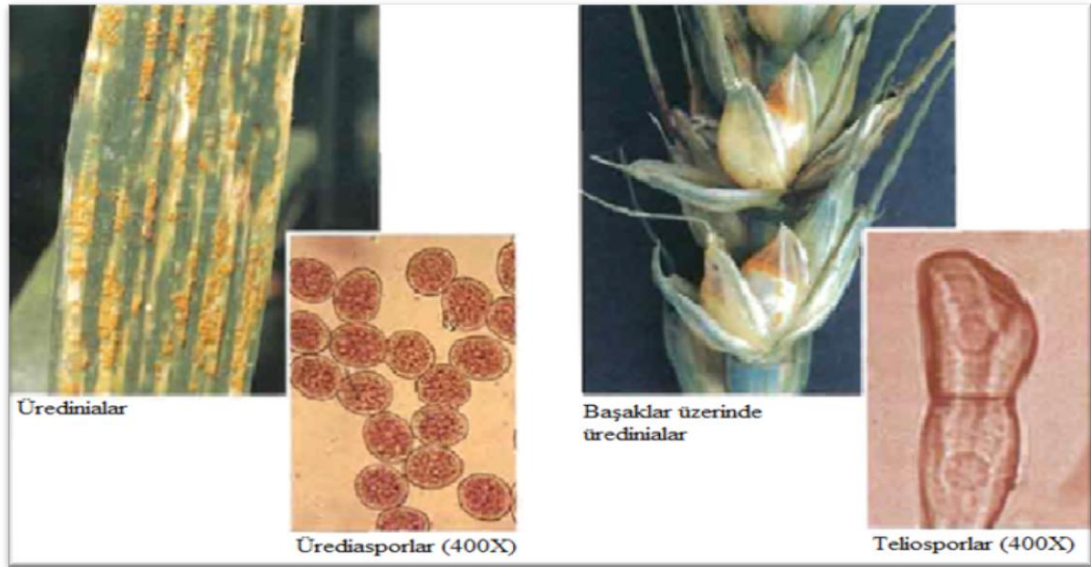
Şekil 1. 1. Dünyada sarı pas hastalığının dağılımı (CABI, 2000).

Çizgi pası olarak da bilinen sarı pas hastalığı ilk kez Gadd (1777) tarafından tanımlanmıştır. Hastalık hakkında ilk rapor ve bilgiler Hassebrauk (1965), Stubbs (1985), Line (2002), Li ve Zeng (2003) tarafından verilmiştir⁷.

Tablo 1. 3. Pst 'nin bilimsel sınıflandırması

Alem	<i>Fungi</i>
Şube	<i>Basidiomycota</i>
Sınıf	<i>Urediniomycetes</i>
Ordo	<i>Uredinales</i>
Familya	<i>Pucciniastraceae</i>
Cins	<i>Puccinia</i>
Tür	<i>Puccinia striiformis</i>
Varyete	<i>Puccinia striiformis tritici</i>

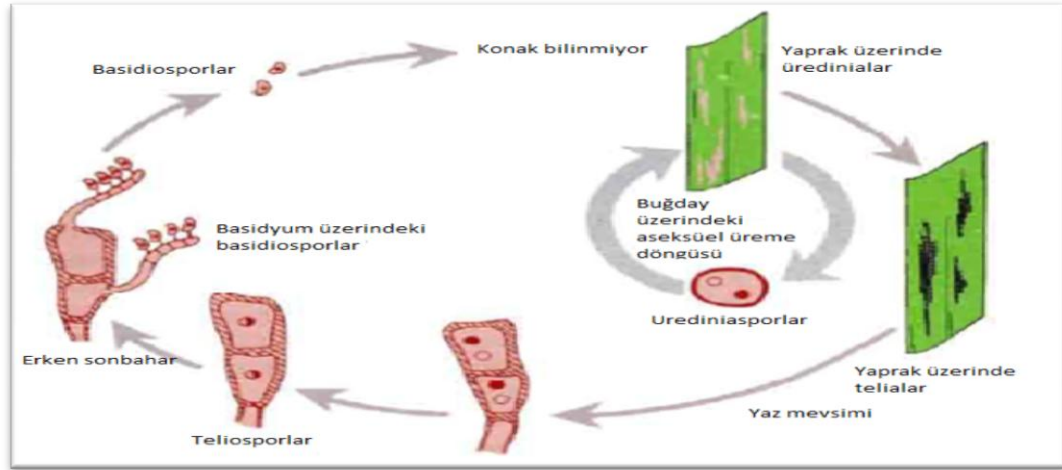
Sarı pas hastalığına sebep olan Pst obligat, biyotrofik bir mantardır. Tahılların sap, başak ve yapraklarında görülür. Yaprakların üzerinde sarı renkli çizgiye benzer dikiş şeklinde püstüller oluşturur. Püstüller yazlık sporların üretildiği yerlerdir. Sarı pas hastalığı buğday haricinde yaklaşık 300 adet kültür ve yabani buğdaygiller familyasına ait türde de hastalığa sebep olmaktadır ama ana konak bitkisi buğdaydır⁸.



Şekil 1. 2. Buğday yaprağı ve başaklarında sarı pas⁸.

Sarı pas hastalığı bitki gelişiminde en erken görülen pas mantarıdır ve başlangıç enfeksiyon noktasının ötesinde sürekli yayılma gösteren tek buğday pasıdır⁸. Bu hastalıkla mücadele etmek ve enfeksiyon sırasında bitkide ne gibi değişiklikler olduğunu anlayabilmek için patojenin yaşam döngüsünün bilinmesi gerekmektedir. Sarı pasın yaşam döngüsü iki safhadan oluşmaktadır bunlar; üredinial (yazlık sporlar) ve telial (kışlık sporlar) safhalardır. Patojenin üredosporları yuvarlak veya oval, çeperleri dikenli, üç veya dört adet olan porlar ise yüzey üzerine

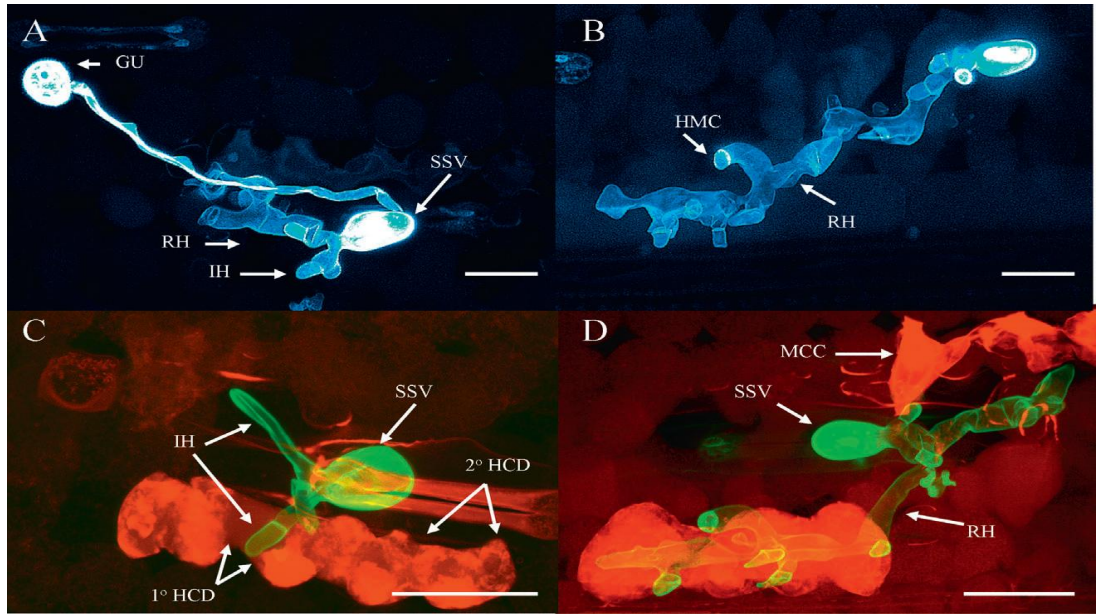
dağılmıştır. Teliosporlar ise uzunca, hücre çeperi kalın ve düz iki hücreli, bu hücreler arası hafif boğumludur. Buğday tarlalarında ilkbaharda hava sıcaklığının 10-15 °C arası olduğu zaman nem ile birlikte hastalık görülmeye başlar. Çizgi gibi uzunlu kısıklı dikiş benzeri püstüllerin içinde patojenin yazlık sporları oluşur. Bu püstüller limon veya portakal rengindedir. İlkbaharda bu püstüllerden oluşan milyonlarca yazlık spor rüzgâr ile çevreye dağılarak uygun koşullar sağlandığında buğday bitkilerine bulaşır ve yeni püstüller oluştururlar. Hastalığın oluşumunda sıcaklık ve nem çok önemlidir. Üredosporların çimlenip konukçuya giriş yapabilmesi için % 100'e yakın oranda neme veya yağışa gereksinim vardır. Mevsim sonunda üredosporların yataklarından aynı püstüllerde siyah renkli teliosporlar (kışlık sporlar) oluşur ve hayat devresinde bir önemi bulunmamaktadır. Patojen yaz mevsimini, yüksek rakımlı bölgelerde canlı kalan yabani buğdaygillerde, kış mevsimini ise güzlük ekilen buğdaylar üzerinde ürediospor veya ürediomisel halinde geçirir. Pas mantarının inkübasyon süresi 12-14 gün ve ara konukçusu bilinmemektedir. Fakat son yapılan araştırmalara göre Berberis, Valerianella ve Mahonia'nın alternatif konakları olabileceği bildirilmektedir⁹.



Şekil 1. 3. Pst'ye ait yaşam döngüsü⁸.

1.3. SARI PAS ENFEKSİYON SÜRECİ

Pst'ye ait aseksüel hayat döngüsü iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Hava ile taşınmış olan üredinosporlar bitki yüzeyinde çimlenir ve stoma açıklığı boyunca bitki içerisine girer. Stoma boşluğunun içerisinde 3 adet enfeksiyon hiflerinin geliştiği bölgede bir adet substomatal vezikülü oluşmaya başlar. Bir enfeksiyon hifi ve konak mezofil hücresi arasında kontakt (bağlantı) kurulmak üzere iken ana haustorya hücresi farklılaşır. Mezofil hücre duvarına doğru dallanan enfeksiyon kancası gelişir ve mezofil hücresinin içerisinde haustoryum oluşur. Yaprak boyunca gelişen, daha çok haustorya oluşumunu sağlayan hücreler arası dağıtıcı (runner) hif meydana gelmesi daha fazla kolonizasyonu sağlar. Enfeksiyondan 14 gün sonra aseksüel yaşam döngüsü tamamlanır ve üredinosporlar yaprak yüzeyine çıkarak sarı pasa özgülü olan sarı püstüller meydana gelir¹⁰. Patojenin gelişiminin farklı safhalarında sarı pasa ait farklı R genleri görülmesi enfeksiyon sürecini anlamayı zorlaştırmaktadır¹¹. Enfeksiyon sürecinin bilinmesinin en iyi yolu hücresel ve moleküler mekanizmaların arkasındaki ırka özgü dayanıklılığın anlaşılmasıdır¹².



Şekil 1. 4. Pst gelişimi ve bitkinin hücresel tepkisi (A) Çimlenen üredinospor (GU), substomatal vezikül (SSV), birinci enfeksiyon hifi (IH) ve dağıtıcı (runner) hifi (RH). (B) Dağıtıcı (runner) hifinin uzunluğu boyunca oluşan haustorya ana hücresi(HMC) (C) Mezofil birincil (1°HCD) ve ikincil (2°HCD) hipersensitif hücre ölümü. (D) Çökmüş mezofil hücreleri (MCC). Bütün resimler 72 hpi(hour post inoculation=saat saat sonra inökülasyon) Avocet 6/Yrl ve Yrl-avirulan izolatının 232E137 ile etkileşimi Bar=50 mm¹³.

1.4. PSTHA12J12 GENİ

PstHa12j12 geni Pst türüne ait bir gendir. Bu gen Pst ile yüksek düzeyde enfekte edilmiş hassas ekmeklik buğday da oluşan haustorya elde edildikten sonra yapılan cDNA sekans analizi sonrasında elde edilmiştir. Yin ve ark.,¹⁴ tarafından yapılan çalışmada haustoryada ifade edilen tüm RNA'lardan (ribo nükleik asit) mRNA'lar elde edilerek oluşturulan cDNA kütüphanesinden gen sekansları bulunmuştur. Sekans sonucu elde edilen EST'ler (Express Sequence Tags) BLAST yapılarak diğer protein ve patojenlerle arasındaki etkileşime bakılarak 15 adet gen belirlenmiş ve PstHa12j12'de bu genlerden bir tanesidir (Tablo 1. 4). Bu genin anlatım seviyesi analizlerine göre Pst ile muamele edilmiş yapraklar üredinosporlara göre 100 kat daha fazla anlatım gerçekleştirmiştir ve sekans sonucunda bitki genomu ile homoloji göstermemektedir. Pst ile enfekte edilmiş yaprakların anlatım düzeylerinin artması bu genin patojen tarafından salgılanıp bitkide hastalık oluşturmada önemli bir role sahip olduğu görülmektedir.

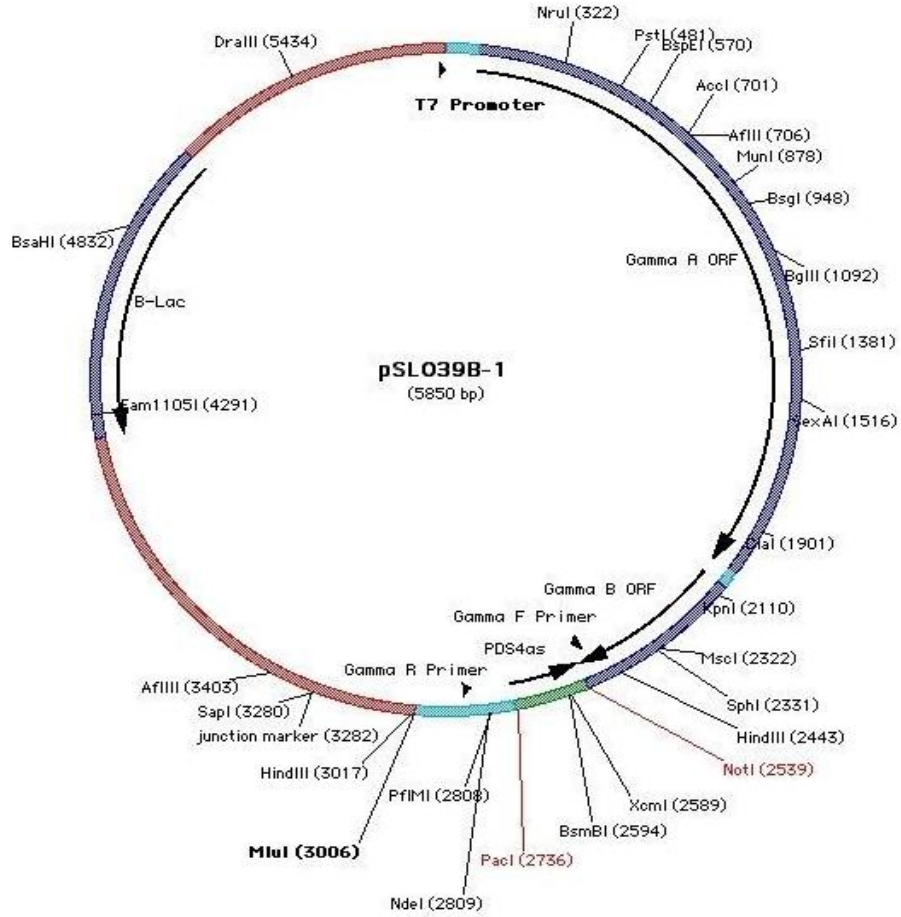
Günümüze kadar yapılan çalışmaların incelenmesi sonucunda PstHa12j12 yeni bulunan bir gendir. Bu genin fonksiyonu ve kodladığı proteinin diğer proteinlerle etkileşimi henüz bilinmemektedir. Hulbert H. S. ve ark. (2010) yaptıkları gen susturma çalışmalarında PstHa12j12 geninin anlatım seviyesinde % 53 azalma tespit etmişler ve BMSV-VIGS yöntemi ile PstHa12j12 geninin yazılımının baskılanabileceğini göstermişlerdir.

