



Mısır-mısır pası uyumlu interaksiyonunda ekspresyonu değişim gösteren genlerin DDRT-PCR analizi

DDRT-PCR analysis of the expressional modulation showing genes in the maize-maize rust compatible interaction

Hatice ÇILKOL^{id}, Mehmet Ali SÜDÜPAK^{id}

Yozgat Bozok Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 66100 Yozgat

Sorumlu yazar (Corresponding author): M. A. Südüpak, e-posta (e-mail): msudupak@hotmail.com

Yazar(lar) e-posta (Author e-mail): haticecilkol@gmail.com

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 20 Ocak 2020
Düzeltilme tarihi 26 Mayıs 2020
Kabul tarihi 26 Mayıs 2020

Anahtar Kelimeler:

Zea mays
Puccinia sorghi
Uyumlu interaksiyon
Gen ekspresyonu
RT-qPCR

ÖZ

Bitki-mikrop interaksiyonlarında ekspresyonu değişim gösteren genlerin tanımlanması, konukçu direnci ve duyarlılığında gerçekleşen fizyolojik değişimler ve bunlardan sorumlu genetik faktörler ve mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Mısır (*Zea mays*) ve mısır pası (*Puccinia sorghi*) uyumlu interaksiyonunda gerçekleştirdiğimiz çalışmada, ekspresyonu değişim gösteren 98 transkript derivatifi fragment (TDF) tanımlanmıştır. Klonlanarak sekans karakterizasyonu yapılan 72 TDF ile gerçekleştirilen GenBankası taramaları, münferit etiketler için bir veya daha fazla benzer kayıt bulunduğunu göstermektedir. Genel olarak, TDF'lerin yaklaşık yarısının fonksiyonu bilinen genlerin sekanslarına benzer olduğu ve bunların önemli bir bölümünün bitki-patojen interaksiyonlarında ekspresyonu değişim gösterenler oldukları tespit edilmiştir. Bunlar arasında, karbonik anhidraz, Bip2, An2, ARP ve ASR3 proteinlerini kodlayan genlere benzerlik gösteren TDF'ler bulunmaktadır. TDF'lerin kalan bölümü, diğer stres yanıtlarıyla ilgili olanlar ve karakterize edilmemiş/hipotetik protein kodlayan sekanslara benzerlik göstermektedir. *ZmBip2*, *ZmCA*, *ZmALDH*, *ZmARP* ve *ZmARPP3* genleri için RT-qPCR primerler tasarlanarak kontrol ve enfekte materyalde ekspresyon teyitleri yapıldı. *ZmCA* hariç, diğerlerinin tespitlerinde gözlenen ekspresyon değişimleri doğrulandı. Sınırlı sayıda TDF çalışılmış olmakla birlikte, belirli fonksiyonlarla ilişkili olanlarla birlikte fonksiyonu bilinmeyenler, çalışılan patosistem uyumlu interaksiyonunda ekspresyonu modülasyon gösteren genler olarak tanımlanmıştır.

ARTICLE INFO

Received 20 January 2020
Received in revised form 26 May 2020
Accepted 26 May 2020

Keywords:

Zea mays
Puccinia sorghi
Compatible interaction
Gene expression
RT-qPCR

ABSTRACT

Differential display analyses of expressional modulations occurring in plant-microbe interactions provide valuable information about the physiological changes and underlying genetic factors and mechanisms involved in host resistance and susceptibility to disease. We carried out a differential display analysis study in the compatible interaction of *Z. mays* and *P. sorghi* and identified 98 Transcript Derived Fragments (TDFs) as expressional modulation showing tags. 72 TDFs were cloned and sequenced. Sequence database similarity searches revealed that there is at least one close matching GenBank record for each TDF. Compiled results showed that approximately half of the TDFs were derived from genes with known functions, about a half of which are known to display expressional modulations in plant-microbe interactions. CA, BiP2, An2, ARP1 and ASR3-like protein encoding sequence similar TDFs constituted the prominent examples of this group. A large proportion of TDFs were found to be similar to uncharacterized/hypothetical protein encoding GenBank records. RT-qPCR primers were designed for *Bip2*, *CA*, *cALDH*, *ARP* and *Arpp3* genes to verify their observed expressional modulations, which were generally confirmed except for CA. Although a limited number of TDFs were characterized, overall, the results provide an overview to the expressional modulation showing genes in the compatible interaction of the studied pathosystem.

1. Giriş

Bitki savunma yanıtları esas olarak hücresele düzeyde, innate (doğuştan gelen) immünite formunda etkin olup, önceden oluşturulan ve sonradan aktive olan (indüklenen) mekanizmalarla lokal ve sistemik olarak sağlanmaktadır. Pasif ve indüklenen direnç olarak ta tanımlanan bu mekanizmalardan, pasif direnç hücre duvarından vaks örtüsüne, trikomlara ve antimikrobiyal bileşiklere geniş bir yelpazede fiziksel ve biyokimyasal bariyerlerden oluşmaktadır (Dickinson 2005; Bigeard ve ark. 2015). Özelleşmiş patojenler bu fiziksel ve biyokimyasal bariyerleri aşarak enfeksiyon oluşturabilmekte, bu aşamada, çok katmanlı indüklenen savunma yanıtlarının etkinliğine bağlı olarak sonuç, hastalık gelişimi veya konukçu direnci olabilmektedir.

