

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**HIYAR BİTKİSİNDE KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Mümin İbrahim TEK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**HIYAR BİTKİSİNDE KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Mümin İbrahim TEK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HIYAR BİTKİSİNDE KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Mümin İbrahim TEK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2021-5501 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HIYAR BİTKİSİNDE KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Mümin İbrahim TEK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 08/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ (Danışman)

Prof. Dr. Şerife Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Doç. Dr. Hakan FİDAN

ÖZET

HIYAR BİTKİSİNDE KÜLLEME HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Mümin İbrahim TEK

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Temmuz 2021; 54 sayfa

Küllemeler hıyarda, önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır ve bu hastalık *Podosphaera xanthii* fungal etmeni tarafından meydana gelmektedir. Küllemeye karşı dayanıklı ve tolerant çeşitlerin geliştirilmesi, bu hastalık ile mücadelede en etkili ve çevre dostu yöntemdir. Küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının bilinmesi, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu mekanizmaların belirlenmesi amacı ile, küllemeye karşı dayanıklı Meltem çeşidi, tolerant VT18 hattı ve hassas yerel çeşit Çamlıca'dan DNA ve RNA'lar izole edilmiştir. PCR ve RT-PCR ile külleme etmenine karşı farklı reaksiyonlar veren bu bitkilerin sahip oldukları mekanizmalar araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bitkilerde bulunan farklı genlerin, farklı savunma mekanizmalarında pozitif ve negatif regülatör olarak görev aldıkları bulunmuştur. Küllemeye karşı verdikleri yanıtların bu nedenle farklı olduğu anlaşılmıştır. Daha önceki çalışmalarda, hıyarda külleme etmenine karşı duyarlılığı arttırdığı belirlenen *MLO1*, *MLO8* ve *MLO11* genleri üzerinde, CRISPR/Cas9 yöntemi ile mutasyon meydana getirilerek, *MLO*-mutant bitkiler elde edilmiştir. Bu bitkiler, gelecek çalışmalarda küllemeye karşı savunma mekanizmaları ile ilgili çalışmalarda, dayanıklı hıyar hattı olarak kullanılacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: Dayanıklılık, Hıyar, Külleme, *Podosphaera xanthii*, Bitki savunma mekanizmaları

JÜRİ: Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Şerife Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Doç. Dr. Hakan FİDAN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RESISTANCE MECHANISM TO POWDERY MILDEW DISEASE IN CUCUMBER PLANTS

Mumin Ibrahim TEK

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. CALIS

July 2021; 54 pages

Podosphaera xanthii associated with the powdery mildew disease of cucumber, causes significant yield losses besides quality deterioration in cucumber. The development of powdery mildew resistant or tolerant varieties is the most effective and eco-friendly method of powdery mildew management. Aim of the project determination of the mechanisms of disease resistance against powdery mildew diseases contributes for the development of resistant varieties. In order to determine the powdery mildew resistance mechanisms, nucleic acids, DNAs and RNAs, were isolated from the powdery mildew resistant Meltem, tolerant VT18 and susceptible local variety Camlica. The different reactions by these plants to powdery mildews were analysed by PCR and RT-PCR. As a result of this study, different genes in cucumber observed to be act as positive and negative regulators in defense mechanisms, and have different responses to powdery mildew. Various *MLO* genes *MLO1*, *MLO8*, and *MLO11*, determined to increase the powdery mildew susceptibility in cucumbers plants, were mutagenized by CRISPR/Cas9 method to obtain *MLO*-mutant cucumber plants. The plants would be used as a resistance source in cucumber for future studies on defense mechanisms against powdery mildew.

KEYWORDS: Cucumber, Plant defense mechanisms, *Podosphaera xanthii*, Powdery mildews, Resistance,

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Şerife Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, küllemeye hassas, tolerant ve dayanıklı hıyar çeşitleri kullanılarak, dayanıklılığın altında yatan moleküler mekanizma anlaşılmaya çalışılmıştır. Ayrıca küllemeye karşı hassaslık genleri olarak belirtilen 3 farklı *MLO* geni üzerinde CRISPR/Cas9 yöntemi ile mutasyon meydana getirilerek *MLO*-mutant bitkiler elde edilmiştir. Genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Tez çalışması sırasında bilgilerini paylaşan ve çalışmada yardımcı olan danışmanım Doç. Dr. Özer ÇALIŞ'a ve ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Gerektiğinde çalışmalarında yardımcı olan, bilgilerini paylaşan ve manevi desteklerinden dolayı Kübra BUDAK'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi/manevi desteğini eksik etmeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
3. MATERYAL METOT.....	9
3.1. İnokulum Kaynağı ve Moleküler Tanısı	9
3.2. Bitki Materyali ve Külleme inokulasyonu	10
3.3. Mikroskopik Gözlem (Trypan Blue ve DAB Boyama).....	10
3.4. Hedef Genlerin Seçimi.....	11
3.5. Hedef Genlere Özgü Primerlerin Dizaynı.....	13
3.6. Bitkilerden DNA İzolasyonu	14
3.7. Hıyar Çeşitleri Arasındaki Farklılıkların PCR ile Belirlenmesi	15
3.8. Bitkilerden RNA İzolasyonu.....	15
3.9. Farklı Çeşitler Arasındaki Transkriptomik Farklılıkların RT-PCR ile Belirlenmesi	16
3.10. <i>MLO</i> -mutant Hıyarlarının Elde Edilmesi.....	17
3.10.1. gRNA dizaynı ve plazmit yapısı.....	17
3.10.2. Plazmitin çoğaltılması, izolasyonu ve kontrolü.....	17
3.10.3. Plazmitin <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e aktarılması ve kontrolü	18
3.10.4. Transformasyon, bitki rejenerasyonu ve T-DNA kontrolü	18
4. BULGULAR	21
4.1. Külleme Patojeninin Tanısı.....	21
4.2. İnokulasyon Sonrasında Bitki Reaksiyonlarının Belirlenmesi	21
4.2.1. İnokulasyon sonrası Çamlıca genel durum.....	21
4.2.2. Çamlıca yapraklarının Trypan Blue ile boyanması	22
4.2.3. Çamlıca yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması	22
4.2.4. İnokulasyon sonrası VT18 genel durum.....	23

4.2.5. VT18 yapraklarının Trypan Blue ile boyanması	23
4.2.6. VT18 yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması	24
4.2.7. İnokulasyon sonrası Meltem genel durum	24
4.2.8. Meltem yapraklarının Trypan Blue ile boyanması	25
4.2.9. Meltem yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması	25
4.3. PCR Sonuçları.....	26
4.4. İzole Edilen RNA'ların CACS Primeri ile Kontrolü	28
4.5. RT-PCR Sonuçları	28
4.6. Kalibre değer ile çizgi grafiklerinin çizilmesi	31
4.7. Plazmitin Kontrolü.....	33
4.8. Plazmitin PCR ile Kontrolü	33
4.9. Plazmitin Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü.....	34
4.10. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 LBA'da Çoğalması.....	35
4.11. MLO-mutant Hıyar Bitkilerinin Elde Edilmesi.....	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR	44
7. KAYNAKLAR	46
8. EKLER.....	53
EK-1. Gelanalyzer 19.2 Kullanılarak Analiz Edilen Her Örneğin RT-PCR Ürünlerine Ait Raw Volume Değeri ve Formüle Göre Hesaplanan Kalibre Değerler.....	53

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Hıyar Bitkisinde Külleme Hastalığına Karşı Dayanıklılık Mekanizmalarının Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

08/07/2021

Mümin İbrahim TEK

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

5'	: 5 üssü
3'	: 3 üssü
μ l	: mikrolitre
ml	: mililitre
ng	: nanogram
μ g	: mikrogram
mg	: miligram
mM	: milimolar
μ M	: mikromolar
g	: g kuvveti
V	: hacim
μ F	: mikrofarad
Ω	: ohm
~	: yaklaşık
°C	: santigrat derece
bp	: baz çifti
rpm	: dakikadaki devir sayısı
.	: ondalık ayraç
+	: artı
/	: bölme
=	: eşittir
x	: çarpı

%	: yüzde
Ca ²⁺	: kalsiyum iyonu
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit

Kısaltmalar

ABA	: Absisik Asit
BAP	: 6-Benzilaminopürin
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
CDS	: Kodlanan sekans
CRISPR	: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar
CTAB	: Setildimetiletil Amonyum Bromür
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EtOH	: Etanol
G	: Gün
gDNA	: Genomik Deoksiribo Nükleik Asit
gRNA	: Rehber Ribonükleik Asit
HR	: Hipersensitif Reaksiyon
İÖ	: İnokulasyondan Önce
İS 1	: İnokulasyondan 1 Gün Sonra
İS 2	: İnokulasyondan 2 Gün Sonra
KEGG	: Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi
LBA	: Luria-Bertani Agar
LBB	: Luria-Bertani Broth

MAPK	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MAS	: Markör Destekli Seleksiyon
<i>MLO</i>	: MLO Geni
MLO	: MLO Proteini
MS	: Murashige ve Skoog Besi Ortamı
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NIL	: Yakın İzogenik Hat
OD	: Optik Yoğunluk
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	: Kantitatif Özellik lokusu
<i>R</i>	: Dayanıklılık Geni
RIL	: Rekombinant Saf Hat
RNA	: Ribonükleik Asit
RNA-Seq	: Ribonükleik Asit Sekanslama
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S</i>	: Hassaslık Geni
T-DNA	: Transfer Deoksiribo Nükleik Asit
TE	: Transpoze Edilebilir Element
UV	: Ultraviyole
VIGS	: Virüs Kaynaklı Gen Susturma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Küllemeye dayanıklılık ile ilgili haritalanan bölgelerin, hıyar kromozomları üzerindeki görünümü, Zhang vd. (2021)'nin çalışmasından esinlenilerek oluşturulmuştur	1
Şekil 3.2. a) Külleme ile enfekteli hıyar yaprakları; b) Külleme inokulasyonu	10
Şekil 3.3. Mikroskopik gözlemler için hazırlanan örnekler a) %96'lık etanol içerisinde kaynatılan enfekteli yapraklar; b) Çamlıca, VT18 ve Meltem yapraklarının Trypan Blue ile boyanması; c) DAB solüsyonunda bekletilen örnekler; d) DAB+Trypan ile boyanmış örnekler.....	11
Şekil 3.5 İlgili genlere özgü primerlerin dizayn edilmesinin temsili gösterimi.....	13
Şekil 3.6. Alınan doku örneklerinin sıvı azot ile havan içerisinde ezilmesi.....	15
Şekil 3.8. Çamlıca, VT18 ve Meltem hıyar bitkilerinin saksılar içerisine dikilmesi, RNA izolasyonu ve inokulasyon sonrası DAB ve Trypan Blue boyama için kullanılan bitkilerin dikimi, İS: inokulasyondan sonra, G: gün	15
Şekil 3.9. Elde edilen RT-PCR jel sonuçlarının GelAnalyzer 19.2 ile analiz edilmesi. a) Jel üzerinde bantların olduğu bölgenin seçilmesi; b) Raw Volume için bant intensity pik noktalarının seçilmesi; c) Bantlara ait Raw Volume değeri	16
Şekil 3.10.1. <i>MLO</i> -mutant bitkiler elde edilmek için kullanılan plazmit yapısı, <i>KanR</i> : Kanamycin Resistance, <i>BlpR</i> : Bialaphos phosphinotricin Resistance, plazmit üzerinde yalnızca kesim işlemi yapılan restriksiyon enzim bölgeleri verilmiştir	17
Şekil 3.10.4. <i>MLO</i> -mutant bitkilerin elde edilme aşamaları. a) Tohum kabuklarının soyulması; b) Tohumların çimlendirilmesi; c) Eksplantların transformasyon sonrası ikili kültür ortamına yerleştirilmesi; d) Transformasyon sonrası gelişen eksplantlar; e) Eksplantlardan sürgünlerin alınması; f) Bitki doku kültürü kaplarında gelişen sürgünler; g, h, i) Gelişime devam eden sürgünler; j) Köklenen bitkiler	19
Şekil 4.1. Külleme etmeninden izole edilen DNA ile yapılan PCR işlemi sonucu, Ladder: Thermo GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	21
Şekil 4.2.1. Çamlıca Yerel çeşidin inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyon yapılmayan Çamlıca Yerel hıyar bitkilerini göstermektedir.....	21
Şekil 4.2.2. Çamlıca hıyar yapraklar üzerinde gelişen <i>P. xanthii</i> 'nin, Trypan Blue ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; a): 4x objektif; b) 10x objektif; c) 40x objektif büyütmede görünümü	22
Şekil 4.2.3. Çamlıca hıyar yapraklar üzerinde gelişen <i>P. xanthii</i> 'nin Trypan Blue+ DAB ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; a) 4x objektif; b) 10x objektif; c) 40x objektif	22
Şekil 4.2.4. VT18 hattının, inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyonu yapılmayan VT18 hattı hıyarlarını göstermektedir	23
Şekil 4.2.5. VT18 hıyar yaprakları üzerinde gelişen <i>P. xanthii</i> 'nin Trypan Blue ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; a) 4x objektif; b) 10x objektif; c) 40x objektif.....	23
Şekil 4.2.6. VT18 hıyar yaprakları üzerinde gelişen <i>P. xanthii</i> 'nin Trypan Blue+ DAB ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; a) 4x objektif; b) 10x objektif; c) 40x objektif	24

Şekil 4.2.7. Meltem çeşidinin, inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyon yapılmayan Meltem çeşidini göstermektedir	24
Şekil 4.2.8. Meltem hıyar yaprakları üzerinde gelişen <i>P. xanthii</i> 'nin Trypan Blue ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; a) 4x Objektif; b) 10x objektif; c) 40x objektif.....	25
Şekil 4.2.9. Meltem hıyar yaprakları üzerinde gelişen <i>P. xanthii</i> 'nin Trypan Blue+ DAB ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; a) 4x Objektif; b) 10x objektif; c) 40x Objektif	25
Şekil 4.3. Hedef genlere özgü primerler ve bitkilerden izole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu,	26
Şekil 4.4. İzole edilen RNA'lar (4 µl) ve CACS primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçları, a, b) Meltem iö; c, d) Meltem is 1. gün; e) Meltem is 2. gün; f, g) VT18 iö; h) VT18 is 1. gün; i, j) VT18 is 2. gün; k, l) Çamlıca iö; m, n) Çamlıca is 1. gün; o) Çamlıca is 2. gün, iö: inokulasyon öncesi, is: inokulasyon sonrası	28
Şekil 4.5. İzole edilen RNA'lar (20 ng) kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucu elde edilen ürünlerin jelde görüntülenmesi, iö: inokulasyon öncesi, is 1: inokulasyondan 1 gün sonra, is 2: inokulasyondan 2 gün sonra	29
Şekil 4.6. Verilere göre oluşturulan, farklı genlerin farklı çeşit ve zamanlarda ekspresyon seviyelerini gösteren çizgi grafiği (iö: inokulasyon öncesi, is 1: inokulasyondan 1 gün sonra, is 2: inokulasyondan 2 gün sonra).....	31
Şekil 4.7. LBA besiyerindeki <i>E. coli</i> hücreleri; a) Antibiyotik içermeyen LBA; b) Kanamisin içeren LBA; c) Spektinomisin içeren LBA.....	33
Şekil 4.8. AgroInsCont primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucu.....	34
Şekil 4.9. <i>E. coli</i> 'den izole edilen plazmitin farklı kesim enzimleri ile kesilmesinin ardından %1'lik jelde görüntülenmesi, Uncut Plasmid, sirküler yapıda doğrudan jele yüklenen plazmiti göstermektedir. <i>BsmBI</i> ; yalnızca <i>BsmBI</i> ile kesilerek lineer hale getirilen plazmiti ve <i>PmeI</i> + <i>PmII</i> ; her iki kesim enzimi ile kesilen plazmiti göstermektedir.	35
Şekil 4.10. Elektroporasyon sonrasında Rifamisin ve Kanamisin içeren LBA üzerine ekilen <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 hücrelerinin 2 günlük inkübasyon sonrasında görünümü	36
Şekil 4.11. Sürgünlerin bitki doku kültürü kaplarına aktarıldıktan 3 hafta sonraki görünümü; a) Transforme olan eksplantlardan gelişen sürgün; b) Transforme olmayan ve seleksiyon ortamındaki glufosinate-ammonium'dan dolayı sararan sürgün.....	36
Şekil 4.12. Elde edilen 6 bitkinin Cas9F ve Cas9R primerleri ile kontrolü a, b, c, d, e, f) Elde edilen bitkiler.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

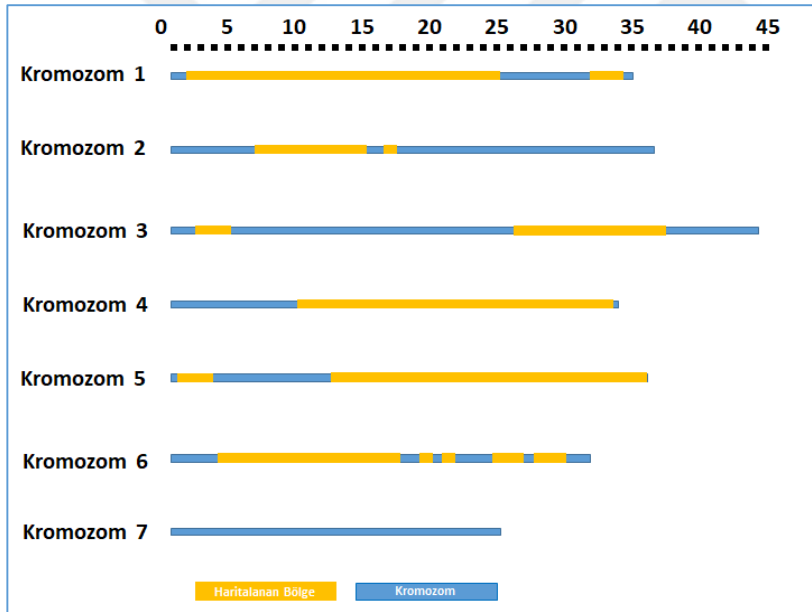
Çizelge 3.1. CTAB yöntemi ile külleme hastalık etmeninden DNA izolasyonu aşamaları	9
Çizelge 3.4. Hedef genler ve bu genlere spesifik olarak dizayn edilmiş primerlerin isimleri, erişim numaraları ve ilgili oldukları mekanizmalar (LOC: NCBI erişim numarası, Cusca:Phytozome).....	11
Çizelge 3.5. Hedef genlere özgü dizayn edilen primerlerin dizilimleri ve ürün boyutları	13



1. GİRİŞ

Külleme patojenleri, bitkilerin yeşil aksanlarında enfeksiyonlara neden olan biyotrof fungal etmenlerdir. Özellikle hıyar yapraklarının geniş yüzeyli olması ve yetiştirildikleri dönemin iklim şartları, patojenin gelişimi için oldukça uygundur. Bu patojenlere karşı genellikle kimyasal mücadele önerilmektedir. Küllemeler çok sayıda spor üretmeleri ve eşeyli olarak çoğalmaları nedeni ile mücadelede kullanılan kimyasallara karşı da hızlı direnç göstermektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı 2018). Ayrıca kullanılan kimyasalların, çevreye ve insan sağlığına zarar vermesi gibi dezavantajları da vardır. Bu nedenle bu patojenlere karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ön plana çıkmaktadır. Fakat hıyarda, küllemelere karşı dayanıklılığın poligenik karakterde olması ve mevcut dayanıklılık markörlerinin ıslahçılara kolaylık sağlamamaktadır. Bu durum küllemeye karşı dayanıklı hatların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır.

Hıyarda küllemeye karşı dayanıklılık, uzun yıllardır çalışılmasına rağmen halen tam anlamıyla anlaşılmamıştır. Dayanıklılık ile ilgili lokusları haritalamaya yönelik çalışmalar günümüzde de devam etmektedir (Chen vd. 2020).



Şekil 1. Küllemeye dayanıklılık ile ilgili haritalanan bölgelerin, hıyar kromozomları üzerindeki görünümü, Zhang vd. (2021)'nin çalışmasından esinlenilerek oluşturulmuştur

Son yıllarda, farklı hıyar hatlarında, küllemeye karşı dayanıklılığın haritalanma çalışmaları hızlanmıştır. Şekil 1'de 2008-2018 yılları arasında belirlenen QTL'lerin hıyar kromozomları üzerindeki fiziksel konumunu göstermektedir. Haritalanan bölgelerin sıklığı, belirlenen dayanıklılık QTL'lerinin sıcaklığa bağlı olması ve kalıtımın tam olarak bilinmemesi gibi nedenler, küllemeye karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Dayanıklılıkla ilişkili bir çok lokus bulunmasına rağmen küllemeye

karşı dayanıklılık mekanizmasının net olarak anlaşılmamıştır. Külleme enfeksiyonu sonrasında, hıyarda hangi mekanizma veya mekanizmaların tetiklendiği ve hangi genlerin bu mekanizma/mekanizmalarda rol oynadığı tam anlamıyla belirlenmemiştir. (Chen vd. 2020).

Hıyarda küllemeye karşı dayanıklılıkla ilgili belirsizlikler devam ederken, son yıllarda *R* genleri aracılığı ile dayanıklılığa alternatif olarak farklı bitkilerde hassaslık (*S*) genleri tanımlanmıştır (De Almeida vd. 2005). Bu genler konukçunun, patojenlere karşı duyarlılığını arttırmaktadır. Bu nedenle, *S* genleri üzerinde gerçekleşen mutasyonlar, konukçunun patojene karşı duyarlılığını azaltmaktadır. Freisleben ve Lein tarafından 1942’lerde arpada keşfedilen *MLO* mutasyonu, arpada küllemeye karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Arpa *MLO* homologlarının, farklı bir çok bitkide keşfinin ardından, *MLO* mutasyonlarının farklı bitkilerde de küllemeye karşı dayanıklılığı sağladığı keşfedilmiştir. Hıyarda ise külleme duyarlılığı ile ilgili olduğu öngörülen 3 farklı *MLO* geni bildirilmiştir. Bunlar *MLO1*, *MLO8* ve *MLO11* genleridir (Berg vd. 2015).

Bu çalışmada, küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının araştırılması amacıyla, hassas (Çamlıca Yerel) , tolerant (VT18) ve dayanıklı (Meltem) olmak üzere 3 farklı hıyar hat ve çeşidi karşılaştırılmıştır. Hücre redoks homeostazı, patojenlere karşı savunma ile ilişkili protein sentezi, bitki patojen interaksyonu, savunma sinyal yolu regülasyonu ve MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) sinyal yolu mekanizmalarında rol oynayan genlere özgü spesifik primerler dizayn edilmiştir. Bu primerler kullanılarak çeşitler arasındaki genomik farklılığı belirlemek için PCR işlemi yapılmıştır. Ayrıca RT-PCR işlemi ile bu genlerden bazılarının inokulasyon sonrasındaki 1 ve 2. günlerde ifade edilip edilmediği ve bu açıdan çeşitler arasında nasıl bir farklılığın olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca küllemeye karşı hassas olduğu belirlenen ADR27 hattına ait hıyar bitkisi üzerinde CRISPR/Cas9 yöntemi ile *MLO1*, *MLO8* ve *MLO11* genleri üzerinde mutasyon meydana getirilmiştir. ADR27 hattı, küllemeye karşı duyarlı, saf hat olması nedeniyle seçilmiştir. *MLO*-mutant hıyarlar, gelecekte küllemeye dayanıklılık mekanizmaları ile ilgili çalışmalarda kullanılmak ve transgen içermeyen küllemeye dayanıklı hatların geliştirilmesi amacıyla elde edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Cucurbitaceae familyası içerisinde yer alan Cucumis cinsindeki hıyar (*Cucumis sativus* L.), ekonomik açıdan önemli bir sebze grubudur. Dünya genelinde 2019 yılında 2.231.402 hektarlık alandan toplam 87.805.086 ton hıyar elde edilmiştir. Hıyar yıllık üretiminin %89'u Asya'da yoğunlaşmıştır ve özellikle üretimde birinci sırada olan Çin'de 70.288.130 ton hıyar yetiştirilmiştir. Üretim miktarında ikinci sırada ise Türkiye yer almaktadır. 2019 yılında Türkiye'de 38.486 hektarlık üretim alanından 1.916.645 ton hıyar elde edilmiştir (FAO 2019). TÜİK'de yer alan son verilere göre (2018) hıyar üretiminde yıllık kayıp 168.202 tondur. Bu kayıba depolama, taşıma ve pazarlama aşamalarındaki kayıpların yanı sıra üretim esnasında abiyotik ve biyotik stres faktörleri de neden olmaktadır. Hıyarın iklim isteği, geniş yaprakları, yüksek su içeriği özellikle yeşil aksamında zarar yapan hastalıklara ve zararlılara karşı duyarlılığını arttırmaktadır. Özellikle külleme patojenleri, geniş bir dağılıma sahip, hızlı yayılan ve önemli verim kayıplarına neden olan yıkıcı hastalıklardır (Chen vd. 2020).