Tablo 1. 4. Pst'ye ait haustorya cDNA kütüphanesindeki genler ve tahmini olarak kodladığı proteinlerin homolojileri¹⁴.

Gen	GenBank No	Boyut (a.a)	Homoloji
PstHa2a5	GH737102	117	<i>P.graminis</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa9F18	GH737274	259	<i>P.graminis</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa12a4	GH737444	289	<i>P.graminis</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa12j12	GH737467	133	Homolojisi yok
PstHa15N21	GH737567	98	Homolojisi yok
PstHa21O8	GH737139	92	Kabul edilen sülfat transportör
PstHa5a23	GH737046	108	Homolojisi yok
PstHa6i16	GH737950	73	<i>P.graminis</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa8F13	GH737007	116	Homolojisi yok
PstHa2c7	GH737231	204	<i>P.graminis</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa1683	GH737129	87	Homolojisi yok
PstHa10F24	GH737323	56	Homolojisi yok
PstHa16D6	GH737598	66	<i>Aspergillus niger</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa9C13	GH738022	65	<i>P.graminis</i> 'de tahmin edilen protein
PstHa12h2	GH737173	70	Homolojisi yok

1.5. BSMV SUSTURMA VEKTÖRÜ PSL039B-1PDS

Arpa çizgi mozaik virüsü (BSMV) Hordeivirus grubuna ait arpayı enfekte eden bir virüstür. Asıl konak olarak kullandığı bitki arpa olmasına rağmen buğday bitkisinde enfekte edebilmektedir. BSMV genomu üç bölümden oluşmaktadır α , β , γ ¹⁵. pSL039B-1PDS vektörünün yapısında 185 baz uzunluğundaki PDS geni *PacI* ve *NotI* enzimleri ile kesilip yerine PstHa12j12 gen fragmanı konulmak üzere tasarlanmıştır. pSL039B-1PDS vektörü Steven R., Scofield of Purdue University, USA'dan temin edilmiştir.



Şekil 1. 5. pSL039B-1PDS vektörünün haritası.

1.6. PROTOPLAST

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan yöntemlerden biri protoplast izolasyonu ile gen aktarımıdır. Bitki hücreleri selülozdan oluşan bir hücre duvarıyla çevrilmiş ve doku içerisindeki hücreler birbirlerine zengin bir matriks ile bağlıdırlar. Mekanik ya da enzimatik yollarla bitki hücre duvarının uzaklaştırılması sonucu oluşan yapıya da protoplast denir.

Protoplasma ismi ilk kez Purkinje tarafından 1840 yılında ve daha sonra Von Mohl tarafında 1846 yılında önerildi. Protoplasma bugün bildiğimiz en kompleks yapılardandır. Canlı protoplasma organizmadan organizmaya ve hücreden hücreye yapısı değişse de ortak metabolizma, büyüme, üreme ve uyarılabilme özelliklerinin fazla değişmediği gözlenmektedir.

Yüksek yapılı bitkilerde mekanik yolla protoplast izolasyonu ilk kez 1892’de, 1960’lı yıllarda ise enzim uygulaması yoluyla canlı protoplast izolasyonu

gerçekleştirilmiştir. Protoplast çalışmalarının temel amacı, bir tek hücreden yeni bir bitki oluşumunu sağlayabilmektir¹⁶. Protoplastlardan bitki rejenerasyonu ilk kez tütün bitkisinde gerçekleştirilmiştir¹⁷. Günümüzde ise tek yıllık bitkiler¹⁸, baklagiller¹⁹ ve çok yıllık bitkilerde²⁰ protoplast kültürü çalışılmıştır.

Protoplastlar genellikle dokuların protoplast yapısını ve canlılığını koruyacak, osmotik basıncın sabit kalmasını sağlayacak, hücre duvarını parçalayacak enzimlere maruz bırakılarak izole edilir. Başarılı bir protoplast izolasyonu; kullanılan doku ve hücrelerin fizyolojik durumuna, kullanılan enzimlere, solüsyon bileşimlerine, osmotik basıncın stabilizasyonu sağlayacak maddelerin yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır.

Protoplast izolasyonunda genel olarak yapraklar kullanılır. Genç bitkiler veya yeni sürgünlerden alınan tam olarak açılmış yapraklar protoplast izolasyonu için uygundur. Yaprığın yaşı ve yaprağın alındığı bitkinin yetiştiği ortamdaki ışık, sıcaklık, toprak verimliliği ve su gibi çevre koşulları protoplast verimini, canlılığını ve kalitesini önemli derecede etkiler. Dokunun fizyolojik durumu protoplast izolasyonunda önemli bir faktör olduğu için bitkiler çevre koşullarının kontrol edilebildiği iklim odalarında ve seralarda yetiştirilir.

Protoplast izolasyonunda yaprak dokusunun dışında, sürgün uçları, kotiledonlar, çiçek petalları, mikrosporlar, kallus ve hücre süspansiyonları da protoplast kaynağı olarak kullanılabilir.

Protoplast teknolojisinin iki önemli uygulama alanı somatik melezleme ve protoplastlara doğrudan gen aktarımıdır. Somatik melezleme, farklı çeşit, tür veya cinsten iki protoplastın genellikle PEG (polyethylene glycol) yardımıyla kaynaştırılması olayına denir. İzole edilmiş protoplastlar çekirdek ve kloroplast gibi bitki organellerini içine alabilmektedir. Ayrıca protoplastların protein, DNA ve mikro molekülleri, içine alabildiği araştırmalarda saptanmıştır. Bakteri ve diğer organizmaların DNA'sı protoplastlar tarafından alınabilmektedir. Bu yolla protoplastlara doğrudan gen aktarımı yapılmaktadır. İşlemin yapılabilmesi için sadece bu genleri taşıyan plastitlerin veya fajların elde edilmesi yeterli değildir. Bunlar doğrudan bir bitkiye aktarılma yerine hücrelerin içine sokulabilirler ve protoplastlar bu tür gen manipülasyonu çalışmalarında ideal bir materyal oluştururlar.

Bu özelliğinin yanı sıra genetik değişikliğe uğratılarak yeni bitki bir oluşturma yeteneğinede sahiptirler.

2. KURAMSAL ÇERÇEVE

Ekosistem içerisinde bitkiler diğer canlılarla sürekli etkileşim halindedir. Mikroorganizmaların ve böceklerin olumlu ya da olumsuz etkilerine maruz kalırlar. Olumsuz etkilerden kendilerini korumak için bitkiler birçok savunma mekanizması geliştirmiştir. Bu mekanizmalar bazı patojenler için engelleyici olsa da bazıları için engelliyici değildir ve bunun sonucunda bitkide hastalıklar meydana gelir. Bu hastalıkların tarımda verimliliği azaltıcı etkisinin yanısıra ürün kayıplarına da sebep olmaktadır. Bu yüzden bitki patojenle karşılaştığında patojene karşı verdiği tepki bitki savunma mekanizmalarını anlamada büyük yarar sağlayacaktır.

Bitki immün sistemi omurgalı canlılarınkinden farklıdır. Örneğin, omurgalılar gibi kan dolaşım sistemi, antikorları, gezici hücreleri yoktur. Bitkilerin sahip oldukları immün sistem bazı patojen ve pestisitlere karşı doğal dayanıklılık gösterirken farklı patojenlere karşı daha duyarlı olurlar. Bu duruma temel dayanıklılık (genel dayanıklılık) denir ve uzun ömürlüdür. Temel dayanıklılığın mekanizması birçok durumda bitkide patojen sporlarının gelişmesini, hücre ve dokularda lezyonların oluşmasını engeller. Bitki, patojenin hücre içine girmesini engelleyici veya hücre içine girmeyi başarmış etkenin çoğalmasını ve yayılmasını önleyebilecek kimyasal maddelere (antimikrobiyal bileşikler, enzimler, yapısal savunma engelleyicileri vb.) ve fiziksel engellere sahiptir. Bu durum bitkinin hastalığa karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır.

Tablo 2. 1. Konukçu bitki-patojen ilişkileri

Patojen genotip	Konukçu bitki genotip		
	RR	Rr	rr
AA (Avirulan)	Dayanıklı	Dayanıklı	Hassas
Aa (Avirulan)	Dayanıklı	Dayanıklı	Hassas
aa (Virulan)	Hassas	Hassas	Hassas

Herhangi bir patojen konukçu bitki üzerinde normal yaşamını devam ettirirken bitkiye zarar veriyorsa, bitki hassas, patojen virulan ve aralarındaki ilişki uyumlu ilişki olarak adlandırılır. Patojen bitki üzerinde normal yaşamını devam ettirirken, bitkide herhangi bir zarar ortaya çıkarmıyorsa, bitki o patojene karşı toleranslıdır denir. Eğer bir patojen konukçu bitki üzerinde gelişme ve çoğalmasını

tümüyle durdurursa, bu durumda konukçu bitki dayanıklı, patojen avirulan ve konukçu-patojen arasındaki ilişkiler de uyumsuzdur denir. Patojen konukçu bitki üzerinde gelişmeye başlamakta ve konukçu hücrenin etrafındaki komşu hücreler hızlı bir şekilde apoptoz (programlanmış hücre ölümü) duruma geçerek patojenin konukçu bitkide yayılmasını engelliyorsa bu duruma hipersensitif tepki (aşırı duyarlılık) denir²¹.

2.1. DAYANIKLILIK GENLERİ (R GENLER)

Bitki savunma mekanizmalarından en önemlisi R (resistant=dayanıklılık) genleridir²². R genleri patojene karşı dayanıklılığı sağlayan yapısal proteinlerdir²³. Genelde patojenleri tanıma ve patojenlerin büyümesini engellemekle görevlidirler. Dayanıklı bitkide bulunan R proteinleri patojene ait avirulan (Avr) proteinlerini tanır ve direnç oluşumunu uyarır. Bu mekanizmaya gene karşı gen hipotezi (gene for gene resistance) denir²⁴. R proteininin dayanıklılık mekanizmasını başlatabilmesi için R-Avr etkileşimi olmalıdır. Bu etkileşim sonucu oluşan sinyal mekanizması patojenin bitkiye enfekte olmaya çalıştığı bölgedeki hücrelerde Hipersensitif Tepki (HR) ortaya çıkar ve patojenin o bölgedeki saldırısını etkin bir şekilde sınırlandırır. Bitki-patojen ilişkisi boyunca HR dahil birçok savunma mekanizması aktif hale gelmektedir. R protein veya Avr proteinin olmadığı durumlarda etkileşim olmadığı için patojen bitki tarafından algılanamaz ve patojen bitkide yayılmaya başlar²⁵.

Flor (1971)²⁴,un gene karşı gen modeline göre, Avr geni tarafından sentezlenen efektör ya da elisitör, R geninin ürününe bağlanarak aktive olur. Aktif duruma geçen R geninin ürünü de savunma yanıtını başlatacak olan sinyallerin iletimini sağlar. İzole edilen R genlerinin büyük çoğunluğu, maya, *Drosophila* ve memelilerde bulunan reseptör proteinlere yapısal benzerlik gösteren proteinleri kodlarlar. R genlerinin ürünleri de reseptör benzeri fonksiyonları yerine getirirler²⁶. R proteinlerinin büyük çoğunluğunun yapısında NBS (Nucleotide Binding Site=Nükleotit bağlanma bölgesi) ve LRR (Leucine Rich Repeat=Lösin zengin tekrarı) altbirimleri bulunur. Bitkilerde NBS-LRR yapısını gösteren çok sayıda gen bulunmaktadır. Örneğin *Arabidopsis thaliana* genomunun % 1'ini NBS-LRR yapısındaki genler oluşturmaktadır²⁷. NBS-LRR genlerindeki NBS, ATP veya GTP bağlarken, LRR birimi protein-elisitör/efektör etkileşiminden sorumludur. Tanıma

işlevinin spesifik oluşunu LRR birimi sağlar²⁸. LRR biriminin üç boyutlu yapısı ilk kez ribonukleaz inhibitöründe (RI) incelenmiştir²⁹ ve NBS'lerden birine karşılık gelmektedir³⁰.

Genel olarak buğday allohektaploid'dir ($2n = 6x = 42$) ve oldukça uzun genoma sahiptir (her bir haploid hücre için 16 milyon kb) ve bununla birlikte % 80'den daha fazla tekrarlayan DNA sekansları bulunmaktadır. Bu özellik buğday genomunun agronomik öneme sahip genlerin genetik metotlarla klonlanmasını zorlaştırmaktadır. Günümüze kadar buğdaydan sadece üç tane R geni izole edilmiş ve yayınlanmıştır. 50 adet *Lr* geninin sadece fenotip ve/veya kromozom üzerindeki pozisyonları bilinmekle birlikte sadece bunlardan 2 tanesinin fonksiyonu karakterize edilmiştir. Bunlar *Lr21*³¹ ve *Lr10*³² genleridir. Buğdayda üçüncü R geni ise *Pm3*'dür ve külleme hastalığına karşı dayanıklılıktan sorumludur³³. *Yr10* geni ise buğdayda sarı pas hastalığına neden olan bir *Pst* ırkına (*Avr10* içeren) karşı dayanıklılıktan sorumludur ve GenBank'ta sekansına ulaşmak mümkündür³⁴, ancak henüz NCBI'daki sekansı *Yr10* direnç aktivitesine sahip olduğunu kanıtlayan bir çalışmaya literatür araştırmasında rastlanmamıştır.