Bitkilerin patojen saldırılarına karşı koymasında fonksiyonel olan (biri elisitörle, diğeri efektörle) indüklenebilir iki savunma katmanı ayırt edilmektedir. Bir ilk basamak savunma katmanını mikrobiyal temasla aktive olan plazma membran reseptörleri, PRR'ların, (Pattern Recognition Receptors) patojen orijinli (elisitörleri) moleküler motifleri, PAMP'ları (Pathogen-Associated Molecular Patterns) algılamasıyla indüklenen, PAMP ile tetiklenen immünite, PTI oluşturmaktadır (Jones ve Dangl 2006). Bazal direnç veya onun bir parçası olarak tanımlanan bu ilk basamak savunma yanıtını patojenler kodladıkları efektörlerle baskılayarak hastalık oluşturabilmektedirler. Efektörle tetiklenen duyarlılık, ETS (Effector-Triggered Sensitivity) olarak tanımlanan durum, efektörü direk veya dolaylı olarak (guard üzerinden) tanyan bitki direnç geni proteini bulunması (ortaya çıkışı) durumunda, bir diğere savunma katmanı aktive olmaktadır. Efektörle Tetiklenen İmmünite, ETI (Effector-Triggered Immunity) (Jones ve Dangl 2006) denen bu savunma katmanı, PTI sonrası veya birlikte bitki savunmasını sağlamaktadır. ETI, patojen ve konukçu genoptilerinde, karşılıklı gen çiftlerince kodlanan spesifik ürünler arasında, sadece özgün tanıma durumunda tetiklenen bir savunma yanıtı olup, alternatifli durumlarda, hastalık gelişimi/konukçu duyarlılığı ortaya çıkmaktadır. Bir genetik motif olarak bu savunma yanıtı, Flor tarafından 1942'de gene-karşı-gen (gene-for-gene) interaksyonu olarak tanımlanmıştır (Flor 1971). ETI yanıtı, enfeksiyon bölgesinde lokalize hücre ölümüyle patojen gelişiminin sınırlandırıldığı Hipersensitif Reaksiyon (HR) (Greenberg 1997; Heath 2000) ve aktive edilen diğere savunma yanıtlarıyla, PTI'ya göre çok daha etkin, yükseltilmiş spesifik bir konukçu direnci sağlamaktadır (Gebrie 2016).

Bitkilerin patojenleriyle teması ve kolonize edilmeleri, genel olarak genom ekspresyonu değişimleriyle orkestra edilen fizyolojik, metabolik, yapısal birçok modifikasyonun da eşlik ettiği konukçu savunma veya duyarlılığını ortaya çıkarmaktadır. İnteraksiyona giren her iki organizmada gerçekleşen transkripsiyonel modülasyonların karakterizasyonu, hastalık mekanizmalarından muhtemel hastalık kontrol noktalarının tanımlanmasına, birçok yönden katkı sağlayan çalışmalar olmaktadır (Rezzonico ve ark. 2017). Mikroarrayden derin transkriptom sekanslamaya bir dizi transkriptom analiz tekniği, patosistem transkriptomlarının karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Elde edilen bilgiler, konukçu organizmanın mikrobiyal sinyalleri algılamasından fizyolojisinde gerçekleşen değişimlerin duyarlı ve dirençli genotiplerde karakterizasyona, konukçu duyarlılığı ve savunma yanıtlarının indüksiyonunda rol oynayan mekanizmaların belirlenmesine kadar geniş bir yelpazede bilgiler sağlamaktadır (Wise ve ark. 2007; Lodha ve Basak 2012). Jel esaslı DDRT-PCR (Liang ve Pardee 1992)

cDNA-AFLP (Bachem ve ark. 1996) teknikleri, diğere taraftan kapsamlı ve büyük ölçekli metotlara ekonomik alternatifler olarak kullanım bulmakta ve ön sekans bilgisi olmadan tüm genomlara uygulanabilmektedir.

P. sorghi, tropik ve subtropik bölgelerde yaygın görülen ve enfeksiyon düzeyine bağlı olarak %40'a varan verim kayıplarına neden olan önemli bir problemdir (Sahah ve Dillard 2006). Pasın farklı ırklarına savunmayı sağlayan çok sayıda direnç geni tanımlanmıştır (Hulbert 1997) ve pas kontrolünde kullanılmakla birlikte, patojen virülansı ve konukçuda gerçekleşen olaylarla ilgili bilgiler sınırlıdır. Bu alanda yapılan çalışmalarda uyumsuz (incompatible) interaksyonları ve konukçu direnç mekanizma ve faktörleri daha fazla ilgi görmektedir ve uyumlu (compatible) interaksyonlar az sayıda çalışmaya konu olmuştur. Duyarlı genotipte gerçekleşen olayların karakterizasyonu, hastalık gelişimi, konukçu metabolizma ve fizyolojisinde gerçekleşen olayların belirlenmesi açısından önemlidir (Rezzonico ve ark. 2017). Mevcut çalışma, *P. sorghi-Z. mays* patosistemi uyumlu interaksyonunda ekspresyonu pas inokülasyonu ile modülasyon gösteren mRNA etiketlerinin DDRT-PCR tekniğiyle tanımlanması, transkripti oldukları genlerin belirlenerek interaksyonda rollerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Biyolojik materyal ve RNA izolasyonu

Çalışmada pas izolatu T09 ve üzerinde virulent olduğu A188 inbredi kullanılmıştır. İki set halinde yetiştirilen 7 günlük A188 fideleri kontrol ve uygulama grupları halinde tasnif edilmiş, uygulama grupları yeni hasat edilmiş pas sporları, kontrollerine sadece steril saf su uygulaması yapılmıştır. Tüm bitkiler aynı koşullarda bir gecelik soğuk nem çemberinde (%95<nem, ~24°C) tutularak enfeksiyon başlatılmış ve uygulama sabahında bitkiler ~27°C ve ~16h/8h gündüz/gece fotoperiyodunda büyümeye bırakılmıştır. Kontrol ve uygulama bitkilerinden ikişer fidenin 2. yaprak ~7 cm uç kısmı (~100 mg) 0, 12, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerinde örneklendi, sıvı azot içinde dondurularak 1.5 ml tüp içinde toz haline getirildi ve tav edilmeden 1 ml RNAzol (MRC) eklenip karıştırılarak homojenatlar hazırlandı.

