



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
Hassas ve Tolerant Hıyar Çeşitleri Arasında Küllemeye
Karşı Dayanıklılık Mekanizmalarının Karşılaştırılması

Proje No: FYL-2021-5501

Proje Türü

Yüksek Lisans Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Özer ÇALIŞ
Bitki Koruma Bölümü

Mümin İbrahim TEK
Bitki Koruma Bölümü

Eylül 2021

ANTALYA

TEŞEKKÜR

Bu proje Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2021-5501 no'lu proje olarak desteklenmiştir. Projeye maddi desteklerinden dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. Tez çalışması sırasında azimle başarıyla çalışan Yüksek Lisans Öğrencim Mümin İbrahim TEK'e ayrıca teşekkür ederim. Bu projenin çıktıları makale haline dönüştürülmekte olup kısa süre içinde yayımlanması planlanmaktadır.

Saygılarımla.

21.09.2021



Doç. Dr. Özer ÇALIŞ
Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	1
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	4
ÇİZELGELER DİZİNİ	5
ÖZET.....	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ / AMAÇ KAPSAM	8
2. GENEL BİLGİLER	10
3. GEREÇ YÖNTEM	15
3.1. İnokulum Kaynağı ve Moleküler Tanısı	15
3.2. Bitki Materyali ve Külleme inokulasyonu	16
3.3. Mikroskopik Gözlem (Trypan Blue ve DAB Boyama).....	16
3.4. Hedef Genlerin Seçimi.....	17
3.5. Hedef Genlere Özgü Primerlerin Dizaynı.....	19
3.6. Bitkilerden DNA İzolasyonu	20
3.7. Hıyar Çeşitleri Arasındaki Farklılıkların PCR ile Belirlenmesi	21
3.8. Bitkilerden RNA İzolasyonu.....	21
3.9. Farklı Çeşitler Arasındaki Transkriptomik Farklılıkların RT-PCR ile Belirlenmesi	22
4. BULGULAR	24
4.1. Külleme Patojeninin Tanısı.....	24
4.2. İnokulasyon Sonrasında Bitki Reaksiyonlarının Belirlenmesi	24
4.2.1. İnokulasyon sonrası Çamlıca genel durum	24
4.2.2. Çamlıca yapraklarının Trypan Blue ile boyanması	25
4.2.3. Çamlıca yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması.....	25
4.2.4. İnokulasyon sonrası VT18 genel durum	26
4.2.5. VT18 yapraklarının Trypan Blue ile boyanması	26
4.2.6. VT18 yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması.....	27
4.2.7. İnokulasyon sonrası Meltem genel durum.....	27
4.2.8. Meltem yapraklarının Trypan Blue ile boyanması	28
4.2.9. Meltem yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması	28

4.3. PCR Sonuçları.....	29
4.4. İzole Edilen RNA'ların CACS Primeri ile Kontrolü	31
4.5. RT-PCR Sonuçları	31
4.6. Kalibre değer ile çizgi grafiklerinin çizilmesi	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR	42
7. EKLER.....	47
EK-1, Gelanalyzer 19.2 Kullanılarak Analiz Edilen Her Örneğin RT-PCR Ürünlerine Ait Raw Volume Değeri ve Formüle Göre Hesaplanan Kalibre Değerler	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Küllemeye dayanıklılık ile ilgili haritalanan bölgelerin, hıyar kromozomları üzerindeki görünümü, Zhang vd. (2021)'nin çalışmasından esinlenilerek oluşturulmuştur	8
Şekil 3.2. a) Külleme ile enfekteli hıyar yaprakları; b) Külleme inokulasyonu	16
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	17
Şekil 3.5 İlgili genlere özgü primerlerin dizayn edilmesinin temsili gösterimi.....	19
Şekil 3.6. Alınan doku örneklerinin sıvı azot ile havan içerisinde ezilmesi	21
Şekil 3.8. Çamlıca, VT18 ve Meltem hıyar bitkilerinin saksılar içerisinde dikilmesi, RNA izolasyonu ve inokulasyon sonrası DAB ve Trypan Blue boyama için kullanılan bitkilerin dikimi, İS: inokulasyondan sonra, G: gün	21
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	22
Şekil 4.1. Külleme etmeninden izole edilen DNA ile yapılan PCR işlemi sonucu, Ladder: Thermo GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	24
Şekil 4.2.1. Çamlıca Yerel çeşidin inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyon yapılmayan Çamlıca Yerel hıyar bitkilerini göstermektedir.....	24
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	25
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.....	25
.....	26
Şekil 4.2.4. VT18 hattının, inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyonu yapılmayan VT18 hattı hıyarlarını göstermektedir	26
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	26
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	27
Şekil 4.2.7. Meltem çeşidinin, inokulasyondan 7 gün sonraki durumu, negatif kontrol; inokulasyon yapılmayan Meltem çeşidini göstermektedir.....	27
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	28

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.....	28
Şekil 4.3. Hedef genlere özgü primerler ve bitkilerden izole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PCR işlemi sonucu	29
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	31
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	32
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).....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. CTAB yöntemi ile külleme hastalık etmeninden DNA izolasyonu aşamaları	15
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).....	17
Çizelge 3.5. Hedef genlere özgü dizayn edilen primerlerin dizilimleri ve ürün boyutları	19

Hassas ve Tolerant Hıyar eřitleri Arasında Küllemeye Karşı Dayanıklılık Mekanizmalarının Karşılaştırılması

ÖZET

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 evre dostu yöntemdir. Küllemeye karşı dayanıklılık mekanizmalarının bilinmesi, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Bu mekanizmaların belirlenmesi amacı ile, küllemeye karşı dayanıklı Meltem eřidi, 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.