2.2. HİPERSENSİTİF TEPKİ

Gene-karşı-gen etkileşiminin tetiklediği dayanıklılık mekanizması hipersensitif tepki olarak adlandırılır. Hipersensitif tepki yapısal bir savunma mekanizmasından çok biyokimyasal bir savunma mekanizmasıdır. Aşırı duyarlı yanıt da denilen hipersensitif tepki, komşu hücreleri patojenin varlığına karşı uyaracak olan sinyal moleküllerin oluşturulması, antimikrobiyal enzim ve metabolitlerin sentezi, enfeksiyonun gerçekleştiği bölgeyi çevreleyen hücre duvarlarının güçlendirilmesi ve patojenle temas kuran hücrelerin programlı ölümü gibi mekanizmaları kapsar. Programlı hücre ölümü bitkinin patojene gösterdiği en önemli dayanıklılık mekanizması olup, hücre bileşenlerinin kahverengileşmesine neden olan katalitik reaksiyonlar tarafından gerçekleştirilir. Ölü hücreler geçirgen olmayan bir tabaka oluşturarak, patojeni sağlıklı hücrelerden uzak tutar ve patojenin yayılmasını engeller³⁵. Patojen ile etkileşime giren konukçu hücre ne kadar hızlı ölürse, bitki enfeksiyona o kadar dayanıklı olur.

2.3. BİTKİ İMMÜN SİSTEM

Bitkilerde hastalıklara karşı dirençlilik ekonomik açıdan önemli bir sorundur ve bu konu üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır. Bitkilerde dirençlilik mekanizmasının anlaşılması ve genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi bitki immün sistemini anlamak üzere atılan büyük adımlardandır.

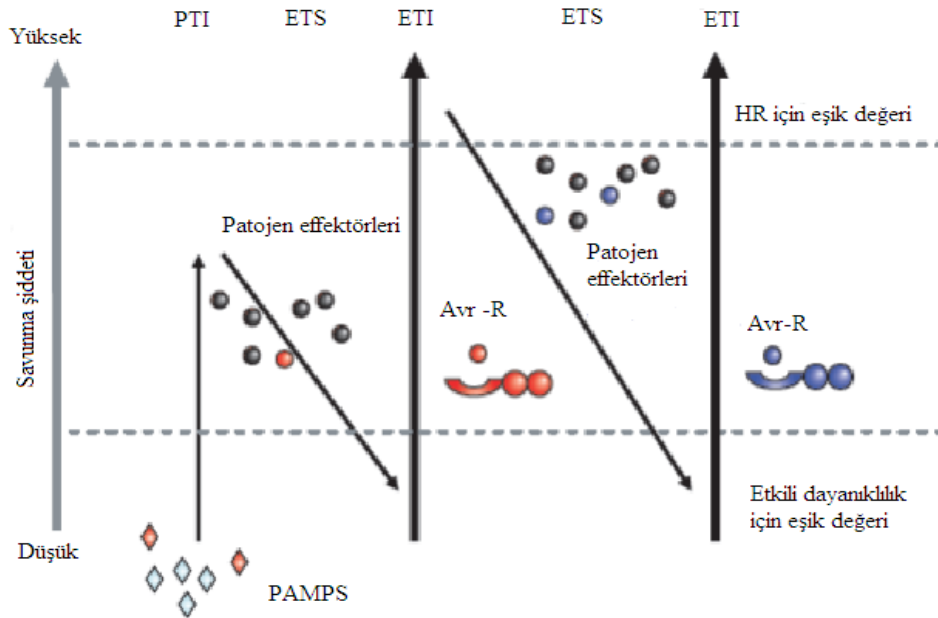
Bitki ve patojen arasındaki ilişkinin evrimsel süreci Jones ve ark. (2006)^{36a}’larının zikzak modeline göre dört bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde, bitki patojen tarafından salgılanan faktörler yani mikrop ilişkili moleküler motifleri (MAMPs) tanıdığı zaman bazal savunmayı indükler. Bu immüniteye patojenin tetiklediği immünite, PTI, denir. Örneğin bakteriyal flajellinler, mantar kökenli kitin, Pep-13 gibi MAMP’lar bitki tarafından tanınır. Mikrop ilişkili moleküler motifler (MAMPs) bitkinin motif tanıma reseptörleri (PRRs) tarafından tanınır. Örneğin flg2 flajellin domain membran üzerinde konumlanmış olan FLS2 adlı LRR-RKs (leucine rich repeat-receptor kinase=Lösün zengin tekrar-reseptör kinazlar) tarafından tanınır. PRRs tarafından tanınan MAMPs zayıf bir immünite sağlar ve daha fazla kolonizasyonu engeller³⁶.

İkinci bölümde patojen bazal savunmanın üstesinden gelmek için bazı adaptasyonlar geliştirir fakat patojen ataklarına karşı çok etkili değildir. Patojenin bu modifikasyonları çoğunlukla konağa özgüdür. Bu bölümde patojenler PTI’nın üstesinden gelir ve ETS ile sonuçlanır. Bu baskılama patojenin kazandığı bazı fonksiyonlar; örneğin yapısal rol ile başarılıdır. Patojenler ayrıca küçük moleküller üretirler ve bunlar bitki hücrelerinin fonksiyonlarını taklit eden ya da tahrip eden moleküllerdir. Örneğin taklit eden bitki hormonlarından jasmonik asit, oksin, giberellin ve sitokinin patojenin konak hücreyi başarılı bir şekilde istila etmesini sağlar. Bu moleküllerin dağıtımı TTSS (Tip üç salgı sistemi) tarafından yapılır. TTSS, PTI’yı baskılar ve böylece PTI’da daha fazla kolonizasyona izin verir³⁶. TTSS daha çok bakteriyal patojenler için kullanılır ama mantar patojenleri için kullanımıyla ilgili yeterli çalışmamabulunmamaktadır.

Bitki cevap süreci dayanıklı patojenlere karşı bitkilerin evrimini içerir. Spesifik elisitörler diğer bir deyişle avirülen (Avr) genleri R genleri tarafından tanınır

ve ETI (effektörün tetiklediği immünite) oluşur. Bitkide R geni patojende Avr geninin her ikisi de bulunduğu zaman patojene dayanıklılık oluşur fakat bu genlerden biri olmadığı zaman hastalık görülür. Bu R-Avr ilişkisi zincir sinyal transdüksiyonu olaylarını tetikler ve patojenin kolonize olmasını engellenir. R geni aracılı ETI çok hızlı, güçlü ve PTI'dan daha etkilidir. ETI genellikle enfeksiyon bölgesinde HR ile sonuçlanır. R genleri patojenin tetiklediği savunma cevabının doğrudan ya da dolaylı olarak farkına varır. Gene karşı gen hipotezi R-Avr ilişkisini doğrudan etkileşim olarak önerir ve aynı kökenli R genleri içinde bu geçerlidir. Bunun aksine Guard hipotezi de R proteinlerinin dolaylı olarak elisitörleri algıladığını, yani ilişkinin başka bir protein ile sağlandığını önermektedir, yani ilişkiyi bir başka protein sağlar³⁷.

Zikzak modelinin son bölümünde, patojen ETI'ın üstesinden geldikçe evrimleşir. Eğer R-Avr genleri arasındaki etkileşim doğrudan ise mutasyon şeklinde değişikliğe sebep olur. Diğer taraftan R-Avr ilişkisi dolaylı ise, patojen virülen aktiviteyi duraklatarak kaçır^{36b}.



Şekil 2. 1. Bitki immün sistemini gösteren zikzak model^{36a}.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYALLER

3.1.1. Kimyasallar

Tablo 3. 1. Kullanılan kimyasallar ve üretici firmalar

Kimyasallar	Üretici firma
Agaroz	Applichem
DNA marker	NEB
Taq DNA polimeraz	NEB
TAE tampon	Applichem
Primer	Heliks biyoteknoloji
10X PZR tampon	Fermantas
Restriksiyon enzim	Fermantas
PZR pürifikasyon kit	Qiagen
Jel ekstraksiyon kit	Qiagen
T4 DNA ligaz enzim	Fermantas
Agar	Lab M
Yeast extract	Lab M
Trypton	Applichem
NaOH	Fluka
Cellulase Onuzuka R-10	Yakuruto
Murashige and Skoog (MS)	Sigma Aldrich
Macerozyme R-10	Yakuruto
Mannitol	Sigma Aldrich
Percoll	Sigma
β -Mercaptoetanol	Sigma Aldrich
BSA	Gerbü
Ampisilin	Applichem

3.1.2. Alet ve Ekipmanlar

Tablo 3. 2. Kullanılan alet ve ekipmanlar

Alet ve ekipmanlar	Üretici firmalar
Santrifüj	Sigma 3K15
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1601
Agaroz jel elektroforez sistemi	Continental Lab
Vorteks	Fisons whirlimixer
İnkübatör ve çalkalayıcı	Biosan Es-20
Jel görüntüleme sistemi	Kodak jel logic
Mikropipet	Eppendorf
Sıcak su banyosu	Grant w-14
Mikrosantrifüj	Continental Lab 3410

3.1.3. Tampon ve Çözeltiler

Tüm çözeltiler aksi belirtilmediği takdirde 0.22-mikron steril filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözeltilerin hazırlanmasında bidistile H₂O (ddH₂O) kullanıldı.

Agaroz jel: % 1.5 agaroz 1XTAE tamponunda ısıtılarak çözüldü ve agaroz jel elektroforezi deneyinde kullanılmak üzere jel kasetine döküldü.

Ampisilin stok çözeltisi (100 µg/mL): 100 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde ampisilin steril ddH₂O içerisinde çözüldü, 0.22-mikron steril filtreden geçirilip 500 µL hacimlerde -20 °C’de saklandı.

CaCl₂ (1M): CaCl₂·2H₂O’dan 29.4 g tartıldı ve 200 mL ddH₂O içerisinde çözüldü. Filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı ve +4 °C’de saklandı.

NaOH (0.5N): 3.99 g NaOH tartıldı ve 200 mL steril ddH₂O içerisinde çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı. LB ve LB agar hazırlarken pH’ı ayarlamak için kullanılmaktadır.

Protoplast besiyeri: 4.3 g MS makro element, 0.1 g MS mikro element ve 30 g sakkaroz tartıldı ve 900 mL ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 5.7-5.8’e ayarlanarak toplam hacim 1 L’ye tamamlandı. 7 g agar eklenip ısıtıcı karıştırıcıda agarın erimesi sağlandı. Besiyeri sıcaklığı 50-55 °C’ye düştüğü zaman 50 cc cam şişelere besiyeri döküldü ve 20 dakika otoklavlandı daha sonra besiyerlerinin donması beklendi ve oda sıcaklığında saklandı.

LB: 5 g Tripton, 5 g NaCl, 2.5 g Yeast Extract, 1.6 mL NaOH 488 mL ddH₂O içerisinde çözüldü ve 1 atm basınç 121 °C’de 20 dakika otoklavlandı ve 4 °C’de saklandı.

LB Agar: 5 g Tripton, 5 g NaCl, 2.5 g Yeast Extract, 1.6 mL NaOH, 7.5 g Agar 480 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1 atm basınç 121 °C’de 20 dakika otoklavlandı. LB agarın sıcaklığı 55-50 °C olduğu zaman petri kaplarına döküldü ve donması beklendi. Kontaminasyonu önlemek için petri kaplarının kapakları parafilm ile sarıldı ve 4 °C’ye kaldırıldı.

Protoplast çözeltisi: 0.6 M Mannitol, % 1.5 Cellulase RS (Yakuruto), % 0.3 Macerozyme R10 (Yakuruto), 10mM MES, % 0.1 BSA, 1mM CaCl₂'dan gerekli miktarlarda tartıldı ve 150 mL ddH₂O içerisinde çözülerek pH 5.7'ye ayarlandı. Daha sonra 5mM β -MercaptoEtOH, 50 ppm Ampisilin eklenip toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı ve filtreden geçirilip steril edildi.

Süspansiyon çözeltisi: 0.6 M Mannitol, 20mM KCl, 4mM MES 180 mL ddH₂O karıştırılıp KOH yardımı ile pH 5.7'ye ayarlandı ve toplam hacim 200 mL'ye tamamlandı ve filtreden geçirildi.

3.1.4. Bitki Materyalleri ve Büyüme Koşulları

Avocet-S (susceptible=hassas) buğday tohumları bir saksıya ekildi ve 16 saat 18 °C ışıklı ortamda ve 8 saat 15 °C karanlık ortamda büyümeye bırakıldı. İlk yapraklar çıktıktan sonra yaprakların eşit büyümesini sağlamak için maleik hidrazit (20 mL/kap) konuldu. İkinci yapraklar çıkmaya başladığı zaman buğday bitkisi inokülasyona hazır hale gelmiş oldu. Buğday yapraklarına elle sürülerek sarı pas sporları inoküle edildi ve buğday bitkisi 10 °C'de 24 saat karanlık ve nem içeren ortamda bırakıldı. Ertesi gün bitkiler normal büyüme koşullarına (16 saat 18 °C ışık, 8 saat 15 °C karanlık ortam) alındı. Sekiz gün sonra buğday yaprakları üzerinde beyazımsı renk kayıpları oluşmaya başladı ve inokülasyonun 14. günü sonunda yaprak üzerinde sarı renkli sporlar oluştu. Sporlar yapraklardan toplandı ve 1 gün 4 °C'de desikatör de bekletildikten sonra -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. PstHa12j12 Gen Sekansı

PstHa12j12 gen sekansı dizi ifade etiketi (Expression Sequence Tag=EST) NCBI, National Center of Biotechnonology, kayıtlarından alındı (Erişim No: GH737467) ve kırmızı ile gösterilen gen sekansı ise Sentegen Biotechnology (Ankara, Türkiye) firması tarafından pBluescript (pBSK) içerisine klonlanmış olarak satın alındı.

```

GGGGGACGATTTCAAAAACCATATATCCGACGTTTGAAATTTTGAATAACCTACCTACCTC
TCAAGATTTTTTCCAGTTCAATCCCCAACAATTATTATCGACTGTTACCTTAGTCGGCAAT
GCAGCTCTACATATCAATTGGATTAGTACTGCTTATAGCAACGACAGTGAACCTAAGCTA
AGACAGGGGCATTTCTTGAGCCATTGTTTACAAAAGTAACAAAACGTGAAGACAAGTTTGT
ACAAACGGGGGGGCTCATTACTGCTTCAAGAAAATCGCGAAAGAGGGTGGCTTATTTGTACA
TATTGCTATACCAACATCACCAAATGAAAAACGGATGATTCTTTATGCAACAAGCTTCGTT
CGGGATTCAAAGCAACTAAGTCCTGCTGTGAATATAAAAAATTTGATCAAATTCCTCAGGAA
AAGGACATTGATAGAGATATCTTTATTGTTACAAATAAGGGCTTCGAACTGCCTGTTCCCA
AGATGTTGGGAGAAGCACATCTTAAATCAGCTCCCATCTGCTTATCAAGGGCTGCGGTCTCTC
TCCAATTTCG

```

Şekil 3.1. PstHa12j12 gen sekansı (Erişim No: GH737467). Sarı ile belirlenmiş olan kısım ileri ve geri primerleri ile çoğaltılması istenen bölüm.