Hıyardaki külleme hastalığına iki farklı patojen neden olmaktadır. Bunlar *Golovinomyces cichoracearum* (*Erysiphe cichoracearum*) ve *Podosphaera xanthii* (*Sphaerotheca fuliginea*) patojenleridir (Block ve Kathleen 2005). Bu patojenler verim ve kalitede ciddi kayıplara yol açarak dünya çapında hıyar üretimini etkilemektedir.

Hastalık etmenleri, kök hariç tüm aksanlarda zarara neden olmaktadır. Küllemeler, yaprak yüzeylerinde, yaprak saplarında ve genç sürgünlerde, beyaz toz halinde görünen bir fungal kütlenin varlığıyla kolayca tanınırlar (Zitter vd. 1996). Tipik olarak yaprak fotosentez kapasitesinde ve meyve kalitesinde bir azalmaya neden olurlar (Nail ve Howell 2004). Obligat biyotrofik ektoparazit *Podosphaera xanthii*'nin neden olduğu külleme, hıyar da dahil olmak üzere kabakgillerde, en yaygın görülen fungal hastalıktır (Zitter vd. 1996).

Çoğu hıyar üretim alanında, külleme hastalığı yaygın olarak fungusitlerin uygulanmasıyla kontrol edilmektedir (Xu vd. 2017); Bununla birlikte, çevreye ve insan sağlığına zararlı olmasının yanı sıra, aşırı fungusit kullanımı, *P. xanthii* popülasyonları üzerindeki fungusit direncini arttırmaktadır (Rubio vd. 2015). Bu yüzden, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, külleme hastalığının kontrolüne yönelik en etkili yaklaşımdır ve hıyar ıslah programlarının birincil odak noktalarından biridir. Çünkü dayanıklı ve tolerant çeşitlerin geliştirilmesi, hıyar yetiştiriciliğinde külleme hastalıkları ile mücadelede en ekonomik ve çevre dostu yöntemdir. (Chen vd. 2020)

Küllemeye dayanıklı hıyar çeşitlerinin geliştirilmesini sağlamak için, bitkilerin küllemeye karşı genetik ve moleküler savunma mekanizmalarını anlamak oldukça önemlidir. Küllemeye karşı dayanıklı hatların ve dayanıklılığın karakterize edilmesi, 1960'larda 'Porto Riko 37' (Kooistra 1968), PI 197087 (Barnes 1961), Natsufushinari (PI 279465) (Fugieda ve Akiya 1962), PI 200815 ve PI 200818 (Kooistra 1968) hatları ile başlanmıştır. 2000'li yıllara gelindiğinde Sakata vd. (2006) hassas Santou ve dayanıklı PI 197088-1 hatlarını kullanarak oluşturdıkları popülasyonlar ile küllemeye karşı dayanıklılık için sıcaklığa bağlı 6 farklı QTL belirlemiştir. Benzer şekilde, S06 hattından

elde edilen F2:3 popülasyonundan, üçü linkage (bağlantı) grubunda olan beş külleme dayanıklılık QTL'i tanımlanmıştır (Liu vd. 2008). Aynı yıl, PI 250147'nin F2 popülasyonu kullanılarak iki QTL tanımlanmıştır (Ruiter vd. 2008). Zhang vd. 2011 yılında, saf K8 hattının F2 ve F2:3 popülasyonlarını kullanarak dört QTL (*pm5.1*, *pm5.2*, *pm5.3*, ve *pm6.1*) tanımlamıştır. He vd. (2013) WI 2757 F2:3 popülasyonlarını kullanarak, kromozom 5 üzerinde iki major QTL (*pm5.1* ve *pm5.2*) olmak üzere, 4 kromozomda 6 farklı QTL tanımlamıştır. Fukino vd. (2013) CS-PMR1 ve Santou hatlarını melezleyerek oluşturdukları, Rekombinant Saf Hatlar üzerinde külleme dayanıklılığı ile ilgili toplamda 9 farklı QTL tanımlamıştır. Bunlardan *pm3.1*, *pm5.1*, *pm5.2* ve *pm5.3* lokuslarının küllemeye karşı dayanıklılıkla ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca, Zhang vd. (2015), BK2 ve H136 hıyar hatlarını melezleyerek oluşturdukları F2 popülasyonlarında, kromozom 1 ve 6 üzerinde iki farklı külleme dayanıklılık lokusu karakterize etmişlerdir. 2018 yılında ise Wang vd. PI 197088 hattını kullanarak oluşturduğu RIL popülasyonlarında külleme dayanıklılığı ile ilgili dört farklı QTL bulunmuştur.

Her ne kadar bu çalışmalar hıyar bitkilerinde küllemeye karşı dayanıklılık hakkında yeni bilgiler verse de, sorunlar hala devam etmektedir. Örneğin, bu çalışmalarda tanımlanan moleküler markörler ıslahçılara kayda değer biçimde kolaylık sağlamamaktadır (He vd. 2013). Ayrıca küllemeye karşı dayanıklılığın altında yatan moleküler mekanizmalar hala bilinmemektedir (Nie vd. 2015a).

Küllemeye karşı dayanıklılık genlerinin çoğu, 5. kromozom üzerinde belirtilmiş olmasına rağmen diğer kromozomlar üzerinde belirtilen lokuslar da mevcuttur. Hıyarda küllemeye karşı dayanıklılık kalıtımına ilişkin birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, elde edilen sonuçlar tek başına yeterli değildir. Küllemeye karşı dayanıklılık sağlayan *pm-1*, *pm-2*, *pm-3* ve *pm-h* lokusları dahil olmak üzere, çeşitli genetik lokuslar kademeli olarak tanımlanmıştır (Ruiter vd. 2008). Hıyar bitkisinin 5. kromozomunda bulunan *pm5.2*, major QTL olarak belirtilmiştir ve bu bölgede dört farklı dayanıklılık geninin (*Csa009587*, *Csa009602*, *Csa009605* ve *BGICucGB009775*) hıyarda dayanıklılık sağladığı tahmin edilmiştir (Zhang vd. 2011).

Ancak dayanıklı hıyar çeşitlerinin çoğu, düşük sıcaklıklarda küllemeye duyarlı hale gelmektedir. Sıcaklığa bağlı QTL dayanıklılığı, ilk olarak 'Santou' ve PI197088-1'in RIL'lerinde tespit edilmiştir (Morishita vd. 2003; Sakata vd. 2006). Daha sonra CSPMR1 ve Santou RIL'lerinde, 4 farklı QTL'nin (*pm1.2*, *pm5.2*, *pm5.3* ve *pm6.1*) sıcaklığa bağlı olarak dayanıklılığı sağladığı bulunmuştur (Fukino vd. 2013). Farklı hıyar çeşitlerinde, külleme dayanıklılığının, genetik kontrolüne ilişkin artan sayıda gen tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmalarda tanımlanan QTL'ler tutarsızdır ve bu konunun belirsizliği devam etmektedir (Chen vd. 2020).

Hıyardaki külleme dayanıklılığı, genellikle birden fazla gen veya metabolik yolak (pathway) içeren karmaşık bir genetik özelliktir. Huang vd. (2009) tarafından, hıyar genomunun dizilenmesi ile, hıyarda verim kalitesi ve hastalıklara dayanıklılık gibi önemli tarımsal özelliklerle ilgili 20.000'den fazla gen keşfedilmiştir (Weng vd. 2010;

Cavagnaro vd. 2010; Guo vd. 2010; Zhang vd. 2011). Hıyarda, külleme hastalığına karşı dayanıklılık mekanizması üzerine yapılan araştırmalar, kademeli olarak moleküler düzeyde artmıştır (Liu vd. 2017). Meng vd. (2016), Zhang vd. (2016) ve Wang vd. (2018) gelecekte bu alanda yapılacak çalışmaların önemine vurgu yaparak;

"transkriptomik ve proteomik çalışmalar, küllemeye ve diğer patojenlere yanıt veren genlerin / proteinlerin hızlı bir şekilde tanımlanmasının yanı sıra, ilgilenilen savunma yollarının belirlenmesi için etkili stratejiler olarak önerilmiştir".

Patojenin enfeksiyonu için temel dayanıklılık mekanizmalarını bastırması gerektiği düşünüldüğünde, hem konukçu dayanıklılık mekanizmalarını hem de ilgili sinyal iletim yollarını biyoteknolojik olarak araştırmak, dayanıklılığın anlaşılması açısından oldukça önemlidir (Hückelhoven 2005). Bu nedenle, transkriptomik, proteomik ve kütle spektrometrisi dahil olmak üzere genomik ve postgenomik teknolojiler, bitkilerin patojenlere karşı verdikleri tepkiyi ve bu tepkinin sinyal yollarının ile fizyolojik yollarının mekanizmasını anlamak için gereklidir (Plett ve Martin 2018).

Evrimsel süreçte bitkiler, hipersensitif reaksiyon (HR) olarak adlandırılan patojen saldırısına karşı bir savunma mekanizması oluşturmuşlardır (Jones ve Dangl 2006; Rejeb vd. 2014). Dayanıklılık (*R*) genleri aracılı dayanıklılık, genellikle HR ile ilişkilidir ve programlanmış hücre ölümünü (PCD) de bu dayanıklılığa dahildir (Cui vd. 2015). Şimdiye kadar, klonlanan en yaygın *R* genleri, reseptör benzeri protein kinazlar veya nükleotid bağlayıcı ve lösin bakımından zengin tekrar reseptörleri (NB-LRR) gibi hücre reseptörlerini kodlamaktadır. Bu tür reseptörler genellikle patojenlere karşı güçlü ve hızlı bir yanıt üretmektedir (Boutrot ve Zipfel 2017; Kourelis ve van der Hoorn 2018). Yang vd. (2013) hıyarda 70 NB-LRR tipi proteinin, hastalıkla ilişkili olabileceğini öngörmüştür; bu genler hıyarın 7 kromozomuna dağılmıştır. Ancak, *R* genlerinin, hıyara transforme edilmesi, bu genlerin profili ve filogenetik analiz yoluyla doğrulanması ve işlevsel olarak karakterize edilmesi gerekmektedir (Chen vd. 2020).

Ayrıca Xu vd. (2019)'un yaptığı çalışmasının sonucuna göre:

"Hücrede aşırı ROS üretimi, programlanmış hücre ölümünü de tetikleyebilmektedir. Tioredoksinler (Trx), ROS akışını düzenleyen kilit aktörlerdir; Trx'in fonksiyonel kaybı, ROS seviyelerinin değişmesine neden olmaktadır. Yapılan çalışmada 5 Trx arasında, *Csa1G651650* ve *Csa6G343710*'un dayanıklı ve hassas hıyar hatlarında birikmiş olduğu görülmüştür. Dayanıklı genotip SSL508-28'de, *Csa2G346600* ve *Csa6G343710*'un yüksek miktarda ekspresyonu, külleme enfeksiyonu sırasında üretilen ROS'un detoksifikasyonuna yardımcı olabileceğini düşündürmüştür"

Çalışmada ileri sürülen diğer bir potansiyel mekanizma, *Pm5.1* lokusunun hastalık / savunma ile ilgili proteinleri tetiklemesidir. Bitki hücre duvarı polisakkaritlerden oluşur ve fungal patojenlere karşı ilk mekanik bariyeri temsil etmektedir. Başarılı bir enfeksiyon için, patojenin hücre duvarının aşması gerekmektedir (Liu vd. 2017). Poligalakturonazlar (PG), enfeksiyon sürecinin çok erken aşamalarında fitopatogenik funguslar tarafından salgılanan en önemli enzimlerdir. Fungal patojenler

sahip oldukları bu enzim sayesinde, poligalakturonun (hücre duvarı bileşeni) oligosakaritlere hidrolizi yoluyla bitki hücre duvarını bozmaktadırlar. Böylece fungus için besin sağlanmaktadır. PG enzim aktivitesine karşı koymak için bitkiler, PGs38'in aktivitesini inhibe ederek fungus enfeksiyonunu sınırlandırmak için hücre duvarına bağlanan poligalakturonaz inhibe edici proteinler (PGIP) kullanmaktadırlar (Kalunke vd. 2015).

Katalaz, ökaryotlarda bulunur ve hidrojen peroksiti (H_2O_2)'i suya ve oksijene dönüştürebilmektedir (Mittler 2002). Xu vd. (2019)'un çalışmasında;

"katalazın (*Csa4G658600*) hassas D8 hattında yüksek oranda indüklendiği bulunmuştur. Külleme ile enfekteli D8 hattındaki bitki yapraklarının, DAB ile boyanması sonucu H_2O_2 daha düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir. Bu işlem de moleküler sonuçları doğrulamıştır. "

Diğer bir çalışmada külleme inokulasyonundan 12 saat sonra küllemeye dayanıklı S1003 ve hassas yakın izogenik hattın (NIL; *Pm5.1*) karşılaştırmalı transkriptomik analizi, dayanıklılığın altında yatan mekanizmanın bitki hücre duvarı kalınlaşması ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Nie vd. 2015b). S1003'te bulunan bu külleme dayanıklılığı çekinik karakterdedir (Xu vd. 2016; Nie vd. 2015a). Xu vd. (2015), *pm5.1* lokusu aracılığı ile sağlanan dayanıklılığın hücre duvarı kalınlaşması ile ilgili olduğunu ve hücre duvarı modifikasyonlarında salisilik asit sinyal yolunun rol oynadığını belirtmiştir.

Bununla birlikte, hıyarda küllemeye karşı dayanıklılık, genetik olarak karmaşık bir özelliktir. Çok fazla gen ve sinyal iletim yollarını içermektedir. Ancak kalıtımı ve dayanıklılık mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu bilinen dayanıklılık genlerinin ötesinde, genetik haritalama ve RNA-Seq yöntemleri ile külleme dayanıklılığına ilişkin önemli etkiye sahip ek genler bulunabilir. Bu aday genler, küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının tam olarak anlaşılması için diğer araştırmalarda kullanılabilir. Dahası, ilgilenilen bu genlerin incelenmesi için, bir referans genomu olan herhangi bir başka tür ile beraber de genişletilebilir (Chen vd. 2020).

Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK), bitki büyümesinde, gelişmesinde ve stres faktörlerine karşı tepkilerde önemli rol oynar ve MAPK, MAPK kinaz (MAPKK / MEK) ve MAPK kinaz kinaz (MAPKKK / MEKK) olmak üzere üç kinazdan oluşmaktadır. MAPK genleri, *Arabidopsis*, pirinç ve domateste ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Ancak çevresel stres ve patojene karşı oldukça hassas olan Cucurbitaceae bitkilerinden, hıyarda (*Cucumis sativus* L.) tam olarak karakterize edilmemiştir. Bu kinazlar, stres faktörleri ile ilgili sinyalleri hücre ortamından fosforilasyon yoluyla transkripsiyonel ve metabolik tepki merkezlerine yönlendiren, entegre eden ve yükselten sıralı sinyal taşıyıcıları olarak çalışmaktadırlar (Tena vd. 2001).

Yüceson vd. (2020)'nin çalışmasında, farklı kabakgil çeşit ve hatlarına külleme inokule ederek, bitkileri Adam ve Somerville (1996) skalasına göre skorlamıştır. Bu skalaya göre; 0-1, hiç ya da çok sınırlı sporulasyon, 1-2, düşük sporulasyon, 2-3, orta

derece ya da gecikmiş sporulasyon, yaprak yüzeyinin %10-30 u külleme ile kaplı, 3-4, neredeyse tüm yaprak yüzeyi külleme ile kaplı, anlamına gelmektedir. Yüceson vd. (2020)'in çalışma sonucunda, inokulasyondan sonra 7, 14 ve 21 gün sonra, bu skalaya göre hıyar bitkilerinin ortalamaları alınmıştır. Bu ortalamaya göre Meltem; 0.66, VT18; 1.00 ve Çamlıca Yerel; 2.75 olarak skorlanmıştır.

Bitki *R* genleri ile kazandırılan dayanıklılığa alternatif olarak hassaslık (*S*) genleri tanımlanmıştır (De Almeida vd. 2005). Çoğu patojen konukçuda uyumlu bir etkileşim sağlamak için bazı bitki proteinlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Özellikle külleme gibi obligat biyotrof patojenler için bu durum oldukça önemlidir. Çünkü patojenin canlılığı, konukçusu ile aralarındaki etkileşime bağlıdır. Bitkide bulunan bu genlerin ifade edilmesi, patojen için gereklidir. Bu genler patojenin konukçuyu tanımasını, penetrasyonun kolaylaştırılmasını, bitki savunma sisteminin negatif yönde düzenlenmesi, patojenin metabolik ve yapısal ihtiyaçlarının karşılanmasını sağlayan proteinleri kodlamaktadır. Bu nedenle de *S* genleri olarak adlandırılırlar (Van Schie ve Takken 2014). Bitkilerdeli *S* geninin ifade edilmesinin engellenmesi yolu ile bitkilerde geniş spektrumlu, uzun süreli ve çekinik karakterde dayanıklılığın sağlanabileceği düşünülmektedir (Pavan vd. 2011; Eckardt 2002). Bu yolla kazandırılan dayanıklılığa en iyi örnek ise arpada 1940'larda *MLO* geni üzerinde gerçekleşen mutasyon aracılığı ile arpada küllemeye karşı kazandırılan dayanıklılıktır (Freisleben ve Lein 1942). Bu dayanıklılık, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*'nin bazı izolatları hariç kullanılmaktadır (Jorgensen 1992). Bu örnek de *S* genleri ile kazandırılan dayanıklılığın ne kadar uzun süreli ve geniş spektrumlu olabileceğini göstermektedir.

Arpa *MLO* geni klonlandıktan sonra, bu genin diğer bitki türlerindeki homologlarındaki mutasyonların da, farklı bitkilerde küllemelere de çekinik karakterde dayanıklılığı sağladığı bulunmuştur. Model *Arabidopsis thaliana*'da üç *MLO* homologundaki T-DNA aracılığı ile gerçekleştirilen mutasyonların, küllemeye karşı dayanıklılığı arttırdığı gösterilmiştir (Consonni vd. 2006). Diğer çalışmalarda, domates (Bai vd. 2008) bezelye (Humphry vd. 2011), hıyar (Berg vd. 2015) ve tütün (Fujimura vd. 2016) gibi bazı türlerde, arpa *MLO* dayanıklılığına benzer özelliklere sahip, çekinik kalıtıma sahip külleme dayanıklılığının, *MLO* üzerinde doğal olarak meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığı bulunmuştur. Diğer türlerde, örneğin; biber, buğday, elma ve asma, *MLO* homologlarının Virüs Kaynaklı Gen Susturma (VIGS) veya RNA interferans (RNAi) ile susturulması küllemeye karşı dayanıklılığı sağlamıştır (Zheng vd. 2013; Hükelhoven vd. 2003).

MLO genleri ile külleme arasındaki etkileşimin özel bir mekanizması olduğu öne sürülmektedir. Bununla birlikte, *MLO* proteinlerinin kesin etki mekanizmasına ilişkin bilgiler sınırlıdır. *MLO* proteinleri kalmodulin bağlayıcı proteinlerdir ve kalmodulin bağlanması arpanın küllemeye duyarlılığını arttırmaktadır (Kim vd. 2002a).

Kim vd. (2002b), Jabs vd. (1997) ve Xu ve Heath (1998) *MLO* fonksiyonu hakkında:

"Ca²⁺ iyonlarının akışının MLO fonksiyonu için önemli olduğunu ve bu nedenle, Ca²⁺ iyonunun bir aday sinyal olabileceği bildirilmektedir. Çünkü bitki hücreleri patojen saldırısına yanıt olarak geçici bir Ca²⁺ sinyali üretmektedir"

Hıyarda, V. grup içerisinde yer alan *MLO* genleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Berg vd. 2015 yılında yaptığı bir çalışmada *MLO8* genini, TE (Transposable Element Insertion) yolu ile ifade edilmesini engelleyerek küllemeye karşı hassaslığın azaldığını göstermiştir. Berg vd. 2017 yılında yaptığı diğer bir çalışmada *MLO1* ve *MLO11* genleriyle aşırı ifade edilme (overexpression) çalışmaları yaparak, *MLO1* ve *MLO8* genlerinin küllemeye hassaslığı daha fazla arttırdığını, *MLO11* geninin ise hassaslıkta diğer iki genden daha az rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Tarımsal ürünlerin genetik olarak üstün özellikler kazandırılması ve bitkilerdeki genlerin fonksiyonlarının karakterizasyonu için spesifik olarak nükleaz enzimleri ile genom üzerinde hedeflenen gen dizilimi sağlayan teknolojiler günümüzde ön plana çıkmaktadır. Bu spesifik nükleaz temelli teknolojilerin başında genomun düzenlenmesini (genome editing) sağlayan CRISPR gelmektedir. CRISPR sistemindeki rehber RNA (gRNA), protein 9 ile birlikte olduğu için Cas9 (CRISPR associated protein 9) denilmekte olup bitki türlerindeki istenen genetik materyalin hızlı değiştirilmesini sağladığı için geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Özellikle bu teknik, bitkilerdeki genlerin fonksiyonlarını kaybetmesi ve/veya genlerin fonksiyonlarının kazandırılması, bu genlerin tanımlanması, kodladıkları protein yapılarının ortaya konulması bakımından vazgeçilmez bir genetik araç olarak görülmekte ve transgen içermeyen bitkilerin elde edilebilmesini sağlamaktadır (Ma ve Yao-Guang 2016). Bitki genomunda, hedef bölgedeki çift sarmallı genetik yapı, Cas9 tarafından kesilmektedir. Bitki genomu homolog olmayan uçların birleşmesi ile tamir edilmektedir (Brooks vd. 2014).

Bu yapı içerisinde Cas9-subgenomic RNA (sgRNA) bitkideki çift sarmal olan DNA'nın birbirinden ayrılmasını ve kırılmasını sağlamaktadır (Sternberg vd. 2014). Birbirine benzer olmayan homologlar üzerinde DNA ilavesi (insertion/In) yada DNA silinmesi (deletion/Del) oluşturulabilmektedir. Bu oluşumlar protein okuma bölgesi (ORF) yapısında değişimlere neden olmakta ya da beklenmedik bir durma kodonu (stop codon) oluşumuna neden olmaktadır. 2017 yılında ise domatestede bulunan ve hassaslık üzerine en etkili olan *MLO1* geni CRISPR/Cas9 ile mutasyona uğratılmış ve transformasyondan sonra sadece 11 ayda küllemeye dayanıklı *Tomelo* çeşidi geliştirilmiştir (Nekrasov vd. 2017).