ANAHTAR KEL MELER: Dayanıklılık, Hıyar, Külleme, *Podosphaera xanthii*, Bitki savunma mekanizmaları

Comparison of Powdery Mildew Resistance Mechanisms Between Susceptible and Tolerant Cucumber Plants

ABSTRACT

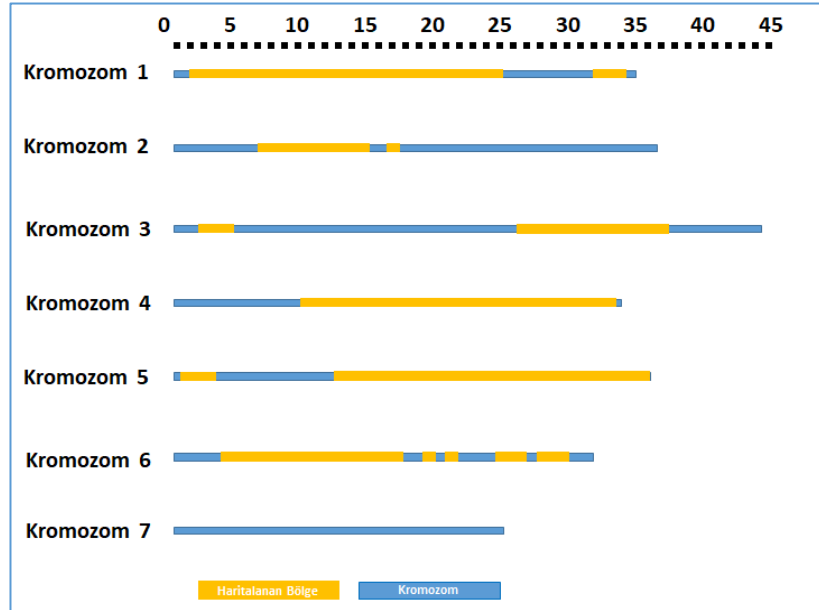
Podosphaera xanthii associated with the powdery mildew disease of cucumber, causes significant yield losses besides quality deterioration in cucumber. The development of powdery mildew resistant or tolerant varieties is the most effective and eco-friendly method of powdery mildew management. Aim of the 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.

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

1. GİRİŞ / AMAÇ KAPSAM

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).

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.

2. GENEL BİLGİLER

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.

3. GEREÇ YÖNTEM

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

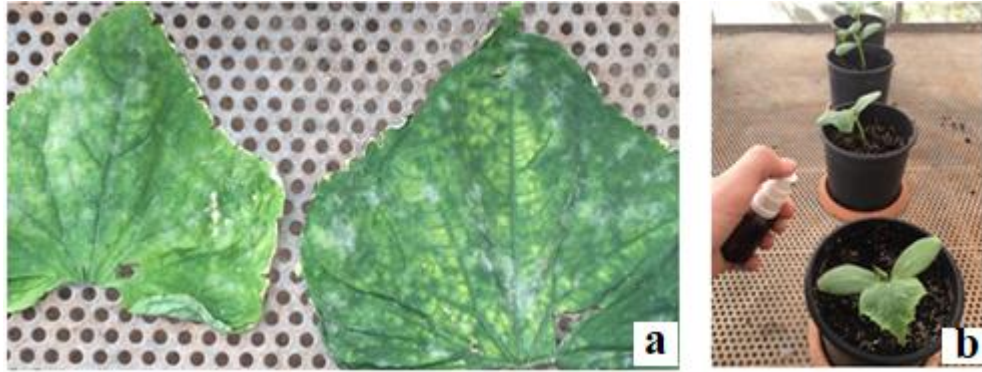
Sıra	Yapılan İşlem
1	Yüzeyden Toplanan sporlar ve miseller 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
2	%3’lük CTAB buffer solüsyonundan 100 µl tüpün içerisine eklendi.
3	Sporlar ve misellerden oluşan materyal, tüpün içerisinde steril ezme çubuğu ile ezildi.
4	Üzerine 500 µl %3’lük CTAB buffer solüsyonu 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.

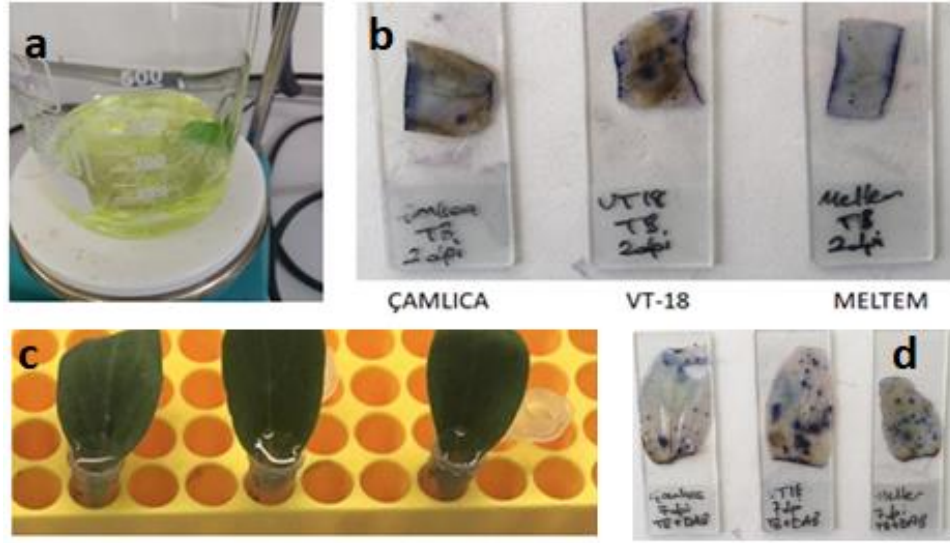


Şekil 3.2. a) Külleme ile enfekteli hıyar yaprakları; b) Külleme inokulasyonu.