3.2.2. Pstha12j12 Gen fragmanı İçin Dizayn Edilen Primerler

PZR’da kullanmak üzere PstHa12j12 gen fragmanına özgün primerler Primer3 programı kullanılarak dizayn edildi. 180 baz uzunluğunda olan PstHa12j12 gen fragmanına PZR ile primerler eklenince 210 baz uzunluğunda elde edildi (Şekil 3.1). İleri ve geri primerleri BMSV’nin γ genomunu içeren pSL039B-1PDS vektörü içindeki PDS geni çıkartılıp yerine PZR ile çoğaltılmış PstHa12j12 gen fragmanını içine alacak şekilde tasarlanmıştır. Tablo 3.3’de PstHa12j12 geni için dizayn edilen primerlerde ileri primerine *PacI*, geri primerine *NotI* tanıma bölgeleri eklenmiştir.

Tablo 3. 3. PstHa12j12 gen fragmanına özgü primerler

Primer adı	Primer sekansı (5’- 3’)
PstHa12j12 <i>PacI</i> ileri	GGATTAATTAAAGGCATTTCTTGAGCCATTGT
PstHa12j12 <i>NotI</i> geri	TAACGCCGGCGCGAACGAAGCTTGTTCATA

3.2.3. Primer Hazırlanması

PstHa12j12 primerler toz halde Heliks Biotechnology (Ankara, Türkiye) firmasına sentezletirildi. 100 μ M toz stok primerleri PZR suyunda çözüldü ve konsantrasyonu 10 pmol olacak şekilde seyreltilip -20 °C’de saklandı.

3.2.4. DNA Fragmentinin Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

PZR, çoğaltılması istenen DNA molekülünün in vitro koşullarda enzimatik olarak kopyalanmasıdır. PZR'ın temel prensibi 3 aşamadan oluşur: DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve DNA polimeraz enzimi yardımıyla DNA sentezi adımlarının 20–40 defa tekrarlanmasıyla DNA fragmenti çoğaltılır³⁸.

Amplifikasyon reaksiyonları ısı döngüsü cihazında (thermocycler) PZR (Eppendorf Mastercycler) yapıldı ve her bir reaksiyon volumü 50 µL olarak ayarlandı. PZR en uygun şartları sağlamak için bağlanma sıcaklığı ve süresinde ayarlamalar yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu bileşenleri 200 µL ependorf tüplerin içerisinde karıştırıldı ve Tablo 3.5'de gösterilen koşullar uygulandı.

Tablo 3. 4. PZR bileşenleri ve miktarları

PZR kullanılan malzemeler	Kullanılan miktarlar (1X)
Kalıp DNA	1 µL
10X PZR çözeltisi + MgCl ₂	5 µL
Taq DNA polimeraz (5 u/µL)	0.4 µL
dNTPmix (20 mM)	1 µL
İleri primer (10 pmol)	1 µL
Geri primer (10 pmol)	1 µL
PZR suyu	40.6 µL
Toplam hacim	50 µL

Tablo 3. 5. PZR koşulları

PZR basamakları	Sıcaklık derecesi ve süresi
İlk denatürasyon	94 °C 3-5 dakika
Denatürasyon	94 °C 30 saniye
Bağlanma	58 °C 1 dakika
Sentez	72 °C 1 dakika
Son sentez	72 °C 5 dakika

3.2.5. Agaroz DNA Jeli Hızırlanması ve PZR ürünlerinin Görüntülenmesi

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrıştırılmasında, tanımlanmasında ve saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Çalışmamızda PZR ile çoğaltılan kalıp DNA örneklerini görebilmek için % 1,5

(w/v) agaroz 1XTAE (Applichem) tampon çözeltisi içinde kaynatılarak çözüldü. El degecek sıcaklığa geldiği zaman içerisine 30 µL etidyum bromür eklendi ve jel kasetine döküldü. Jel donduktan sonra örnek:yükleme boyası oranı 1:5 olacak şekilde karıştırıldı ve jele yüklendi. 65 V'da 1 saat boyunca örnekler jelde yürütüldü. Daha sonra Kodak gel logic görüntüleme sistemi yardımıyla jel görüntüsü elde edildi³⁹.

3.2.6. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ile çoğalttığımız DNA örneklerimizin daha sonraki çalışmalarda verimli bir şekilde kullanabilmek için PZR ürünü saflaştırması yapıldı. PZR ürünü saflaştırılmasında Gene Jet PCR Purification Kit (Fermantas, K0702 Lot# 00080748) kullanıldı. Kit kullanma kılavuzuna göre;

- 1:1 oranında bağlayıcı tampon PZR karışımına eklendi.
- Bu karışım daha sonra PZR kolonuna aktarıldı ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Altta kalan kısım döküldü ve 700 µL yıkama tamponu eklendi.
- 3-5 dakika beklenip ve tekrardan 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Kolon yeni 1,5 mL ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 20-50 µL elüsyon tamponu eklendi.
- 1 dakika santrifüj yapıp elde edilen saf DNA -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.7. Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Qiagen Plasmid Miniprep kiti (Cat. No: 27106, Lot. No:124104532) kullanıldı ve ürün içerisinde bulunan yöntem uygulandı;

- Bir gün önce LB-Amp besi ortamında 16-18 saat büyümeye bırakılan pSL039B-1PDS vektörü microsantrifüj yardımıyla 2 mL ependorf tüpü kullanılarak hücrelerin dibe çökmesi sağlandı.
- Bakteri hücrelerini içeren dipteki pellet üzerine 250 µL tampon P1 (RNase A eklenmiş) eklenip pelletin çözülmesi sağlandı.
- 250 µL tampon P2 eklendi. Eppendorf tüpü içerisindeki karışım tamamen maviye dönene kadar hassas bir şekilde karıştırıldı.

- 350 µL tampon N3 konuldu ve eppendorf tüpü hemen hassas bir şekilde yoğun beyaz çökelti oluşturma kadar karıştırıldı.
- Eppendorf tüpü microsantrifüj kullanılarak 10 dakika 13000 rpm’de santrifüjlendi.
- Santrifüj sonucu oluşan süpernatant kısım Miniprep kit içerisinde bulunan spin kolona pipet yardımıyla konuldu.
- 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj yapıldı ve kolonun alt kısmına geçen sıvı kısım döküldü.
- Kolonun üzerine 750 µL tampon PE eklendi ve 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj yapıldı ve altta kalan sıvı kısım döküldü.
- 1.5 mL temiz eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 30 µL PZR suyu konuldu.
- Kolonun olduğu eppendorf tüpü 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı ve altta kalan sıvı kısım daha sonra kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırıldı.

3.2.8. Pstha12j12 Gen Fragmanının pSL039B-1 Vektörüne Klonlanması

3.2.8.1. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile Pstha12j12 gen fragmanının ve pSL039B-1 vektörünün kesilmesi

Çalıştığımız geni (PstHa12j12) izole etmek ve pSL039B-1 vektörünü düz zincir haline getirmek amacıyla *PacI* ve *NotI* (Fermantas) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yapıldı. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılabilmesi için gerekli malzemeler Tablo 3.6’da verilmiştir. Reaksiyon koşullarını sağlamak için enzimler içerisinde bulunan protokol uygulandı. 0.2 mL eppendorf tüpü içerisinde gerekli malzemeler karıştırıldı ve 37 °C’de 3–5 saat arasında inkübe edilerek 65 °C’de 20 dakika enzimleri inaktive etmek için bekletildi. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilen örnekleri almak için % 1,5’luk agaroz jel 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde örnekler yürütülmüştür.

Tablo 3. 6. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim reaksiyon karışımı

Kullanılan malzemeler	Reaksiyon karışımı (1X)
10X G tampon + BSA	4.5 µL
<i>PacI</i> enzimi (10 u/µL)	2 µL
<i>NotI</i> enzimi (10 u/µL)	2 µL
Gen fragmanı/ vektör DNA	100 ng- 1 µg
Toplam hacim	45 µL

3.2.8.2 Jel ekstraksiyon kiti ile DNA saflaştırılması

UV ışık altında görüntülenen DNA parçaları temiz bir bistüri yardımıyla jelden kesildi ve steril eppendorf tüpleri içerisine alındı. DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Lot# 139312248) kullanıldı. Kitin kullanma kılavuzuna göre;

- DNA:Tampon çözelti oranı 1:3 oranında QG çözeltisinden konuldu ve 10 dakika 50 °C sıcak su banyosunda tutuldu.
- Jel çözüldükten sonra karışıma 1 hacim filtre edilmiş izopropanol eklendi ve karışım QIAquick kolonuna aktarıldı.
- 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapıldı ve altta kalan kısım döküldü.
- 500 µL QG tamponu eklendi ve tekrar 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapıldı ve altta kalan kısım döküldü.
- Kolona 750 µL PE tamponu eklendi. 5 dakika bekledikten sonra 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- Kolon 1,5 mL' lik eppendorf tüpüne transfer edildi ve kolona 20–50 µL EB tamponu konuldu.
- 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapıldı. Elde edilen DNA -20 °C'ye kaldırıldı.
- DNA nın jel bandından tam olarak ekstrakt edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla % 1,5 (w/v) agaroz jelinde yürütüldü.

Bütün bu aşamalar oda sıcaklığında yapıldı.

3.2.8.3. Ligasyon

Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş PstHa12j12 gen fragmanı ve pSL039B-1 vektör DNA'sının birbirine bağlanması amacıyla bu reaksiyon yapıldı. Tablo 3.7'de verilen malzemeler belirtilen miktarlarda kullanılarak insert:vektör molar oranı 3:1 olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon koşulları üreticinin tavsiye ettiği protokole göre 1 saat 22 °C'de inkübe edildikten sonra 65 °C'de 10 dakika inaktivasyon işlemiyle tamamlandı. Kullanılan T4 DNA ligaz enzim ve T4 DNA ligasyon tampon Fermantas (Lot# EL0014)'dan temin edilmiştir. Uygulanan işlemin ardından ligasyon karışımı *E.coli* Dh5a bakterisine transfer edilmek üzere kullanılmıştır.

Tablo 3. 7. Ligasyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Kullanılan malzemeler	Kullanılan miktarlar
T4 DNA ligasyon tampon (10X)	2 µL
T4 DNA ligaz enzim (5 u/µL)	1 µL
PstHa12j12/ <i>PacI</i> + <i>NotI</i>	3.1 µL
pSL039B-1/ <i>PacI</i> + <i>NotI</i>	13.9 µL
Toplam hacim	20 µL

3.2.8.4. Kompetent hücre hazırlanması

Bakteriler yabancı DNA moleküllerini büyüme ortamından hücre içine alabilme yeteneğine sahiptir. Bu özellik *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Pneumococcus* gibi bakteri gruplarının yapılarında mevcuttur. Laboratuvar koşullarında da bu özelliğe sahip olmayan bakteri gruplarının (örneğin, *Escherichia coli*) hücrelerine bazı kimyasal ve fiziksel metodlar kullanılarak bu özellik kazandırılabilir. Kimyasal ve/veya fiziksel uygulamaya maruz kalmış hücrelere kompetent (yeterlilik) denir. Kimyasal kompetent hücre hazırlanmasında CaCl₂ (kalsiyum klorür) kullanıldı. Ca⁺² DNA'nın negatif yükünü maskeleyip hücre duvarındaki porların açılmasını sağlar ve 42 °C de ısı şokuna maruz bırakılarak da DNA'nın hücre içine girişi sağlanmış olur. Kompetent hücre hazırlanırken aşağıdaki aşamalar uygulandı;

- Stok *E.coli* DH5a hücresi, -80 °C'den alındı ve 3 mL LB içine inoküle edildikten sonra 37 °C 250 rpm'de çalkalayıcılı inkübatörde ~16 saat bekletildi.

- Ertesi gün inkübe edilen hücrelerden 1000 µL alınıp 100 mL LB içerisine konur ve OD₆₀₀ değeri 0.375 nm olana kadar (~2 saat) 37 °C 250 rpm’de inkübe edilir.
- Bakteri kültürü buz üzerinde soğutulmuş 2 adet 50 mL falcon tüpüne paylaştırıldı ve 10 dakika buz üzerinde tutuldu.
- 4 °C 5000 rpm’ de 5 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı döküldü.
- 10 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ eklenip çökelti hassas bir şekilde pipetleme yardımıyla çözüldü ve 10 dakika buzda bekletildikten sonra 5 dakika 5000 rpm 4 °C’ de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant kısmı tekrar döküldü ve üzerine soğuk 10 mL 0.1 M CaCl₂ eklenip çökelti aynı şekilde çözülüp 30 dakika buzda bekletildi.
- 5 dakika 5000 rpm 4 °C’ de santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı.
- Her bir çökelti 2 mL 0.1 M CaCl₂ ile çözülüp 5 dakika buzda bekletildi.
- Önceden hazırlanmış filtre ile steril edilmiş %50 (w/v) gliserol 100 µL’lik kısımlar halinde 1.5 mL eppendorf tüplerine konulup üzerine 100 µL CaCl₂ ile muamele edilmiş hücrelerden konuldu.
- Hücreler ile gliserol hassas bir şekilde karıştırıldıktan sonra -80 °C derin dondurucuda saklandı³⁹.

3.2.8.5. Ligasyon ürününün *E.coli* DH5α kompetent hücrelerine transformasyonu

Transformasyon işlemi için aşağıda belirtilen işlemler uygulandı;

- 80 °C’de saklanan kimyasal kompetent hücreler (200 µL) işlemiden yarım saat önce çıkarılarak erimesi beklendi. Hücreler eridikten sonra üzerine 10 µL ligasyon ürünü eklendi ve 20 dakika buz üzerinde beklendi.
- 20 dakikanın son 45 saniyesinde örnekler 42 °C ısı şokuna maruz bırakıldı ve tekrar buz üzerine alınıp 5 dakika bekletildi.

- Transformasyon tüpündeki sıvıların tamamı önce 1.5 mL antibiyotik içermeyen LB sıvı besiyerlerine boşaltılarak 37 °C’de aerobik olarak 1-2 saat süreyle 37 °C 160 rpm de çalkalayıcılı inkübatörde üretilmişlerdir.
- İnkübasyonun ardından 300 µl, 200 µl ve 100 µl alınarak ampisilin içeren LB agar besiyerlerine steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekimler yapıldı ve 18 saat inkübasyona bırakıldı³⁹.

Bu süre sonunda transformasyon plaklarında rekombinant (geni almış olan) ve non-rekombinant (geni almadan kapanmış olan) plazmit DNA’lar ile transforme olmuş olan bakteriler üreyecektir.

