

Konukçu-Patojen İlişkisinde Model Bir Bitki: *Arabidopsis thaliana*

Figen MERT-TÜRK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Çanakkale (fturk@comu.edu.tr)

Geliş Tarihi : 08.12.2004

Özet. *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*)'nin kromozom sayısının az olması, bu bitkinin genetik yapısının diğer bitki türlerine göre daha kolay çalışılmasına olanak sağlamakta, ayrıca diğer bitkilerde patojenlere karşı gözlenen ana savunma mekanizmaları bu bitkide de bulunmaktadır. Bu açıdan, konukçu bitkilerin patojen saldırılarına karşı savunma mekanizmalarını çalışma konusunda *Arabidopsis* bitkisi ideal bir model sistem oluşturmaktadır. Bu derlemenin amacı, patojenlere karşı bitki savunma mekanizmasının genetiğini anlamada *Arabidopsis*'in bir şablon olarak nasıl kullanıldığını, bitki ekotiplerinin patojen izolatlarına karşı gösterdiği farklılıkları (duyarlılık ve dayanıklılık) ortaya koyacak inceleme metodlarını açıklamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, *Peronospora parasitica*, hastalıklara dayanıklılık, mutant bitkiler

A Model Plant In Host-Pathogen Interaction: *Arabidopsis thaliana*

Abstract. Because of its small genome, genetic studies are performed easier in *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) compared to other plants and it exhibits all of the major kinds of defense responses described in other plants. Thus, *Arabidopsis* provides to be an ideal model system for studies of host defense responses to pathogen attack. This review details methods to isolate and utilize phytopathogens useful as probes in understanding the genetics of plant defense responses in *Arabidopsis*. As well, it will be defined how screening systems can be set up to determine differential responses (resistance and susceptibility) of *Arabidopsis* ecotypes to pathogen isolates.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*, *Peronospora parasitica*, disease resistance, mutant plants

GİRİŞ

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (bundan sonra sadece *Arabidopsis* olarak isimlendirilecektir) bugün dünyada model bir bitki olarak kullanılmaktadır. İngilizce adı "mouse ear cress" olan ve dünyanın hemen hemen her yerine adapte olmuş tek yıllık ve ekonomik değeri olmayan bir bitkidir. Önemi 19. yüzyılın başlarında fark edilmiş ve 1980 yılı sonrası bu bitki ile ilgili çalışmalar büyük bir ivme kazanmıştır. Dünyanın dört bir yanından toplanan çok büyük bir "ekotip koleksiyonu" mevcuttur. İşte bu yüzden bu bitkinin bir koleksiyonunun yapılması ve genetik stokların tanımlanmasının önemi ortaya çıkmış ve bu öneriyi ilk kez Profesör Laibach [1951] ortaya atmıştır. Onun emekliliğinden sonra Röbbelen [1965] koleksiyondan sorumlu olmuş ve "tohum bankası"ni organize eden Kranz'a teslim etmiştir [1987]. Daha sonra Nottingham (İngiltere) ve Columbus (A.B.D.)'da bu tohumların korunması ve stokların "*Arabidopsis* Genom Projesi" çerçevesinde çalışan araştırmacılara sağlanması görevini üstlenecek stok merkezleri kurulmuştur. Halen bu bitkinin genetik ve fizyolojisi ile ilgili pek çok çalışma devam etmektedir.

Konuya bitki patolojisi açısından bakıldığında, bitkilerde dayanıklılık mekanizmalarının saptanması, konukçu ve patojen arasında ilk karşılaşma esnasında nasıl bir etkileşim olduğu, neden bazı ekotipler hastalık etmenlerinin bazı izolatlarına karşı çok hassasken, diğerlerine karşı yüksek oranda dayanıklılık gösterdiği ile ilgili soruları cevaplamak amacıyla, özellikle son 10-15 yıldır oldukça fazla

çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bütün bu çalışmalara rağmen dayanıklılığı sağlayan mekanizma veya mekanizmalar hala tam olarak gün ışığına çıkarılamamıştır.

Yukarıda da değinildiği gibi *Arabidopsis* ekonomik öneme sahip bir bitki değildir, fakat şu an bitkiler aleminde tanımlanamamış bir çok soruyu cevaplandırabilecek bir potansiyele sahiptir [Dangl, 1993; Davis ve Hammerschmidt, 1993].

Arabidopsis neden model bir bitki olarak seçilmiştir?