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)

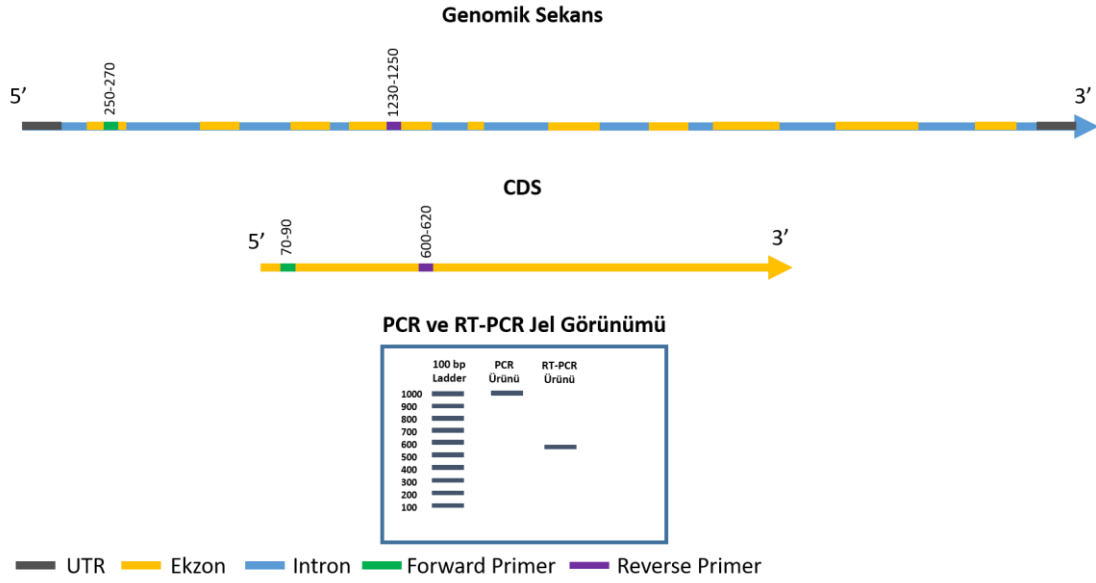
Gen	Primer	Erişim Numarası	İlişkili Mekanizma
Thioredoxin F1	ThioF1	Cusca.356300.1	Hücre Redoks Homeostazı
Thioredoxin	Thio	Cusca.077150.1	
Catalase peroxidase	Catalase	Cusca.272120.1	
Polygalacturonase Inhibitor	LRR-PGIP1	Cusca.038100.1	DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION
DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION	DRT-100	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	AAATCTCCCACGCCCACTTT	AGGCACAGCCCCAATAACAC	452	345
Catalase	GCCCTGAAACGCTCAGAGAT	GCAAGATATCCTCGGGCCAA	847	303
LRR-PGIP1	CAATCCCACCCCTTTGTGGGT	GGTTGGCAAGAGAGCTAGGG	243	243
DRT-100	CGGTTTGAACGTTGCGGAT	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	CTCGTTTCGACTCGTCCTCC	672	672
D6PKL1	TTGCAGCATGGGGTCCTTAG	CAGGTAGAAACCTGGGGCTG	1528	631
LRRSTPKRPK2	AACCTTCCTTCCCAGCTTCG	GGAAGTCCAGCAGGGGAATC	950	950
PERK10	TCCGAGACTGGCTCTTCTGA	CAAACGAGGGCTCATGGAGT	1444	477
STN7	AATCCCTGGTGCCATTCTGG	GCTATTAGCACAAAGCACGCC	1268	310
At1g35710	GGGAGGAGTTCCATCACAGC	TTCACACCTTGCCGAAATGC	823	228
STRLK-NFP	GGGCAGCTTCTGTTCATTCC	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	TAGCCTCTCCGATCCCGAAG	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	GGCGTTTTTCGTCAGAATCCG	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.



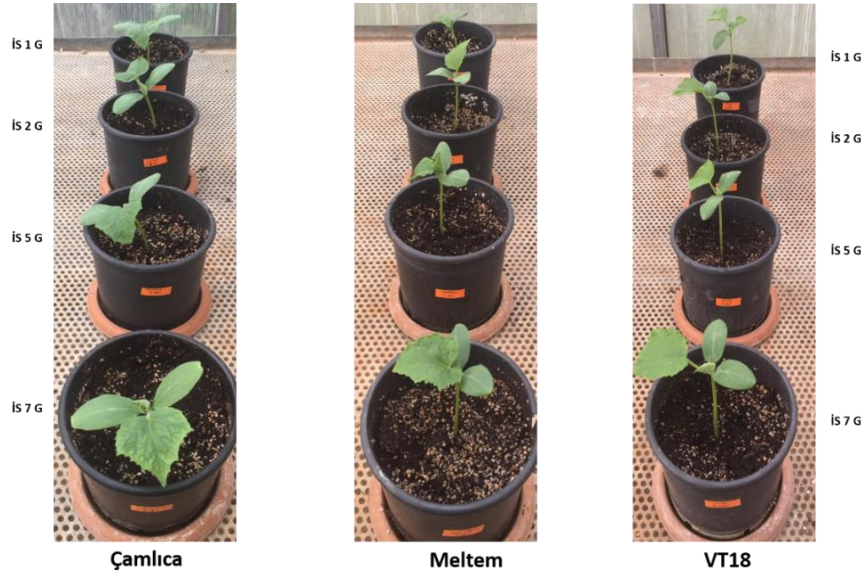
Şekil 3.6. Alınan doku örneklerinin sıvı azot ile havan içerisinde ezilmesi