DDRT-PCR, materyal örnekleri, kapsanan süre aralığı münferit homojenatlarından, kontrol, K, (0-120 h), T1 (12-48 h) ve T2 (72-120) eşit miktar materyal birleştirmeleriyle (pool edilerek) hazırlanmıştır: Birleştirilmiş materyallerden total RNA izolasyonları sağlanan MRC protokolüne göre gerçekleştirildi (Südüpak 2014). Pellet büyüklüğüyle orantılı olarak 50-100 µl DEPC suyu içinde çözülen örneklerin konsantrasyonları nanodropla ölçüldü ve yaklaşık 100 mg dokudan 60 µg total RNA elde edildi, saflık ise, 1.8-2.0 bulundu.

2.2. DDRT-PCR

RNA örneklerinden cDNA sentezi, münferit ve ortak olarak hazırlanan iki karışım kombine edilerek gerçekleştirildi: Münferit RT reaksiyonlarının RNA-primer karışımları, 37 µl DEPC muameleli-ddH₂O içinde 20 µl total RNA (~8 µg) ve 3 µl oligo-d(T)₁₁ primeri kombine edilerek 60 µl hacimde oluşturulmuş ve 5 dakika 65°C'de inkübasyonu takiben 10 dakika 37°C'ye soğutmayla hazırlandı. Bu karışıma, 40 µl ortak sentez karışımı [bileşimi 20 µl 5X Fermentas RT-H⁻ tamponu, 200 U Ribolock (Thermo-Fermentas), 10 µl dNTP karışımı (2 mM) ve 5 µl (200 U µl⁻¹) Thermo-Fermentas RT-H⁻ olan]

eklenerek teşkil edilen 100 µl hacimde ve 60 dakika 42°C'de inkübasyonla cDNA sentezleri gerçekleştirildi. Sentez sonrası, reaksiyonlar 5 dakika 95°C'ye ısıtılıp enzim inaktive edilerek -20°C'de muhafaza edildi. Sentez ürünlerinin 1:1 seyreltmeleri 2 µl'si mRNA-DDRT-PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanıldı.

Münferit DDRT-PCR reaksiyonları 15 µl hacimde standart protokol izlenerek hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımlarında amplifikasyon, 94°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu sonrasında her biri 94°C'de 30 sn denatürasyon, 42°C'de 30 sn primer bağlanması, 72°C'de 1 dakika zincir uzatımından oluşan 35 döngü PCR ve 72°C'de 5 dakika son uç doldurmadan oluşan programla gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımlarına sonra yükleme boyası eklenmiş, 94°C'de 3-4 dakika bekletilerek ampliconlar denatüre ve konsantrite edilmiştir. Takiben örnek 5 µl'si 75 W'ta 10-15 dakika ön yürütmeyle 45-50°C'ye ısıtılmış %6'lık denatüre edici 0.5X TBE PAGE (19:1) jellerinde 50 W, ~50°C'de 90-100 dak. yürütülmüştür. Yürütme boyası, XC jel tabanına ~15 cm mesafeye gelince koşturma durdurularak jel soğutulup açılmış ve 1 litre %10'luk asetik asit solüsyonunda 20-30 dakika fikse edilerek gümüş boyamayla ampliconlar jel içinde görünür hale getirilmiştir.

2.3. TDF'lerin klonlanması ve sekanslanması

Ekspresyonel değişim gösteren bandlar jellerden toplanarak elüt edildi. Elüt 3 µl'siyle 25 µl re-amplifikasyon PCR'ları DDRT-PCR deneylerindeki konsantrasyonlar ve parametrelerle gerçekleştirildi. PCR ürünleri purifiye edilerek klonlanmaları, linear pTZ57 veya pUC18 T-vektörlerinden biri içine ligasyon ve *E. coli* JM107 hücrelerine transformasyonla gerçekleştirildi. Rekombinant kolonilerden duruma göre plazmid izolasyonu veya koloni-PCR ile etiketler hazırlandı ve hizmet alımıyla sekanslatıldı. Sekansların benzerlik taramaları genbankası veri tabanlarında (NCBI, maizGDB, vb.) gerçekleştirildi ve en yakın benzerleri dikkate alınarak gen ve fonksiyon tanımlamaları yapıldı.

2.4. RT-qPCR

RT-qPCR çalışmaları için materyal, daha önce tanımlandığı şekilde, iki biyolojik tekrar olarak kontrol gruplarıyla birlikte yetiştirildi. Fideler yeni toplanmış pas sporlarıyla inoküle edilerek, 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 inokülasyon sonrası saatlerde yukarıda tanımlandığı gibi örneklendi ve münferit örneklerden RNA izolasyonları 100 mg ml⁻¹ ölçeğinde gerçekleştirildi. RNA'nın DNaz I muamelesi, oligo(dT) primeriyle cDNA

sentezi ve diğer manipülasyonlar daha önce tanımlandığı şekilde, aynı enzim ile diğer bileşenler ve protokoller kullanılarak gerçekleştirildi. İki aşamalı qPCR çalışmalarının RT-qPCR aşamasında, AMPLIQON Real Q-Plus/WO ROX 2x Green karışımı kullanıldı. Reaksiyonlar, 10 µl Real Q plus ile birlikte her biri 10 pmol ileri/geri gen spesifik primerler ve 50 defa seyreltilmiş cDNA kalıbının 3 µl'si 6 µl ddH₂O içinde kombine edilerek 20 µl hacimlerde hazırlandı. RT-qPCR programı; 95°C'de 15' HotStart DNA polimeraz, TEMPase aktivasyonunu takiben, her biri, 94°C'de 20 sn denatürasyon, 59°C'de 20 sn primer bağlanması ve 72°C'de 30 sn zincir uzatımı sıcaklık ve süre segmentlerinden teşkil edilen 40 döngüden oluşmuştur. Qiagen Rotor-Gene Q, Real-Time termal döngüleyici önerilen koşullarda ve zincir uzatımı sonunda kit bileşimindeki (SYBR) Green boyasıyla reaksiyonların PCR ürünü sentez kinetiği monitör edilmiş ve eşik döngü değeri (Ct) hesaplanmaları yapılmıştır. *ZmActin1* (J01238.1) geninin internal kontrol ve normalizasyonda kullanıldığı bu çalışmalarda, ölçülen hedef gen kalibratör ve uygulama Ct değerleri, delta-deltaCt metoduyla (Livak ve ark. 2001), aynı deneyde paralel ölçülen referans gen Ct değerleriyle normalize edilerek kalibratöre göre relatif ekspresyonları hesaplandı.