3. MATERYAL METOT

3.1. İnokulum Kaynağı ve Moleküler Tanısı

Külleme hastalık etmenleri, Aksu (Antalya) hıyar üretim alanlarından temin edilmiştir. Enfekteli yapraklar, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Mikoloji laboratuvarına getirilmiştir. Külleme etmeni, hassas Çamlıca hıyar bitkisine inokule edilmiştir. Belirti gösteren Çamlıca yapraklarından fırça ile ayrıştırılan hastalık etmenleri santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kalan örnekler etmenin tanısından sonra inokulasyon için kullanılmıştır. CTAB DNA izolasyonu için, Çizelge 3.1’de verilen yöntem kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. CTAB yöntemi ile külleme hastalık etmeninden DNA izolasyonu aşamaları

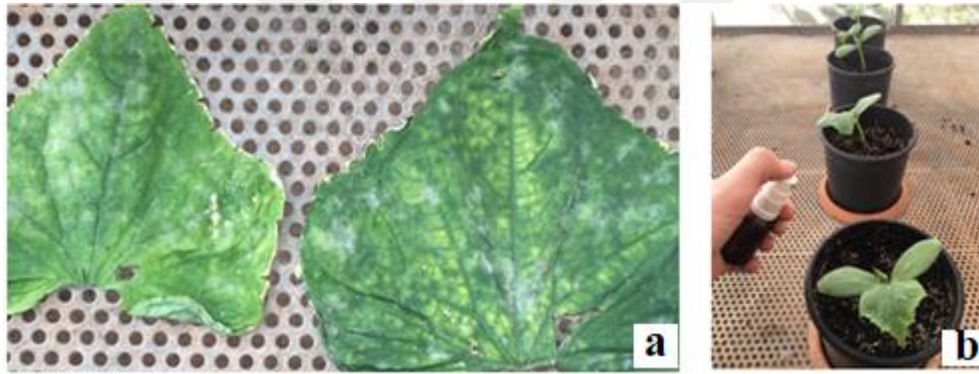
Sıra	Yapılan İşlem
1	Yüzeyden Toplanan sporlar ve miseller 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
2	%3'lük CTAB buffer solüsyonundan 100 µl tüpün içerisine eklendi.
3	Sporlar ve misellerden oluşan materyal, tüpün içerisinde steril ezme çubuğu ile ezildi.
4	Üzerine 500 µl %3'lük CTAB buffer solüsyonu eklenip vorteks yapıldı.
5	65 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
6	600 µl Chloroform eklenir ve 12 dakika 13.000 rpm de santrifüj yapıldı.
7	Üst kısım alınarak yeni 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
8	1 ml isopropanol tüplere eklenerek vorteks yapılır.
9	-20 °C’de bir gece bekletildi
10	15 dakika 13.000 rpm de santrifüj yapıldı.
11	Üst kısım dikkatlice boşaltıldı.
12	1 ml soğuk %70’lik EtOH tüplere eklendi.
13	2 dakika 13.000 rpm de santrifüj yapıldı.
14	Tüm EtOH boşaltıldı.
15	DNA’nın EtOH dan iyice uzaklaşması için 30 dakika kurumaya bırakıldı.
16	DNA’nın 100 µl su eklenerek DNA çözüldü -20 °C’de muhafaza edildi

PCR ile külleme hastalık etmeninin tanısı için White vd. (1990)'ın çalışmasında belirtilen iki farklı primer çifti kullanılmıştır. Bu primer çiftleri, PCR sonrası agaroz jelde *P. xanthii*'de ~550 bp bant veren ITS1-4 ve ~300 bp bant veren ITS2-5 primer çiftleridir.

PCR işlemi için; 25 µl DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo), 10 mM Forward ve Reverse Primer, 100 µg DNA, 50 µl'ye kadar Nuclease-free saf su ile tamamlanmıştır. 3 dakika 95 °C'de ön denatürasyon, 30 saniye 95 °C'de denatürasyon, 45 saniye 58°C'de primer bağlanma ve 1 dakika 72 °C'de uzama ve 5 dakika son uzama aşamaları olacak şekilde PCR işlemi tamamlanmıştır. Elde edilen ürün, %1.5 agaroz jelde 60 V'da yürütüldükten sonra görüntülenmiştir.

3.2. Bitki Materyali ve Külleme inokulasyonu

Çalışmada, küllemeye karşı reaksiyonları daha önceden belirlenmiş ve literatür özetinde (Yüceson vd. 2020) verilmiş olan Çamlıca, VT18 ve Meltem hıyar bitkileri kullanılmıştır. Yapraklar üzerindeki külleme konidiosporları, Zhang vd. (2021)'nin çalışmasında belirttiği konsantrasyonda (10^6 spor/ml⁻¹) olacak şekilde saf su ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon hıyar yapraklarına püskürtülerek inoküle edilmiştir.

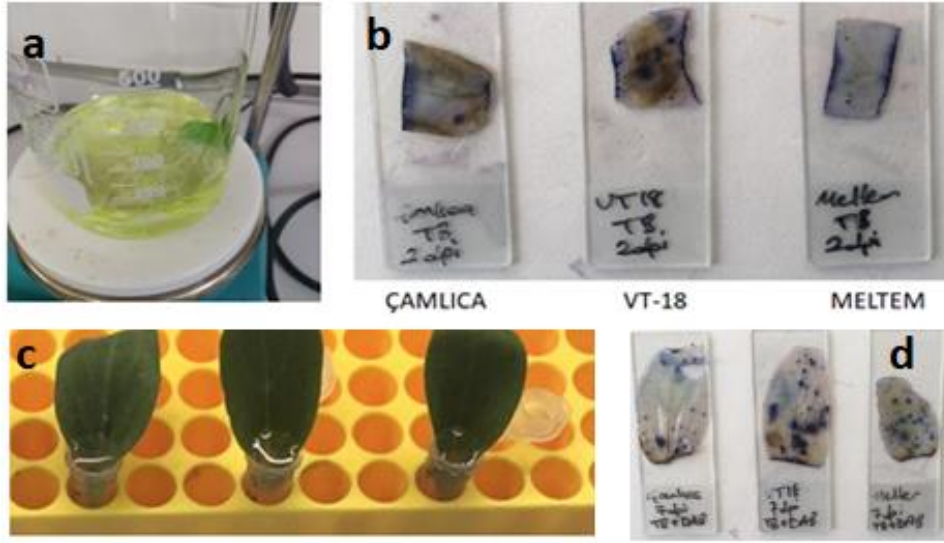


Şekil 3.2. a) Külleme ile enfekteli hıyar yaprakları; **b)** Külleme inokulasyonu

3.3. Mikroskopik Gözlem (Trypan Blue ve DAB Boyama)

Külleme sporlarının yapraklarda kolonizasyonunun ve inokulasyon sonrası oluşan süperoksitlerin gözlemlenmesi için Trypan Blue ve DAB boyama yapılmıştır. Trypan blue boyası ile konidiospor yapıları bitki dokusunda mavi bir renk olarak ışık mikroskopunda görünür hale getirilmiştir. Bu sayede bitki dokusunda çimlenmiş veya çimlenmemiş külleme spor yapıları mikroskop altında gözlemlenmiştir. DAB ve Typan Blue boyama Thordal-Christensen vd. (1997)'nin çalışmasında belirttiği gibi yapılmıştır.

Trypan Blue boyama işlemi için inokulasyondan 2 gün sonra enfekteli yapraklar %96'lık etanol içerisinde kaynatılmıştır. Klorofil temizlendikten sonra üzerine ~1 ml Trypan Blue damlatılmıştır ve ışık mikroskobu altında yapraklar görüntülenmiştir.



Şekil 3.3. Mikroskopik gözlemler için hazırlanan örnekler **a)** %96'lık etanol içerisinde kaynatılan enfekteli yapraklar; **b)** Çamlıca, VT18 ve Meltem yapraklarının Trypan Blue ile boyanması; **c)** DAB solüsyonunda bekletilen örnekler; **d)** DAB+Trypan ile boyanmış örnekler

Diamino Benzidin (DAB) ise dayanıklı bitki hücrelerinde oluşan kararsız bileşikler olan süperoksitler ile reaksiyona girerek kararlı bileşikler oluştururlar. Bu nedenle süperoksit oluşumu var ise mikroskop altında bu alanlar koyu kırmızı-kahverengi olarak görülür. DAB boyama için, inokulasyondan 7 gün sonra, enfekteli yapraklar, içerisinde 1 ml DAB solüsyonu bulunan santrifüj tüpleri içerisinde 1 gece bekletilmiştir. Daha sonrasında bu yapraklar, %96'lık etanolde kaynatılarak üzerine ~1 ml Trypan Blue damlatılmıştır.

3.4. Hedef Genlerin Seçimi

Dayanıklılığın altında yatan mekanizmalarda rol oynayan potansiyel genler ile beraber KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) üzerinden hıyarda bitki-patojen interaksyonu ve MAPK sinyal yollarında rol oynayan genler seçilmiştir.

Çizelge 3.4. Hedef genler ve bu genlere spesifik olarak dizayn edilmiş primerlerin isimleri, erişim numaraları ve ilgili oldukları mekanizmalar (LOC: NCBI erişim numarası, Cusca:Phytozome)

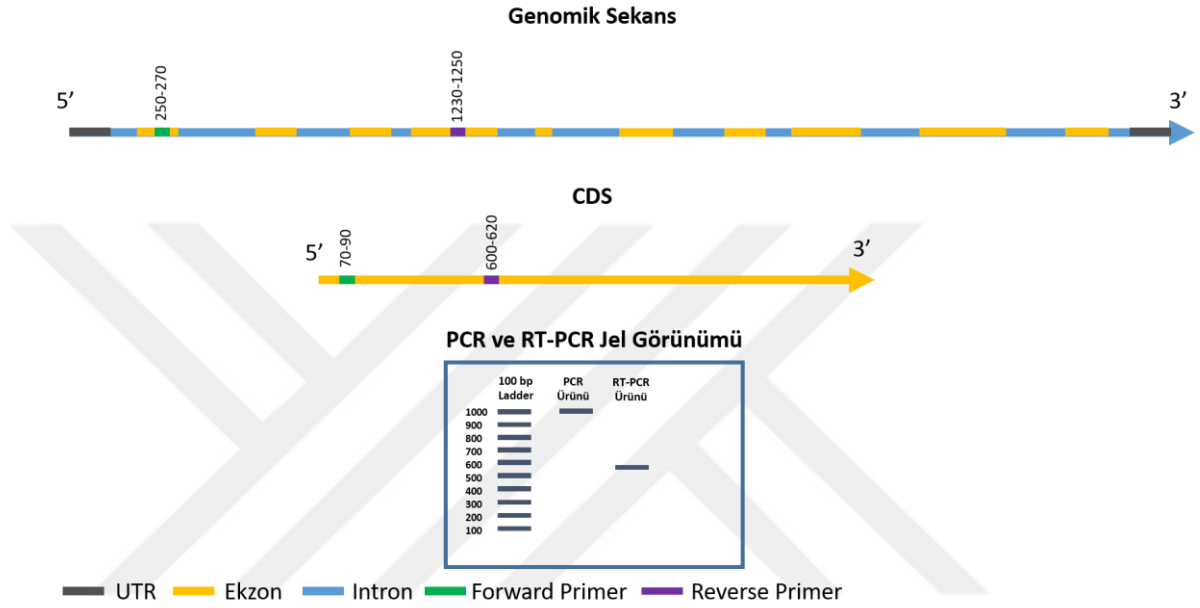
Gen	Primer	Erişim Numarası	İlişkili Mekanizma
Thioredoxin F1	ThioF1	Cusca.356300.1	Hücre Redoks Homeostazı
Thioredoxin	Thio	Cusca.077150.1	
Catalase peroxidase	Catalase	Cusca.272120.1	
Polygalacturonase Inhibitor	LRR-PGIP1	Cusca.038100.1	DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION
DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION	DRT-100	Cusca.065390.1	

Çizelge 3.4'ün devamı

pathogenesis-related protein 1	PR1.5	Cucsa.218940.1	
pathogen-related protein, transcript variant X4	PRXVar	LOC101202865	
pathogen-related protein	Ch4PR	LOC101211488	
basic form of pathogenesis-related protein 1	BasicFormPR1	LOC105436021	Patojene Karşı Savunma İlişkili Proteinler
glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8	gluendo1-3	LOC101206143	
cinnamyl alcohol	CADLP	Cucsa.219440.1	
dehydrogenase-like protein			
callose synthase	Callose	Cucsa.249900.1	
pathogen-associated molecular patterns-induced protein A70	PampA70	LOC101211488	
serine/threonine-protein kinase D6PKL1	D6PKL1	LOC101210027	
Serine/threonine-protein kinase STE7	STE7	Cucsa.339990.1	
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2	LRRSTPKRPK2	LOC101202920	Bitki-Patojen İnteraksiyonları
proline-rich receptor-like protein kinase PERK10	PERK10	LOC101203399	
serine/threonine-protein kinase STN7	STN7	LOC101207504	
leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710	At1g35710	LOC101208963	
serine/threonine receptor-like kinase NFP	STRLK-NFP	LOC101203481	
ethylene-responsive transcription factor	ERF024	LOC101206867	
calmodulin binding protein PICBP	CBP-PICBP	LOC101218934	
WRKY transcription factor 10	WRKY10	Cucsa.356720.1	
WRKY transcription factor 2	WRKY2	Cucsa.041700.1	Savunma Sinyal Yolu Regülasyonu
WRKY transcription factor 33	WRKY33	Cucsa.000200.1	
WRKY transcription factor 22-like	WRKY22	Cucsa.106960.1	
WRKY transcription factor	WRKY1	Cucsa.100440.1	
glycerol kinase	glycerol kinase	Cucsa.105620.1	
MAP KINASE KINASE KINASE SSK2	MAPKKKSSK	Cucsa.091500.1	
mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAPKK1	Cucsa.155460.1	
mitogen-activated protein kinase kinase 1 MEKK1P	MAPKK1P	Cucsa.034370.1	
mitogen-activated protein kinase 5	MAPK5	Cucsa.303420.1	MAPK Sinyal Yolu
Mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Cucsa.231940.1	
mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Cucsa.106400.1	
AGC Kinase (CAMP Dependent Protein Kinase C)	AGC-CAMPPKC	Cucsa.077920.1	

3.5. Hedef Genlere Özgü Primerlerin Dizaynı

Primer dizaynı için hedef genlerin genomik sekans ve CDS (Coding Sequence) verileri Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) ve NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) üzerinden indirilmiştir. NCBI Primer Blast üzerinden primer dizayn edilmiştir (Şekil 3.5). Primerlerin, gDNA ve cDNA kullanılarak yapılacak PCR ve RT-PCR işlemlerinde, hedef bölgeye bağlanacak şekilde dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerler Çizelge 3.5'te üzerinde verilmiştir.



Şekil 3.5 İlgili genlere özgü primerlerin dizayn edilmesinin temsili gösterimi

Çizelge 3.5. Hedef genlere özgü dizayn edilen primerlerin dizilimleri ve ürün boyutları

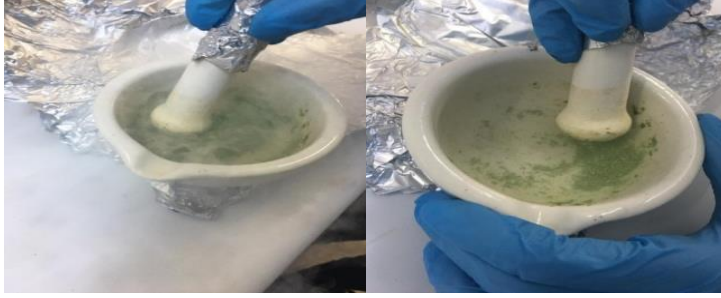
Primer	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	PCR Ürün Boyutu (bp)	RT-PCR Ürün Boyutu (bp)
ThioF1	TCGAAGAGTGGCTGCTTCAG	GGGTGTACATGTCGAGCACA	211	211
Thio	AAATCTCCCACGCCACTTT	AGGCACAGCCCCAATAACAC	452	345
Catalase	GCCCTGAAACGCTCAGAGAT	GCAAGATATCCTCGGGCCAA	847	303
LRR-PGIP1	CAATCCCACCCTTTGTGGGT	GGTTGGCAAGAGAGCTAGGG	243	243
DRT-100	CGGTTTTGAACGTTGCGGAT	TGCTCCGTTTGGTATCGGAC	554	554
PR1.5	CACAAAAGAACACATACCACAT	CAGCTGCTCCACTAAACCCA	656	248
PRX4Var	CAAAAACCATGCCCCACTG	AGACAGGGCAGCTTGACATC	260	185
Ch4PR	ACACCCCTAAATGGGCTCCT	TTGAGAGTGGCCATGCCATA	1032	699
BasicFormPR1	AACACATGCCCAAACTCCCC	AGGTTGCCACACCACTTGT	320	320

Çizelge 3.5'in devamı

gluendo1-3	CGGATGCATGGACTGTGAGT	GTGTGTCGTAATTGGCGTCG	675	564
CADLP	CACATGGGGGTGAAATTGGC	GGATGACCATGGGAGAGACG	289	289
Callose	ATAGAGCTACCGGTCGTGGT	TGGTTGCAGGCACACCAATA	318	318
PampA70	TTCTCAACCTCGTGATCGGC	CTCGTTTCGACTCGTCTCC	672	672
D6PKL1	TTGCAGCATGGGGTCCTTAG	CAGGTAGAAACCTGGGGCTG	1528	631
LRRSTPKRPK2	AACCTTCCTTCCCAGCTTCG	GGAAGTCCAGCAGGGGAATC	950	950
PERK10	TCCGAGACTGGCTCTTCTGA	CAAACGAGGGCTCATGGAGT	1444	477
STN7	AATCCCTGGTGCCATTCTGG	GCTATTAGCACAAGCACGCC	1268	310
At1g35710	GGGAGGAGTTCCATCACAGC	TTCACACCTTGCCGAAATGC	823	228
STRLK-NFP	GGGCAGCTTCTGTTTATTCC	AAACCAACACCCAAAGCCAC	509	509
ERF024	ACTGGTTTCCACCCTTTCCA	CTGGCACAGGTAGCGAAGAT	333	333
CBP-PICBP	GGGGAGAAGAGAGTTGCGAG	CAGCACGATCTCCACTCGTT	928	928
WRKY10	GACATTGACACGCAGCATCC	GGTTTCCACCACCTTCACCA	331	331
WRKY2	GGTCACCATCCTCAAGTGGG	TCCTCGTCGGTTTGGTGAAG	408	408
WRKY33	ACATTCCCAAATTGCCCTGT	GGCGTGGTTACAGAGTGAGA	212	212
WRKY22	TAGCCTCTCCGATCCGAAG	CTTCCCATCTGTACACCT	218	218
WRKY1	CACAAATGCACAGGGGCTTC	CACCATGCAAGTAGGATGCG	297	297
glycerol kinase	CGAGAAATTGGCATCGCAGG	CCAAGGGCAGTTGTCTCGAT	451	363
MAPKKKSSK	TTGCACCTGGAAGCTGTTCT	AGTGCCAAAAGCATCAAGCG	443	323
MAPKK1	GAGTCTCACCGCAAGCAGAT	TTGCCCGGGTGGAGAATAAG	755	498
MAPKK1P	CGGATGGCTACTGCTACTGG	CCCTATGAGCGATGCGTTCT	261	261
MAPK5	GTCCTGCACCGTGATCTCAA	TGCCAGGGAAGAGAGGTTCT	247	247
MAPK1	CTGGTATCGAGCCCCAGAAC	CGCTCGGATAAAGACGGGAA	272	272
STE7	ATTGGCAGATGTCCTGCGTT	AAGCCCAAGGCTCCAAATGT	536	510
MAPK14	GAGAATCGTACGGACGCCAT	GCTTCAAGTCCCGGTGAAGA	706	280
AGC-CAMPPKC	AATCCGATCAGCAGGCTACG	GGCGTTTTCGTCAGAATCCG	256	256

3.6. Bitkilerden DNA İzolasyonu

Çamlıca, VT18 ve Meltem hıyar tohumları viyollere ekilmiştir. Tohumlar çimlendikten sonra 100 mg doku örneği alınarak sıvı azot içerisinde ezilmiştir. Ezilen dokudan DNA izole etmek için GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo) kullanılmıştır. İzolasyon kit protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



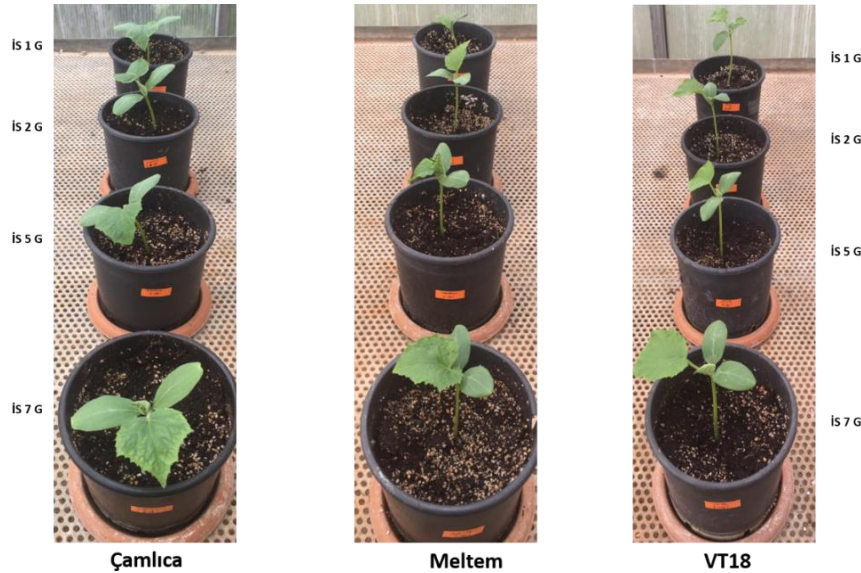
Şekil 3.6. Alınan doku örneklerinin sıvı azot ile havan içerisinde ezilmesi

3.7. Hıyar Çeşitleri Arasındaki Farklılıkların PCR ile Belirlenmesi

Çizelge 3.4'te gösterilen primerler ve Meltem, VT18 ve Çamlıca Yerel çeşitleri kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. PCR işlemi için DreamTaq Green MasterMix (2x) kullanılmıştır. PCR işlemi, 95 °C'de 45 saniye denatürasyon, 58 °C de 50 saniye primer bağlanma sıcaklığı ve 72 °C'de 50 saniye uzama olmak üzere 36 döngüde yapılmıştır. Daha sonra agaroz jel hazırlanmıştır ve PCR ürünü elektroforezde yürütülmüştür

3.8. Bitkilerden RNA İzolasyonu

Laboratuvarında bulunan Çamlıca Yerel, VT18 hattı ve Meltem çeşidi hıyar tohumları viyollere ekilmiştir. Kotiledon yaprakları çıktıktan sonra hıyar fideleri, içerisinde steril torf (0.8 V) ve perlit (0.2 V) bulunan saksılar içerisine dikilmiştir. Her bir hıyar çeşidi için 1 bitki kontrol olmak üzere 5 bitki dikilmiştir (Şekil 3.8).