3.2.8.6. Pozitif kolonilerin değerlendirilmesi

Elde edilen kolonilerde istediğimiz gen (PstHa12j12) pSL039B-1vektörünün içerisine doğru şekilde bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amaçlı rastgele seçilen kolonilerden restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yapılmıştır. Rastgele seçilen koloniler 12 µL PZR suyu içerisinde çözülmüş ve 5 mL ampisilinli LB içerisinde 16 saat büyütülmüştür. Ertesi gün plazmit izolasyonu yapılarak elde edilen DNA’lardan belli bir miktar alınarak restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim yapılmıştır.

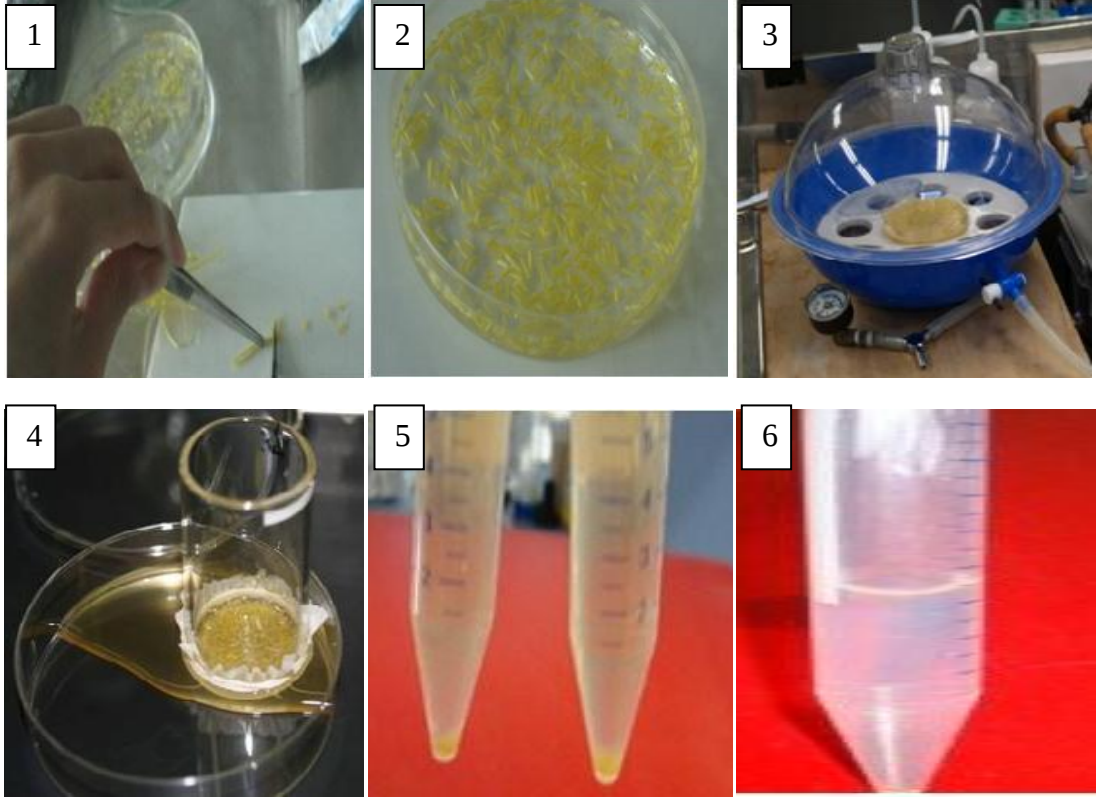
3.2.9 Protoplast İzolasyonu

Avocet Yr10 tohumları besiyerine konulmadan önce aşağıdaki sterilizasyon işlemleri uygulandı;

- Tohumlar % 70’lik etil alkol içerisinde 2-3 dakika bekletildi. % 10’luk hazırlanmış olan sodyum hipoklorit içerisinde 2-3 dakika tutuldu.
- Otoklavlanmış ddH₂O içerisinde bekletilerek sterilizasyon işlemi tamamlandı.
- Steril tohumlar 50 cc cam şişelerde hazırlanmış olan MS ortamı üzerine tohumlar birbirine değmeyecek şekilde konuldu ve 26 °C’de 2 hafta boyunca karanlık ortamda çimlendirilmek üzere bitki büyütme kabinine bırakıldı.

- İki hafta sonunda çimlenen Avocet Yr10 bitki yaprakları uzunlukları 0.5-1 mm olacak şekilde kesilip 10 mM pH'ı 5.7 olan MES (2-N- morfolin etanosulfonik asit) tamponu içerisinde tutuldu.
- Bu işlem bittikten sonra kesilmiş olan yapraklar protoplast tamponu içerisine alınarak ~2 saat inkübe edildi.
- Petri plağı içerisindeki protoplast tamponu ve bitki parçacıkları desikatöre konuldu ve oda sıcaklığında 1 atm basınç altında vakum infiltrasyon işlemi uygulandı.
- 26 °C sıcaklık ve 40 rpm'de 4 saat boyunca çalkalayıcıda inkübasyon işlemi yapıldı.
- Bu süre sonunda çalkalayıcının hızı 80 rpm'e çıkarıldı ve 5 dakikada bu hızda karışması sağlandı.
- 100 µm'lik naylon filtreden geçirilen protoplast tamponu içindeki bitki parçacıkları filtre üzerinde kaldı ve altta kalan sıvı kısım 800 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
- Bu işlem 2 kez tekrar edildi.
- Dipte oluşan pelleti 2 mL süspansiyon tamponu eklendi ve pelletin süspanse olması sağlandı.
- Oluşan hücre süspansiyonu üzerine Percoll gradiyent eklendi ve karıştırıldı.
- Bu karışımı 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısımda oluşan protoplast tabakası pastör pipet yardımıyla alındı ve üzerine 13 mL süspansiyon tamponu eklenip yıkama işlemi yapıldı.
- 800 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulandı ve üstte kalan kısım atıldı.
- 5 mL süspansiyon tamponu eklendi.
- Protoplastlar eşit miktarlarda ayrılıp üzerlerine B5 ortamı ilave edilerek protoplastların büyümeleri için gerekli ortam sağlanmış oldu.

Şekil 3.2’de protoplast izolasyon aşamaları görülmektedir.

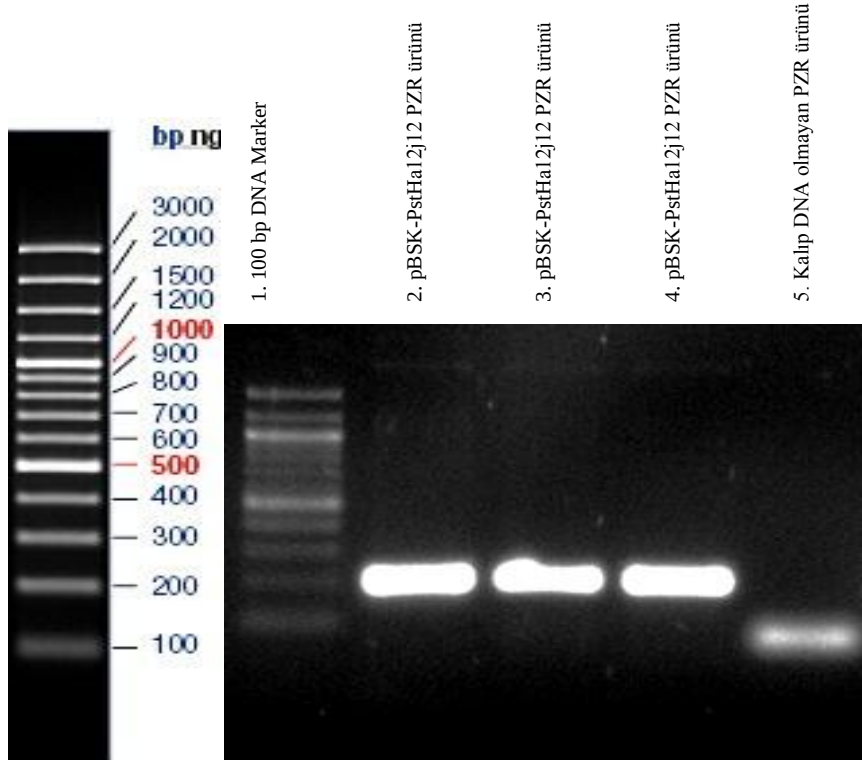


Şekil 3.2. Avocet Yr-10 buğday türünden protoplast izolasyon aşamaları. (Soldan sağa) Resim 1. İn vitro olarak çimlendirilmiş Avocet Yr10 fidecikleri, 2. resim enzim solüsyonu içinde bırakılan yaprak parçaları, resim 3. vakum infiltrasyon işlemi ile stomalar içindeki havanın alınması, resim 4. naylon membran yardımıyla sıvı kısmın süzülmesi, resim 5. santrifüj yardımıyla dibe çöken protoplast yığını, resim 6. percoll gradiyent yardımıyla üst kısımda yüzen protoplast tabakası.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 DNA FRAGMENTİNİN PZR İLE ÇOĞALTILMASI

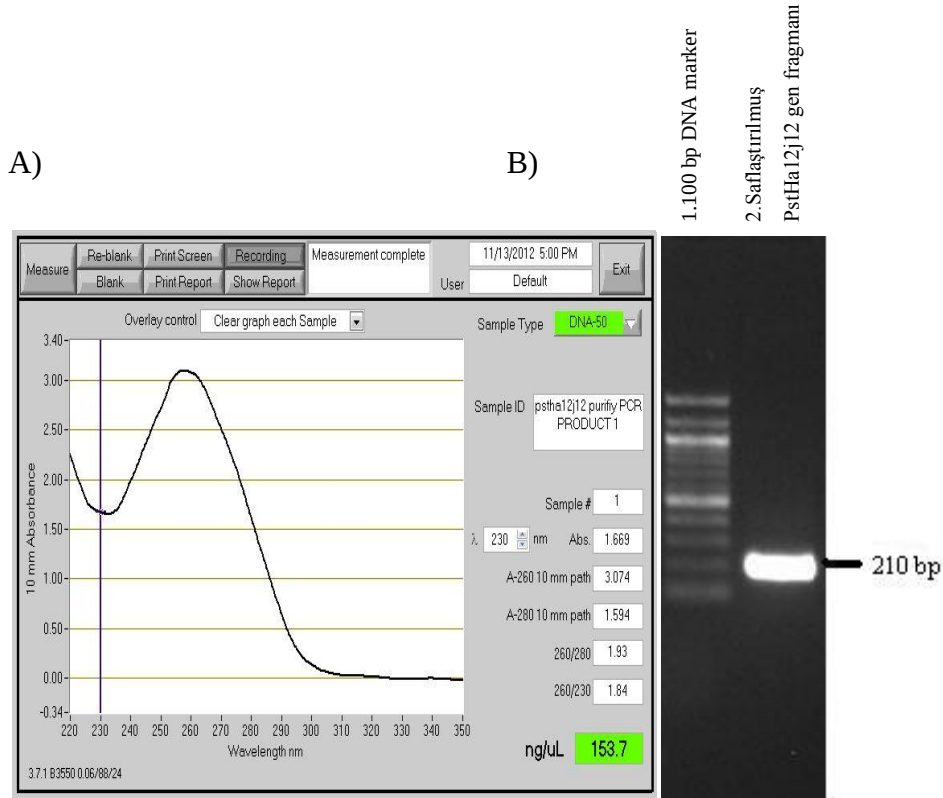
NCBI veribankasında sekansı bulunan PstHa12j12 geninin 342 bp'lik kısmı olan açık okuma çerçevesi SenteGen Firmasına sentezlettirilmiştir. Sentezlettirilen genin 180 baz uzunluğundaki bir bölgesini çoğaltmak üzere hazırlanan primerlerle yapılan PZR sonucunda Şekil 4.1'de görüldüğü üzere çoğaltma başarılmıştır. PZR amplifikasyon sonucu beklenen fragman uzunluğu 210 bp'dir. PZR kontrolü olarak kalıp içermeyen reaksiyon karışımı negatif kontrol jelin 5. kuyusuna yüklenmiştir.



Şekil 4. 1. pBSK-PstHa12j12 gen fragmanının PZR ile amplifikasyonu sonucu agaroz jel görüntüsü. 1. kuyu Marker 100 bp gene ruler' dan (1 µL) (Fermantas), 2. 3. ve 4. kuyu pBSK-PstHa12j12 geni ve her bir kuyucukda (5 µL) PZR ürünü. 5. kuyu kalıp DNA dışında PZR bileşenlerini içeren PZR sonucu.

4.2. PZR ÜRÜNÜ SAFLAŞTIRILMASI

PZR ürününü diğer bileşenlerinden temizlemek amacıyla Qiagen, “PCR purification kit” kullanılmıştır. Sonuç olarak elde edilen saf PstHa12j12 gen fragmanının konsantrasyonu ve agaroz jel fotoğrafı Şekil 4.2B’de gösterildi. Şekil 4.2B’ye göre PZR ürünü saflaştırma işlemi sonucu bir tane parlak bant elde edildi. Bu ise saflaştırma işleminin başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir.

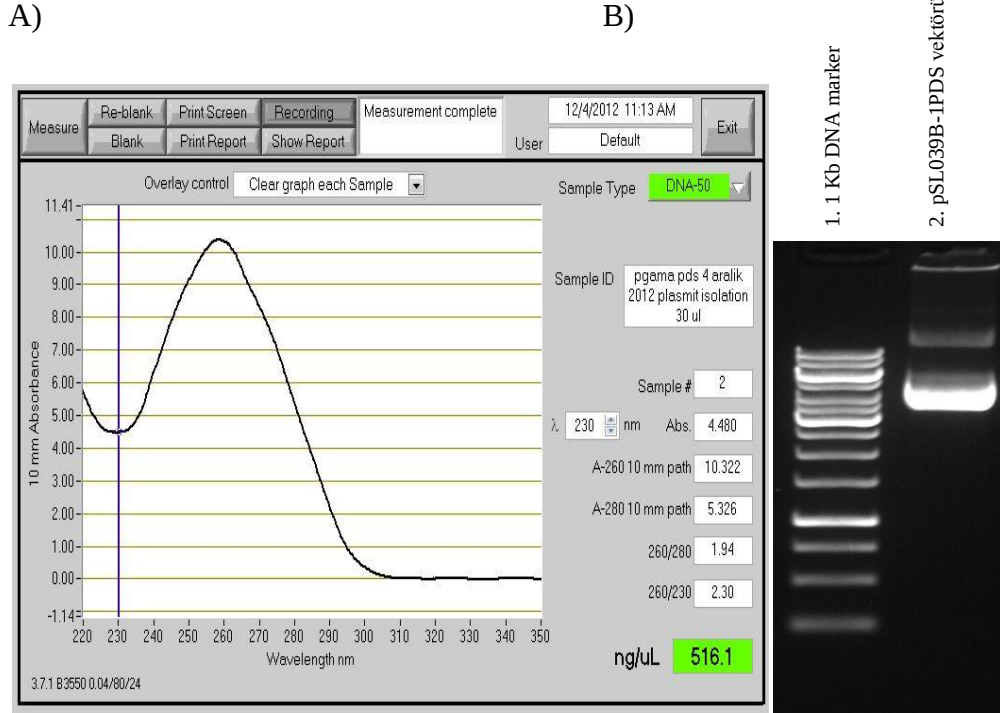


Şekil 4.2. PZR ile çoğaltılan PstHa12j12 gen fragmanının saflaştırılması. A) Nanodrop cihazı yardımıyla PstHa12j12 gen fragmanının konsantrasyonu. B) %1 Agaroz DNA jel fotoğrafı 1. kuyu 100 bp DNA Marker (1 μ L) (Fermantas), 2. kuyu PstHa12j12 gen fragmanı 1 μ L saflaştırılmış PZR ürünü.