Çalışmada tanımlanan etiketlerden bitki-mikrop interaksyonlarında rol oynadığı düşünülen beş gen (*ZmCA*, (NM_001154374.1), *ZmARP1* (EU964946.1), *ZmBip2* (NM_001112424.1), *ZmcALD* (AF348412.2), *ZmArpp3* (NM_001111919.1) ve bir referans genden, *ZmActin1* (J01238.1), orijine olan transkriptlerin kodlama veya 3' UTR bölgesinde hedef segmentleri amplifiye eden primer çiftleri web tabanlı Primer3plus (sourceforge.net/projects/primer3) programıyla tasarlandı ve çalışmada kullanıldı (Çizelge 1).

3. Bulgular

Gerçekleştirilen mRNA DDRT-PCR çalışmasında, 27 primer kombinasyonu ile ekspresyonu modülasyon gösteren 98 TDF tanımlandı ve klonlandı. Elde edilen 72 TDF sekansı ile yapılan GenBankası taramaları, 32 etiket sekansın fonksiyonu bilinen kayıtlara (Çizelge 2, Şekil 1), diğer bir 31 etiketin ise, karakterize edilmemiş/hipotetik protein kodlayan sekanslara benzerlik olduğunu göstermiştir. Kalan 9 etiketten, biri *P. graminis* Cullin 1 mRNA sekansına benzer, ikisi mısır mtDNA, biri mısır ctDNA sekansına benzerlik gösteren ve diğerleri de bakteriyel sekanslara benzer bulunmuştur. Tanımlanan genlerin bir gruplandırılması yüzdeleriyle Şekil 1'de grafik olarak verilmektedir.

Çizelge 1. Seçilen genlerin ekspresyon teyitlerinde kullanılan RT-qPCR primerleri.

Table 1. RT-qPCR primers used in expressional validation studies of the selected genes.

Genler	Primer sekansları, 5'→3' (sırasıyla, İleri / Geri primer)	Ürün (bp)	Kullanılan primer bağlanma sıcaklığı (°C)
<i>ZmActin1</i>	TTTAAGGCTGCTGTACTGCTGTAGA CACTTTCTGCTCATGGTTTAAGG	120	59
<i>ZmARP</i>	AATCGCCAATAAGCAACAAC GCCCAAAGTACAGGATGGAAAT	184	59
<i>ZmCA</i>	AGTTCTCACATGGAAAAAGTGAAA TGGGCGATTGTTGATCCGGT	195	59
<i>ZmBip2</i>	TGTTTAGGAGGGAGGGTGGT CACTGCAATGCGAATCCTCT	135	59
<i>ZmArpp3</i>	CAATGATGGTGAGCGGAGGT AGGTTACAGACAGGACAGC	219	59
<i>ZmcALDH</i>	TACAAGATGAGCGGGTTCCGG ACAGGATGAGGTCGGTCAGA	120	59

Çizelge 2. Belirli bir fonksiyonla ilişkilendirilebilen TDF'lerin listesi. Tabloda en yakın sekans benzerleriyle birlikte ekspresyon profilleri ve diğeri ilgili bilgiler listelenmektedir.

Table 2. The list of TDFs having close similarity to the genes with known functions. Accession numbers of the closest matching GenBank record, expression profiles and other related information are given in the table.