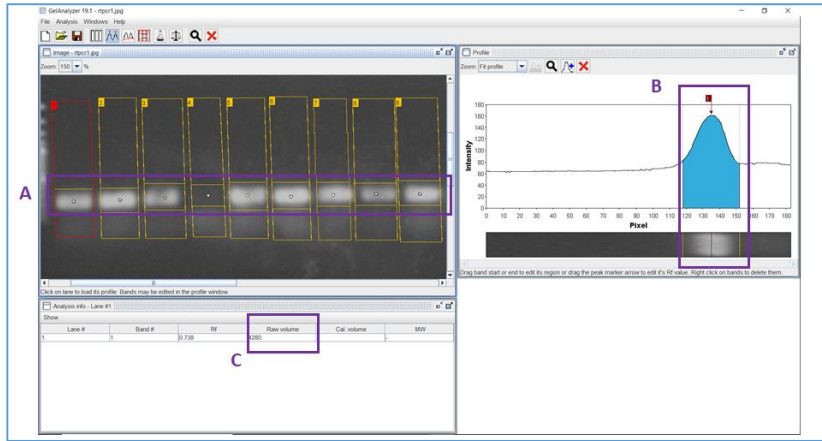
Şekil 3.8. Çamlıca, VT18 ve Meltem hıyar bitkilerinin saksılar içerisine dikilmesi, RNA izolasyonu ve inokulasyon sonrası DAB ve Trypan Blue boyama için kullanılan bitkilerin dikimi, İS: inokulasyondan sonra, G: gün

İnokule edilmeyen hıyar bitkilerinden ve inokulasyondan 1 ve 2 gün sonra her bitkinin inokule edilen yaprağından RNA izolasyonu için örnekler alınmıştır. Her izolasyon için ~100 mg yaprak örneği alınarak doğrudan sıvı azot içerisinde ezilmiştir. İyice ezilen örnekler 15 ml'lik falcon tüpler içerisine aktarılmıştır. RNA izolasyonu için, GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo) kullanılmıştır. İzolasyon kit protokolüne göre yapılmıştır.

İzolasyon sonrasında, elde edilen RNA örneklerini kontrol etmek amacı ile Verso 1-Step RT-PCR ReddyMix Kit (Thermo Scientific) ve Miao vd. (2019)'un çalışmasında referans olarak tanımlanan CACS (*Clathrin adaptor complex subunit*) genine özgü primerler kullanılarak RT-PCR işlemi yapılmıştır. Her bir reaksiyon için; 0.25 µl Enzyme Mix, 7.5 µl PCR Reddy Mix, 0.75 µl RT-Enhancer, 1 µl Forward ve Reverse CACS primeri (10 µM) ve 2 µl RNA örneği eklenerek hacim 15 µl'ye kadar nuclease-free saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon PCR cihazına (BioRad) yerleştirilerek; 50 °C'de 15 dakika cDNA sentezi, 95 °C 2 dakika RT inaktivasyonu ve 95 °C 45 saniye denatürasyon, 58 °C 50 saniye bağlanma, 72 °C 50 saniye uzama aşaması olmak üzere 36 döngüde işlem tamamlanmıştır. Elde edilen ürün %1.5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülenmiştir.

3.9. Farklı Çeşitler Arasındaki Transkriptomik Farklılıkların RT-PCR ile Belirlenmesi

CACS genine özgü primerler ile doğrulanan RNA'lar kullanılarak aynı işlem farklı genlere özgü primerler ve 20 ng RNA kullanılarak tekrar edilmiştir. Çalışmada kullanılan çeşitlerin inokulasyon öncesi ve inokulasyon sonrası 1 ve 2 gün sonrasında izole edilen RNA'lar kullanılmıştır. Araştırılan genlerin inokulasyon öncesi ve sonrasında ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. RT-PCR sonrası elde edilen ürün, agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntüler GelAnalyzer 19.1 ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. Elde edilen RT-PCR gel sonuçlarının GelAnalyzer 19.2 ile analiz edilmesi. **a)** Jel üzerinde bantların olduğu bölgenin seçilmesi; **b)** Raw Volume için bant intensity pik noktalarının seçilmesi; **c)** Bantlara ait Raw Volume değeri

Gen ifadesinin incelenmesi için Gel Analyzer üzerinden her bir ürünün jel görüntüsündeki Intensity değerine göre Raw Volume elde edilmiştir.

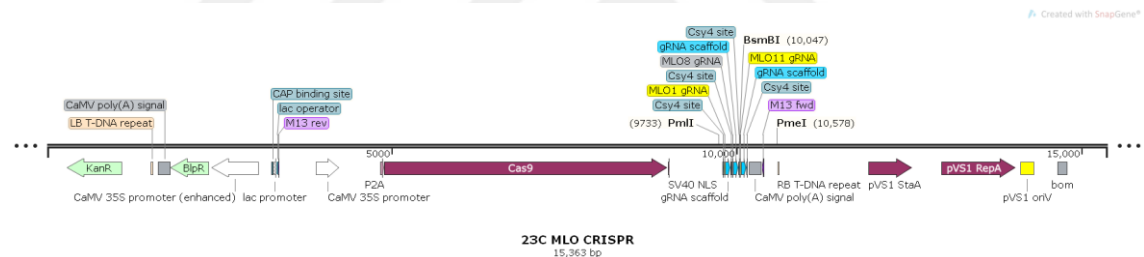
$$Kalibre\ Değer = \frac{a}{b}$$

Her değ er (a), CACS primeri ve aynı gruptaki cDNA kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucu (b) elde edilen değere bölünmüştür. Böylece her bir genin RT-PCR sonucu için Kalibre Değ er hesaplanmıştır. Daha sonrasında CACS geni için kalibre edilmiş değ er 1 kabul edilerek çizgi grafikleri çizilmiştir.

3.10. *MLO*-mutant Hıyarlarının Elde Edilmesi

3.10.1. gRNA dizaynı ve plazmit yapısı

Hıyarda, külemeye karşı duyarlılıkla ilişkili olduğu bildirilen *MLO1*, *MLO8* ve *MLO11* genlerinin, Cas9 tarafından spesifik olarak bulunması amacı ile her gene özgü gRNA'lar dizayn edilmiştir. gRNA'lar, <http://crispor.tefor.net> üzerinden dizayn edilmiştir. Dizayn edilen her bir gRNA sekansı, hedef dışı etkisini önlemek amacı ile Phytozome üzerinden BLAST edilmiştir. Plazmitin lineer yapısı aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 3.10.1. *MLO*-mutant bitkiler elde edilmek için kullanılan plazmit yapısı, *KanR*: Kanamycin Resistance, *BlpR*: Bialaphos phosphinotricin Resistance, plazmit üzerinde yalnızca kesim işlemi yapılan restriksiyon enzim bölgeleri verilmiştir

3.10.2. Plazmitin çoğaltılması, izolasyonu ve kontrolü

Plazmitin çoğaltılması amacı ile *Escherichia coli* DH5 α kullanılmıştır. Saf plazmit, transformasyona hazır (kompotent) *E. coli* hücrelerine Heat-shock yöntemi (Froger ve Hall 2007) ile aktarılmıştır. Kompetent *E. coli* hücreleri buz üzerinde çözölmeye bırakılmıştır. Santrifüj tüplerine 100 μ l hücre kültürü aktarılmıştır. Daha sonrasında 50 ng plazmit üzerine eklenmiştir. Santrifüj tüpü 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 45-50 saniye boyunca 42 $^{\circ}$ C'ye ayarlı su banyosu içerisinde bekletilmiştir. Hemen sonrasında tekrar buz içerisine koyulup 2 dakika bekletilmiştir. Hücrelerin üzerine soğuk LB Broth eklenip 37 $^{\circ}$ C'de 1 saat 225 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonrasında antibiyotikli LBA içeren, Petri kaplarına hücreler yayılarak ekilmiştir. Petriler 37 $^{\circ}$ C'de gelişmeye bırakılmış 16-24 saat sonra transformant koloniler görölmeye başlamıştır. Plazmit izolasyonu için seçilen kolonileri kontrol etmek

için aynı zamanda PCR işlemi yapılmıştır. Seçilen koloniler, steril öze ile alınarak, 8.5 µL Dreamtaq Master Mix 2x, 8.5 µL nuclease free saf su, 1 µL AgroInsCont (Forward 5' TGG AACAGAGCAGCGTACTT 3'-Reverse 5' ATGTCGGCGTCTCTTCCAAG 3'-136bp) kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır. PCR; 95 °C denatürasyon 1 dakika, 58 °C'de primer bağlanma sıcaklığı 45 saniye ve 72 °C'de uzama sıcaklığı 45 saniye olmak üzere 35 döngü yapılmıştır. Daha sonrasında ürün %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür ve ürün boyutu kontrol edilmiştir.

Plazmit izolasyonu için GeneJet Plazmit Miniprep Kit (Thermo) kullanılmıştır. Petri kaplarında gelişen tek kolonilerden alınan *E. coli* hücreleri, içerisinde 5 ml LBB bulunan tüplere aktarılmıştır. Falcon tüpleri 12-16 saat boyunca 37 °C'de 200-250 rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst kısım boşaltılmıştır. Altta kalan kısmı sadece transformant bakterileri içermektedir. İzole edilen plazmit DNA'sı *PmeI*, *Pm1I* ve *BsmBI* (*Esp3I*) enzimleri ile (37 °C'de 2 saat) kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesim işlemi sonrası reaksiyon içerisine 3 µL Loading Dye eklenerek ve kesim işlemi yapılmamış plazmit ile beraber %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elde edilen ürünler UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.10.3. Plazmitin *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılması ve kontrolü

Elektrokompotent *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 bakterileri -80°C'den çıkarılmıştır. 1000 µL LB içerisinde bulunan *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 içerisine, 75 ng plazmit eklenmiştir. Pipet ile karıştırıldıktan sonra Gene Pulser Cuvette 2 ml (Biorad) içerisine aktarılmıştır. Elektroporasyon işlemi 2500 Volt, 25 µF ve 400 Ω şartlarında gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında elektroporasyon küveti içerisinde bulunan LBB ortamından 50-100 µL alınarak Rifamisin ve Kanamisin içeren LBA besi ortamlarına aktarılarak, baget ile yayılmıştır. 2 gün 28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Elektroporasyon işlemi sonrasında *A. tumefaciens* 50 ng/ml Kanamisin+Rifamisin içeren LBA ortamına ekilmiştir. LBA ortamında bakterilerin çoğalmaları gözlemlenmiş olup içerisinde başarılı bir şekilde plazmiti içeren *A. tumefaciens* bakterilerinin besi ortamında geliştiği görülmüştür. *A. tumefaciens*'in gRNA yapılarını içeren plazmiti içerip içermediğini kontrol etmek amacı ile koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR işlemi için 1 µL tek koloni, 8.5 µL Dreamtaq MasterMix 2x, 8.5 µL nuclease free saf su, 1 µL Forward ve Reverse Primer kullanılmıştır. 95 °C denatürasyon 1 dakika, 58 °C'de primer bağlanma sıcaklığı 45 saniye ve 72 °C'de uzama sıcaklığı 45 saniyede 35 döngü olmak üzere PCR işlemi yapılmıştır. Daha sonrasında elde edilen ürün %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

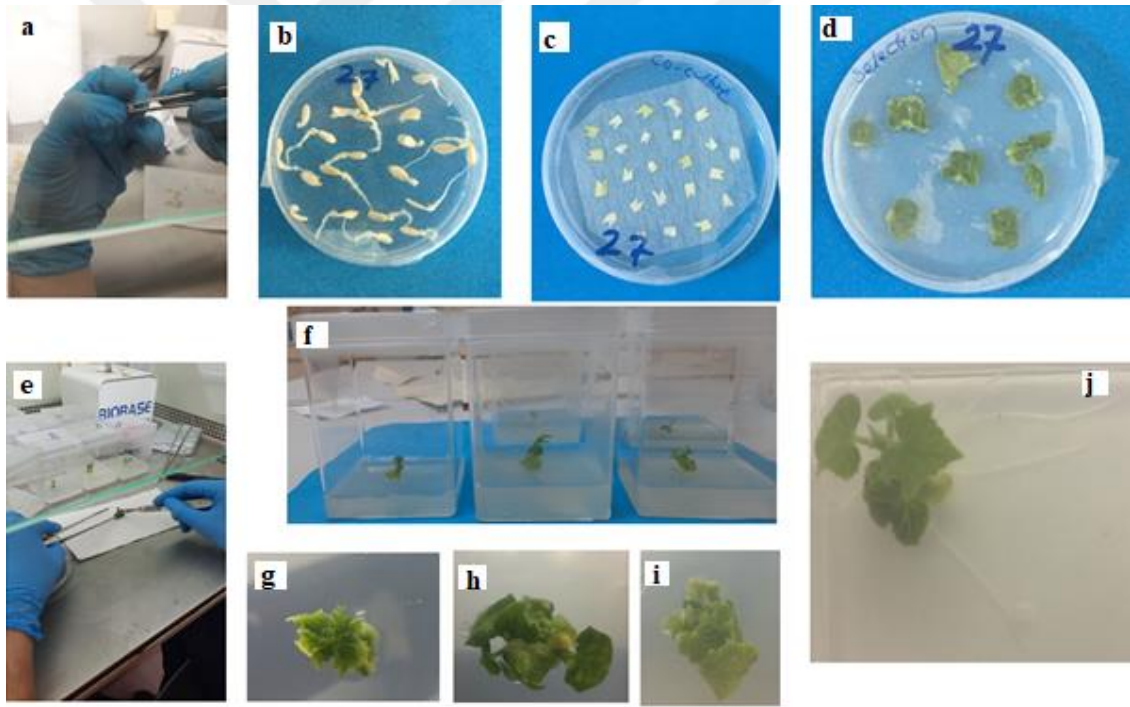
3.10.4. Transformasyon, bitki rejenerasyonu ve T-DNA kontrolü

Transformasyon ve rejenerasyon işlemlerinde Zhang vd. (2017) çalışmasında belirtilen protokol kullanılmıştır. Küllemeye karşı hassas ve ticari saf hat olmasından dolayı ADR27 hattı transformasyon için bitki materyali olarak kullanılmıştır. İlk olarak

hassas ADR27 tohumları, %75'lik alkol ve sonrasında %3'lük sodyum hipoklorit kullanılarak sterilize edilmiştir. Sonrasında steril kabin içerisinde tohumların kabukları soyulmuştur. Tohumlar %8 sakaroz içeren MS (Murashige Skoog) Agar besi ortamına ekilmiştir. 2 gün 28 °C'de karanlıkta bekletilmiştir.

Transformasyona hazır *Agrobacterium*, Kanamisin ve Rifamisin içeren LBA (Luria-Bertani Agar) besiyerine ekildikten sonra 2 gün 28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, besiyerinden tek koloni seçilerek sıvı LB ortamı içerisinde aktarılmıştır. Bakteri kültürü, 28 °C'de 200 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ değeri 0.6-0.8 arasına geldiğinde kültür alınarak 4000g'de santrifüj yapıldıktan sonra bakteri sıvı MS ortamı içerisinde süspanse edilmiştir.

Çimlenen hıyar kotiledonlarından eksplantlar alınmıştır ve sonrasında, *Agrobacterium* süspansiyonu içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Steril filtre kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra, eksplantlar ikili kültürde (MS, 1.5 mg/ml BAP, 1 mg/ml ABA, 100 µM acetosyringone, %0.8 agar, %3 sakaroz) besi ortamına aktarılmıştır. Eksplantlar 2 gün 28 °C'de karanlıkta bekletilmiştir.



Şekil 3.10.4. MLO-mutant bitkilerin elde edilme aşamaları. **a)** Tohum kabuklarının soyulması; **b)** Tohumların çimlendirilmesi; **c)** Eksplantların transformasyon sonrası ikili kültür ortamına yerleştirilmesi; **d)** Transformasyon sonrası gelişen eksplantlar; **e)** Eksplantlardan sürgünlerin alınması; **f)** Bitki doku kültürü kaplarında gelişen sürgünler; **g, h, i)** Gelişime devam eden sürgünler; **j)** Köklenen bitkiler

2 günün sonunda ikili kültür ortamında canlılığını koruyan eksplantlar, seleksiyon ortamına (MS, 1.5 mg/ml BAP, 1 mg/ml ABA, 100 µM acetosyringone, %0.8 agar, %3 sakaroz, 100 mg/ml Timentin, 1 mg/ml glufosinate-ammonium) aktarılmıştır. 25 °C ve

16 saat ışıktanma süresinde, 4 hafta boyunca eksplantlar bu besi yeri üzerinde gözlemlenmiştir. Her 1.5 haftada bir besi ortamı yenilenmiştir.

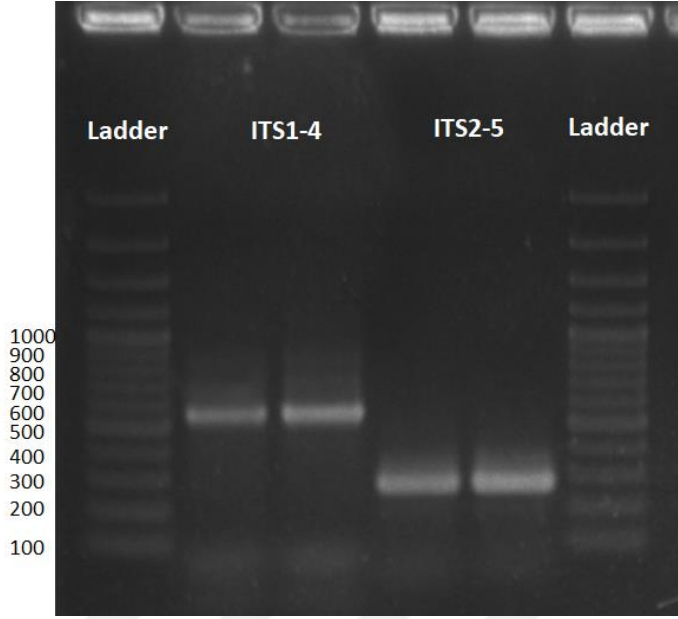
Sürgün gelişimi gözlemlenen petrilere seçilen eksplantlar, steril filtre kağıdı üzerine alınmıştır. Sürgünler, eksplantlardan bistüri ile ayrılarak içerisinde köklendirme ortamı (MS, %3 sakaroz, %0.8 agar) bulunan bitki doku kültürü kabı içerisine aktarılmıştır.

Köklendirme ortamında, kökleri iyi gelişen bitkiler seçilmiştir. Bu bitkiler içerisinde 1 V torf ve 1 V perlit içeren 180 ml hacimdeki potlar içerisine aktarılmıştır. Nemin uzaklaşmaması amacı ile potların üzerleri, ışığı geçiren saydam örtü ile kaplanmıştır. Bitkiler 4 günde bir sulanmıştır. Her iki günde bir, saydam örtü üzerine 10 mm çapında delikler açılmıştır. İki hafta sonunda örtü, kademeli olarak çıkarılmıştır. Bitkilerden, GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo) kullanılarak DNA izole edilmiştir. Bu işlem kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. T-DNA'ya özgü Cas9F (5'-GGAAACACCGATAGGCACT-3') ve Cas9R (5'-ATCATGTGAGCGAGAGCGA-3') primerleriyle PCR işlemi yapılmıştır. Agaroz jelde (%1.5), hedeflenen bölgenin (382 bp) çoğaltılıp çoğaltılmadığı kontrol edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Külleme Patojeninin Tanısı

Külleme etmeninden izole edilen DNA ve ITS1-4 (~550 bp) ve ITS2-5 (~300 bp) primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu, patojenin *P. xanthii* olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1. Külleme etmeninden izole edilen DNA ile yapılan PCR işlemi sonucu, Ladder: Thermo GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder

4.2. İnokulasyon Sonrasında Bitki Reaksiyonlarının Belirlenmesi

4.2.1. İnokulasyon sonrası Çamlıca genel durum

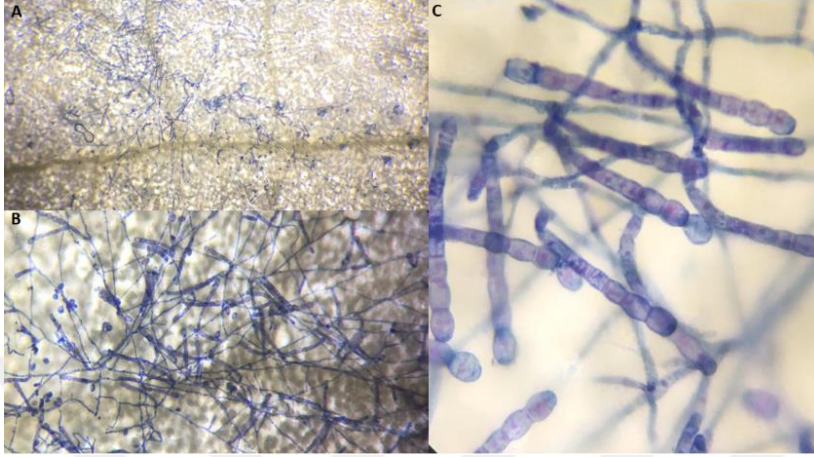
İnokulasyondan 7 gün sonra Çamlıca hıyar çeşidinde, *P. xanthii* sporlarının yaprak yüzeyini kapladığı görülmektedir. Şekil 4.2.1’de Çamlıca Yerel çeşidine ait, inokulasyondan 7 gün sonra ve inokule edilmeyen bitkiler görülmektedir (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. Çamlıca Yerel çeşidin inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyon yapılmayan Çamlıca Yerel hıyar bitkilerini göstermektedir

4.2.2. Çamlıca yapraklarının Trypan Blue ile boyanması

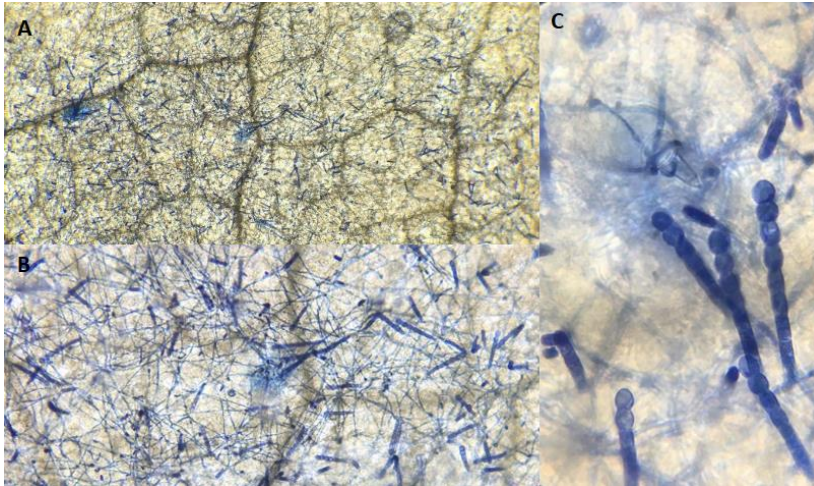
İnokulasyondan 2 gün sonra yapılan Trypan Blue boyama yöntemi ile mikroskop altında Çamlıca Yerel hıyar yapraklarında, *P. xanthii* sporlarının çoğunun çimlendiği görülmektedir (Şekik 4.2.2).