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).



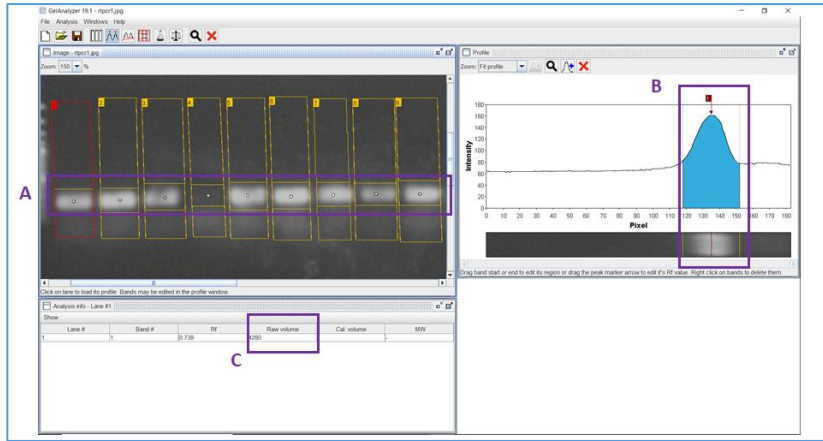
Şekil 3.8. Çamlıca, VT18 ve Meltem hıyar bitkilerinin saksılar içerisine dikilmesi, RNA izolasyonu ve inokulasyon sonrası DAB ve Trypan Blue boyama için kullanılan bitkilerin dikimi, İS: inokulasyondan sonra, G: gün

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 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.

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

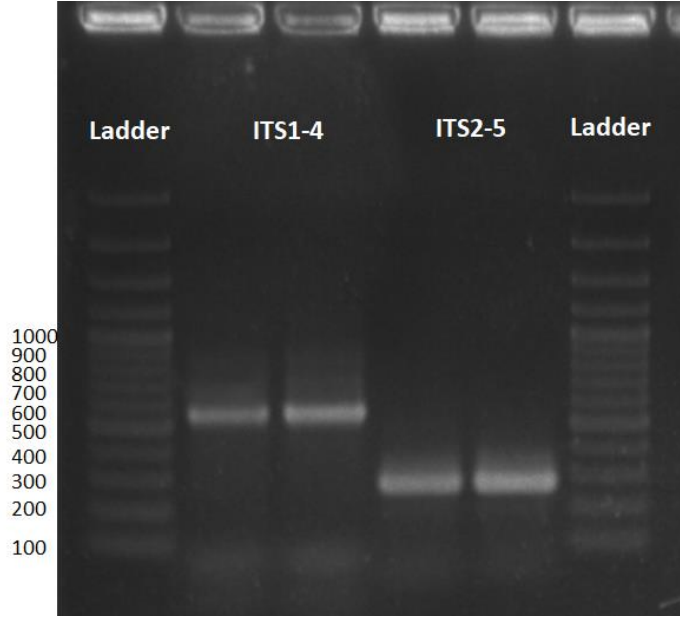
$$Kalibre\ Değer = \frac{a}{b}$$

Her değer (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 Değer hesaplanmıştır. Daha sonrasında CACS geni için kalibre edilmiş değer 1 kabul edilerek çizgi grafikleri çizilmiştir.

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

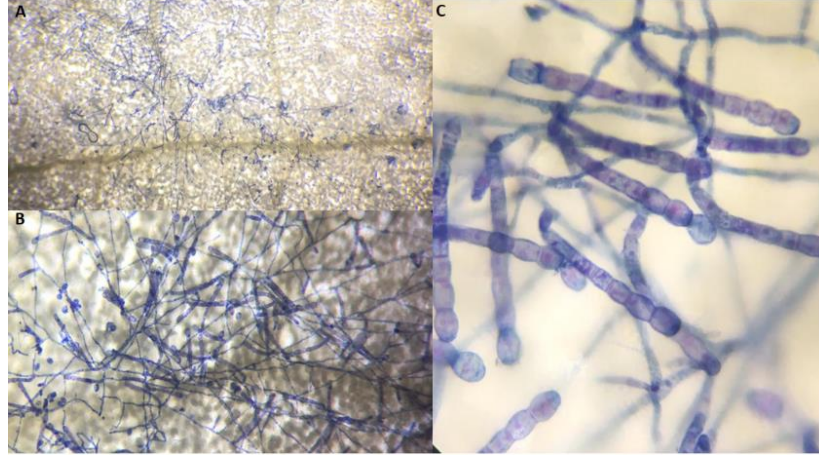
İnokulasyondan 7 gün sonra Çamlıca hıyar çeşidinde, *P. xanthii* sporlarının yaprak yüzeyini kapladığı görülmektedir. Şekil 4.2.1’de Çamlıca Yerel çeşidine ait, inokulasyondan 7 gün sonra ve inokule edilmeyen bitkiler görülmektedir (Şekil 4.2.1).