TDF	Uzunluk	Aksesyon no	En yakın sekans benzeri	E-değeri	Ekspresyon [§]		
					K	T1	T2
Stres, savunma, sinyal iletimi, büyüme-düzenleme ilişkili etiketler							
DD1	97	XM_008647554	<i>Z.m.</i> ABA stres-olgunlaşma protein 3 mRNA	8e-99	*	I	R
DD2	52	XM_008657861	<i>Z.m.</i> Lorocrin-benzeri transkript var. X2, mRNA	6e-16	+	R	R
DD3	138	EU954250.1	<i>Z.m.</i> SRC2 mRNA	1e-58	*	I	R
DD4	216	XM_008659761	<i>Z.m.</i> Filamentasyon sıcaklığa duyarlı H2A	3e-123	+	R	I
DD5	147	EU964946.1	<i>Z.m.</i> Oksinle baskılanan protein mRNA	0.0	*	I	I
DD6	45	EU973052.1	<i>Z.m.</i> Büyüme düzenleyici faktör mRNA	3e-18	*	*	*
DD7	114	XM_008653311	<i>Z.m.</i> Gamma yanıtı 1 protein mRNA varyantı X8	3e-30	+	R	R
DD8	199	XM_008650278	<i>Z.m.</i> Kauren sentaz 2 (<i>An2</i>) mRNA varyantı X1	9e-21	*	I	R
DD9	71	XM_008669566	<i>Z.m.</i> TPR motif içeren protein mRNA varyantı X1	5e-23	+	R	R
DD10	83	XM_008662088	<i>Z.m.</i> TPR içeren karakterize edilmemiş protein, mRNA	4e-13	+	R	I
DD11	140	NM_001152569	<i>Z.m.</i> Tetratrikoptid tekrar protein mRNA	1e-45	-	I	R
DD12	76	EU966630.1	<i>Z.m.</i> Tetratrikoptid tekrar protein mRNA	3e-32	-	I	R
DD13	169	XM_008675810	<i>Z.m.</i> Auxilin-ilişkili protein 1-benzeri mRNA	6e-09	+	R	R
DD14	123	NM_001112424	<i>Z.m.</i> Bip2 (ER şaperonu) mRNA	4e-30	+	I	I
DD15	176	NM_001157006	<i>Z.m.</i> Ribozom geri dönüşüm faktörü (RRF) mRNA	3e-11	+	R	R
DD16	75	NM_001111919	<i>Z.m.</i> Asidik ribozomal protein P3 (arpp3) mRNA	1e-63	*	*	*
DD17	120	EU968527.1	<i>Z.m.</i> 17.5 kDa sınıf II HSP mRNA	3e-13	*	*	*
DD18	146	XM_008646106	<i>Z.m.</i> U5 küçük nüklear ribonükleoprotein mRNA	1e-48	+	I	R
DD19	96	DQ417753.1	<i>Z.m.</i> B73 serin/treonin kinaz içeren gDNA sekansı	8e-36	+	R	R
DD20	102	NM_001111704	<i>Z.m.</i> Metile bağlanan domain protein mRNA	9e-46	*	*	*
Fotosentez, metabolizma ve transport ilişkili etiketler							
DD21	136	EU969568.1	<i>Z.m.</i> Rubisco küçük alt birim (rbcS-m3) geni	4e-32	+	R	R
DD22	294	EU965446.1	<i>Z.m.</i> Fotosistem II 22 kDa protein mRNA	4e-74	+	R	R
DD23	270	NM_001111758	<i>Z.m.</i> Fotosistem II alt birim PsbS1 mRNA	5e-99	+	R	R
DD24	95	AF467541.1	<i>Z.m.</i> Treonin dehidrataz mRNA (kloroplast formu)	0.0	+	+	R
DD25	100	NM_001154374	<i>Z.m.</i> Karbonik anhidraz (CA) mRNA sekansı	1e-56	*	I	R
DD26	66	XM_008666956	<i>Z.m.</i> Nikotinamid sentaz 3-benzeri mRNA sek.	2e-34	*	I	I
DD27	59	AF348412.2	<i>Z.m.</i> cALD (RFC2) mRNA	9e-39	+	I	I
DD28	81	X15642.1	<i>Z.m.</i> Fosfoenol pürivat (PEP) karboksilaz mRNA	2e-39	+	R	R
DD29	146	XM_008679140	<i>Z.m.</i> Siklik nükleotid kontrollü iyon kanalı mRNA	2e-60	+	R	R
DD30	136	EU954542.1	<i>Z.m.</i> ATP sentaz C zinciri mRNA'sı	6e-47	-	-	I
DD31	171	GU075813.1	<i>Z.m.</i> ATP sentaz F0 alt ünitesi 6 (atp6) mRNA	1e-72	+	I	+
DD32	96	X80820.1	<i>Z.m.</i> ABP1 mRNA (aktin-depolimerizasyon faktörü)	7e-07	+	R	R

§K; kontrol, T1; 12-48 h örnekleme aralığına sahip uygulama 1, T2; 72-120 h örnekleme aralığına sahip uygulama 2, R; Represyon, I; İndüksiyon “+”/“-”; band “var”/“yok”, “*”; kaydedilmemiş bilgi.



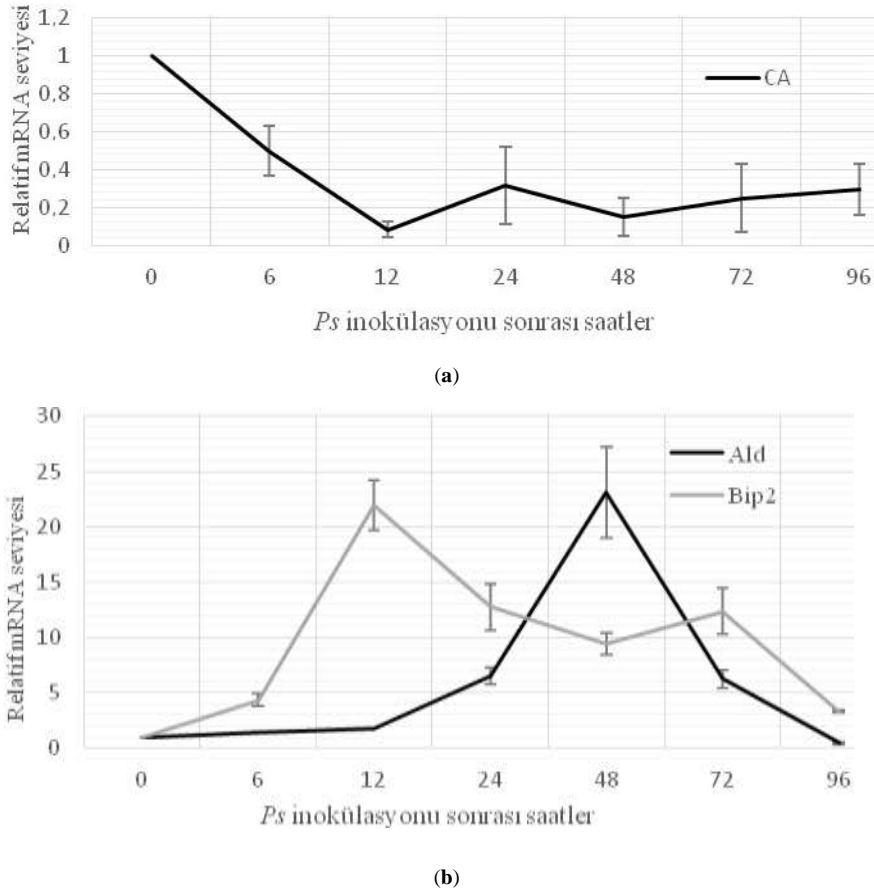
Şekil 1. Tanımlanan genlerin gruplandırılmaları.

Figure 1. Functional groupings of the identified genes.