Özellikle genetik alanında yapılan çalışmalar için *Arabidopsis* ile çalışmayı çok çekici kılan özellikler kısaca aşağıdaki gibi sayılabilir:

1. *Arabidopsis* küçük kromozom sayısına sahiptir ($2n=10$). Angiospermiler arasında en küçük genoma sahip bir bitkidir [Leutwiler ve ark., 1984].
2. Çok yüksek miktarlarda tohum üretir, bitki başına yaklaşık 10 bin adet [Davis, 1992].
3. Yaşam döngüsünü bitkinin içinde bulunduğu koşullara bağlı olarak 5-8 hafta gibi çok kısa bir sürede tamamlar.
4. Küçük alanlarda (hatta bir petri kabında bile) çok kolay yetiştirilebilir.
5. Çok fazla sayıda ekotip koleksiyonu vardır.
6. Ekotipler arası melezleme kolaydır ve elde edilen F_1 genotipler tam üretkendir.

7. Biyolojik, fiziksel ve kimyasal mutajenler kullanılarak, kolayca mutant genotipler elde edilebilir.

Arabidopsis'in Bitki Patolojisindeki Yeri:

Doğal ortamında *Arabidopsis*'te hastalık oluşturabilen çok sayıda fungal, bakteriyel ve viral patojenler vardır ve hatta nematodlar da rapor edilmiştir [Crute ve ark., 1994; Sijmons ve ark., 1994; Simon, 1994]. Yukarıda da değinildiği gibi *Arabidopsis*'in oldukça zengin ekotip koleksiyonu mevcuttur. *Arabidopsis*'i doğal olarak hastalandıran bakteriyel ve viral patojenlerin yanı sıra, özellikle bitki-patojen ilişkilerinde yer alan ve gen-için-gen hipotezine uyan biyotrof fungal etmenler de bulunmaktadır (Tablo 1).

Burada dikkat çeken en önemli nokta yukarıda sayılan bütün hastalık etmenlerinin *Arabidopsis* yanında, kültürü yapılan bitkilerde de hastalık oluşturmasıdır [Dixon, 1981]. Bu hastalık etmenleri içerisinde geniş konukçu spektrumuna sahip heminekrotrof (*Leptosphaeria maculans*) ve nekrotroflar (örn. *Botrytis cinerea* ve *Rhizoctonia*

solani)ve ayrıca konukçu ekotiplerine oldukça fazla ihtisaslaşmış olan (genotip-spesifik) biyotrofik patojenler da dahildir (örn. *Albugo candida* ve *Peronospora parasitica*). *A. candida* hakkında her ne kadar çalışma yapılmış olsa da asıl odak nokta *P. parasitica* olmuştur. *P. parasitica*'ın oldukça fazla izolatu mevcuttur ve bu izolatların korunma işlemini çoğunu Dr. Eric Holub (HRI, Warwick, İngiltere) üstlenmiştir. Bakteriyel etmenlerle ilgili yapılan çalışmaların çoğunda *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ve *P. s. pv. maculicula*'nın kullanıldığı dikkat çekmektedir (Glazebrook, 1997).

Arabidopsis'in bitki patolojisinde bir kullanım yeri de, hangi genlerin mikrobiyal patojenleri tanıma ve onlara tepki verme işlevlerine sahip olduğunu tanımlamaktır. *Arabidopsis*'te bu fungal patojenlerle çalışmanın amacı, bitkilerin patojenleri tanıma ve patojenlere tepki vermelerinin hangi genetik kontrol mekanizmasının aktifleşmesi sonucu oluştuğunu anlamak ve sonuç olarak elde edilen bu bilgiler doğrultusunda tarımı yapılan bitkileri, insanoğlunun lehine kullanmaktır.

Tablo 1. *Arabidopsis*'te hastalık oluşturan fitopatojen etmenler (Dangl ve ark., 1993; Crute ve ark. 1994; Sijmons ve ark., 1994; Simon, 1994; Adam ve ark. 1999).