4.3. PLAZMİT İZOLASYONU

PSL039B-1PDS vektörü *E.coli* Dh5 α hücresinden izole edildi ve miktar tayini yapıldı (Şekil 4.3). Agaroz jel fotoğrafında 2.kuyuya yüklenen pSL039B-1PDS vektöründe birden fazla bant görülmektedir. Bunlar plazmit DNA’nın farklı formlarıdır. En altta çıkan bant sirküler, diğerleri ise konkatamerlerdir. NanoDrop

sonucu 260/280 nm oranı 1.8-2.0 arası DNA'nın başarılı bir şekilde izole edildiğini göstermektedir. Agaroz jel görüntüsü de NanoDrop sonucunu desteklemektedir.

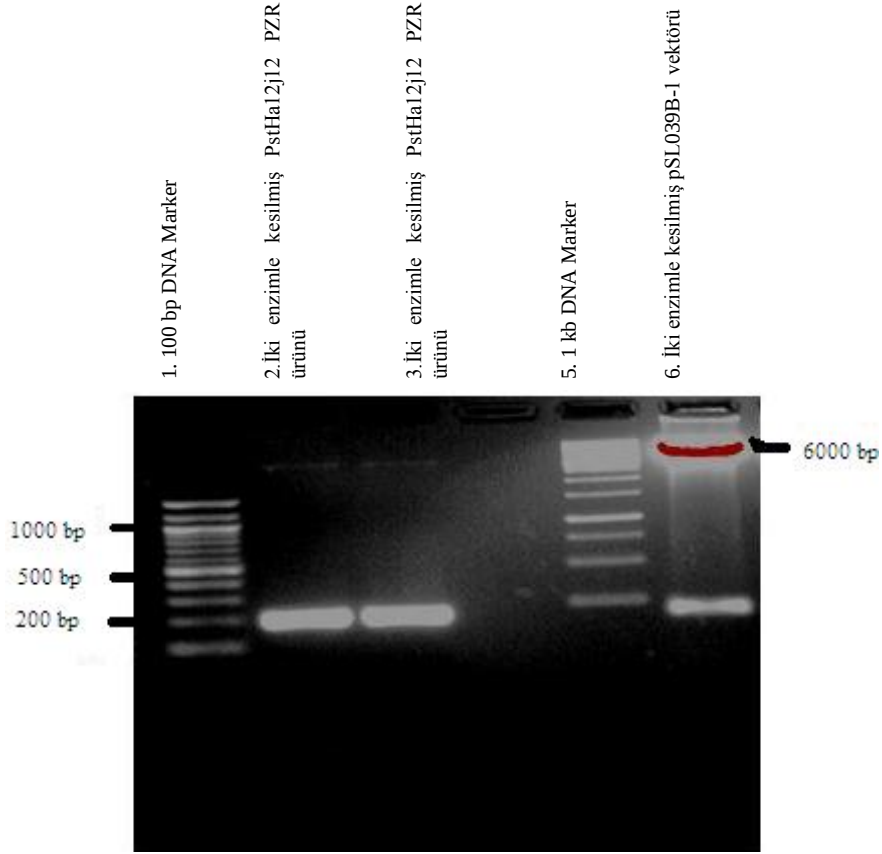


Şekil 4. 3. pSL039B-1PDS vektörü plazmit izolasyonu. A) NanoDrop ile tayin edilmiş pSL039B-1 vektör konsantrasyonu. B) %1 Agaroz DNA jel fotoğrafı. 1. kuyu 1 kb DNA Marker (1 µL) (Fermantas), 2. kuyu pSL039B-1PDS plazmit izolasyon ürünü (1 µL).

4.4. RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMLERİ İLE PSTHA12J12 GEN FRAGMANININ VE PSL039B-1VEKTÖRÜNÜN KESİLMESİ

PZR amplifikasyonu sonucu PstHa12j12 genine *PacI* ve *NotI* enzim kesim bölgeleri eklenmiştir. pSL039B-1 vektöründe ise bu tanıma bölgelerinde ~200 bp uzunluğunda PDS gen fragmanı vardır. *PacI* (TTAATTAA) ve *NotI* (CGCCGGCG) enzimleri ile kesim yapılarak PDS geni çıkartılıp yerine PstHa12j12 gen fragmanı konularak rekombinant plazmiti oluşturulmuş olacaktır. Tablo 3.6'daki miktarlar uygulanarak restriksiyon enzim kesimi yapılmıştır. Çalışmalar süresince vektörden PDS geninin tamamıyla kesilip ayrılması için inkübasyon süresinde optimizasyonlar yapıldı. Restriksiyon enzim kesim ürünleri Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Buna göre 210 baz uzunluğundaki PstHa12j12 gen fragmanı kesim sonrası boyutu yaklaşık 200

baz uzunluğunda, pSL039B-1PDS vektörü kesim sonrası içerisinde 185 baz uzunluğunda PDS geni çıkarıldığında 2 adet bantın görülmesi bekleniyordu. Şekil 4.4’de belirtilen sonucu desteklemektedir.

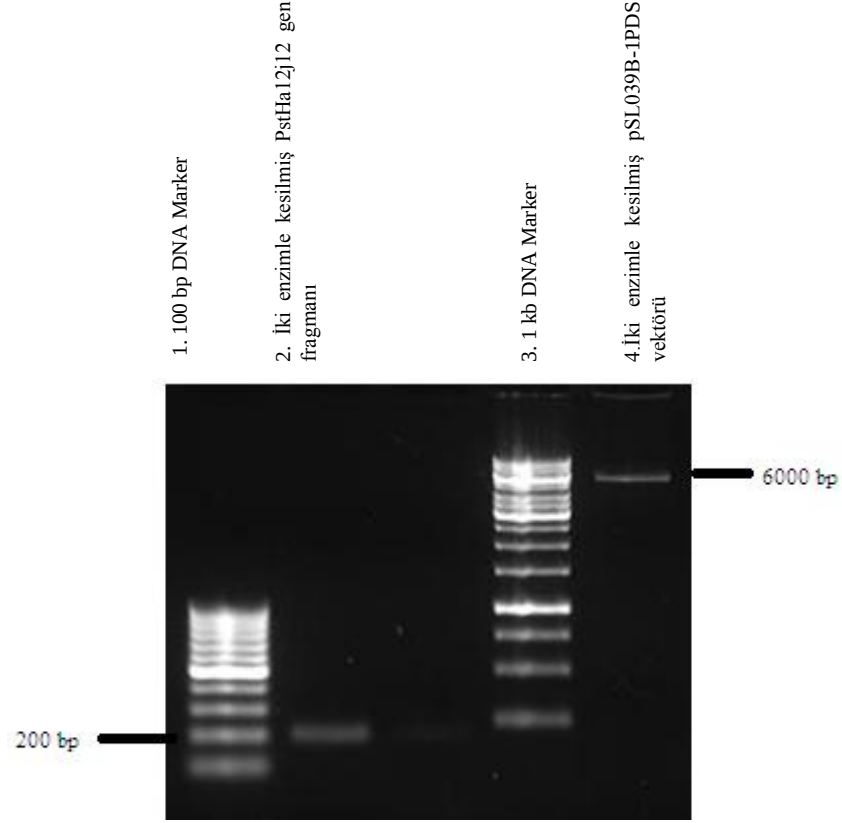


Şekil 4. 4. Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle muamele edilmiş PstHa12j12 gen fragmanının PZR ürünü ve pSL039B-1PDS vektörünün jel görüntüsü. 1. kuyu 100 bp DNA Marker (Fermantas) (1 µL). 2. ve 3. Kuyu PstHa12j12 gen fragmanının *NotI* ve *PacI* enzimleri ile kesilmiş örnekleri (10 µL). 5. kuyu 1kb DNA Marker’dan (1 µL) ve 6. kuyu pSL039B-1-PDS vektörünün *NotI* ve *PacI* enzimleriyle kesilmiş örnekleri (10 µL).

4.5. JEL EKSTRAKSİYON KİTİ İLE DNA SAFLAŞTIRILMASI

Şekil 4.4’de beklenen moleküler ağırlıkta oluşan tek DNA bantlar steril bir bistüri yardımıyla düşük UV ışık altında dikkatli bir şekilde kesilerek darası alınmış 1,5 mL eppendorf tüpüne konuldu ve ağırlığı ölçüldü. Bölüm 3.2.8.2’de anlatılan yöntem uygulanarak DNA’lar agaroz jelden alınıp saflaştırıldı. Şekil 4.5’e göre tek

bir bant halinde ve istenilen boyutta bantların görülmesi saflaştırma işleminin başarıyla tamamlandığını göstermektedir.

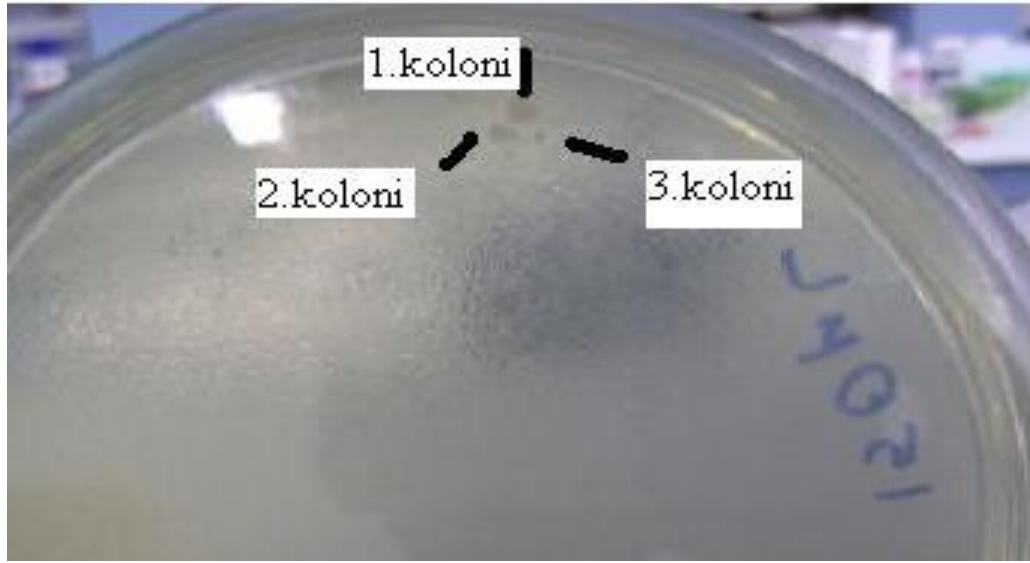


Şekil 4. 5. Agaroz jelden geri kazanılmış restriksiyon enzim kesim ürünleri. 1. kuyu 100 bp gene ruler DNA marker (1 μ L). 2.kuyu PstHa12j12 gen fragmanı (1 μ L). 3.kuyu 1 kb gene ruler DNA marker (1 μ L). 4.kuyu pSL039B-1PDS vektörü (1 μ L).

4.6. LİGASYON VE TRANSFORMASYON

Moleküler biyolojide klonlamanın verimli bir şekilde olması için belli başlı aşamaların iyi dengelenmesi gereklidir. Ligasyon reaksiyonunun yüksek verimde olması için insert ve vektör miktarı iyi bir şekilde ayarlanmalıdır. Ayrıca restriksiyon enzimle muamele edilmiş örneklerin jelden kesimi sırasında DNA'nın UV ışığa çok maruz kalmaması sağlandı.

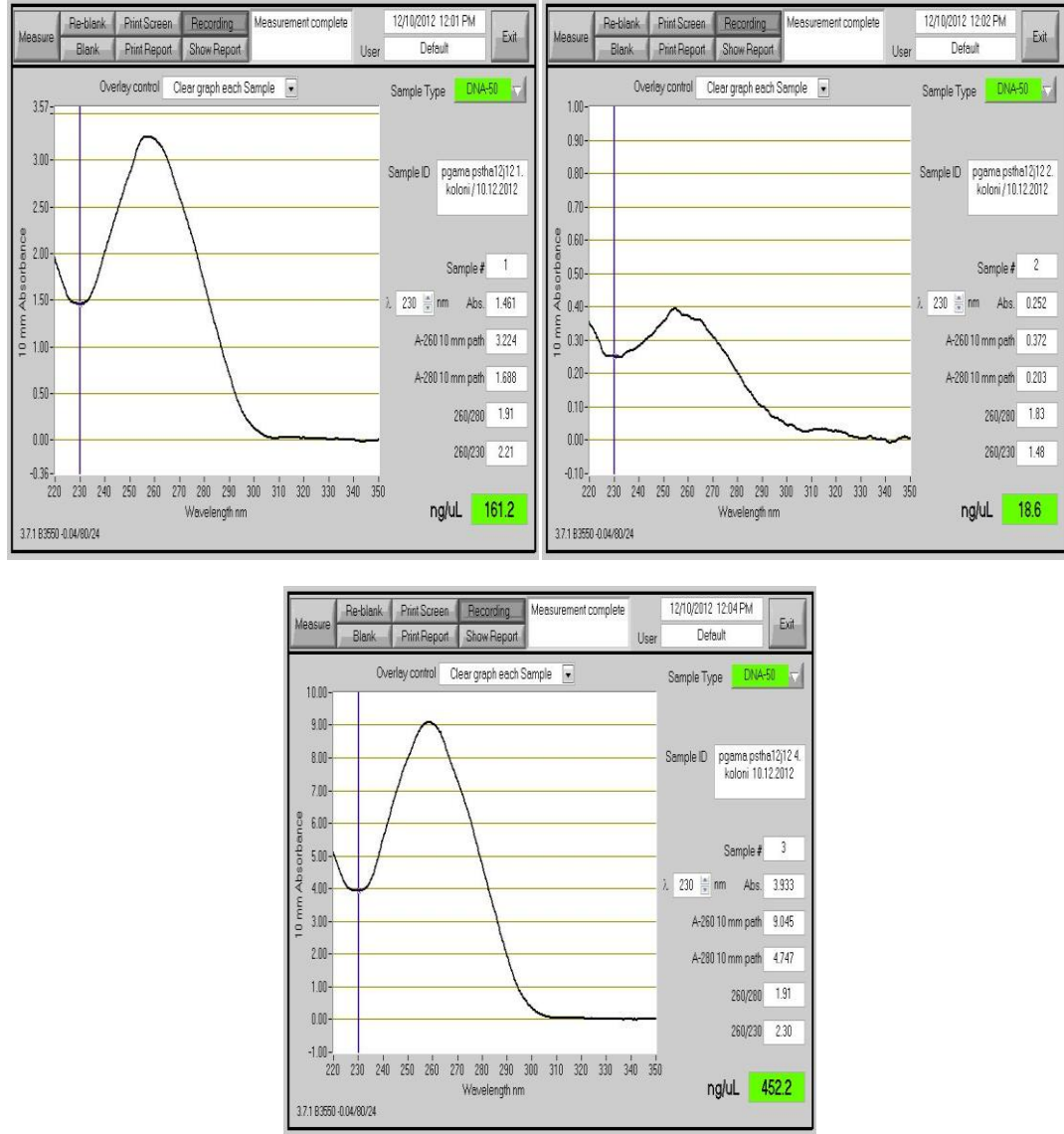
Ligasyon sonrası oluşan ürün transformasyon da kullanılmak üzere 10 μ L olarak 2 ayrı 100 μ L'lik *E.coli* Dh5 α kompetent hücrelerine aktararak ve LB-Agar+Amp besiyerlerine 100, 150, 200 μ L olacak şekilde ekim yapıldı. 37 °C'de yirmi dört saat süren inkübasyon sonrası dört transformantın büyüdüğü gözlemlendi.