Belirli fonksiyonlarla ilişkili olan etiketlerin önemli bir bölümünün bitki-patojen interaksiyonlarında rol oynadığı veya ilişkili olduğu bilinen mesajlardan orijine oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 2). Bunlar arasında, biyotrofik patojenlere yanıtta rol oynayan Salisilik Asit (SA) ile savunma yanıtında (SABP3 olarak) görev aldığı bilinen (kloroplast enzimi) karbonik anhidraz, Bip2 proteini, Gibberellik Asit (GA) sentez yolu enzimi *ent*-kaurene sentaz 2, yine interaksiyonlarda rol oynayan oksinle baskılanan ve absisik asit stres-olgunlaşma proteinleri bulunmaktadır. Yine bitki-mikrop interaksiyonlarında ekspresyonu değişim gösteren sitoplazmik aldehit dehidrogenaz (RF2C), tetratrikopeptid, büyüme düzenleyicisi faktör (GRF1) kodlayan gen sekansı homologları da, bu tip genlerin diğer örnekleridir. Benzer olarak, sıcaklık ve soğuk gibi diğer streslerle ilişkili olduğu bilinen asidik ribozomal protein P3, SRC2, gamma yanıtı I protein, nikotinamid sentaz 3, axillin ve kinesin benzeri sekanslarda tanımlanan etiketler arasındadır (Çizelge 2).

Bitki-patojen interaksiyonlarında rol oynadığı düşünülen altı genin (*CA*, *ARP*, *Bip2*, *Arpp3* ve *cALDH*) ekspresyonu Çizelge

1'de verilen gen spesifik primer çiftleriyle RT-qPCR deneylerinde çalışıldı. Normalize edilmiş relatif değişim değerleri ve bunlardan hazırlanan grafikler, genel olarak tespitlerinde gözlenen ekspresyonel değişimi doğrulayan sonuçlar ortaya koymuştur (Şekil 2). Karbonik anhidraz etiketinin tarama jelinde gözlenen T1'de induksiyon T2'de represyon yerine, kontrol hariç tüm *Ps* uygulaması (6-96 h) örneklerinde düzeyi %80'leri bulan bir represyon RT-qPCR teyitlerinde gözlenmiştir (Şekil 2a). *Bip2* ve *ALDH* ekspresyonları, sırasıyla 12. ve 48. saatlerde 20 katın üzerinde maksimum induksiyon seviyelerinin gözlendiği tek tepeli profillere sahiptir (Şekil 2b). *Arpp3* ekspresyonu, 2 kat induksiyon etrafında dar bir aralıkta artış azalışlar gösteren, 96. saatte, 3.5 kat relatif induksiyon ile karakterize edilen bir değişim profiline sahiptir. *ARP1* ekspresyonu ise 12. ve 48. saatlerde sırasıyla tepe değerleri 2.2 ve 3.9 kat induksiyon olan, çok daha heterojen bir değişim profili sergilemiştir (grafikleri verilmemiştir).



Şekil 2. RT-qPCR deneylerinde ölçülen relatif mRNA seviyesi grafikleri: (a) *ZmCA* (b) *ZmALDH* ve *ZmBip2*. İki biyolojik tekrarın iki teknik tekrar halinde çalışıldığı RT-qPCR deneylerinde ölçülen Ct değerleri, referans gen, *ZmActin1*, ekspresyonuyla normalize edilerek kontrole göre hesaplanan relatif (kat) ekspresyon değerleri standart hatalarıyla birlikte grafikte verilmektedir.

Figure 2. Graphs of relative mRNA levels measured via RT-qPCR experiments: (a) *ZmCA* (b) *ZmALDH* and *ZmBip2*. All experiments were carried out as biological duplicates each with two technical replicates. Computed Ct values were normalized to the expression level of *ZmActin1* and expressed as the average fold change at each time point with relative to the control. Bars represent standard errors.

4. Tartışma ve Sonuç

Bitki-patojen interaksyonlarında transkriptom çalışmaları her iki organizmada ve ara yüzde gerçekleşen olayların karakterizasyonu, konukçu direnci/duyarlılığında rol oynayan faktörlerin belirlenmesine genom ölçeğinde katkılar sağlamaktadır (Kazan ve ark. 2001; Lodha ve Basak 2012; Rezzonico ve ark. 2017). Paraleli çalışmalara benzer olarak mısır-*Puccinia* sisteminde birkaç çalışma yapılmıştır. Wang ve ark. (2012) Affimetrix mısır GeneChip ile mısır-*Puccinia polysora* patosisteminde ekspresyonu modülasyon gösteren 532 prob tanımlamış, genel olarak, biyotik stres yanıtlarında rol oynayanların indüklendiği, abiyotik streslere yanıtı ilişkilerinin ekspresyonlarının ise, baskılandığı gözlemlenmiştir. Mısır-*P. sorghi* sistemi kompatibil ve inkompatibil interaksyonlarında gerçekleştirilen cDNA-AFLP çalışmasında 310 TDF'in sekans karakterizasyonu yapılmıştır (Südüpak 2014). Fonksiyonu bilinen gen sekanslarına benzerlik gösteren TDF'lerin büyük çoğunluğunun bitki-patojen interaksyonlarında rol oynayan genlerden orijine olduğu bulunmuştur. Gerçekleştirilen DDRT-PCR çalışmasında tanımlanıp sekansı belirlenen 72 TDF'ten fonksiyonu bilinen genlere benzerlik gösterenlerin önemli bir bölümü de biyotik stresle ekspresyonu modülasyon gösteren genlerden oluşmaktadır. Kloroplast formu karbonik anhidraz kodlayan, *ZmCA*, ER şaperon *ZmBip2*, *ZmAn2*, *ZmcALD*, *ZmARPI*, Rubisco küçük alt birimi, tetratrikopeptid motif içeren protein kodlayan genler bunların tipik örnekleridir (Çizelge 2). TDF içeriğinin yaklaşık yarısının bitki-patojen interaksyonlarında sıklıkla tanımlananlardan oluşması, hedeflenen transkriptomun çalışmada örneklediğini göstermektedir.