Fungal Hastalıklar

Mildiyö	<i>Peronospora parasitica</i>
Beyaz pas	<i>Albugo candida</i>
Külleme	<i>E. cruciferearum</i>
	<i>E. cichoracearum</i>
Çökerten	<i>Pythium</i> spp.
	<i>Rhizoctonia solani</i>
Yaprak lekesi	<i>Alternaria brassicae</i>
Siyah leke	<i>Leptosphaeria maculans</i>
Solgunluk	<i>Fusarium oxysporum</i>
Kurşuni küf	<i>Botrytis cinerea</i>

Bakteri Hastalıkları

Siyah çürüklük	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Bakteriyel benek hastalığı	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
	<i>P. syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>

Virus Hastalıkları

Tütün mozaik virüsü (TMV, Tobacco mosaic virus)
Şalgam kıvrıcıklık etmeni (TCV, Turnip crinckle virus)
Karnabahar mozaik virüsü (CaMV, Cauliflower mosaic virus)

Nematod Hastalıkları

Kist Nematodu	<i>Heterodera schachtii</i>
---------------	-----------------------------

Konukçu-Patojen İlişkisinde Gen-İçin-Gen İnteraksiyonu:

Mikrobiyal bitki patojenleri besinlerini ya biyotrofik olarak canlı hücrelerden, ya da nekrotrofik olarak öldürdükleri dokulardan alırlar. Obligat biyotroflar duyarlı bitkileri istila eder ve konukçu hücreler ya canlılıklarını sürdürürler, ya da patojen gelişimini tamamladıktan ve diğer hücreleri istila etmeye hazır olduktan sonra öldürürler. İşte *P. parasitica* da öyle bir patojen olup, fizyolojik ırk düzeyinde ihtisaslaştığı için büyük bir ilgi odağı olmuştur. Bitki-patojen ilişkilerinden söz edildiği durumlarda aşağıdaki terimlerin bilinmesinde fayda vardır.

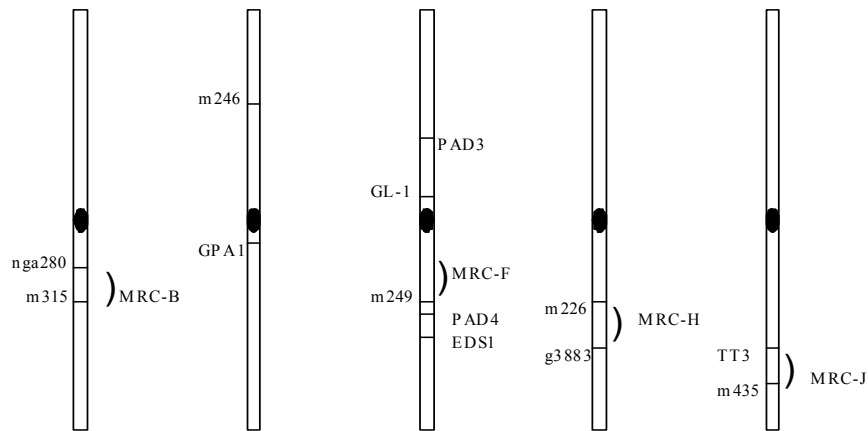
Bir patojen, potansiyel bir konukçu ile karşı karşıya geldiğinde, konukçuyu başarılı bir şekilde kolonize eder ve hastalık oluşturabilirse, patojen virulent olarak ve konukçu da duyarlı olarak tanımlanır ve bu ilişkiye “uyumlu” ilişki denir. Alternatif olarak eğer bir patojen potansiyel bir konukçu ile karşı karşıya geldiğinde, konukçunun savunma mekanizmasını hızlı bir şekilde uyarıp, gelişmesi engelleniyorsa ve hastalık gelişimi gözlenmiyorsa, patojene avirulent, konukçuya dayanıklı ve bu ilişkiye de “uyumsuz” ilişki denir. İkinci teori gen-için-gen teorisine uyar ve patojendeki her bir avirulentlik (*avr*) genine karşılık konukçuda bir dayanıklılık (*R*) geninin olduğu varsayılır. Gen-için-gen teorisinin basit bir tanımı yapılırsa, *avr* genler, *R* genler tarafından deşifre edilen reseptörlere bağlanan ligandlar sentezlerler veya sentezlenmesinden sorumlu olurlar.

Arabidopsis- *P. parasitica* İlişkisinde Ekotipler ve İzolatlar:

Arabidopsis'in her ne kadar çok sayıda ekotipi mevcutsa da, pratikte dört ekotip yoğun olarak kullanılmaktadır; Landsberg erecta (Ler), Columbia (Col), Wassilewskija (Ws) ve Niederzenz (Nd). *P. parasitica*'nın izolatları için durum biraz farklıdır. Şöyleki, her bir ekotip için *P. parasitica*'nın farklı izolata veya izolatları popüler olmaktadır. Çünkü bir ekotip bir izolata karşı duyarlı iken, başka birine karşı dayanıklılık gösterebilir. İşte *Arabidopsis*- *P. parasitica* ilişkisini çekici kılan da budur. Bu konuda yapılan bütün moleküler ve genetik çalışmalar basitçe bu temel üzerine dayanır.