Şekil 4.2.2. Çamlıca hıyar yapraklar üzerinde gelişen *P. xanthii*'nin, Trypan Blue ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; **a)** 4x objektif; **b)** 10x objektif; **c)** 40x objektif büyütmede görünümü

4.2.3. Çamlıca yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması

İnokulasyondan 7 gün sonra DAB+Trypan Blue kombinasyonunda herhangi bir süperoksit oluşmadığı ve patojenin çok daha fazla kolonize olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3. Çamlıca hıyar yapraklar üzerinde gelişen *P. xanthii*'nin Trypan Blue+DAB ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; **a)** 4x objektif; **b)** 10x objektif; **c)** 40x objektif

4.2.4. İnokulasyon sonrası VT18 genel durum

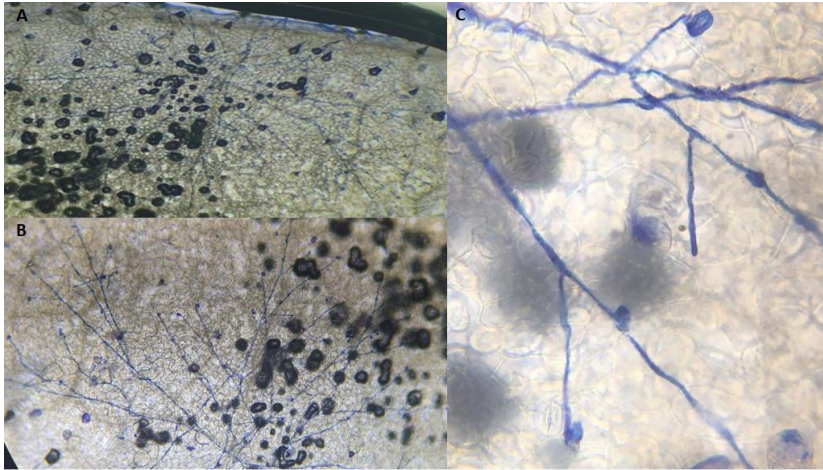
VT18 hattında ise, inokulasyondan 7 gün sonra yapraklarda *P. xanthii*'nin, Çamlıca Yerel çeşidine göre çok daha az kolonize olduğu ve bazı bölgelerde HR oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.4. VT18 hattının, inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyonu yapılmayan VT18 hattı hıyarlarını göstermektedir

4.2.5. VT18 yapraklarının Trypan Blue ile boyanması

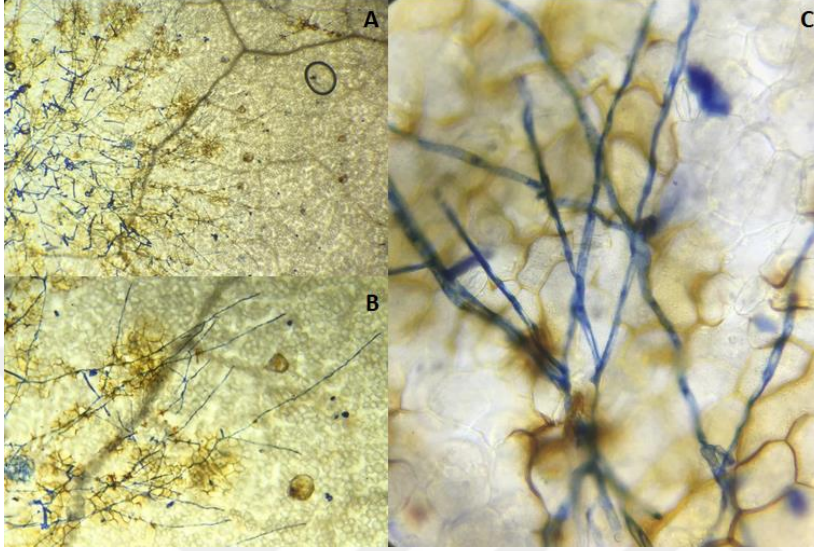
İnokulasyondan 2 gün sonra yapılan Trypan Blue boyama sonrasında mikroskop altında, VT18 yapraklarında külleme sporlarının çimlendiği görülmektedir. Ancak Çamlıca'ya göre daha az çimlenme ve spor oluşumu görülmektedir (Şekil 4.2.5).



Şekil 4.2.5. VT18 hıyar yaprakları üzerinde gelişen *P. xanthii*'nin Trypan Blue ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; **a)** 4x objektif; **b)** 10x objektif; **c)** 40x objektif

4.2.6. VT18 yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması

İnokulasyondan 7 gün sonra DAB+Trypan Blue boyama sonrasında ise VT18 yapraklarında sporların çimlendiği bölgelerde kahverengimsi renkte boyanan süperoksit oluşumları görülmektedir (Şekil 4.2.6).



Şekil 4.2.6. VT18 hıyar yaprakları üzerinde gelişen *P. xanthii*'nin Trypan Blue+DAB ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; **a)** 4x objektif; **b)** 10x objektif; **c)** 40x objektif

4.2.7. İnokulasyon sonrası Meltem genel durum

Meltem'de ise külleme inokulasyonu sonrasında hastalığın genel simptomları gözlemlenmemiştir (Şekil 4.2.7).



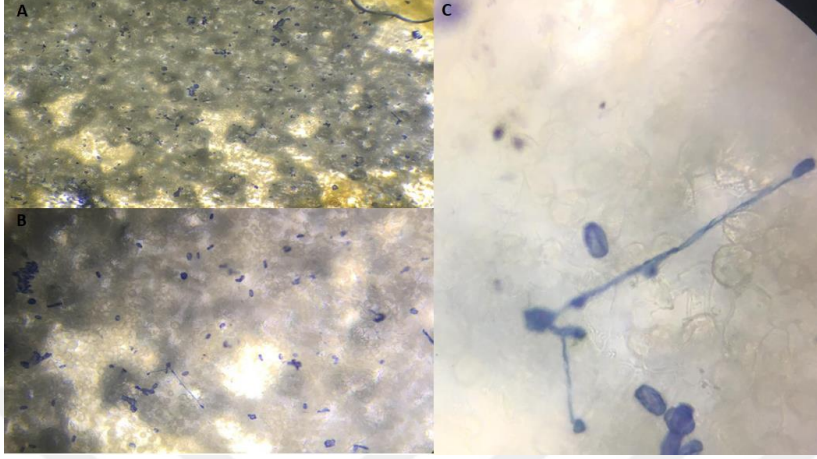
İnokulasyondan 7 gün sonra

Negatif Kontrol

Şekil 4.2.7. Meltem çeşidinin, inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyon yapılmayan Meltem çeşidini göstermektedir

4.2.8. Meltem yapraklarının Trypan Blue ile boyanması

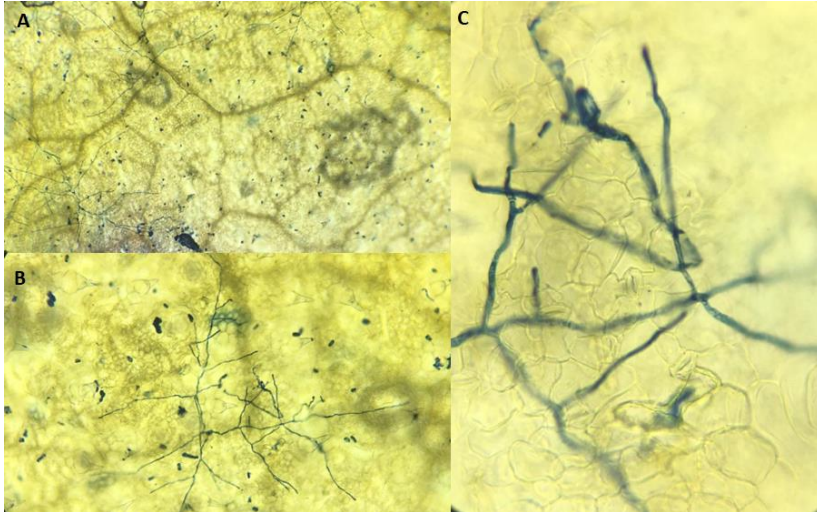
İnokulasyon sonrasında, Meltem yapraklarında *P. xanthii* sporlarının nadiren çimlendiği görülmektedir (Şekil 4.2.8).



Şekil 4.2.8. Meltem hıyar yaprakları üzerinde gelişen *P. xanthii*'nin Trypan Blue ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; **a)** 4x Objektif; **b)** 10x objektif; **c)** 40x objektif

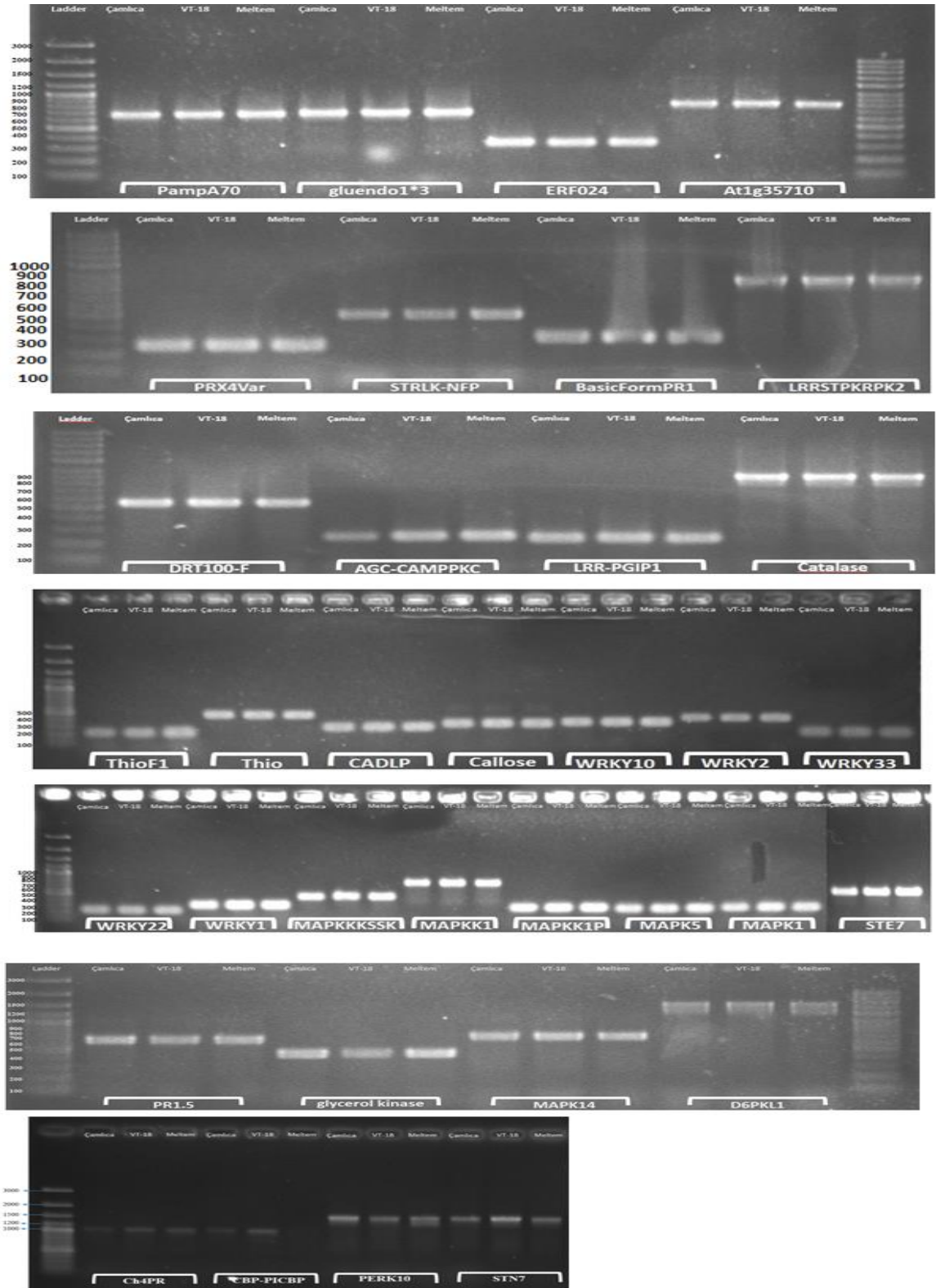
4.2.9. Meltem yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması

İnokulasyondan 7 gün sonra DAB+Trypan Blue boyama sonrasında mikroskop altında görüntülenen yapraklarda konidiospor çimlenmesinin çok düşük olmasına rağmen süperoksit oluşumu görülmemiştir (Şekil 4.2.9).



Şekil 4.2.9. Meltem hıyar yaprakları üzerinde gelişen *P. xanthii*'nin Trypan Blue+DAB ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında görüntülenmesi; **a)** 4x Objektif; **b)** 10x objektif; **c)** 40x Objektif

4.3. PCR Sonuçları



Şekil 4.3. Hedef genlere özgü primerler ve bitkilerden izole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu

Hücre redoks homeostazında rol oynayan ve bu çalışmada araştırılan, *Thioredoxin F1*, *Thioredoxin* ve *Catalase peroxidase* genlerine özgü primerler sırasıyla; ThioF1 (211 bp), Thio (452 bp) ve Catalase (847 bp) primerleridir. Bu primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu, dayanıklı Meltem çeşidi, hassas Çamlıca çeşidi ve tolerant VT18 hattında bu genlerin olduğu belirlenmiştir.

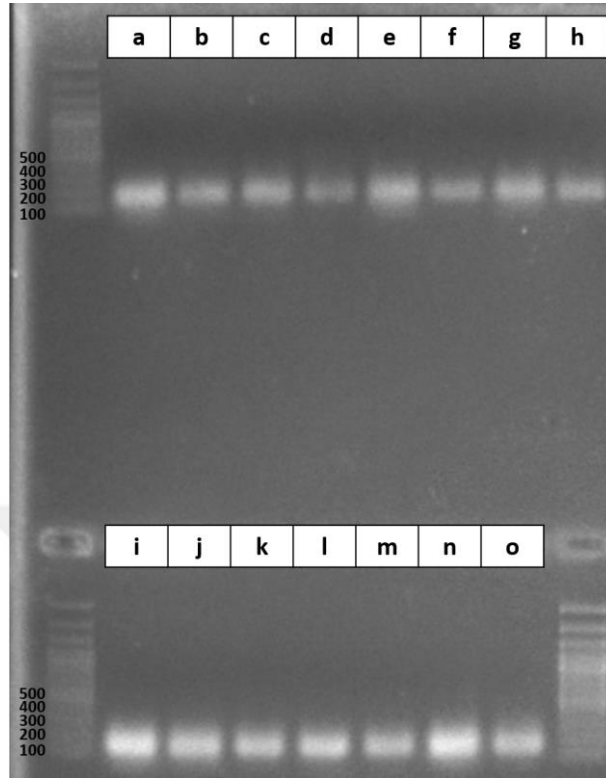
Hıyarda, MAPK sinyal yolunda rol oynayan ve bu çalışmada araştırılan genler *MAPK kinase kinase SSK2*, *MAPKK1*, *MAPKK1-MEKK1P*, *MAPK5*, *MAPK1*, *MAPK14* ve *AGC kinase* genleridir. Bu genlere özgü primerler sırasıyla; MAPKKKSSK (443 bp), MAPKK1 (755 bp), MAPKK1P (261 bp), MAPK5 (247 bp), MAPK1 (272 bp), MAPK14 (706 bp) ve AGC-CAMPPKC (256 bp) primerleridir. MAPK sinyal yolunda rol oynayan genlerin, dayanıklı, hassas ve tolerant hıyar bitkilerinde olduğu görülmektedir.

Hıyarda patojenlere karşı savunma ile ilişkili proteinlerini kodlayan ve bu çalışmada araştırılan genler; *Polygalacturonase Inhibitor*, *DNA-Damage/Repair/Toleration DRT-100*, *pathogenesis-related 1*, *pathogen-related X4*, *pathogen-related, basic form of pathogenesis related 1*, *glucan endo-1,3-beta-glucosidase 8*, *cinnamyl alcohol dehydrogenase* ve *callose synthase* genleridir. Bu genlere özgü primerler sırasıyla; LRR-PGIP1 (243 bp), DRT-100-F (554 bp), PR1.5 (656 bp), PRXVar (260 bp), Ch4PR (1032 bp), BasicFormPR1 (320 bp), gluendo 1-3 (675 bp), CADLP (289 bp) ve Callose (318 bp) primerleridir. Şekil 4.3'te verilen PCR işlemi sonucu bu mekanizmayla ilişkili genlerin dayanıklı, hassas ve tolerant çeşitlerde, olduğu belirlenmiştir.

Pathogen-associated molecular patterns-induced A70, *serine/threonine-protein kinase D6PKL1*, *serine/threonine-protein kinase STE7*, *LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase RPK2*, *proline-rich receptor-like protein kinase PERK10*, *serine/threonine-protein kinase STN7*, *leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710* ve *serine/threonine receptor-like kinase NFP* genleri, bitki-patojen interaksiyonlarında rol oynamaktadır. Bu genlere özgü primerler sırasıyla; PampA70 (672 bp), D6PKL1 (1528 bp), STE7 (536 bp), LRRSTPKRPK2 (950 bp), PERK10 (1444 bp), STN7 (1268 bp), At1g35710 (823 bp) ve STRLK-NFP (509 bp) primerleridir. Şekil 4.3'te bu genlerin hassas, tolerant ve dayanıklı hıyar bitkilerinde olduğu görülmektedir.

Savunma sinyal yolunun düzenlenmesinde rol oynayan genler; *ethylene-responsive transcription factor ERF024*, *calmodulin binding PICBP*, *WRKY* transkripsiyon faktörleri (10, 2, 33, 22, 1) ve *glycerol kinase* genleridir. Bu genlere özgü primerler sırasıyla ERF024 (333 bp), CBP-PICBP (928 bp), WRKY10 (331 bp), WRKY2 (408 bp), WRKY33 (212 bp), WRKY22 (218 bp), WRKY1 (297 bp) ve glycerol kinase (451 bp) primerleridir. PICBP primeri ile yapılan PCR işlemi sonucunda, dayanıklı çeşit Meltem'de hedeflenen bölgenin çoğaltılmadığı görülmektedir. Hassas ve tolerant çeşitte ise *calmodulin binding PICBP* geninde hedeflenen bölge çoğaltılmıştır. Bu da *calmodulin binding PICBP* geninin dayanıklı Meltem'de olmadığını göstermektedir.

4.4. İzole Edilen RNA'ların CACS Primeri ile Kontrolü



Şekil 4.4. İzole edilen RNA'lar (4 µl) ve CACS primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçları, **a, b)** Meltem iö; **c, d)** Meltem is 1. gün; **e)** Meltem is 2. gün; **f, g)** VT18 iö; **h)** VT18 is 1. gün; **i, j)** VT18 is 2. gün; **k, l)** Çamlıca iö; **m, n)** Çamlıca is 1. gün; **o)** Çamlıca is 2. gün, iö: inokulasyon öncesi, is: inokulasyon sonrası

İzole edilen her RNA örneğinin, miktarı belirlenmeden önce yapılan RT-PCR sonucu Şekil 4.4'te verilmiştir. CACS primerleri ile yapılan RT-PCR sonucunda cDNA üzerinden elde edilmesi beklenen bant boyutu (171 bp) jelde görülmektedir. CACS primer çifti ve gDNA kullanılarak yapılan PCR işleminde 748 bp'de vermektedir. Ancak bu büyüklükte bi bant jelde görülmemektedir (Şekil 4.4). Bu da yapılan RT-PCR işlemlerinde, primerlerin yalnızca sentezlenen cDNA'ya bağlandığını göstermektedir.

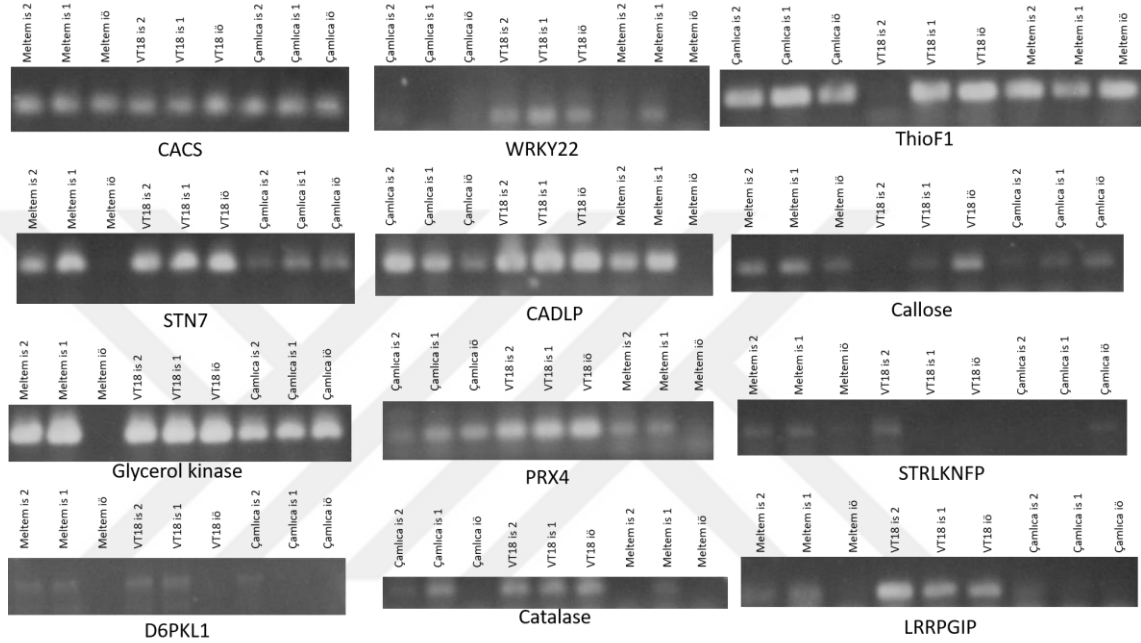
4.5. RT-PCR Sonuçları

Her bir RNA örneğinin miktarı belirlendikten sonra, her örnekten 20 ng RNA kullanılarak yapılan RT-PCR işlemlerinin sonucu Şekil 4.5.1'de verilmiştir. CACS geninin, inokulasyon öncesi ve sonrasında farklı çeşitler arasında ekspresyon seviyesinin değişmediği görülmektedir (Şekil 4.5 CACS).

WRKY22 genine özgü primer ve VT18'den inokulasyon öncesi, inokulasyon sonrası 1 ve 2. günlerde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi

soncunda, agaroz jelde bant görülmektedir. Ayrıca Meltem'den inokulasyondan 1 gün sonra izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda da, agaroz jelde bant görülmektedir (Şekil 4.5 WRKY22).

Thioredoxin F1 genine özgü ThioF1 primeri ve Çamlıca ve Meltem'den inokulasyon öncesi ve sonrasındaki 1 ve 2. günlerde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda, agaroz jelde bant görülmektedir. Sadece VT18'de inokulasyondan sonraki 2. günde izole edilen RNA kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda, agaroz jelde bant görülmektedir (Şekil 4.5 ThioF1).



Şekil 4.5. İzole edilen RNA'lar (20 ng) kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucu elde edilen ürünlerin jelde görüntülenmesi, iö: inokulasyon öncesi, is 1: inokulasyondan 1 gün sonra, is 2: inokulasyondan 2 gün sonra

Serine/threonine-protein kinase STN7, genine özgü STN7 primeri ve Meltem'den inokulasyon öncesinde izole edilen RNA kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda, agaroz jelde bant görülmemektedir. Diğer çeşitlerde ve inokulasyon sonrasında ise farklı yoğunluklarda bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.5 STN7).

Cinnamyl alcohol dehydrogenase, genine özgü CADLP primeri ile yapılan RT-PCR sonucunda, dayanıklı çeşit Meltem'den inokulasyon öncesi izole edilen RNA ile yapılan RT-PCR işlemi sonrasında, agaroz jelde bant görülmemektedir. Çamlıca'da inokulasyon öncesi izole edilen RNA ile yapılan RT-PCR işlemi sonrasında diğer bantlara göre daha düşük yoğunlukta bant görülmektedir (Şekil 4.5 CADLP).

Callose synthase genine özgü primer ve inokulasyon sonrasındaki 2. günde izole edilen Çamlıca ve VT18 RNA'ları kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda elde edilen ürün, agaroz jelde görülmemektedir. Ayrıca inokulasyon sonrasındaki 1. ve 2.

günde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonrasında, diğer bantlardan daha yüksek yoğunluğa sahip bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.5 Callose).

Glycerol kinase, genine özgü primer ve Meltemden inokulasyon öncesinde izole edilerek yapılan RT-PCR işlemi sonrasında elde edilen ürünün agaroz jelde görülmemektedir. VT18 ve Çamlıca'da inokulasyon öncesi ve sonrasındaki 1 ve 2. günlerde ise bant görülmektedir. Ayrıca Meltem'de inokulasyon sonrasındaki 1 ve 2. günde de bant görülmektedir (Şekil 4.5 Glycerol kinase).

Pathogen-related X4, genine özgü PRX4 primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda, inokulasyon öncesi Meltem'den izole edilen RNA'lar hariç, diğer zamanlarda (inokulasyon sonrası 1 ve 2. gün) Meltem'den ve diğer hassas ve tolerant bitkilerden izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda agaroz jelde bant görülmektedir (Şekil 4.5 PRX4).