Tanımlanan *ZmCA*, SA-binding protein 3 (SABP3) olarak bitki savunmasında fonksiyonel olduğu bilinen bu enzimdir. VIGS ile bir homologunun susturulduğu *Nicotiana benthamiana* genotiplerinde, Pto:avrPto kombinasyonu ile tetiklenen HR'in baskılandığı (Slaymaker ve ark. 2002), *Phytophthora infestans* büyümesinin artış gösterdiği bulunmuştur. Patates-*Phytophthora infestans* kompatibil interaksyonunda da, inokülasyonu takiben ilk 12-15 saat aralığında CA transkripsiyonu baskılanmaktadır (Restrepo ve ark. 2005). Yu ve ark. (2012) SABP3'ün *Arabidopsis* te direnç reaksiyonu pozitif regülatörü olduğunu ileri sürmektedir. Mısır-*Ps* interaksyonu RT-qPCR deneylerinde 6. saatten itibaren başlayan genel baskılanma durumu, yukarıda tanımlanan çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir (Şekil 2a). Bir SABP3 olarak karbonik anhidrazın çalışılan patosistem konukçu savunmasında rol oynadığı, gözlenen baskılanmanın kompatibil interaksyonda ortaya çıkan bir durum olduğu mevcut bilgilerle yapılabilecek bir değerlendirmedir.

Hem TDF olarak, hem de RT-qPCR teyidinde pas inokülasyonu ile ekspresyonu belirgin şekilde indüklenen (Şekil 2b) aldehit dehidrogenaz (AF348412.2, RF2C), interaksyonda fonksiyonel olduğu düşünülen diğer bir gen dir ve paraleli bulgular bir birçok yayında rapor edilmektedir: Wang ve ark. (2007) Çin üzümünde (*Vitis pseudoreticulata*) külleme fungusu *Uncinula necator* infeksiyonu sonrası ekspresyonu indüklenen bir *ALDH* tanımlamışlardır. Biberde *CaALDH1* geninin susturulması, hidrojen peroksit birikimiyle hücre ölümü yanıtı ve *X. campestris* pv. *vesicatoria*'ya direncin azalmasına neden olmaktadır (Kim ve ark. 2015). Benzer olarak, bu enzimlerin programlı hücre ölümünde rollerine bir kanıtta, pirinç hastalık lezyonu mimik mutantında (*cdr2*) yüksek seviyede *ALDH* proteini birikiminden gelmiştir (Tsunezoka ve ark. 2005). *Arabidopsis* te artırılmış *ALDH1* ekspresyonu *Pseudomonas*

syringae pv. *tomato* ve *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2 infeksiyonlarına duyarlılığı azaltmaktadır (Kim ve ark. 2015). Aldehit dehidrogenazların bitki stres yanıtı yollarında, özellikle de oksidatif stres oluşturanlarda önemli olduğu değerlendirilmektedir (Singh ve ark. 2013).

Ekspresyonu indüklenen üç farklı TDF sekansı halinde tanımlanan ve RT-qPCR ekspresyon teyidi yapılan (Şekil 2b) mısır *Bip2* (NM_001112424.1) geni, bulgularımızla uyumlu olarak mikrobiyal enfeksiyonlar sırasında, PR protein ekspresyonu öncesinde hızlı bir şekilde indüklenen bir mesajdır (Tsunezoka ve ark. 2005; Jelitto-Van Dooren ve ark. 1999). BiPler, ER'da yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak degradasyonlarında, ER ilişkili apoptozis sinyali düzenlenmesi ve patojenlere immünte de rol oynayan şaperonlardır. Bip2, ekspresyonunun susturulması, PR1 sekresyonu, SAR kurulumunu ve genel patojen direncini zayıflatmaktadır (Wang ve ark. 2005). Diğer çalışmalar, patojen infeksiyonlarında, savunmada rol oynayan moleküllerin sentezi ve salgılanmasının büyük ölçekli arttığını, bu sentez yolu ve fonksiyonel olan elemanlarının savunma yanıtlarında önemli olduğunu göstermektedir (Körner ve ark. 2015). Pirinçte artırılmış BiP3 ekspresyonu, immünoresptörün proses edilmesi ve stabilitesini düzenleyerek Xa21 ile sağlanan dirence katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Park ve ark. 2010). Bu tespitler çerçevesinde, BiP'in PCD pozitif regülatörü olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, ER protein sentezi ve işleme kapasite düzenlenmesinin, bitki savunma yanıtlarında önemli olduğu, tanımlanan BiP2'nin bu sistemin bir elemanı olarak çalışılan patosistemde fonksiyonel olduğu bulgular ışığında değerlendirilmektedir.

Oksinle baskılanan protein (ARP, EU964946.1), pas inokülasyonu ile sınırlı bir ekspresyonel değişim gösterdiği teyit edilen diğer bir gen dir. (Çizelge 2, grafiği verilmemiştir). *ARPI*'in vejetatif büyümeyle hastalık direnci/savunma yanıtları arasında ikili bir role sahip olduğu ileri sürülmektedir. *ARPI* ekspresyonu vejetatif büyümeyi negatif düzenlerken, hastalık direncinin pozitif regülatörü olduğu ve bu iki durum arasında antagonist çalışan bir integral regülatör olduğu ileri sürülmektedir (Zhao ve ark. 2014). Tanımlanan ARP'ın fonksiyonu karakterize edilmiş olmamakla birlikte, bu bilgilerle birlikte tespit edilen ekspresyonel değişim, mısır-*Ps* interaksyonunda da benzer bir role sahip ve konukçu savunmasında önemli olabileceğini göstermektedir.