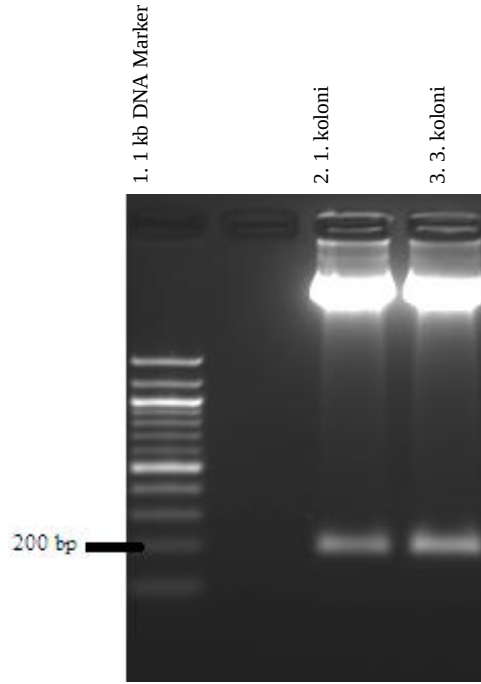
Şekil 4. 6. LB-Agar/Amp’li besiyerinde pSL039B-1-PstHa12j12 geninin taşındığı tahmin edilen rekombinant *E.coli* kolonileri.

4.2. POZİTİF KOLONİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Transformasyon sonucu besiyerinde büyüyen rekombinant koloniler arasından rastgele üç tanesi seçildi ve plazmit izolasyonu yapıldı (Şekil 4.7). Plazmit izolasyon sonucuna göre kolonilerden iki tanesi alındı ve PstHa12j12 gen fragmanını içerip içermediğini kontrol amaçlı *PacI* ve *NotI* enzimleri ile kesim yapıldı. Kesim reaksiyonlarının her birinden 10 µL alınarak % 1 agaroz jelde yürütüldü. Şekil 4.8.’deki jel fotoğrafına göre beklenildiği gibi 6000 bp büyüklüğünde pSL039B-1 vektör DNA’sı (üstteki parlak bant) ve diğeri ~200 bp büyüklüğünde PstHa12j12 gen fragmanı olduğu tahmin edilen bantlar görülmektedir.



Şekil 4. 7. Transformantlardan elde edilen plazmit DNA konsantrasyonlarının NanoDrop sonuçları. A) 1. koloniden elde edilen plazmit DNA konsantrasyonu. B) 2.koloniden elde edilen plazmit DNA konsantrasyonu. C) 3. koloniden elde edilen plazmit DNA konsantrasyonu



Şekil 4. 8. PstHa12j12 gen fragmanını taşıdığını varsaydığımız transformantların restriksiyon kesim analiz sonucu agaroz jel görüntüsü. 1. kuyu 1 kb DNA Marker (1 µL) (Fermantas), 2. kuyu 1. koloniden alınan 10 µL ve 3. kuyu 3. koloniden alınan (10 µL) restriksiyon enzim kesim ürünü.

Şekil 4.8'e göre klonlama işleminin başarıyla tamamlanmış olduğu görülmektedir fakat kesin sonuç alınması için örneklerin sekanslatmaya gönderilmesi gerekmektedir. Bunun için plazmit örneklerinden 5 µL RefGen Firmasına gönderilerek sekanslama yaptırıldı.

4.8. SEKANS ANALİZİ

RefGen firmasına gönderilen plazmit DNA örnekleri sekans sonucu Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Bu sekanslar M13 geri primeri kullanılarak sekanslatma yaptırılmıştır. Sekans analiz sonucunda çalıştığımız gen fragmanı olup olmadığını NCBI/nücleotide blast programını kullanarak karşılaştırma yapılmıştır. Sonuç olarak elimizdeki sekansın % 94 PDS geni ile benzerlik göstermesi klonlama işleminin başarıyla sonuçlanmadığını göstermiştir.

Sarı pasa ait aday efektör genlerinden biri olan PstHa12j12 geni Yin ve ark., (2009)¹⁴ yılında belirlenmiş ve şimdiye kadar PstHa12j12 ve diğer belirlenen aday

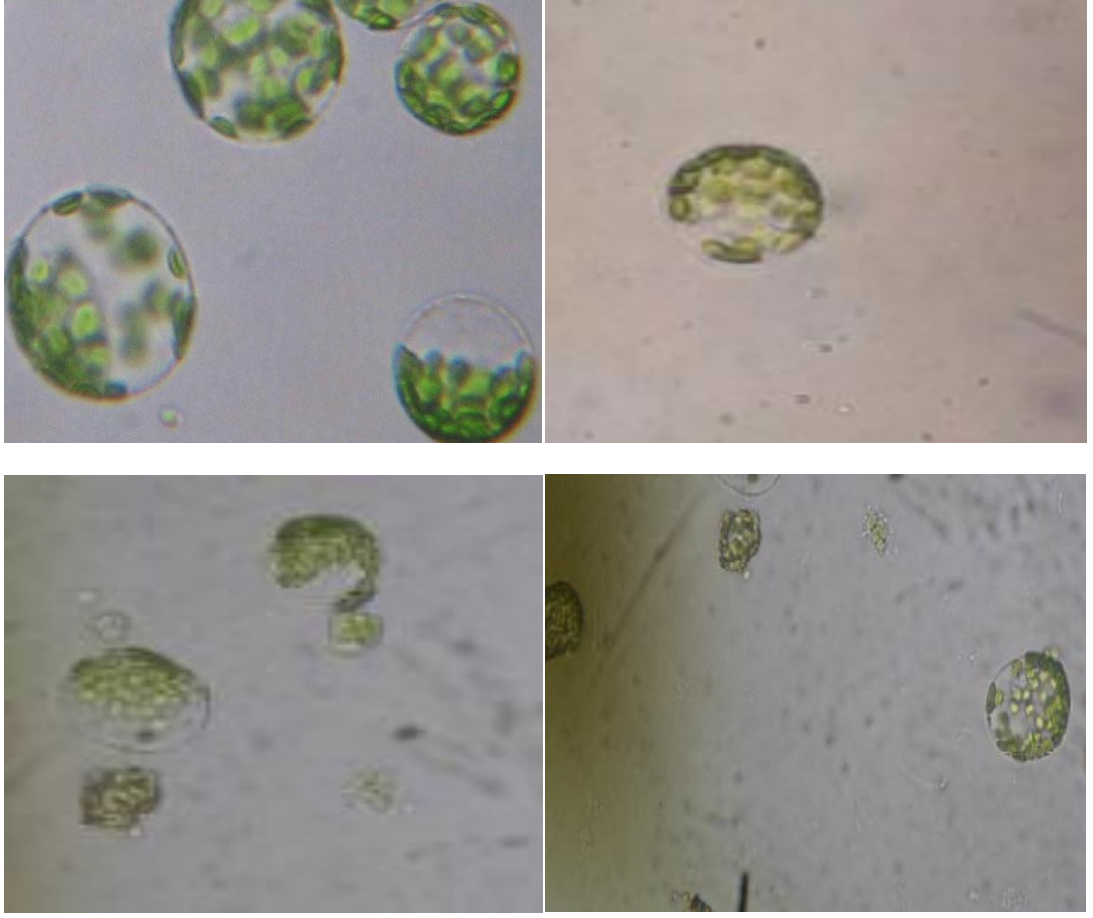
efektör genler üzerinde yapılan çalışma bulunamamıştır. Bu yüzden çalışmamız başka araştırmalar ile karşılaştırılıp desteklenememektedir.

CCCAGCTTGCTGACGCGCGCTGGTCTTCCCTTGG GGGACCGAAGCTGAGCTTCGGCTCAGTATGCACAC TCTTAAAGTGTGACGCAGCTACCGAAGTTGTAGC TTACATACCAATTCTAAATTTTCTCTCCAGAGTC CGTTAAGATTTCATGGTTTCCAATTCAGGCATCGTT TTCAAGTTCGATTATAGTGGACTTGCAAACACTCC CATCATATGGTTGATGGGCACCATCAGATTGAAT GATCTGATCAAACATTTTTTTTTTTTTTTAGCTAG CTGATTAATTAAGTGGATGAAAAAGAAGGGTGTTC CTGATCGAGTCAACGACGAGGTTTTTATTGCAATG TCCAAGGCCCTCAATTTTATAAACCCCTGACGAGTT ATCCATGCAGTGCATTCTGATTGCTCTAAACCGTT TTCTCCAGGAGACGCATGGCTCGAAAATGGCATTTC TTGGATGGTAATCCTCCTGAAAGTAGGCGGCCGCT CAGCTAGCAACGGAAGAAGTAATCATCACATCCAAC AGAATCTTCAAAGAAGAAGCTACGGACTTACGTA TTGCGTTAACCTCACTTTCAAGCTTAGCCATTTTT ACGATATGAGAAAGTTTCAGCTCCTGCATCTTCTT CTGGAGAAATTCAGAAGTAATCCTGTTTCAAGAAC GTTTCAGAAGTGAATCATACAGATCCGCATGCTTT TGGCCACAGAACCCTACTCAGATTGGCAGTTGATC ACAAGCCTCTTCCGCAATGGAGCATGGCATTCCAC AAGTGTGTCAACGATTCCATTTCAGGGCGCATTTT TGCGGTTCCAATAGATACTTCTTGTAAAGTTCCAA TCTCTTATTCTTGTTCAGAAATATACATG	CAACAGCTTGCTGACGCGCGCTGGTCTTCCCTTGGGGG ACCGAAGCTGAGCTTCGGCTCAGTATGCACACTCTTAAA GTGTGACGCAGCTACCGAAGTTGTAGCTTACATACCAA TTCTTAAATTTTCTCTCCAGAGTCCGTTAAGATTTCATGG TTTCCAATTCAGGCATCGTTTTCAAGTTCGATTATAGTG GACTTGCAAACACTCCCATCATATGGTTGATGGGCACCA TCAGATTGAATGATCTGATCAAACATTTTTTTTTTTT TTAGCTAGCTGATTAATTAAGTGGATGAAAAAGAAGGGT GTTCTGATCGAGTCAACGACGAGGTTTTTATTGCAATG TCCAAGGCCCTCAATTTTATAAACCCCTGACGAGTTATCC ATGCAAGTGCATTCTGATTGCTCTAAACCGTTTTCTCCAG GAGACGCATGGCTCGAAAATGGCATTCTTGGATGGTAAT CCTCCTGAAAGTAGGCGGCCGCTCAGCTAGCAACGGAAG AAGAATCATCACATCCAACAGAATCTTCAAAGAAGAAG CTACGGACTTACGATTGCGTTAACCTCACTTCAAGCT TAGCCATTTTTACGATATGAGAAAGTTTCAGCTCCTGCA TCTTCTTCTGGAGAAATTCAGAAGTAATCCTGTTTCAAG AACGTTTCAGAAGTGAATCATACAGATCCGCATGCTTTT GGCCACAGAACCCTACTCAGGATTGGCAGTTGATCACAA CCTCTTCCGCAATGGAGCATGGCATTCCACAAGTGTGTC CAACGATTCCATTTCAGGGCGCATTTTTGCGGTTCCAATA GATACTTCTTGTAAAGTTCCAATCTTATTCTTGTGTT CAGAATATACATGCTTTCGCTCACATCTTCTTACCACAG TAAGTACTTGTAGTTAAGGTACCACACACCACAGAGA AAGTAGCCATCATGCGAGGTAATACAGTAGATTTAAAC ATCAGGACCTAGAGTCCCCACCTCGAAGTCTTTTTCCC
---	--

Şekil 4.9. Sekans analiz sonuçları (Soldan sağa) 1. koloniye ait sekans analizi, 2. koloniye ait sekans analizi

4.9. PROTOPLAST İZOLASYONU

Çalışmamız da kullanılan Avocet Yr10 tohumlarının sterilizasyonu için gereken 5 dakikalık sürenin yeterli olduğu görülmüştür. Tohumlar steril edildikten sonra MS ortamına çimlendirilmek üzere 26 °C’de 2 hafta boyunca karanlık ortamda bırakıldı. Tüm tohumlar çimlenerek köklü sarımsı fidecikler oluşmuştur ve çimlenme yüzdesi % 100 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.9’da izole edilen küresel şekilli, kloroplastlı protoplastlar görülmektedir. İzole edilen protoplastların yeni hücreler oluşturup kolonize olması için B5 ortamına aktarıldı fakat birkaç gün sonra büyüme ortamında kontaminasyon olduğundan dolayı protoplast hücrelerinde büyüme gözlemlenemedi.