Arabidopsis ve *P. parasitica* ilişkisi konusunda yapılan çalışmalar, *Arabidopsis*'te çok sayıda ‘tanıma seçiciliği=recognition specificities’ olarak tanımlanan tanıma yani *R* genleri bulunduğunu göstermiştir. *P. parasitica*'ya karşı dayanıklılık genlerinin her beş kromozoma kümeler halinde dağılmış olduğu görülmektedir (Şekil 1).

En çok ilgiyi çeken nokta farklı mikroorganizmaları tanıma görevi üstlenen *R* genlerinin, kromozomlar üzerinde bir küme şeklinde birbirine çok yakın yerlerde yer almasıdır. Kromozomlar üzerinde morfolojik veya moleküler belirleyici işaretler (marker) arasında yer alan bu bölgeler kolaylık sağlaması açısından “Major Recognition Complex: MRC” olarak isimlendirilmiştir ve birçok bakteriyel ve fungal etmenlere karşı dayanıklılık sağlayan *R* genlerinin bu bölgelerde bulunduğu gösterilmiştir [Holub ve Beynon, 1997]. Sadece bu kadar değil, dayanıklılığın oluşumunu sonuçlayan sinyal iletim mekanizmasında yer aldığı sanılan bir çok gen de (*PAD*, *EDS1* ve *NDRI*) yine aynı şekilde bu bölgelerde yer almaktadır.



Şekil 1. *Arabidopsis*'in beş kromozomu üzerinde kümeler halinde bulunan RPP lokuslarının fiziksel lokalizasyonları (Holub ve Beynon, 1997).

Özellikle MRC-F bölgesinde yer alan *RPP* (Resistance to *P. parasitica*) dayanıklılık genleri (Şekil 1), bir çok laboratuvar tarafından çalışılmıştır (Holub ve Beynon, 1997). Bu bölgede ekotipe bağlı olarak, genlerin varlığı veya yokluğu sonucu, patojenle inokulasyondan sonra, çok farklı fenotip spektrumunun görünmesi mevcuttur. Örneğin Col-0 ekotipinde bu bölgede *P. parasitica*'nın belli izolatlarına (Maks9, Coco1, Edco1, Aswa1, Emco5 ve Goco1) karşı dayanıklılık geni bulunmadığı için çok duyarlı bir fenotip görmek mevcuttur. Fakat bunun aksi olarak, Nd-1'de dayanıklılık geni (*RPP13*) mevcuttur ve bu genin uyarılması sonucu, bitkide bu izolatlara karşı aşırı duyarlılık reaksiyonunun eşlik ettiği yüksek bir dayanıklılık gözlenmektedir. Yine Nd-1'de bu bölgede bulunan ve *RPP13* genine çok yakın olan *RPP1* dayanıklılık geni Emoy2, Hiks1 ve Waco5 izolatları tanırken ve böylece tam bir dayanıklılık gözlenirken, Col-0 ekotipi ilk iki izolatı diğer kromozomlarda yer alan farklı *R* genleri tarafından (sırasıyla *RPP4* ve *RPP7*) tanımakta ve dayanıklılık oluşmaktadır. Waco5'e karşı herhangi bir dayanıklılık gözlenmeyip tam duyarlı bir fenotip sergilemektedir [Bittner-Eddy ve ark., 1999].

***Arabidopsis-P. parasitica* 'nın İnteraksiyon Fenotipleri:**

Fenotipleri oluşturmada kullanılan metot kısaca şöyledir: Yedi günlük *Arabidopsis* bitkicikleri $4-5 \times 10^5$ konidi/ml su konsantrasyonunda bir spor süspansiyonu ile inokule elmekte, hastalık gelişimi ve konukçu tepkisi inokulasyondan 3 ve 7 gün sonra incelenmektedir [Dangl, 1992]. Hastalık gelişimi fungusun her bir kotiledon üzerinde oluşturduğu sporangiofor sayısına göre yapılır. Bu genellikle şimdiye kadar skala usulü ile yapılmıştır. Bunlar aşağıdaki gibi olmaktadır:

N: Sporulasyon mevcut değil.