Ekspresyon teyidi yapılmamış olmakla birlikte, tanımlanan diğer bir gen, GA biyosentez yolu, *ent*-kauren sentaz 2 enzimini kodlayan *An2*'dir. *Ps* inokülasyonu ile ekspresyonu indüklenen bu gen Harris ark. (2005) tarafından mısırdaki *Fusarium graminearum* inokülasyonu ile indüklendiği bulunmuştur. GA'ların hem bakteriyel, (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) hem de fungal (*Magnaporthe oryzae*) patojenlerle interaksyonlarda pirinç savunma yanıtlarının negatif regülasyonunda görev aldığı ve konukçu duyarlılığının oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Qin ve ark. 2013). Pirinç gibi, mısırdaki da (farklı enzim olmakla birlikte) fungal patojenler, *Fusarium* ve *P. sorghi*, enfeksiyonları, GA sentez enzimi indüksiyonuyla duyarlılık ortaya çıkışını, endojen GA seviyesini yükselterek sağlıyor olabilir. Diğer tanımlanan biyotik ve abiyotik stres ilişkili genler arasında sıcaklık şoku proteinleri, *ArpP3*, tetratrikopeptide tekrar domein içeren proteinler ve SRC2, absisik asit-stres ve olgunlaşmayla indüklenen (ASR) proteinler, ribozom tekrar kullanım faktörü (RRF), büyüme düzenleyicisi faktörler de bulunmaktadır (Çizelge 2).

Sonuç olarak, sınırlı sayıda etiket çalışılmış olmakla birlikte, bitki-mikrop interaksyonlarında rol oynadığı bilinen

bir dizi genin sekans benzeri TDF tanımlanması ve bunların biyoteknolojik manipülasyonlarda kullanılabilir niteliklere sahip olması, çalışma kapsamı ve hedefi açısından önemlidir. Tanımlanan genler ve bunların muhtemel fonksiyonlarının bitki-patojen interaksyonlarında, özellikle de mısır-mısır pası uyumlu interaksyonunda gerçekleşen olayların moleküler arka planına ve manipülasyonlarına, önemleri ölçüsünde katkı sağlaması beklenmektedir.

Teşekkür

Çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi BAP projesi, 6601-FBE/19-256 kapsamında sağlanan destekle gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Bachem CWB, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* 9: 745-53.
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H (2015) Signaling mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant* 8: 521-539.
- Dickinson M (2005) *Molecular Plant Pathology*, pp. 160-168, BIOS Scientific Publishers. New York: Taylor & Francis Group.
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Gebrie SA (2016) Biotrophic fungi infection and plant defense mechanism. *Journal of Plant Pathology Microbiology* 7: 378-384.
- Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-41.
- Harris LJ, Saparno A, Johnston A, Pristic S, Xu M, Allard S, Kathiresan A, Ouellet T, Peters RJ (2005) The maize *An2* gene is induced by *Fusarium* attack and encodes an ent-copalyl diphosphate synthase. *Plant Molecular Biology* 59: 881-894.
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Hulbert SH (1997) Structure and evolution of the *rp1* complex conferring rust resistance in maize. *Annual Review of Phytopathology* 35(1): 293-310.
- Jelitto-Van Dooren EP, Vidal S, Denecke J (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. *The Plant Cell* 11: 1935-1944.
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kazan K, Schenk PM, Wilson I, Manners JM (2001) DNA microarrays: New tools in the analysis of plant defense response. *Molecular Plant Pathology* 2(3): 177-185.
- Kim NK, Hwang BK (2015) Pepper aldehyde dehydrogenase CaALDH1 interacts with *Xanthomonas* effector AvrBsT and promotes effector triggered cell death and defense responses. *Journal Experimental Botany* 66(11): 3367-3380.
- Körner C, Du X, Vollmer ME, Pajeroska-Mukhtar K (2015) Endoplasmic reticulum stress signaling in plant immunity - At the crossroad of life and death. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 26582-26598.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lodha TD, Basak J (2012) Plant-pathogen interactions: What microarray tells about it?. *Molecular Biotechnology* 50: 87-97.
- Park CJ, Han SW, Chen X, Ronald PC (2010) Elucidation of XA21-mediated innate immunity. *Cell Microbiology* 12(8): 1017-1025.
- Qin X, Liu JH, Zhao WS, Chen XJ, Guo ZJ, Peng YL (2013) Gibberellin 20-oxidase gene *OsGA20ox3* regulates plant stature and disease development in rice. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26: 227-239.
- Restrepo S, Myers KL, Pozo OD, Martin GB, Hart AL, Buell CR, Fry WE, Smart CD (2005) Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 913-922.
- Rezzonico F, Rupp O, Fahrentrapp J (2017) Pathogen recognition in compatible plant-microbe interactions. *Scientific Reports* 7: 63-83.
- Sahah DA, Dillard H (2006) Yield loss in sweet corn caused by *Puccinia sorghi*: A meta-analysis. *Plant Disease* 90: 1413-1418.
- Singh S, Brocker C, Koppaka V, Ying C, Jackson B, Matsumoto A, Thompson DC, Vasiliou V (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radical Biology Medicine* 56: 89-101.
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A* 99: 11640-11645.
- Südüpak MA (2014) A cDNA-AFLP protocol with reciprocally arranged 2-enzyme sequential digestion and silver staining detection. *Turkish Journal of Biology* 38: 260-270.
- Tsunezoka H, Fujiwara M, Kawasaki T, Shimamoto K (2005) Proteome analysis of programmed cell death and defense signaling using the rice lesion mimic mutant *cdr2*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 52-59.
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* 308: 1036-1040.
- Wang X, Wang Y, Hao W (2007) cDNA cloning and characterization of the novel genes related to aldehyde dehydrogenase from wild Chinese grape (*Vitis pseudoreticulata*). *DNA Sequence* 18(1): 9-18.
- Wang X, Liu T, Li C, Zhao Z (2012) Gene expression profiles in maize (*Zea mays* L.) leaves inoculation with southern corn rust (*Puccinia polysora* Underw.). *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 997-1006.
- Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ, Whitham SA (2007) Transcript profiling in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 48: 457-479.
- Yu M, Yun BW, Spoel SH, Loake GJ (2012) A sleigh ride through the SNO: Regulation of plant immune function by protein S-nitrosylation. *Current Opinion Plant Biology* 15: 424-430.
- Zhao Y, Li C, Ge J, Xu M, Zhu Q, Wu T, Guo A, Xie J, Dong H (2014) Recessive mutation identifies auxin-repressed protein ARP1, which regulates growth and disease resistance in tobacco. *Molecular Plant Microbe Interaction* 27(7): 638-654.