Serine/threonine receptor-like kinase NFP genine özgü STRLKNFP primeri ve Meltem inokulasyon sonrası 1 ve 2. günde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonrasında elde edilen ürün agaroz jelde görülmektedir. Ayrıca VT18'de inokulasyondan 2 gün sonra izole edilen RNA'lar ile yapılan RT-PCR işleminde de bant görülmektedir. Hassas Çamlıca'dan izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonrasında ise agaroz jelde bant görülmemektedir (Şekil 4.5 STRLKNFP).

Serine/threonine-protein kinase D6PKL1 genine özgü D6PKL1 primeri ve inokulasyon sonrasında 1. ve 2. günlerde, Meltem ve VT18'den izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda, agaroz jelde bant görülmektedir. Ayrıca Çamlıca'da inokulasyon sonrasındaki 2. günde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonrasında da bant görülmektedir (Şekil 4.5 D6PKL1).

Catalase peroxidase, genine özgü primer ve VT18'den inokulasyon öncesi, inokulasyon sonrası 1 ve 2. günde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucu, agaroz jelde bant olarak görülmektedir. Ayrıca Çamlıca'dan ve Meltem'den inokulasyon sonra 1. günde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda da, agaroz jelde bant görülmektedir (Şekil 4.5 Catalase).

Polygalacturonase inhibitor, genine özgü LRRPGIP primeri ve VT18'den inokulasyon öncesi, inokulasyon sonrasındaki 1 ve 2. günlerde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonrasında, agaroz jelde bant görülmektedir. Ayrıca dayanıklı Meltem'den inokulasyon sonrasında 1 ve 2. günlerde izole edilen RNA'lar kullanılarak yapılan RT-PCR işlemi sonucunda da agaroz jelde bant görülmektedir (Şekil 4.5 LRRPGIP).

Elde edilen jel görüntüleri (Şekil 4.5) GelAnalyzer 19.2 ile analiz edilmiştir ve elde edilen Raw Volume değerleri kullanılarak kalibre değerleri hesaplanmıştır. Yapılan analiz sonuçları ve kalibre değerler çizelge halinde EK 1'de verilmiştir.

4.6. Kalibre değer ile çizgi grafiklerinin çizilmesi

EK 1’de, hesaplanan kalibre değerler kullanılarak çizgi grafik oluşturulmuştur. Bu grafikler Şekil 4.6’da verilmiş olup ilgili genin ismi grafiklerin üstünde belirtilmiştir. Dayanıklılık ile ilişkili genlerin inokulasyon öncesi ve sonrasındaki 1 ve 2. günlerde farklı çeşitler arasında ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıkları gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Verilere göre oluşturulan, farklı genlerin farklı çeşit ve zamanlarda ekspresyon seviyelerini gösteren çizgi grafiği (i0: inokulasyon öncesi, is 1: inokulasyondan 1 gün sonra, is 2: inokulasyondan 2 gün sonra)

Glycerol kinase’ın, dayanıklı Meltem çeşidinde, inokulasyon sonrasında, öncesine göre yüksek seviyede ifade olduğu görülmektedir. Ayrıca inokulasyon sonrasında 1 ve 2. günlerde, VT18 ve Meltem’de bu genin ekspresyon seviyesinin Çamlıca’dan daha yüksek seviyede olduğu Şekil 4.6’da gösterilmiştir.

Serine/threonine-protein kinase STN7 geninin inokulasyon sonrasında, dayanıklı çeşit Meltem’de inokulasyon öncesine göre arttığı görülmektedir. Bu genin VT18’de ekspresyon seviyesi daha yüksek olmasına rağmen inokulasyon öncesinde veya sonrasında, ekspresyon seviyesinde farklılık bulunmamaktadır. Ayrıca *Serine/threonine-protein kinase STN7*’nin inokulasyon sonrasında 1 ve 2. günde ekspresyon seviyesinin en düşük olduğu bitki Çamlıca hıyar çeşididir (Şekil 4.6).

Cinnamyl alcohol dehydrogenase'ın, inokulasyon öncesi ve sonrasında dayanıklı Meltem ve hassas Çamlıca'da ekspresyon seviyesinin arttığı görülmektedir. İnokulasyon öncesi ve sonrasında bu genin ekspresyon seviyesinin en yüksek VT18'de olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

Pathogen-related X4 geninin inokulasyondan sonra tolerant VT18'de, inokulasyon öncesine göre ekspresyon seviyesinde farklılık bulunmamaktadır. Dayanıklı Meltem'de ise inokulasyon sonrasındaki 1. günde artmış olmasına rağmen hassas çeşit Çamlıca'daki aynı genin ekspresyon seviyeleri arasında çok farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.6).

WRKY22'nin inokulasyondan sonra 1. günde dayanıklı Meltem ve tolerant VT18'de ekspresyon seviyesinin arttığı, 2. günde düştüğü tespit edilmiştir. Hassas Çamlıca'da ise inokulasyon sonrasındaki 1. ve 2. günlerde ekspresyon seviyesinde artış görülmemiştir ve en düşük seviyededir (Şekil 4.6).

Catalase peroxidase'ın inokulasyon sonrasındaki 1. günde hassas Çamlıca'da ekspresyon seviyesinin arttığı görülmektedir. En yüksek ekspresyon seviyesi VT18'de olmasına karşın, inokulasyon öncesinde ve sonrasındaki 1 ve 2. Günlerde ekspresyon seviyeleri arasında artış ya da azalma görülmemektedir (Şekil 4.6).

Serine/threonine-protein kinase D6PKL1'in inokulasyondan sonra 1. günde, dayanıklı Meltem ve tolerant VT18'de ekspresyon seviyesinin arttığı görülmüştür. Çamlıca'da ise aynı genin ekspresyon seviyesi, inokulasyondan 2 gün sonra arttığı görülmektedir. Ancak ekspresyon seviyesi, artmış olmasına rağmen dayanıklı ve tolerant hıyar bitkilerine göre daha düşük seviyededir (Şekil 4.6).

Thioredoxin F1 geninin dayanıklı ve hassas hıyar bitkilerinde inokulasyon öncesi ve sonrasında ekspresyon seviyeleri çok fazla değişmemiştir. Ancak tolerant VT18'de, bu genin ekspresyon seviyesi, inokulasyondan 2 gün sonra birden düştüğü görülmüştür (Şekil 4.6).

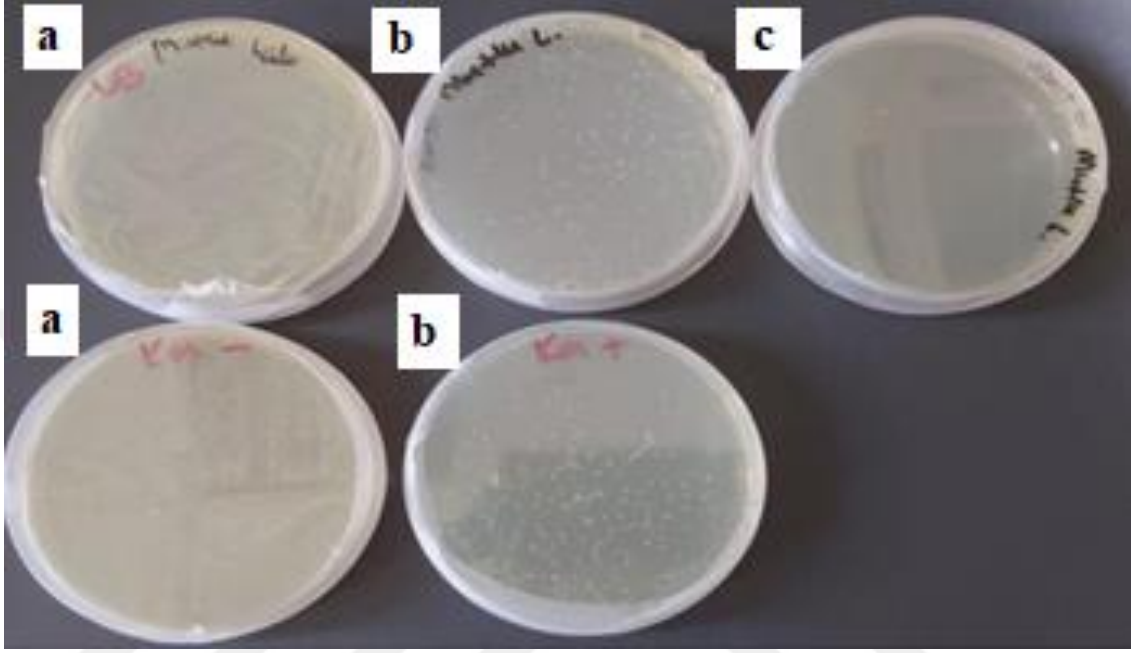
Polygalacturonase inhibitor, geninin dayanıklı Meltem'de inokulasyondan 1 gün sonra, tolerant VT18'de ise 2 gün sonra ekspresyon seviyesinin arttığı görülmektedir. Aynı genin ekspresyon seviyesinin, hassas Çamlıca'da artmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.6).

Callose synthase geninin ekspresyon seviyesinin, inokulasyondan 1 gün sonra yalnızca dayanıklı çeşit Meltem'de arttığı tespit edilmiştir. Tolerant ve hassas bitkilerde, bu genin ekspresyon seviyesi, inokulasyondan sonra artmamıştır (Şekil 4.6).

Serine/threonine receptor-like kinase NFP'nin inokulasyondan sonra dayanıklı Meltem'de ekspresyon seviyesi inokulasyondan 1 gün sonra düşük miktarda artmıştır. Aynı genin ekspresyon seviyesi tolerant VT18'de inokulasyondan 2 gün sonra artmıştır. Hassas Çamlıca'da ise bu genin ekspresyon seviyesinde bir artış tespit edilmemiştir (Şekil 4.6).

4.7. Plazmitin Kontrolü

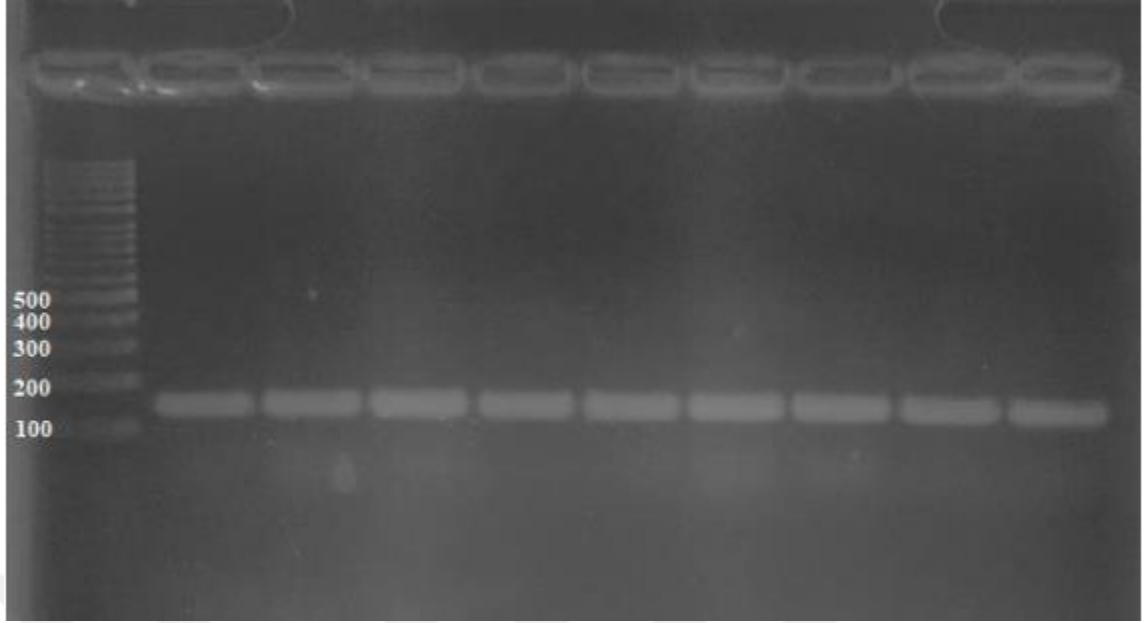
Heatshock sonrasında, *E. coli* bakterilerinin antibiyotik içermeyen ortamda yoğun olarak çoğaldığı (Şekil 4.7a) ve Spektinomisin içeren besi ortamında çoğalmadığı görülmüştür (Şekil 4.7c). Plazmiti taşıyan *E. coli* hücrelerinin, Kanamisin içeren LBA ortamında çoğaldığı görülmektedir (Şekil 4.7b).



Şekil 4.7. LBA besiyerindeki *E. coli* hücreleri; **a)** Antibiyotik içermeyen LBA; **b)** Kanamisin içeren LBA; **c)** Spektinomisin içeren LBA

4.8. Plazmitin PCR ile Kontrolü

Kanamisin içeren besi ortamından seçilen koloniler ile yapılan PCR işlemi sonucu plazmitin *E. coli*'ye başarılı bir şekilde aktarıldığı görülmektedir (Şekil 4.5.2).



Şekil 4.8. AgroInsCont primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucu

4.9. Plazmitin Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü

Plazmit, yeniden izole edildikten sonra restriksiyon enzimleri ile yapılan kesim sonucu, plazmitin başarılı bir şekilde izole edildiğini göstermektedir (Şekil 4.9). Şekil 4.5.3'te restriksiyon enzimlerinin plazmit haritasında belirtilen yerdeki gibi, plazmiti fragmentlere ayırdığı görülmektedir.



Şekil 4.9. *E. coli*'den izole edilen plazmitin farklı kesim enzimleri ile kesilmesinin ardından %1'lik jelde görüntülenmesi, Uncut Plasmid, sirküler yapıda doğrudan jele yüklenen plazmiti göstermektedir. *BsmBI*; yalnızca *BsmBI* ile kesilerek lineer hale getirilen plazmiti ve *PmeI+PmlI*; her iki kesim enzimi ile kesilen plazmiti göstermektedir.

4.10. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 LBA'da Çoğalması

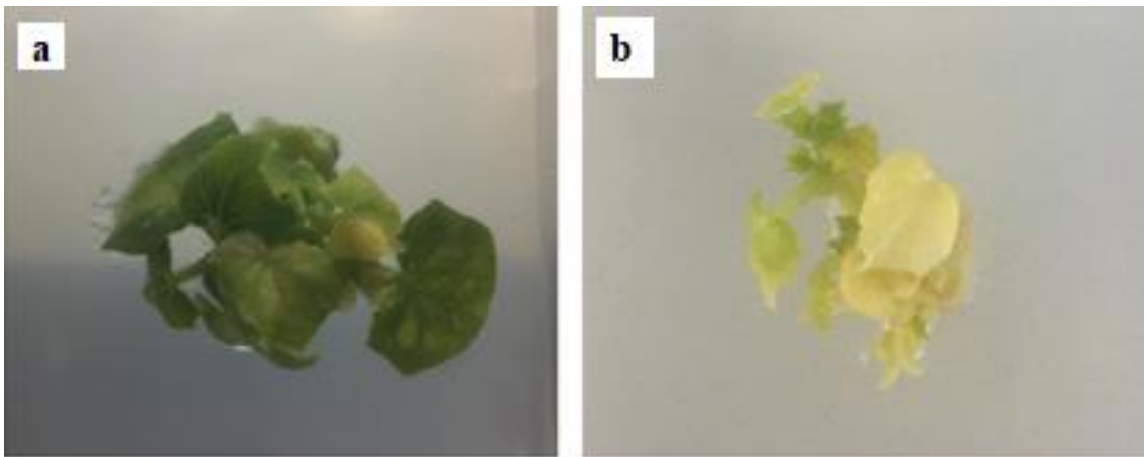
Elektroporasyon sonrasında, *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücrelerinin, Rifamisin ve Kanamisin içeren besi ortamında çoğaldığı görülmektedir. EHA105 straini, Rifamisin antibiyotiğine dayanıklı olmasının yanısıra plazmiti de taşıdığından dolayı Kanamisin ve Rifamisin içeren LBA ortamında başarılı bir şekilde çoğalmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Elektroporasyon sonrasında Rifamisin ve Kanamisin içeren LBA üzerine ekilen *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 hücrelerinin 2 günlük inkübasyon sonrasında görünümü

4.11. MLO-mutant Hıyar Bitkilerinin Elde Edilmesi

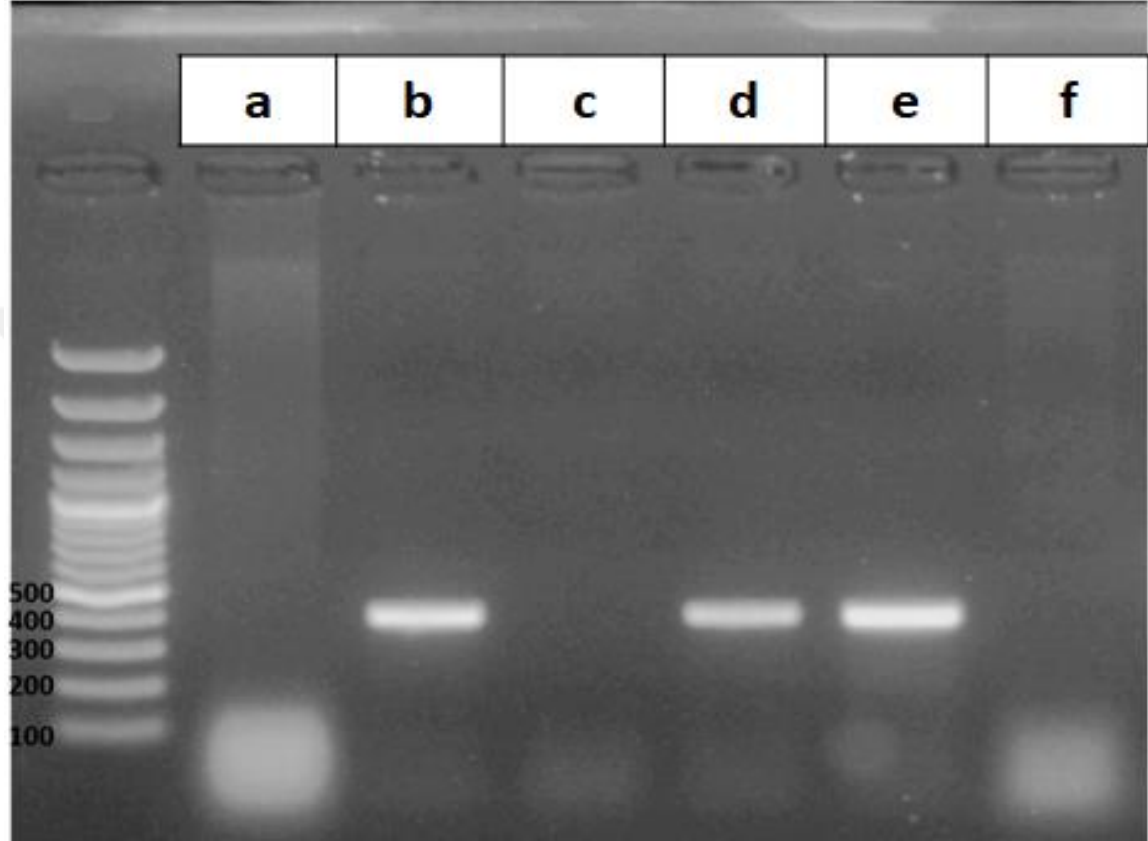
MS bazlı seleksiyon ortamına yerleştirilen sürgünlerin gelişimi gözlemlenmiştir. T-DNA aracılığı ile aktarılan *BlpR* transgenini taşıyan bitkilerin, glufosinate-ammonium içeren seleksiyon ortamında gelişmeye devam ettiği görülmüştür (Şekil 4.11a). Ancak transformasyonun başarılı olmadığı bitkilerin, bu seleksiyon ortamında canlılığını devam ettiremediği görülmüştür (Şekil 4.11b). Bu da seleksiyonun ve transformasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir.



Şekil 4.11. Sürgünlerin bitki doku kültürü kaplarına aktarıldıktan 3 hafta sonraki görünümü; **a)** Transforme olan eksplantlardan gelişen sürgün; **b)** Transforme olmayan ve seleksiyon ortamındaki glufosinate-ammonium'dan dolayı sararan sürgün

4.12. *MLO*-mutant Hıyar Bitkilerinde T-DNA'nın PCR ile Kontrolü

Seleksiyon ve aklimatizasyon sonrasında elde edilen bitkilerden izole edilen DNA ve Cas9F/Cas9R primerleri kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Elde edilen 6 bitkinin, 3 tanesinin (Şekil 4.12 b, d, e) T-DNA'yı taşıdığı görülmektedir.



Şekil 4.12. Elde edilen 6 bitkinin Cas9F ve Cas9R primerleri ile kontrolü **a, b, c, d, e, f)** Elde edilen bitkiler

5. TARTIŞMA

Hıyardaki külleme hastalığına iki farklı patojen neden olmaktadır. Bunlar *Golovinomyces cichoracearum* (*Erysiphe cichoracearum*) ve *Podosphaera xanthii* (*Sphaerotheca fuliginea*) patojenleridir (Block ve Kathleen 2005). Bu patojenler verim ve kalitede ciddi kayıplara yol açarak dünya çapında hıyar üretimini etkilemektedir. Obligat biyotrofik ektoparazit *Podosphaera xanthii*'nin neden olduğu külleme, hıyar da dahil olmak üzere kabakgillerde, göze çarpan ve en yaygın fungal hastalıktır. Bu hastalık ile mücadelede yaygın olarak fungusitler kullanılmaktadır (Xu vd. 2016). Bununla birlikte, çevreye ve insan sağlığına zararlı olmasının yanı sıra, aşırı fungusit kullanımı, *P. xanthii* popülasyonları üzerindeki fungusit direncini artırabilir (Rubio vd. 2015). Ayrıca külleme etmenleri, son dönemlerde küresel ısınmanın etkisiyle tarımsal üretimde daha da önemli bir konumda yer almakta ve zarar düzeyi artan fungal etmen olarak anılmaktadır (Tümay ve Özkaya 2020). Bu nedenle külleme hastalık etmenlerini kontrol etmek için alternatif yollar bulunmalıdır.

Bu alternatif yöntemlerden en önemlisi küllemeye karşı dayanıklı veya tolerant çeşitlerin geliştirilmesidir. Çünkü dayanıklı ve tolerant çeşitlerin geliştirilmesi, hıyar yetiştiriciliğinde külleme hastalıkları ile mücadelede en ekonomik ve çevre dostu yöntemdir. Ancak küllemeye karşı dayanıklı hıyar çeşitlerinin geliştirilmesi için, bitkilerin küllemeye karşı genetik ve moleküler savunma mekanizmalarının anlaşılması çok önemlidir. Küllemeye karşı dayanıklılığın karakterizasyonu 1960'lı yıllarda başlamıştır. Günümüzde bu alanda, dayanıklılık karakterizasyonu ve genetik haritalama çalışmaları devam etmektedir.

Ancak bu çalışmalarda tanımlanan QTL'lerin sıcaklığa bağlı olarak değişmesi, bazılarının tutarsız olması ve 7. Kromozom hariç geriye kalan 6 kromozom üzerinde bir çok bölgede dayanıklılık ile ilgili QTL bulunması gibi nedenlerden dolayı, küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmaları ile ilgili bilgiler belirsizliğini sürdürmektedir.

Çalışmamızda külleme dayanıklılık mekanizmalarının araştırılması amacıyla, küllemeye karşı verdikleri tepkileri bilinen 3 farklı hıyar çeşit ve hattı kullanılmıştır. Bunlar dayanıklı Meltem çeşidi, hassas Çamlıca Yerel çeşidi ve tolerant VT18 hattıdır (Yüceson vd. 2020).

R genleri aracılığı ile kazandırılan dayanıklılık genellikle programlı hücre ölümü ve HR ile ilişkilendirilir (Cui vd. 2015). Külleme inokulasyonu sonrasında tolerant VT18 hattında süperoksitlerin oluştuğu ve HR gerçekleştiği görülmektedir. Ancak külleme etmeninin gelişiminin yavaş da olsa devam ettiği görülmektedir. Yapılan mikroskopik gözlemlerde, inokulasyondan sonra *P. xanthii* konidiosporlarının çimlendiği ve fungal yapılarının geliştiği bulunmuştur.