Şekil 4.10. Avocet Yr10 buğday türünden elde edilen protoplast hücreleri (Leica marka ışık mikroskopunun 40X 100X büyütme ile elde edilen görüntüler)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *Puccinia striiformis f. sp. tritici*'ye ait aday efektör genlerinden olan PstHa12j12 geninin susturulma çalışması hedeflenmiştir. Bu genin seçilmesinin nedeni patojen ile enfekte edilmiş yapraklarda anlatım düzeyinin artmış olmasıdır¹⁴. Ayrıca genin sinyal peptit bölgesi içermesi ve efektör proteinlerde daha fazla bulunduğu bilinen sistein aminoasit kodonlarının bulunması bitkide hastalık oluşturmada önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

İlk bölümde, PstHa12j12 efektör aday geninin susturulması hedeflenmiştir. Susturulma işleminin VIGS yöntemi ile yapılması planlanmıştır. Bunun için genin ~180 bp uzunluğundaki bir bölgesinin BMSV'ye ait γ genomunu içeren plazmite klonlanması çalışmaları yapılmıştır. PstHa12j12 geninin hedeflenen bölgesi primerler uygun restriksiyon enzim bölgeleri içerecek şekilde tasarlanmış ve PZR ile çoğaltılmıştır. Bu gen fragmanı ve pSL039B-1PDS vektörü *PacI* ve *NotI* enzimleri ile kesim yapılarak yapışkan uçlar elde edilmiştir. T4 DNA ligaz enzimi ile vektöre klonlanmıştır. Ligasyon ürünü *E.coli* Dh5 α hücrelerine aktarılmış ve klonlama işleminin olup olmadığını öğrenmek için sekanslama yaptırılmıştır. Örneklerin sekans sonucu klonlama işleminin başarısız olduğu görülmüştür. Bu nedenle VIGS susturma deneylerine geçilememiştir. Klonlama işleminin başarısız olmasında;

1. Vektörün *PacI* ve *NotI* enzimleri ile tam olarak kesilememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Enzim aktiviteleri tampon içerisinde % 20-50 arasında başarı oranına sahiptir ve enzim miktarının az gelmesinden dolayı enzim ile kesim işlemi tam olarak yapılamadığı tahmin edilmektedir.

2. Klonlama işleminin diğer önemli bir aşaması olan ligasyon basamağında, vektör ile insert miktarının molar konsantrasyon oranlarının doğru ayarlanamamış olması klonlama işleminin başarısız olmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

3. En önemli sebep olarak PZR sonrasında ve enzim ile kesim aşamalarında gen fragmanının yeteri kadar elde edilememiş olması gösterilebilir.

Literatürde bu gene ait susturma deneyleri mevcuttur değildir.

Tezin ikinci bölümünde gerçekleştirilen protoplast izolasyon optimizasyon çalışmaları daha sonraki biyolojik testlerde kullanılmak üzere hedeflenmiştir. Bunun için bir buğday çeşiti olan ‘Avocet Yr10’ yapraklarından protoplast hücrelerinin izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Protoplast başarılı bir şekilde elde edildi ancak miktarı yeterli olmamıştır. Protoplastların sürekliliğinin sağlanması için B5 ortamına adaptasyonu ve kontaminasyon olasılığının minimum olacağı koşulların sağlanması gereklidir. Deneyler ileride bu koşulları sağlayan bir laboratuvar da tekrarlanmak üzere optimize edilmiştir. Uygun ortam şartı ve yeterli miktarda protoplast hücresi elde edildiğinde bitki-patojen etkileşiminde önemli bir rolü olduğunu düşündüğümüz PstHa12j12 gen fragmanının protoplast hücrelerine aktarımı yapılacaktır. Bu sayede bu genin bitki immün sisteminde meydana getirdiği değişiklikleri izlenecektir. Ek olarak monokotil bitkilerden olan buğday bitkisinden protoplast izolasyonu aşamalarının optimize edilmiş olması direnç mekanizmasında rolü olabileceği düşünülen diğer aday patojen efektör genlerin bitki immün sistemindeki rollerinin çalışılmasına imkan verecektir. Elde edilen protoplastların miktarı arttırıldığı zaman verimli gen transferi yapmak mümkün olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Çölkesen, M. *Harran ovasında buğday tarımı ve sorunları üzerine yapılan araştırma ve gözlemler*, Harran Üniversitesi, Zir. Fak. Der. **1995**, 1(1): 117-131.
2. Yıldırım, Ş. *Avrupa birliği ve Türkiye’de Tarımsal Yapı ve Verimlilik*, Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları No:69, Ankara, **2001**, 131.
3. a) Curtis, B. C.; Rajaram, S.; Macpherson, H. G. *Bread wheat*, FAO corporate document repository, **2002**, Erişim: <http://www.fao.org>. b) Mızrak G. *Buğdayın hikayesi*, Türkiye Ziraat Odaları Birliği Dergisi, **2011**.
4. Harlan, J.R. ve Zohary, D. *Distribution of wild wheats and barley*, Science, **1966**, 4, 1074-1079.
5. a) Duke, J. A. *Triticum aestivum L., Poaceae, Common wheat, Bread wheat*, Handbook of Energy Crops, **1983**; b) Milner, M.; Scrimshaw, N.; Wang, D.I.C. *Protein Resources and Technology*, AVI Publishing, **1978**.
6. Chen, X. *Epidemiology and control of stripe rust (Puccinia striiformis f. sp. tritici) on wheat*. Can. J. Plant Pathol., **2005**, 27, 314–337.
7. Roelfs, A.P.; Singh, R.P.; Sari, E.E., *Rust Diseases of Wheat: Concepts and method of disease management*, **1992**, Mexico, D.F.: Cimmyt. 81.
8. Hassebrauk K. *Nomenklatur, geographische verbreitung und wirtsbereich des gelbrostes, Puccinia striiformis west.* **1965**.
9. Jin, Y. *Role of Berberis spp. as alternate hosts in generating new races of Puccinia graminis and P. striiformis*. Euphytica, **2010**, doi:10.1007/s10681-010-0328-3.
10. a) Cartwright, D.W. ve Russell, G.E. *Development of Puccinia striiformis in a susceptible winter-wheat variety*, Trans. Br. Mycol. Soc. **1981**, 76, 197–204; b) Garrood, J.M. *The interaction of Puccinia striiformis with wheat and barley*, Doktora tezi, University of East Anglia. **2001**; c) Mares, D.J., *Light and electron-microscope*

study of the interaction of yellow rust (*Puccinia-striiformis*) with a susceptible wheat cultivar, *Ann. Bot.* **1979**, 43, 183–189.

11. a) Melichar, J.P.E.; Berry, S.; Newell, C.; MacCormack, R.; Boyd, L.A. *QTL identification and microphenotype characterisation of the developmentally regulated yellow rust resistance in the UK wheat cultivar Guardian*, *Theor. Appl. Genet.* **2008**, 117, 391–399; b) Moldenhauer, J.; Moerschbacher, B.M.; Van der Westhuizen, A.J. *Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp tritici) development in resistant and susceptible wheat cultivars*, *Plant Pathol.* **2006**, 55, 469–474; c) Moldenhauer, J.; Pretorius, Z.A.; Moerschbacher, B.M.; Prins, R.; Van Der Westhuizen, A.J., *Histopathology and PR-protein markers provide insight into adult plant resistance to stripe rust of wheat*, *Mol. Plant Pathol.*, **2008**, 9, 137–145.

12. Boyd, L.A. *Can Robigus defeat an old enemy?—Yellow rust of wheat*. *J. Agric. Sci*, **2005**, 143, 233–243.

13. Bozkurt, T.; Mcgrann, R. G.; Maccormack, R.; Boyd L.; Akkaya, M. *Cellular and transcriptional responses of wheat during compatible and incompatible race-specific interactions with *Puccinia striiformis* f. sp. tritici* *Molecular Plant Pathology*. **2010**, 11(5), 625–640.

14. Chuntao Yin, Xianming Chen, Xiaojie Wang, Qingmei Han, Zhensheng Kang and Scot H Hulbert *Generation and analysis of expression sequence tags from haustoria of the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. Tritici*. *BMC Genomics*, **2009**, 1471-2164/10/626.

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

16. S. Özcan, E. GüreL M. Babaoğlu, M. *Bitki Biyoteknolojisi; Doku Kültürü ve Uygulamaları II, Bölüm 20*, **2001**.

17. Takebe, I., Labib, G., Melchers, G., *Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco*. *Naturwissenschaften*, **1971**, 58: 318-320.

18. a) Wardrop, J., Lowe, K.C., Power, J.B., Davey, M.R., *Perfluorochemicals and plant biotechnology: an improved protocol for protoplast culture and plant regeneration in rice (Oryza sativa L.)*. *Journal of Biotechnology*, **1996**, 50: 47-54; b) Kihara, M., Funatsuki, H. *Fertile plant regeneration from barley (Hordeum vulgare L.) protoplasts isolated from primary calluses*. *Plant Science*, **1995**, 106: 115-120; c) Funatsuki, H., Lörz, H., Lazzeri, P.A., *Use of feeder cells to improve barley protoplast culture and regeneration*. *Plant Science*, **1992**, 85: 179-187; d) Folling, M., Madsen, S., Olesen, A., , *Effect of nurse culture and conditioned medium on colony formation and plant regeneration from Lolium perenne protoplasts*. *Plant Science*, **1995**, 108: 229-239; e) Spangenberg, G., Wang, Z.Y., Nagel, J., Potrykus, I., , *Protoplast culture and generation of transgenic plants in red fescue (Festuca rubra L.)*. *Plant Science*, **1994**, 97: 83-94; f) Buiteveld, J., Creemers-Molenaar, J., , *Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of leek (Allium ampeloprasum L.)*. *Plant Science*, **1994**, 100: 203-210.
19. Radionenko, M.A., Kuchuk, N.V., Khvedynich, O.A., Gleba, Y.Y., , *Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of red clover (Trifolium pratense L.)*. *Plant Science*, **1994**, 97: 75-81.
20. a) Zhu, Y., Hoshino, Y., Nakano, M., Takahashi, E., Mii, M., *Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (Vitis vinifera L.) through somatic embryogenesis by using embryogenic callus culture and activated charcoal*. *Plant Science*, **1997**, 123: 151-157; b) Kim, S.W., Oh, S.C., In, D.S., Liu, J.R., *Plant regeneration of rose (Rosa hybridia) from embryogenic cell-derived protoplasts*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **2003**, 73: 15-19.
21. Tör, M. *Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler*. *Tr.J.Biology*, **1998**, 22, 271-285.
22. Dixon, R.A.; Harrison M.J.; Lamb, C.J. *Early events in the activation of plant defense responses*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1994**, 32, 479-501.

23. a) Staskawicz, B.; Ausubel F.M.; Baker B.J.; Ellis J.G.; Jones, J.D.G.. *Molecular genetics of plant disease resistance*. *Science*, **1995**, 268:661-667; b) Feys, B.J. ve Parker J.E.. *Interplay of signaling pathways in plant disease resistance*, **2000**, 16, 449-455.
24. Flor, H.H.. *Current status of the gene-for-gene concept*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **1971**, 9:275-296.
25. Halterman, D.; Zhou, F.; Wei F.; Wise, R.; Schulze, P. *The MLA6 coiled-coil, NBS-LRR protein confers AvrMla6-dependent resistance specificity to Blumeria graminis f. sp. hordei in barley and wheat*. *Plants J.*, **2001**, 25(3), 335-348.
26. Gabriel, D.W.; Rolfe, B.G. *Working models of specific recognition in plant-microbe interactions*, *Annu. Rev. Phytopathol*, **1990**, 28, 365-391.
27. a) McDowell, J.M.; Dhandaydham, M.; Long, T.A.; Aarts, M.G.M.; Goff, S.; Holub, E.B.; Dangl, J.L. *Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of Arabidopsis*, *Plant Cell*, **1998**, 10, 1861-1874; b) Bendahmane, A.; Kanyuka, K.; Baulcombe, D. *The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses*, *Plant Cell*, **1999**, 11, 781-791; c) Gassmann, W.; Hinsch, M.E.; Staskawicz, B.J. *The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes*, *Plant J*, **1999**, 20(3), 265-277; d) Wang, Z.X.; Yano, M.; Yamanouchi, U.; Iwamoto, M.; Monna, L.; Hayasaka, H.; Katayose, Y.; Sasaki, T. *The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes*, *Plant J*, **1999**, 19, 55-64.
28. Tameling, W.I.L.; Elzinga, S.D.J.; Darmin, P.S.; Vossen, J.H.; Takken, F.L.W.; Harling, M.A.; Cornelissen, B. *The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity*, *Plant Cell*, **2002**, 14, 2929-2939.
29. Kobe, B. ve Deisenhofer, J. *Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats*, *Nature*, **1993**, 366, 751-756.

30. Luo, M.; Carson, M.; Li, S.; Lin, G., Schormann, N.; Symersky, J. *Structural Genomics of Caenorhabditis Elegans: Crystal Structure of the Tropomodulin C-Terminal Domain, Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **2003**, 53, 947-949.
31. Huang, L.; Brooks, S.A.; Li, W.L.; Fellers, J.P.; Trick, H.N.; Gill, B.S. *Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat, Genetics*, **2003**, 164: 655-664.
32. Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublat A., and Keller, B. *Mapbased isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (Triticum aestivum L.) genome, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100: 15253-15258.
33. Yahiaoui, N.; Srichumpa, P.; Dudler, R.; Keller, B. *Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene Pm3b from hexaploid wheat, Plant J.* **2004**, 37: 528-538.
34. Laroche, A.; Eudes, F.; Frick, M.M.; Huel, R.; Nykiforuk, C.L.; Conner, R.L.; Kuzyk, A.; Acharya, S.; Jordan, M. *A wheat resistance gene against stripe rust, Can. J. Plant Pathol.* **2002**, 24: 504-507.
35. a) Pryor, T. *The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants, TIG*, **1987**, 3(6), 157-161; b) Dangl, J.L.; Dietrich, R.A.; Richberg, M.H. *Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions, The Plant Cell*, **1996**, 8, 1793-1807; c) Hammond-Kosack, K.E. ve Jones, J.D.G. *Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses, Plant Cell*, **1996**, 8, 1773-1791.
36. a) Jones, J.D.G.; Dangl J.L. *The plant immune system, Nature*, **2006**, 444(7117): 323-329; b) Bent, A.F.; Mackey D. *Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions." Annual Review of Phytopathology*, **2007**, 45: 399-436.
37. Van Der Biezen E.A.; Jones J.D.G. *Plant disease-resistance proteins and the gene for gene concept" Trends Biochem Sci.*, **1998**, 23(12):454.

38. Mullis, B. ve Faloona F. A. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymology*, **1987**, 155, 335-350.
39. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis T. *Molecular clonning a laboratoy manual*, Cold Spring Harbor Laboratory PresS, U.S.A, **1989**.
40. a) Chen, S.; Tao, L.; Zeng, L.; Vega-Sanchez, M. E.; Umemura, K.; Wang, G. L. *A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice*, *Molecular Plant Pathology*, **2006**, 7,417-427. b) Yoshida, K.; Saitoh, H.; Fujisawa, S.; Kankazi, H.; Matsumura, H; Tosa, Y. *Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen Magnoportha oryzae*, *The Plant Cell*, **2009**, 21(5), 1573-1591.

1. pSL039B-1 PLAZMİT SEKANSI

48

ÖZGEÇMİŞ

Nasibe Tekiner, 31.10.1985 tarihinde Ankara’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara’ da tamamladım. 2005 yılında Gazi Üniversitesi’nin Kırşehir Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2009 yılında biyoloji bölümünü ikincilikle bitirdim. Aynı yıl Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.