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

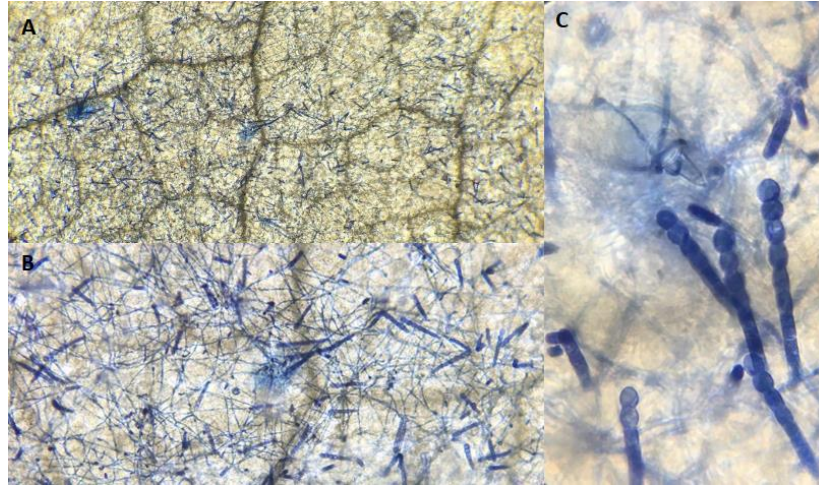
İnokulasyondan 2 gün sonra yapılan Trypan Blue boyama yöntemi ile mikroskop altında Çamlıca Yerel hıyar yapraklarında, *P. xanthii* sporlarının çoğunun çimlendiği görülmektedir (Şekil 4.2.2).



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

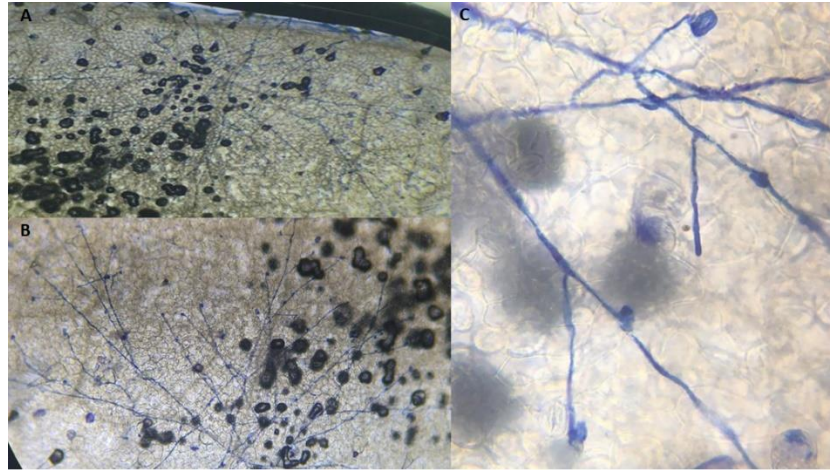
VT18 hattında ise, inokulasyondan 7 gün sonra yapraklarda *P. xanthii*'nin, Çamlıca Yerel çeşidine göre çok daha az kolonize olduğu ve bazı bölgelerde HR oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.2.4).



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

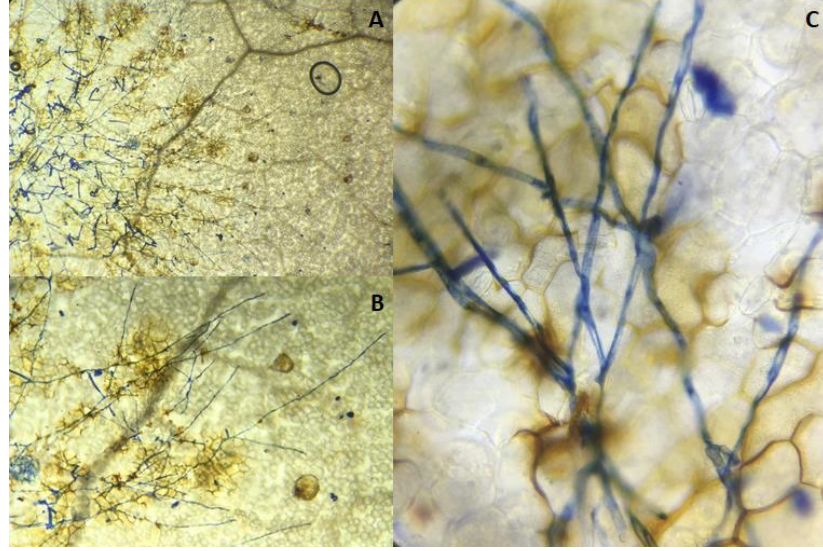
İnokulasyondan 2 gün sonra yapılan Trypan Blue boyama sonrasında mikroskop altında, VT18 yapraklarında külleme sporlarının çimlendiği görülmektedir. Ancak Çamlıca'ya göre daha az çimlenme ve spor oluşumu görülmektedir (Şekil 4.2.5).



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).