R: Nadiren görülen sporulasyon, her kotiledonda ortalama olarak 1'den az konidiyofor

L: Düşük derece sporulasyon, her kotiledonda ortalama olarak 5-10 konidiyofor

M: Orta derece sporulasyon, her kotiledonda ortalama olarak 11-20 konidiyofor

H: Yüksek oranda sporulasyon, her kotiledonda >20 konidiyofor

Eğer sporulasyon inokulasyondan 3 gün sonra başlıyorsa buna erken sporlanma (E), eğer sporlanma dördüncü günden sonra başlıyorsa buna da geç kalan sporlanma (D) denilmektedir.

Bitkilerin patojene olan tepkisi ise genellikle hipersensitif reaksiyon (HR) sonucu oluşan hücre ölümleriyle ilgili olan klorozlar veya nekrozlar şeklinde aşağıdaki gibi açıklanabilir:

F: klorotik minik benekler,

C: geniş alanlara yayılmış klorotik lekeler,

P: geniş alanlara yayılmış nekrotik çöküntüler,

Arabidopsis-P. parasitica ilişkisinin ne kadar spesifik olabileceğini göstermek amacıyla Tablo 2'de bazı örnekler verilmiştir. Bu yüzlerce farklı fenotipik ilişkiden sadece birkaçını göstermektedir.

Tablo 2. *Arabidopsis thaliana*'nın birkaç ekotipi ile *Peronospora parasitica*'nın izolatları arasındaki ilişki [Bittner-Eddy ve ark., 1999; Holub, 1997; Aarts ve ark., 1998; Botella ve ark., 1998].

Peronospora parasitica izolatları				
Ekotipler	Emoy2	Cala2	Emwal	Maks9
Nd-1	PN	EH	DH	FN
Col-0	FDL	FR	FL	EH
Ler-1	FN	EH	FN	FR
Oy-0	EH	FN	DH	EH
Ws-3	PN	CN	DH	PN

***Arabidopsis*'te *R* Genleri Nasıl Tanımlanmaktadır?**

Arabidopsis-patojen araştırmalarının ilk amacı genetik metodlarla *R* genlerini tespit etmek ve onları harita-bazlı strateji kullanarak klonlamaktır [Glazebrook, 1997]. Her ne kadar *P. parasitica* kullanılarak birkaç *R* geni klonlanmış olsa da (Bittner-Eddy ve ark., 1999; Botella ve ark., 1998), bakteriyel bir etmen olan *P. syringae*'nin patovarlarını tanıyan genler de izole edilmiştir [Bent ve ark., 1994; Mindrinos ve ark., 1994; Grant ve ark., 1995]. *Arabidopsis*'in patojenlerinin kullanılmasıyla, *R* genleri iki farklı strateji kullanılarak tanımlanmaktadır:

Birinci strateji fungal patojenin bir ırkına karşı, *Arabidopsis*'in birisi duyarlı ve diğerinin dayanıklı olduğu iki ekotipinin saptanmasıdır. Dayanıklı ekotip, duyarlı ekotip ile melezlenir ve elde edilen F_1 'ler kendine tozlanmaya bırakılarak, F_2 tohumları elde edilir. F_2 genotiplerde, dayanıklılığın tek bir gen olarak açılım gösterip göstermediğine bakılır. Bu yolla patojenlere dayanıklılığı sağlayan çok sayıda tek bir lokus tanımlanmıştır. Mesela fungal patojen olan *P. parasitica*'ya karşı 26 gen, *A. candida* karşı 2 gen, *E. cichoracearum*'a karşı 5 ve *P. brassicae*'e karşı 1 genin varlığı tespit edilmiştir. Bazı virüs ve bakteriler için de bu strateji kullanılmıştır [Crute ve ark., 1994; Holub ve Beynon, 1997; Holub ve ark., 1994; Parker ve ark., 1996; Tör ve ark., 1994; Adam and Somerville, 1996; Lee ve ark., 1994; Buell ve Somerville, 1995].

Bazı bakteriyel patojenler için ikinci bir strateji kullanılmaktadır. *R* genlerini tanımlamak için, klonlanmış *avr* genler, virulent ırkların izojenik avirulent ırklara çevrilmesi için kullanılır [Debener ve ark., 1991]. Bu yöntemin avantajı ise, sadece tek

bir *avr* geninden dolayı farklılık gösteren bir virulent ve bir de avirulent ırk elde etmiş olmaktadır. Bu gibi ırkların gen-için-gen dayanıklılığında kullanılması, inokulasyon sonucunda konukçu bitkide görülen değişikliğin sadece tek bir *R* gen-*avr* gen ilişkisinden dolayı kaynaklandığını ve *avr* genlerinin varlığı veya yokluğu dışında, patojen ırklarında başka bir farklılıklardan dolayı kaynaklanmadığı garanti edilmiş olmaktadır. Farklı bitki türlerinden elde edilen bir çok *P. syringae* koleksiyonu *Arabidopsis* üzerinde denenmiş, birkaç virulent ve avirulent ırklar tespit edilmiştir.