Daynıklılık genellikle HR ile ilişkilendirilmesine rağmen, dayanıklı Meltem çeşidinde külleme inokulasyonu sonrasında süperoksit oluşumu ve HR görülmemiştir. Ancak inokule edilen *P. xanthii* konidiosporlarının, yeni konidiosporları oluşturmadığı görülmektedir. Hassas çeşit olan Çamlıca Yerel yapraklarında ise *P. xanthii*

konidiosporlarının çok sayıda çimlendiği ve fungal kitlenin yaprak yüzeyini kapladığı görülmektedir.

VT18 ve Meltem’de yapılan mikroskopik gözlemler (Trypan Blue ve DAB boyama), konukçunun küllemeye karşı savunmada farklı mekanizmaların rol oynadığını göstermektedir. VT18’de gerçekleşen ROS birikimi ve HR, *P. xanthii* enfeksiyonunun yayılmasını engellemektedir.

Meltem’de ise ROS ve HR görülmemesine rağmen, küllemenin tipik belirtileri görülmemiştir. Ayrıca *P. xanthii* yaprak yüzeyinde gelişmemiş ve konidiosporlarının çoğu çimlenmemiştir. Meltem’deki dayanıklılığın, konukçunun sahip olduğu farklı savunma mekanizmaları ile ilişkili olduğunu veya farklı savunma mekanizmalarının aktive olması ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Her çeşitten izole edilen DNA’lar kullanılarak yapılan PCR işleminde 35 farklı gene özgü primerler kullanılmıştır. PCR sonucunda, *Csa_5G451650 (LOC101218934)* genine özgü primerlerin, Meltem’de hedeflenen bölgeyi çoğaltmadığı görülmektedir. Ancak tolerant VT18 ve hassas Çamlıca’da ise hedeflenen bölgenin primerler tarafından çoğaltıldığı ve genin bu çeşitlerde mevcut olduğu belirlenmiştir. Diğer primerler ile yapılan PCR işlemlerinin sonuçlarında, farklı çeşitler arasında başka farklılıklar bulunmamaktadır. *Csa_5G451650 (LOC101218934)* geni, calmodulin binding protein PICBP (Kalmodulin bağlayan protein PICBP)’yi kodlamaktadır. Bu gen hıyarda 5. kromozom üzerinde 19651486-19654822 nükleotitler arasında bulunmaktadır.

Daha önceki çalışmalarda MLO proteinlerinin kalmodulin bağlayıcı proteinler olduğu ve kalmodulin bağlanmasının arpanın küllemeye duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca *in-vivo* koşullarda, MLO proteinindeki kalmodulin bağlanma domaininin fonksiyonel kaybı, *MLO* genlerinin neden olduğu duyarlılığı %50 oranında azaltmıştır (Kim vd. 2002a).

Savunma sinyal yolu regülasyonlarında rol oynayan bu genin, dayanıklı çeşit Meltem’de varlığı tespit edilmemiştir. Bu nedenle *Csa_5G451650*’in savunma sinyal yolu regülasyonlarında, arpada olduğu gibi hıyarda daküllemeye karşı dayanıklılıkta negatif rol oynadığını düşündürmektedir.

Farklı çeşitlerden, inokulasyon öncesi ve inokulasyon sonrası 1 ve 2. günlerde izole edilen RNA’lar kullanılarak RT-PCR işlemi yapılmıştır. CACS referans genine özgü primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR sonucu, GelAnalyzer 19.2 programı kullanılarak analiz edildiğinde, ekspresyon seviyelerinin farklı çeşitlerde ve zamanlarda değişmediği tespit edilmiştir. Bu da yapılan RT-PCR işleminin güvenilirliğini göstermektedir.

Serine/Threonine-protein Kinase D6PKL1 geninin, Meltem ve VT18’de inokulasyon sonrasında 1. günde ekspresyon seviyesinin arttığı belirlenmiştir. İnokulasyondan 1 gün sonra, hassas çeşitte ekspresyon seviyesinde kayda değer bir artış görülmemiştir. Çamlıca’da 2. günde bu genin ekspresyon seviyesinde artış görülmesine

rağmen, dayanıklı ve tolerant çeşitlere göre bu seviye düşüktür. *Haynaldia villosa*'da bulunan, Serine/Threonine-protein Kinase gen ailesinden, *Stpk-V* (Serine/Threonine-protein Kinase V) geninin, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* enfeksiyonu sonrası indüklendiği bilinmektedir (Cao vd. 2011). Dayanıklı ve tolerant hıyar bitkilerinde, *Csa_6G450970* (LOC101210027) geninin, enfeksiyondan 1 gün sonra ekspresyon seviyesinin artması, bu genin patojenin penetrasyon aşamasında konukçu tarafından tanınmasını sağladığını akla getirmektedir. Bu gen tarafından kodlanan protein, hıyar-*P. xanthii* interaksiyonunda aday bir reseptör olabilir.

Çalışma kapsamında ekspresyon seviyeleri belirlenen, KEGG Pathway Database içerisinde, bitki patojen interaksiyonlarında rol oynayan diğer bir gen ise *serine/threonine receptor-like kinase NFP*'dir. *NFP*'nin inokulasyon sonrasında VT18 ve Meltem'de ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmektedir. Ayrıca ekspresyon seviyesinin hassas Çamlıca'da değişmediği ve düşük seviyede olduğu görülmektedir. VT18'de bu genin, inokulasyon sonrasında ekspresyon seviyesi, *Serine/Threonine-protein Kinase D6PKL1*'den daha düşüktür. Ancak Meltem'de *NFP*'nin inokulasyondan 1 gün sonraki ekspresyon seviyesi VT18'den daha yüksek olduğu görülürken, inokulasyondan 2 gün sonra ise VT18'de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *NFP*'nin inokulasyon sonrasında dayanıklı ve tolerant çeşitlerde ekspresyonunun artması, külleme etmeninin konukçu tarafından tanınmasında başka bir aday reseptör olabileceğini göstermektedir.

KEGG Pathway Database içerisinde, bitki patojen interaksiyon yolağında yer alan diğer bir gen, *Serine/threonine STN7*'in , inokulasyondan 1 ve 2 gün sonra ekspresyon seviyesindeki en yüksek artışın Meltem'de olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı genin VT18 ve Meltem ekspresyon seviyesinin, hassas Çamlıca çeşidine göre daha yüksek miktarda ifade edildiği görülmektedir. Ancak *STN7*'in VT18'de ekspresyon seviyesinin inokulasyon öncesi ve sonrasında değişmediği tespit edilmiştir. Meltem'de bu genin yüksek oranda indüklenmesi, *STN7*'in dayanıklı Meltem çeşidi için, tolerant VT18'e göre daha önemli bir rol oynadığı anlamına gelebilir.

PG'ler (Polygalacturonase) fungal patojenite faktörleridir. Enfeksiyonun ilk aşamalarında üretilen ve bitki hücre duvarı bileşeni olan poligalakturonu parçalarlar. Fungal PG enzim aktivitesine karşı, bitkiler de fungus enfeksiyonunu sınırlandırmak için hücre duvarına bağlanan poligalakturonaz inhibe edici proteinler (PGIP) kullanırlar (De Lorenzo ve Ferrari 2002). *Polygalacturonase inhibitor* genlerinden *Cuসা.038100.1*'in hassas Çamlıca'da bulunmasına rağmen ifade olmadığı görülmektedir. Dayanıklı ve tolerant hıyarlarda ise inokulasyondan sonra ekspresyon seviyesinin, hassas çeşide göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Çamlıca'da, enfeksiyonun çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesinin nedeni, bu genin ifade olmamasıyla ilişkili olabilir. PG ile hücre duvarını parçalayan diğer funguslara karşı dayanıklılıkta etkili olduğu gibi, hıyarda külleme hastalığına karşı dayanıklılıkta da *polygalacturonase inhibitor* geni rol oynamaktadır.

Hıyarda bulunan PR genlerinden *Csa_6G338110*, PR proteinlerinden X4 varyantını kodlamaktadır. KEGG bitki patojen interaksiyonu yolağında, hıyar bitkisinde

fungus patojenlere karşı dayanıklılıkta rol oynayan gen olarak belirtilmiştir. İnokulasyon sonrasında dayanıklı bitkide, ekspresyon seviyesi artarken, hassas olan Çamca'da ekspresyon seviyesi düşmüştür. VT18'de en yüksek ekspresyon seviyesi olmasına rağmen, bu genin *P. xanthii* ile indüklenmediği görülmektedir. Bu nedenle, *Csa_6G338110* doğrudan külemeye karşı savunmada rol oynadığı düşünülmemektedir.

Patojenlere karşı savunma ile ilişkili proteinlerden, *Cucsa.219440.1* geni, hıyarda cinnamyl alcohol dehydrogenase proteinini kodlamaktadır. Bu protein hücre duvarının fiziksel olarak güçlendirilmesi ve patojenin penetrasyonunun engellenmesi amacı ile bitki tarafından sentezlenir. Özellikle bitki hücre duvarının güçlendirilmesinde kilit rolde yer alırlar, çünkü lignin biyosentezi için kaynak olan monolignol sentezinde rol oynarlar (Kim vd. 2004). Ayrıca bakteriyel ve fungus patojenlere karşı savunmada rol oynarlar (Rong vd. 2016). Bu genin dayanıklı çeşitte, inokulasyon sonrasında yüksek oranda indüklendiği görülmektedir. Fakat aynı genin ekspresyon seviyesinin, inokulasyon sonrasında hassas çeşitte de doğrusal olarak arttığı görülmektedir. *Cucsa.219440.1*'in inokulasyondan sonra ekspresyon seviyesinin VT18 ve Meltem'de yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak VT18'de bu genin küleme enfeksiyonu ile indüklenmediği görülmektedir. *Cucsa.219440.1*'in hassas, toleran ve dayanıklı çeşitlerde de ekspresyon seviyesinin yüksek olması, *Cucsa.219440.1*'in hücre duvarı kalınlaşmasında tek başına etkili rol oynamadığını göstermektedir. Ayrıca bu enzimin bitki tarafından, diğer patojenlere karşı sentezlendiği gibi, külemeye karşı da sentezlendiği görülmektedir.

Çalışmada ekspresyon seviyeleri belirlenen, patojenlere karşı savunma ile ilişkili proteinlerden sonuncusu Callose proteindir. Callose proteini hıyarda, *Cucsa.249900.1* tarafından kodlanmaktadır. Callose proteini, bitki büyüme, gelişimi ve farklı stres koşullarına karşı yanıt olarak kodlanmaktadır. Patojenlere karşı savunmada rol oynayan bu protein, hücre duvarında birikir ve hücre duvarının kalınlaşmasını sağlar. Bu sayede patojen penetrasyonunu yavaşlatmak ve engellemek için fiziksel bariyer görevi görür. *Arabidopsis*'te callose birikiminin külemeye karşı dayanıklılığı sağladığı belirtilmiştir (Nauman vd. 2013). *Arabidopsis*'te olduğu gibi, dayanıklı Meltem çeşidinde, Callose ekspresyonunun küleme inokulasyonu sonrası indüklendiği, toleran ve hassas çeşitlerden daha yüksek seviyede ifade olduğu görülmektedir. Dayanıklı ve toleran çeşitler arasındaki farklılığın nedenlerinden birisi Callose'un ekspresyon seviyesiyle ilgili olduğu sonucuna varılmaktadır.

Thioredoxin (Trx), ROS akışını düzenler ve ROS seviyesinde değişimlere sebep olurlar. Dayanıklı ve hassas hıyar hatlarında Trx'lerin birikmiş olduğu bildirilmiştir (Xu vd. 2019). Hıyarda bu proteini kodlayan genlerden birisi *Cucsa.356300.1* genidir ve T Thioredoxin F1 proteinini kodlamaktadır. Her çeşitte bu genin ekspresyon seviyesi inokulasyon öncesinde ve 1 gün sonrasında yüksektir. Ancak inokulasyondan 2 gün sonra, VT18 hattında, *Cucsa.356300.1*'in ekspresyon seviyesinin diğer bitkilere göre birden düştüğü görülmektedir. VT18'de HR gerçekleşmesinin nedenlerinden birisi, bu genin ekspresyon seviyesindeki bu düşmeden kaynaklı olabilir.

Xu vd. (2019)'un çalışmasında, *Catalase*'in hıyarda, hassas bitkilerde daha yüksek oranda indüklendiği belirtilmiştir. *Catalase peroxidase* (*Cucsa.272120.1*)'in ekspresyon seviyesinin hassas çeşitte, dayanıklı Meltem çeşidine göre yüksek olduğu görülmektedir. En yüksek ekspresyon seviyesi VT18'de olmasına rağmen inokulasyon öncesinde ve sonrasında ekspresyon seviyesinde bir değişiklik olmamıştır. İnokulasyon öncesine göre, ekspresyon seviyesi en fazla artan çeşit ise, hassas Çamlıca'dır. Katalazın, H_2O_2 'yi suya ve oksijene dönüştürdüğü (Mittler 2002) düşünüldüğünde, ekspresyonun indüklenmesinin, külemeye karşı savunmayı olumsuz etkilediği düşünülebilir.

Glycerol kinase, *Arabidopsis*'te *NHO1* geni tarafından kodlanmaktadır. Glycerol kinase, gliserolü fosforilasyon aracılığı ile, gliserol-3-fosfata dönüştürmektedir. *Pseudomonas syringae* tarafından bu genin dayanıklı ekotipte indüklendiği ve bu patojene karşı dayanıklılıkta kilit bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Kang vd. 2003). Ayrıca *NHO1* geni tarafından kodlanan glycerol kinazın, gliserol-3-fosfata seviyeleri arttırdığı ve hemibiyotrofik patojen olan *Colletotrichum higginsianum* karşı dayanıklılıkta rol oynadığı bildirilmiştir (Chanda vd. 2008). Ayrıca Li vd. (2020)'nin çalışmasında, buğdayda gliserol uygulamasının, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*'ye karşı dayanıklılığı indüklediği bildirilmiştir. Hıyarda bu proteini kodlayan *Cucsa.105620.1*'in küleme enfeksiyonu sonrasında dayanıklı çeşit olan Meltem'de, yüksek oranda indüklendiği bulunmuştur. Diğer bitkilerde inokulasyon öncesi ve sonrasında ekspresyon seviyelerinde değişiklik olmasa da *Cucsa.105620.1*'in ifade olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, *Cucsa.105620.1*'in, hücre içerisinde farklı görevlerde de rol oynamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple *Cucsa.105620.1*'in külemeye karşı dayanıklılıkta, konukçu savunma sinyal yolunun düzenlenmesinde önemli bir regülatör olduğu düşünülebilir. Ancak VT18 ve Çamlıca'da bu genin inokulasyon sonrasında, ekspresyon seviyesi değişmese de, yüksek seviyelerde ifade olduğu görülmektedir.

WRKY transkripsiyon faktörleri, bitkilerde farklı stres koşullarına karşı verilen yanıtta düzenleyici rolde görev alırlar (Gao vd. 2020). Bunlardan birisi de hıyarda bulunan *WRKY22* transkripsiyon faktörüdür. *WRKY22*'nin küleme inokulasyondan 1 gün sonra dayanıklı ve tolerant bitkilerde ekspresyon seviyelerinin arttığını, 2. Günden sonra ise yeniden düştüğü görülmektedir. Ancak hassas Çamlıca'da *WRKY22*'nin ifade olmadığı görülmektedir. Sonuçlar *WRKY22*'nin küleme enfeksiyonun ilk aşamalarında, savunma sinyal yolunun düzenlenmesinde, aday bir gen olduğunu göstermektedir.

Külemeye karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesindeki zorluklar, biyoteknolojik yöntemleri ön plana çıkarmaktadır. Transkriptomik ve proteomik yaklaşımlar hastalıklara karşı dayanıklılık mekanizmalarının daha net anlaşılmasını sağlamaktadır (Plett ve Martin 2018). Ayrıca bitkilerde bulunan hassaslık genleri üzerinde mutasyon meydana getirilerek *S* genlerinin fonksiyonlarının kaybetmesi sağlanmaktadır. Bu sayede bitkilere istenilen dayanıklılık kazandırılmaktadır. En etkili gen düzenleme tekniği olan CRISPR/Cas9 ile bu dayanıklılık, klasik ıslahla karşılaştırıldığında bitkilere çok daha kısa sürede kazandırılmaktadır. Buna en iyi örnek ise, Nekrasov vd. (2017) tarafından yalnızca 11 ayda geliştirilmiş olan, transgen içermeyen ve külemeye dayanıklı domates çeşidi *Tomelo*'dur. Bu örnek, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde biyoteknolojik

yöntemlerin gelecek yıllarda, bitki ıslahında çok daha yoğun kullanılacağını göstermektedir.

Hıyarda bulunan *MLO1*, *MLO8* ve *MLO11* genlerinin, küllemeye karşı duyarlılığı arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Berg vd. 2015; Berg vd. 2017). Bu nedenle çalışma kapsamında, bu genler üzerinde CRISPR/Cas9 yöntemi ile mutasyon meydana getirilerek, *MLO*-mutant hıyar bitkileri elde edilmiştir. Elde edilen *MLO*-mutant ADR27 bitkileri hem transkriptomik analizler hem de dayanıklı çeşit geliştirmek amacı ile kullanılabilir.



6. SONUÇLAR

P. xanthii'nin hıyarda neden olduğu külleme hastalığı, üretim sırasında verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır. Küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının bilinmesi, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında, dayanıklı Meltem çeşidi, tolerant VT18 hattı ve hassas Çamlıca Yerel çeşitleri arasındaki *P. xanthii* karşı savunmada rol oynadığı düşünülen genler, PCR ve RT-PCR ile karşılaştırılmıştır.

Csa_5G451650 geni, calmodulin binding protein PICBP (Kalmodulin bağlayan protein PICBP)'i kodlamaktadır. Hassas ve tolerant hıyarlarda, *Csa_5G451650* geninin varlığı PCR ile doğrulanmıştır. Ancak dayanıklı Meltem'de bu genin bulunmadığı görülmektedir. Bu nedenle Meltem'deki bu farklılığın, küllemeye karşı duyarlılığı azalttığı sonucuna varılmaktadır.

Çalışmada belirlenen genlerin, hassas, tolerant ve dayanıklı hıyarlarda, küllemeye karşı farklı savunma sistemlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu mekanizma çeşitler arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca bazı genlerin, küllemeye karşı konukçu savunmasını, negatif yönde düzenlediği ve duyarlılığı arttırdığı öne sürülmüştür. *Csa_5G451650* geninin, kalmodulin bağlayıcı bir protein olup, küllemeye karşı hassaslığı arttırdığı öne sürülmüştür. Son yıllarda *R* genlerine alternatif olarak *S* genlerinin tanımlanmasının da önemi arttığı düşünüldüğünde, *Csa_5G451650* geni gelecekte yapılan çalışmalarda karakterize edilebilir.

RT-PCR ve Trypan Blue+DAB boyama ile yapılan mikroskopik gözlemler, VT18 hattında, külleme enfeksiyonu sonrasında ROS birikiminin arttığını ve HR gerçekleştiğini göstermektedir. Bu mekanizma, obligat biyotrof patojen *P. xanthii*'nin gelişimini yavaşlatmasına rağmen, hastalık belirtilerinin oluşmasını önlemekte yeterli olmamıştır. HR görülmemesine rağmen, *P. xanthii*'nin neden olduğu belirtiler en az Meltem'de görülmüştür. Meltem'deki dayanıklılığın HR'den ziyade hücre duvarı kalınlaşması ile ilişkili genlerin ifade olması ile ilişkili olduğu çalışmada gösterilmiştir. Bu yolla gerçekleşen dayanıklılık reaksiyonunun, HR'dan daha etkili olduğunu göstermektedir.

Serine/Threonine-protein Kinase D6PKL1 ve *receptor-like kinase NFP* genlerinin inokulasyon sonrasında dayanıklı ve tolerant çeşitlerde ekspresyon seviyelerinin artmıştır. Bu nedenle *NFP* ve *D6PKL1*'in, *P. xanthii*'nin tanınmasında aday reseptör genler olabileceği öne sürülmektedir. Ancak *Serine/threonine STN7*'nin dayanıklı çeşitte, inokulasyon sonrası ekspresyon seviyesinin *D6PKL1* ve *NFP*'ye göre daha fazla arttığı belirlenmiştir. Bu nedenle *STN7*'in, Meltem tarafından, *P. xanthii*'nin tanınmasında, daha olası bir reseptör olduğu düşünülmektedir.

Hıyarda poligalakturonaz inhibe edici proteini (PGIP) kodlayan genlerden biri olan *Cucsa.038100.1*'in, hassas çeşit Çamlıca'da külleme inokulasyonu sonrasında ekspresyon seviyesinde değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Bu da külleme etmeninin Çamlıca üzerinde neden çok hızlı geliştiğini göstermektedir.

Cinnamyl alcohol dehydrogenase ve *Callose synthase* genlerinin ekspresyon seviyelerinin külleme inokulasyonu sonrasında Meltem’de yüksek oranda indüklendiği görülmüştür. Bu genlerin bitki hücre duvarının güçlendirilmesi ile ilişkili olduğu düşünüldüğünde, Meltem’deki dayanıklılığın bu mekanizma ile ilişkili olduğu öne sürülebilir.

WRKY22’nin inokulasyondan 1 gün sonra dayanıklı ve tolerant hıyarda ekspresyon seviyesinin arttığı bulunmuştur. Bu nedenle, *WRKY22*’nin enfeksiyonun ilk aşamalarında savunmanın düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmektedir.

Tez sonucunda, küllemeye karşı dayanıklılıkta model bitki olan *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde küllemeye karşı dayanıklılıkta rol oynayan genlerden bazılarının, hıyarda da küllemeye karşı dayanıklılıkta rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genler *Callose sythase*, *Serine/Threonine-protein Kinase D6PKL1*, *glycerol kinase* ve *Cinnamyl alcohol dehydrogenase* genleridir.

Farklı fungal patojenlere karşı savunma mekanizmasında rol oynayan genlerin, külleme enfeksiyonu sonrasında da dayanıklı çeşitte indüklendiği bulunmuştur. *STN7*, *NFP* ve *WRKY22*, KEGG Pathway Database’de bitki patojen interaksyonu sinyal yolunda rol oynadığı belirtilen genlerdir. Bu genlerin dayanıklı çeşitte külleme enfeksiyonu sonrasında indüklendiği gösterilmiştir. *Polygalacturonase inhibitor* geninin de hıyarda inokulasyon sonrasında dayanıklı ve tolerant çeşitlerde indüklenmesi, bu genin diğer patojenlere karşı savunmada rol oynadığı gibi külleme hastalığına karşı savunmada da rol oynadığını göstermektedir.

RT-PCR ve PCR sonuçları, hıyarda külleme dayanıklılık mekanizmaları ile ilgili bilgiler vermektedir. Çalışmada külleme dayanıklılık mekanizmalarını daha anlaşılır kılacak veriler elde edilmiştir. Gen ekspresyon seviyesinin çeşitler arasındaki farklılığın nedeninin anlaşılması için farklı çeşitlerde ifade olan gen sekanslanabilir. Bu sayede farklılığın gDNA’daki mutasyonlardan kaynaklanıp kaynaklanmadığı belirlenebilir.