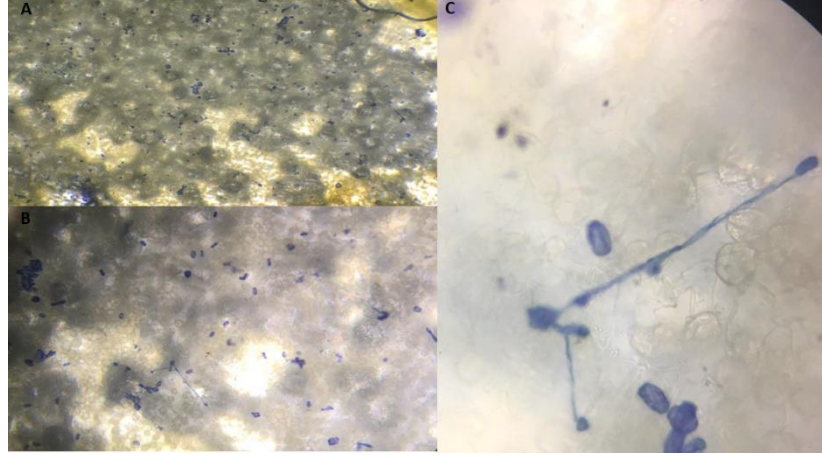
İnokulasyondan 7 gün sonra

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

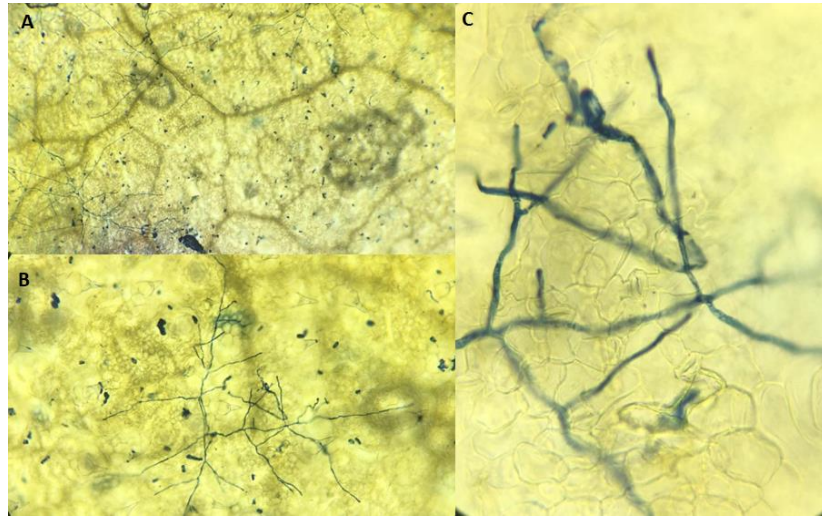
İnokulasyon sonrasında, Meltem yapraklarında *P. xanthii* sporlarının nadiren çimlendiği görülmektedir (Şekil 4.2.8).



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

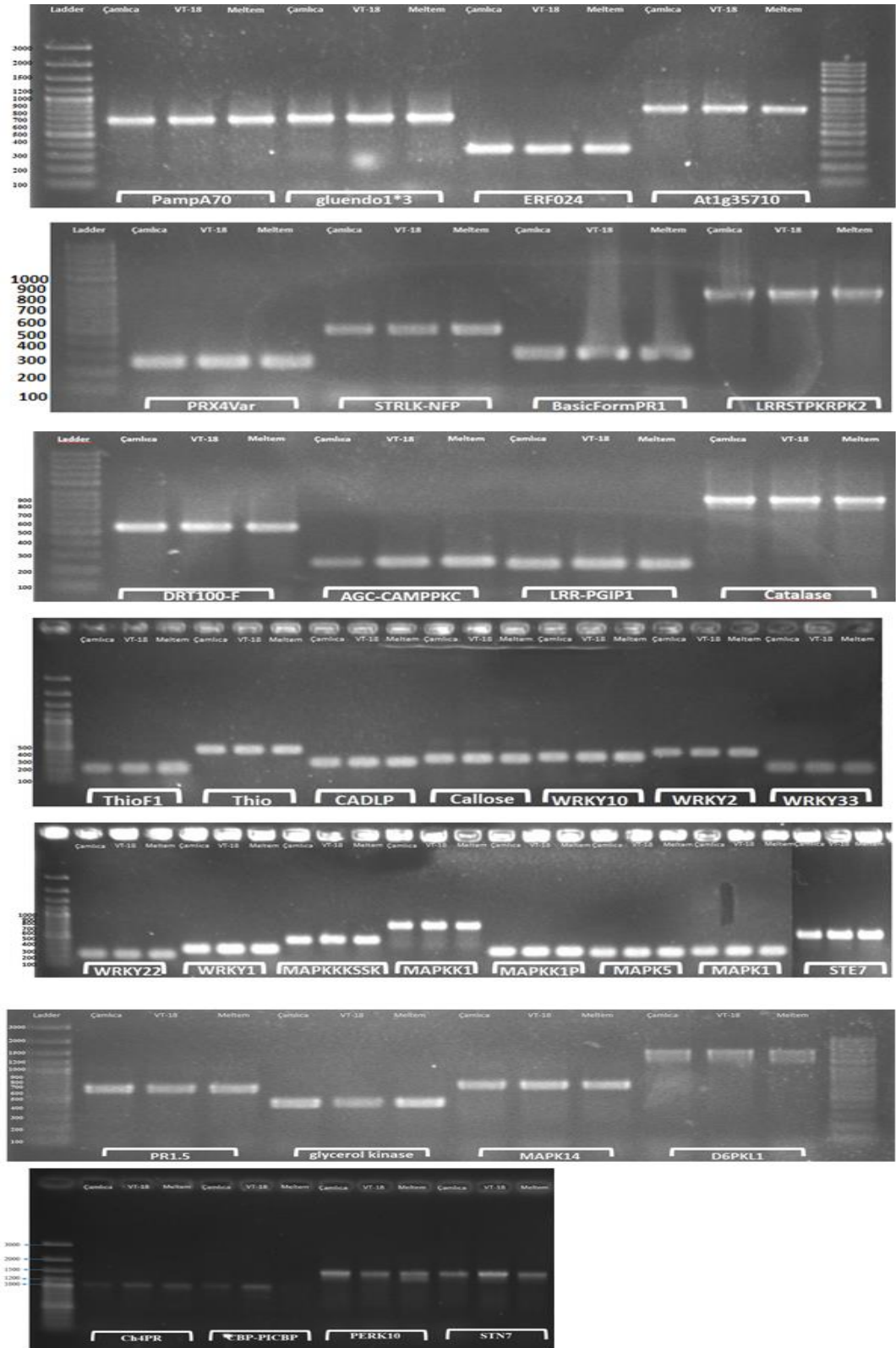
4.2.9. Meltem yapraklarının DAB+Trypan Blue ile boyanması