Ayrıca çalışmada, CRISPR/Cas9 yöntemi ile hıyarda hassaslıkla ilgili olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenen *MLO1*, *MLO8* ve *MLO11* genleri üzerinde mutasyon meydana getirilmiştir. Bunun için dizayn edilen gRNA ve diğer bileşenleri içeren plazmit, *E. coli* hücrelerine aktararak çoğaltılmış ve yeniden izole edilmiştir. Ardından *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 içerisine aktarılan plazmit, her aşamada doğrulanmıştır. Daha sonrasında, küllemeye hassas ADR27 hıyar hattından bitkilere transformasyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan glufosinate-ammonium seleksiyonu ve PCR işlemi sonucunda transforme olan bitkiler seçilmiştir. Bu sayede gelecek yıllarda transkriptomik çalışmalarda ve dayanıklı çeşit geliştirilmesinde kullanılmak üzere *MLO*-mutant bitkiler elde edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Adam, L. and Somerville, S. C. 1996. Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 9: 341-356
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N. F., Reinstädler, A., Lotti, C., De Giovanni, C., Ricciardi, L., Lindhout, P., Visser, R., Theres, K., & Panstruga, R. 2008. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 21(1), 30–39.
- Barnes W. C., 1961. Multiple disease resistant cucumbers. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 77: 417–423.
- Berg, J. A., Appiano, M., Santillán Martínez, M., Hermans, F. W., Vriezen, W. H., Visser, R. G., Bai, Y., & Schouten, H. J. 2015. A transposable element insertion in the susceptibility gene CsaMLO8 results in hypocotyl resistance to powdery mildew in cucumber. *BMC plant biology*, 15, 243.
- Berg, J. A., Appiano, M., Bijsterbosch, G., Visser, R., Schouten, H. J., Bai, Y. 2017. Functional characterization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) Clade V MLO genes. *BMC plant biology*, 17, 80.
- Block, C. C., and Kathleen, K. R., 2005. Powdery mildew resistance in the U.S. national plant germplasm system cucumber collection. *HortScience* 40:416–420.
- Boutrot, F. and Zipfel, C. 2017. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Reviews of Phytopathology* 55:257–286.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., Van Eck, J. 2014. Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiol.* 166, 1292–1297.
- Cao, A., Xing, L., Wang, X., Yang, X., Wang, W., Sun, Y., Qian, C., Ni, J., Chen, Y., Liu, D., Wang, X., & Chen, P. 2011. Serine/threonine kinase gene Stpk-V, a key member of powdery mildew resistance gene Pm21, confers powdery mildew resistance in wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7727–7732.
- Cavagnaro, P. F., Senalik, D. A., Yang, L., Simon, W. P., Harkins, T. T., Kodira, D. C., Huang, S. and Weng, Y. 2010. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *BMC Genomics* 11:569.
- Chanda, B., Venugopal, S. C., Kulshrestha, S., Navarre, D. A., Downie, B., Vaillancourt, L., Kachroo, A., & Kachroo, P. 2008. Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 147(4), 2017–2029.

- Chen, Q., Yu, G., Wang, X., Menh, X., Lv, C. 2020. Genetics and Resistance Mechanism of the Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Against Powdery Mildew. *J Plant Growth Regul* 020-10075-7.
- Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S. C., & Panstruga, R. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature genetics*, 38(6), 716–720.
- Cui, H., Tsuda, K., Parker, J.E., 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol* 66:487–511.
- de Almeida Engler, J., Favory, B., Engler, G., & Abad, P. 2005. Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 112–117.
- De Lorenzo, G. and Ferrari S. 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opinion Plant Biol* 5: 295-299.
- Eckardt, N.A. 2002. “Plant Disease Susceptibility Genes?” *Plant Cell* 14(9): 1983–86.
- FAO Food and Agriculture Organization Statistics. Production/Yield quantities of Cucumbers and gherkins in Turkey <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> [Son erişim tarihi: 7 Mayıs, 2021].
- Froger, A. and Hall, J. E. 2007. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (6), 253.
- Fugieda, K. and Akiya, R. 1962. Genetic study of powdery mildew resistance and spine color on fruit in cucumber. *J Jpn Soc Horticulture Science* 31:30–32.
- Fujimura, T., S. Sato, T. Tajima, and M. Arai. 2016. “Powdery Mildew Resistance in the Japanese Domestic Tobacco Cultivar Kokubu Is Associated with Aberrant Splicing of MLO Orthologues.” *Plant Pathology* 65(8): 1358–65.
- Fukino, N., Yoshioka, Y., Sugiyama, M., Sakata, Y., Matsumoto, S. 2013. Identification and validation of powdery mildew (*Podosphaera xanthii*)-resistant loci in recombinant inbred lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Mol Breed* 32:267–277.
- Freisleben, R., and A. Lein. 1942. “Über Die Auffindung Einer Mehltaresistenten Mutante Nach Röntgenbestrahlung Einer Anfälligen Reinen Linie von Sommergerste.” *Die Naturwissenschaften* 30(40): 608.
- Gao, Y. F., Liu, J. K., Yang, F. M., Zhang, G. Y., Wang, D., Zhang, L., Ou, Y. B., & Yao, Y. A. (2020). The WRKY transcription factor WRKY8 promotes resistance to pathogen infection and mediates drought and salt stress tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Physiologia plantarum*, 168(1), 98–117.
- Guo, S.G, Zheng, Y., Joung, J.G., Liu, S.Q., Zhang, Z.H., Crasta, O.R., Sobral, B.W., Xu, Y., Huang, S.W., Fei, Z.J. 2010. Transcriptome sequencing and comparative analysis of cucumber flowers with different sex types. *BMC Genom.* 11: 384-10.1186/1471-2164-11-384.
- He, X., Li, Y., Pandey, S., Yandell, B. S., Pathak, M., Weng, Y. 2013. QTL mapping of

- powdery mildew resistance in WI 2757 cucumber (*Cucumis sativus* L.). TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik*, 126(8), 2149–2161
- Huang, S., Li, R., Zhang, Z., Li, L., Gu, X., Fan, W., Lucas, W. J., Wang, X., Xie, B., Ni, P., Ren, Y., Zhu, H., Li, J., Lin, K., Jin, W., Fei, Z., Li, G., Staub, J., Kilian, A., van der Vossen, E. A., vd. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature genetics*, 41(12), 1275–1281.
- Humphry, M., Reinstädler, A., Ivanov, S., Bisseling, T., & Panstruga, R. 2011. Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *er1* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsMLO1. *Molecular plant pathology*, 12(9), 866–878.
- Hückelhoven, R. 2005. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol Lett* 245:9–17.
- Hückelhoven, R., Cornelia D., and Karl H.K. 2003. “Overexpression of Barley BAX Inhibitor 1 Induces Breakdown of Mlo-Mediated Penetration Resistance to *Blumeria Graminis*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9): 5555–60.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., & Scheel, D. 1997. Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4800–4805.
- Jones, J. and Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- Jorgensen, I. Helms. 1992. “Discovery, Characterization and Exploitation of Mlo Powdery Mildew Resistance in Barley.” *Euphytica* 63(1–2): 141–52.
- Kalunke, R. M., Tundo, S., Benedetti, M., Cervone, F., De Lorenzo, G., & D'Ovidio, R. 2015. An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Frontiers in plant science*, 6, 146.
- Kang, L., Li, J., Zhao, T., Xiao, F., Tang, X., Thilmony, R., He, S., & Zhou, J. M. 2003. Interplay of the Arabidopsis nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3519–3524.
- Kooistra, E. 1968. Powdery mildew resistance in cucumber. *Euphytica* 17:236–244.
- Kourelis, J., van der Hoorn, Renier, A.L. 2018. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell* 30:285–299.
- Kim, M., C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Cho, M. J., & Schulze-Lefert, P. 2002a. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 416(6879), 447–451.
- Kim, M. C., Lee, S. H., Kim, J. K., Chun, H. J., Choi, M. S., Chung, W. S., Moon, B. C., Kang, C. H., Park, C. Y., Yoo, J. H., Kang, Y. H., Koo, S. C., Koo, Y. D., Jung, J. C., Kim, S. T., Schulze-Lefert, P., Lee, S. Y., & Cho, M. J. 2002b. Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein.

- Isolation and characterization of a rice Mlo homologue. *The Journal of biological chemistry*, 277(22), 19304–19314.
- Kim, S. J., Kim, M. R., Bedgar, D. L., Moinuddin, S. G., Cardenas, C. L., Davin, L. B., Kang, C., & Lewis, N. G. 2004. Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1455–1460.
- Li, Y., Qiu, L., Liu, X., Zhang, Q., Zhuansun, X., Fahima, T., Krugman, T., Sun, Q., Xie, C. 2020. "Glycerol-Induced Powdery Mildew Resistance in Wheat by Regulating Plant Fatty Acid Metabolism, Plant Hormones Cross-Talk, and Pathogenesis-Related Genes" *Int. J. Mol. Sci.* 21, no. 2: 673.
- Liu, N., Zhang, X., Sun, Y., Wang, P., Li, ., Pei, ., Li, F. and Hou, Y. 2017. Molecular evidence for the involvement of a polygalacturonase-inhibiting protein, GhPGIP1, in enhanced resistance to Verticillium and Fusarium wilts in cotton. *Sci. Rep.* 7, 39840.
- Liu, L., Yuan, X., Cai, R., Pan, J., He H., Yuan, L., Guan, Y. and Zhu, L. 2008. Quantitative trait loci for resistance to powdery mildew in cucumber under seedling spray inoculation and leaf disc infection. *J Phytopathol* 156:691–697.
- Ma, X. and Yao-Guang, L. 2016. "CRISPR/Cas9-Based Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants." *Current Protocols in Molecular Biology* 115(1): 31.6.1-31.6.21.
- Meng, X., Song, T., Fan, H., Yu, Y., Cui, N., Zhao, J. and Kexin A. 2016. A comparative cell wall proteomic analysis of cucumber leaves under *Sphaerotheca fuliginea* stress. *Acta Physiologiae Plant* 38:260.
- Miao, L., Qin, X., Gao, L., Li, Q., Li, S., He, C., Li, Y., & Yu, X. 2019. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in cucumber (*Cucumis sativus* L.), pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) and cucumber-pumpkin grafted plants. *PeerJ*, 7, e6536.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Morishita, M., Sugiyama, K., Saito, T. and Sakata, Y. 2003 Powdery mildew resistance in cucumber. *JARQ-Jpn Agric Res Q* 37:7–14.
- Nail, W.R. ve Howell, G.S. 2004. Effects of powdery mildew of grape on carbon assimilation mechanism of potted 'Chardonnay' grapevines. *HortScience* 39:1670–1673.
- Naumann, M., Somerville, S., & Voigt, C. 2013. Differences in early callose deposition during adapted and non-adapted powdery mildew infection of resistant Arabidopsis lines. *Plant signaling & behavior*, 8(6), e24408.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific Reports*, 7, (482).
- Nie, J., He, H., Peng, J., Yang, X., Bie, B., Zhao, J., Wang, Y., Si, L., Pan, Jungsong, R. and Cai, R. 2015a. "Identification and Fine Mapping of *Pm5.1*: A Recessive Gene

- for Powdery Mildew Resistance in Cucumber (*Cucumis Sativus* L.). *Molecular Breeding* 35(1): 1–13.
- Nie, J., Wang, Y., He, H., Guo, C., Zhu, W., Pan, J., Li, D., Lian, H., Pan, J. and Cai R. 2015b. Loss-of-Function mutations in CsMLO1 confer durable powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Front. Plant Sci.* 6, 1155.
- Pavan, S., Schiavulli, A., Appiano, M., Marcotrigiano, A. R., Cillo, F., Visser, R. G., Bai, Y., Lotti, C., & Ricciardi, L. 2011. Pea powdery mildew er1 resistance is associated to loss-of-function mutations at a MLO homologous locus. TAG. Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik*, 123(8), 1425–1431.
- Plett, J.M. and Martin, F. M. 2018. Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *Plant J.* 93, 729–746.
- Rejeb, I.B., Pastor, Victoria B. and Mauch-Mani, B. 2014. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants (Basel)* 3:458–475.
- Rong, W., Luo, M., Shan, T., Wei, X., Du, L., Xu, H., & Zhang, Z. 2016. A Wheat Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase TaCAD12 Contributes to Host Resistance to the Sharp Eyespot Disease. *Frontiers in plant science*, 7, 1723.
- Rubio, M., Rodríguez M.L., Ballester, A.R., de Moura M.C., Bonghi, C., Candresse, T. and Martínez G.M. 2015. Analysis of gene expression changes in peach leaves in response to Plum pox virus infection using RNA-Seq. *Mol Plant Pathol* 16:164–176.
- Ruiter de, W., Hofstede, R., de Vries, J., van den Heuvel, H. 2008. Combining QTL for resistance to CYSDV and powdery mildew in a single cucumber line. Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the 9th EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, INRA, Avignon.
- Sakata, Y., Kubo, N., Morishita, M., Kitadani, E., Sugiyama, M., Hirai, M. 2006. QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber. *Theor Appl Genet* 112:243–250.
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67.
- TC. Tarım ve Orman Bakanlığı. 2018.. Teoriden Pratiğe Kimyasal Mücadele. Dr. BİRİŞİK N. Matsa Basımevi, Ankara Sayfa, 241-241.
- Tena, G, Boudsocq, M. and Sheen, J. 2011. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 519–529.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11: 1187-1194.

- TÜİK, 2018, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=104&locale=tr> [Son Erişim Tarihi:5 Mayıs,2021].
- Tümay, A , Özgönen Özkaya, H . 2020. Antalya İlinin Bazı İlçelerindeki Sebze Alanlarında Bulunan Külleme Türlerinin Belirlenmesi . *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* , 35 (1) , 1-14 .
- Van Schie C.N., Frank, L.W. Takken, L. 2014. “Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host.” *Annual Review of Phytopathology* 52: 551–81.
- Wang, Y, Vanden, L.K., Wen, C., Wehner, T.C. and Weng, Y. 2018. QTL mapping of downy and powdery mildew resistances in PI 197088 cucumber with genotyping-by-sequencing in RIL population. *Theor Appl Genet* 131:597–611.
- Weng, Y., Johnson S. and Staub, J.E. and Huang, S. 2010. An Extended intervarietal microsatellite linkage map of cucumber, *Cucumis sativus* L. *Hortsci A Publ Am Soc Horticult Sci* 45:882–886.
- White T.J, Bruns T., Lee S. and Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (Eds.), Academic Press, Inc., New York. pp. 315-322
- Xu, H. and Heath, MC. 1998. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10: 585-598.
- Xu, Q., Xu, X., Shi, Y., Qi X. and Chen, X. 2017. Elucidation of the molecular responses of a cucumber segment substitution line carrying *Pm5.1* and its recurrent parent triggered by powdery mildew by comparative transcriptome profiling. *BMC Genomics* 18:21.
- Xu, X., Yu, T., Xu, R., Shi, Y., Lin, X., Xu, Q, Qi, X., Weng, Y. and Chen, X. 2016. Fine mapping of a dominantly inherited powdery mildew resistance major- effect QTL, *Pm1.1*, in cucumber identifies a 41.1kb region containing two tandemly arrayed cysteine-rich receptorlike protein kinase genes. *Theor Appl Genet* 129:507–516.
- Xu, X., Liu, X., Yan, Y., Wang, W., Gebretsadik, K., Qi, X., Xu, Q., & Chen, X. 2019. Comparative proteomic analysis of cucumber powdery mildew resistance between a single-segment substitution line and its recurrent parent. *Horticulture research*, 6, 115.
- Yang, L., Li, D., Li, Y., Gu, X., Huang, S., Garcia, M.J. and Weng, Y. 2013. A 1,681-locus consensus genetic map of cultivated cucumber including 67 NB-LRR resistance gene homolog and ten gene loci. *BMC Plant Biol* 13:53.
- Yüceson, M , Tek, M , Çalış, Ö . 2020. Determination and identification of powdery mildews on domestic, wild and commercial cucurbits . *Mediterranean Agricultural Sciences* , 33.
- Zhang, D., Meng, K.X., Hao, Y.H., Fan, H. Y., Cui, N., Wang, S.S. and Song, T.F.S. 2016. Comparative proteomic analysis of cucumber roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* Owen. *Physiol Mol Plant Pathol* 96:77–84.
- Zhang, P, Zhu, Y., Wang, L., Chen, L. and Zhou, S. 2015. Mining candidate genes

- associated with powdery mildew resistance in cucumber via super-BSA by specific length amplified fragment (SLAF) sequencing. *BMC Genom* 16(1):1058.
- Zhang, S.P., Liu, M.M., Miao, H., Zhang, S.Q., Yang, Y., Xie, B.Y. and Gu, X.F. 2011. QTL mapping of resistance genes to powdery mildew in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sci Agric Sin* 44:3584–3593.
- Zhang, C., Badri Anarjan, M., Win, K. T., Begum, S., & Lee, S. 2021. QTL-seq analysis of powdery mildew resistance in a Korean cucumber inbred line. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 134(2), 435–451.
- Zhang, Z., Li, X., Ma, S., Shan, N., Zhang, X. and Sui X. 2017. A Protocol for *Agrobacterium*-mediated Transformation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon explants. <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-6159/v1> [Son erişim tarihi: 07.07.2021]
- Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S., Matsuda, Y., Toyoda, H., Wolters, A. M., Visser, R. G., & Bai, Y. 2013. Loss of function in Mlo orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PloS one*, 8(7), e70723.
- Zitter, T.A, Hopkins, D.L., Thomas, C.E. 1996. Compendium of cucurbits diseases. APS Press, Saint Paul, pp. 24-159.

8. EKLER

EK-1, Gelanalyzer 19.2 Kullanılarak Analiz Edilen Her Örneğin RT-PCR Ürünlerine Ait Raw Volume Değeri ve Formüle Göre Hesaplanan Kalibre Değerler

Örnek	Raw Volume	Kalibre Değer	Örnek	Raw Volume	Kalibre Değer
CACS- Meltem iö	2764	1	PRX4- Meltem iö	1594	0.576700434
CACS- Meltem 1is	2749	1	PRX4-Meltem 1is	2621	0.953437614
CACS- Meltem 2is	2814	1	PRX4-Meltem 2is	2570	0.913290689
CACS-VT18 iö	2771	1	PRX4-VT18 iö	3570	1.288343558
CACS VT18 1is	2759	1	PRX4-VT18 1is	3902	1.414280536
CACS-VT18 2is	2701	1	PRX4-VT18 2is	3651	1.351721585
CACS-Camlica iö	2758	1	PRX4-Camlica iö	2678	0.970993474
CACS-Camlica 1is	2749	1	PRX4-Camlica 1is	2232	0.811931611
CACS-Camlica 2is	2765	1	PRX4-Camlica 2is	1607	0.58119349
STN7- Meltem iö	772	0.279305355	Catalase- Meltem iö	1473	0.5329233
STN7-Meltem 1is	3897	1.417606402	Catalase-Meltem 1is	1789	0.650782103
STN7-Meltem 2is	3453	1.227078891	Catalase-Meltem 2is	1380	0.490405117
STN7-VT18 iö	4185	1.510285096	Catalase-VT18 iö	2748	0.991699747
STN7 VT18 1is	4415	1.60021747	Catalase-VT18 1is	2723	0.986951794
STN7-VT18 2is	4317	1.598296927	Catalase-VT18 2is	2774	1.027027027
STN7-Camlica iö	2619	0.94960116	Catalase-Camlica iö	1794	0.650471356
STN7-Camlica 1is	3262	1.186613314	Catalase-Camlica 1is	2612	0.950163696
STN7-Camlica 2is	2203	0.796745027	Catalase-Camlica 2is	1722	0.62278481
CADLP- Meltem iö	1728	0.625180897	glycerol kinase- Meltem iö	1430	0.517366136
CADLP-Meltem 1is	4556	1.657329938	glycerol kinase-Meltem 1is	6529	2.375045471
CADLP-Meltem 2is	4048	1.438521677	glycerol kinase-Meltem 2is	5911	2.100568586
CADLP-VT18 iö	5159	1.86178275	glycerol kinase-VT18 iö	6208	2.240346445
CADLP-VT18 1is	4696	1.702065966	glycerol kinase-VT18 1is	6831	2.475897064
CADLP-VT18 2is	4429	1.639763051	glycerol kinase-VT18 2is	6336	2.345797853
CADLP-Camlica iö	2788	1.010877447	glycerol kinase-Camlica iö	5208	1.888324873
CADLP-Camlica 1is	3529	1.283739542	glycerol kinase-Camlica 1is	4897	1.781375045
CADLP-Camlica 2is	4199	1.518625678	glycerol kinase-Camlica 2is	5443	1.968535262
WRKY22- Meltem iö	1447	0.523516643	D6PKL1- Meltem iö	756	0.273516643
WRKY22-Meltem 1is	2704	0.983630411	D6PKL1-Meltem 1is	2012	0.73190251
WRKY22-Meltem 2is	1841	0.654228856	D6PKL1-Meltem 2is	2111	0.750177683
WRKY22-VT18 iö	3296	1.189462288	D6PKL1-VT18 iö	988	0.356549982

Ek 1'in devamı

WRKY22-VT18 1is	3768	1.365712215	D6PKL1-VT18 1is	2230	0.808263864
WRKY22-VT18 2is	3074	1.138097001	D6PKL1-VT18 2is	2256	0.835246205
WRKY22-Camlica iö	1805	0.654459753	D6PKL1-Camlica iö	756	0.274111675
WRKY22-Camlica 1is	1763	0.641324118	D6PKL1-Camlica 1is	986	0.358675882
WRKY22-Camlica 2is	1799	0.650632911	D6PKL1-Camlica 2is	1832	0.662567812
ThioF1- Meltem iö	4438	1.605643994	LRRPGIP- Meltem iö	1783	0.645079595
ThioF1-Meltem 1is	3534	1.285558385	LRRPGIP-Meltem 1is	2742	0.997453619
ThioF1-Meltem 2is	4594	1.632551528	LRRPGIP-Meltem 2is	2155	0.765813788
ThioF1-VT18 iö	5316	1.918440996	LRRPGIP-VT18 iö	3033	1.094550704
ThioF1-VT18 1is	5231	1.895976803	LRRPGIP-VT18 1is	3254	1.179412831
ThioF1-VT18 2is	1462	0.541281007	LRRPGIP-VT18 2is	4101	1.518326546
ThioF1-Camlica iö	4121	1.494198695	LRRPGIP-Camlica iö	1374	0.498187092
ThioF1-Camlica 1is	4778	1.738086577	LRRPGIP-Camlica 1is	1251	0.455074573
ThioF1-Camlica 2is	4280	1.547920434	LRRPGIP-Camlica 2is	1766	0.638698011
Callose- Meltem iö	1896	0.685962373	STRKKNFP- Meltem iö	1210	0.437771346
Callose-Meltem 1is	2760	1.004001455	STRKKNFP-Meltem 1is	1815	0.660240087
Callose-Meltem 2is	2371	0.84257285	STRKKNFP-Meltem 2is	1903	0.676261549
Callose-VT18 iö	2706	0.976542764	STRKKNFP-VT18 iö	874	0.315409599
Callose-VT18 1is	1353	0.490395071	STRKKNFP-VT18 1is	878	0.318231243
Callose-VT18 2is	976	0.361347649	STRKKNFP-VT18 2is	1996	0.738985561
Callose-Camlica iö	2132	0.77302393	STRKKNFP-Camlica iö	1230	0.445975344
Callose-Camlica 1is	1830	0.665696617	STRKKNFP-Camlica 1is	805	0.292833758
Callose-Camlica 2is	1434	0.518625678	STRKKNFP-Camlica 2is	924	0.334177215

ÖZGEÇMİŞ

Mümin İbrahim TEK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2019-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2019	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Stajyer	EGE TARIMSAL ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
2018-2018	

ESERLER

Ulusal/Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Yüceson, M , Tek, M , Çalış, Ö . (2020). Determination and identification of powdery mildews on domestic, wild and commercial cucurbits . Mediterranean Agricultural Sciences , 33 (2) , 207-214 . DOI: 10.29136/mediterranean.711786

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

TEK, M. I. And CALIS, O. 2020, Generating MLO Gene Mediated Resistance to Cucumber Powdery Mildews, II. International Agricultural, Biological & Life Science Conference Book