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.

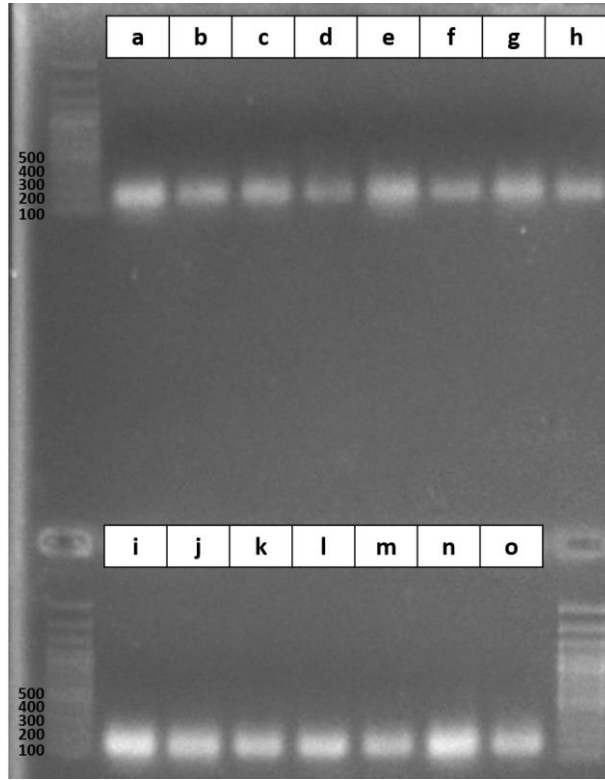
Hıyarda, MAPK sinyal yolunda rol oynayan ve bu çalışmada araştırılan genler *MAPK kinase kinase SSK2*, *MAPKK1*, *MAPKK1-MEKK1P*, *MAPK5*, *MAPK1*, *MAPK14* ve *AGC kinase* genleridir. Bu genlere özgü primerler sırasıyla; MAPKKKSSK (443 bp), MAPKK1 (755 bp), MAPKK1P (261 bp), MAPK5 (247 bp), MAPK1 (272 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, tolerat 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 tolerat 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

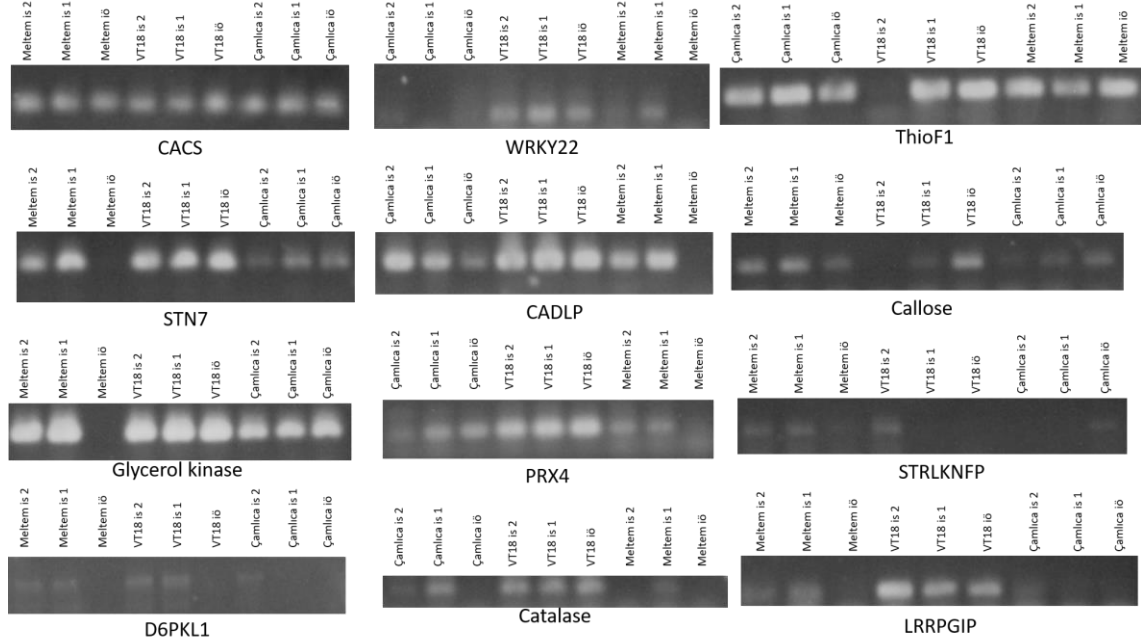
İzole edilen her RNA örneğinin, miktarı belirlenmeden önce yapılan RT-PCR sonucu Şekil 4.4'te verilmiştir. CACS primerleri ile yapılan RT-PCR sonucunda cDNA üzerinden elde edilmesi beklenen bant boyutu (171 bp) jelde görülmektedir. CACS primer çifti ve gDNA kullanılarak yapılan PCR işleminde 748 bp'de 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 sonucunda, 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 görülmemektedir (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 (iö: 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).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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 arttırabilir (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* enfeksiyonun yayılmasını engellemektedir.

Meltem’de ise ROS ve HR görülmemesine rağmen, küllenmenin 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 külemeye duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca *in-vivo* koşullarda, MLO proteinindeki kalmodulin bağlama 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* interaksyonunda aday bir reseptör olabilir.

Çalışma kapsamında ekspresyon seviyeleri belirlenen, KEGG Pathway Database içerisinde, bitki patojen interaksyonlarında 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 interaksyon 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 *Cucsa.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 interaksyonu yolağında, hıyar bitkisinde fungal patojenlere karşı dayanıklılıkta rol oynayan gen olarak belirtilmiştir. İnokulasyon sonrasında dayanıklı bitkide, ekspresyon seviyesi artarken, hassas olan Çamlıca'da ekspresyon seviyesi düşmüştür. VT18'de en yüksek ekspresyon seviyesi olmasına rağmen, bu genin *P. xanthii* ile indüklenmediği görülmektedir. Bu nedenle, *Csa_6G338110* doğrudan küllemeyle 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 fungal 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 külleme enfeksiyonu ile indüklenmediği görülmektedir. *Cucsa.219440.1*'in hassas, tolerant 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, külleme karşı da sentezlendiği görülmektedir.

Çalışmada ekspresyon seviyeleri belirlenen, patojenlere karşı savunma ile ilişkili proteinlerden sonuncusu Callose proteini. 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 külleme karşı dayanıklılığı sağladığı belirtilmiştir (Nauman vd. 2013). *Arabidopsis*'te olduğu gibi, dayanıklı Meltem çeşidinde, Callose ekspresyonunun külleme inokulasyonu sonrası indüklendiği, tolerant ve hassas çeşitlerden daha yüksek seviyede ifade olduğu görülmektedir. Dayanıklı ve tolerant 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,

H₂O₂'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 külleme 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 değişme 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 külleme 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 külleme enfeksiyonun ilk aşamalarında, savunma sinyal yolunun düzenlenmesinde, aday bir gen olduğunu göstermektedir.

Proje kapsamı sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar;

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, külemeye karşı duyarlılığı azalttığı sonucuna varılmaktadır.

Çalışmada belirlenen genlerin, hassas, tolerant ve dayanıklı hıyarlarda, külemeye karşı farklı savunma sistemlerinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu mekanizma çeşitler arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca bazı genlerin, külemeye karşı konukçu savunmasını, negatif yönde düzenlediği ve duyarlılığı arttırdığı öne sürülmüştür. *Csa_5G451650* geninin, kalmodulin bağlayıcı bir protein olup, külemeye 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 hıyarlarda ekspresyon seviyesinin arttığı bulunmuştur. Bu nedenle, *WRKY22*'nin enfeksiyonun ilk aşamalarında savunmanın düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmektedir.

Tez sonucunda, külemeye karşı dayanıklılıkta model bitki olan *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde külemeye karşı dayanıklılıkta rol oynayan genlerden bazılarının, hıyarda da külemeye 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 interaksiyonu 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.

6. 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
- Barnes W. C., 1961. Multiple disease resistant cucumbers. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 77: 417-423.
- 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.
- 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.
- 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 Lorenzo, G. and Ferrari S. 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* 5: 295-299.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hückelhoven, R. 2005. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiol Lett* 245:9–17.
- 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.
- 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 polygalacturonaseinhibiting 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.
- 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., Sugiyam, 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.
- 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.
- 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.
- 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]
- Zitter, T.A, Hopkins, D.L., Thomas, C.E. 1996. Compendium of cucurbits diseases. APS Press, Saint Paul, pp. 24-159.

7. 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	STRLKNFP- Meltem iö	1210	0.437771346
Callose-Meltem 1is	2760	1.004001455	STRLKNFP-Meltem 1is	1815	0.660240087
Callose-Meltem 2is	2371	0.84257285	STRLKNFP-Meltem 2is	1903	0.676261549
Callose-VT18 iö	2706	0.976542764	STRLKNFP-VT18 iö	874	0.315409599
Callose-VT18 1is	1353	0.490395071	STRLKNFP-VT18 1is	878	0.318231243
Callose-VT18 2is	976	0.361347649	STRLKNFP-VT18 2is	1996	0.738985561
Callose-Camlica iö	2132	0.77302393	STRLKNFP-Camlica iö	1230	0.445975344
Callose-Camlica 1is	1830	0.665696617	STRLKNFP-Camlica 1is	805	0.292833758
Callose-Camlica 2is	1434	0.518625678	STRLKNFP-Camlica 2is	924	0.334177215