En çok kullanılan iki patovar *Arabidopsis*'in test edilen bütün ekotiplerinde virulent olan *P. s. pv. maculicola* ve *P.s. pv. tomato*'dur. Diğer aktaba türlerde tespit edilen avirulent ırklardan, *avr* genleri klonlanarak bu iki patovara transfer edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bu avirulent ırkları tanıyan bazı *R* genlerinin *Arabidopsis*'te de var olduğu saptanmıştır. Böylece bu *R* genlerinin saptanması sonucu bu ırklara denk gelen *R* genleri klonlanabilmektedir [Debener ve ark., 1991].

Virulent ve avirulent izojenik çiftin varlığı ile *avr* genlerine karşılık gelen *R* genlerinin saptanması için iki strateji kullanılır. Birincisi bitkilerin farklı ekotiplerinde test edilerek karşılaştırılmanın, yukarıda değinildiği gibi yapılması, ikincisi ise mutajenik yaklaşımdır [Holub ve ark., 1994]. İkinci stratejinin ana fikri şudur: Eğer tek bir *avr* genine karşılık konukçu bitkide tek bir dayanıklılık geni mevcutsa, konukçu bitkideki bu genin mutasyona uğratılması sonucu dayanıklılığın kırılacağı, yani yok olacağı düşüncesine dayanır. Bu şekilde bir çok fungal ve bakteriyel patojenlere karşı dayanıklılık genleri izole edilmiştir.

***Arabidopsis*'te Suni Mutasyon Oluşturulması:**

Mutajenik maddelerin kullanılmaya başlanması 1920'li yıllara dayanır. Klasik genetik analizleri, her lokusta en az iki farklı allelin varlığını gerektirmektedir. 1920'li yıllara kadar bilimciler kendiliğinden varolan mutasyonlara bağlı kalmak zorundaydılar; fakat daha sonra mutajenlerin keşfedilmesiyle, genetik analizlerde büyük gelişmeler ortaya çıkmıştır. Çok fazla sayıda biyolojik, fiziksel ve kimyasal mutajen mevcuttur. Fakat bugüne kadar yapılmış çalışmalara bakılırsa, iki tür mutajenin çok yoğun bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Bunlardan birincisi fiziksel bir mutajen olan "fast neutron: FN", ikincisi ise kimyasal bir mutajen olan "ethylmethane sulfonate: EMS"tir.

Mutasyonlar yaratmak için bugün en yoğun kullanılan mutajen EMS'dir. EMS ile mutajene tabi tutulacak tohumlar geniş ince dokuma pamuklu bir torbaya konular ve ağzı iyice bağlanır. Torba daha sonra mutajen solüsyonuna daldırılır. Uygulama

sonucunda birkaç kere sudan geçirilir ve akan suda 3-4 saat tutulur. EMS'in yarı ömrü ısıya bağlıdır: örneğin 40°C'de yarı ömrü 8 saat iken, 0°C'de yaklaşık 72 saattir. Mutajenlerin büyük bir çoğunluğu kanserojendir. Genetik ve biyokimyasal analizler için faydalı mutasyon oluşturulabilmesi için %0.2 veya %0.3'lük EMS konsantrasyonu yeterlidir.

Mutajen uygulanan tohumlar M_1 diye etiketlenir ve bunlar M_2 tohumları üretmek üzere yetiştirilir. M_2 bitkileri, mesela bitki-patojen ilişkisi araştırılıyorsa, ana bitkiyle uyumsuz olan bir izolata inokule edilerek fenotipik interaksiyonda bir değişiklik olup olmadığına bakılır. Bu durumda, eğer bir mutant bitki bu izolata karşı hassas ise yani hastalık belirtileri görülüyorsa, bu durumda konukçu bitkide bu izolata tanıyan genin fonksiyonunun negatif yönde etkilendiği anlaşılır ve bir sonraki adıma geçilir.

Bir mutasyon *avr* geni taşıyan bir patojene karşı dayanıklılıktan ödün veriyorsa, yani hastalık oluşumunu sonuçluyorsa, bunun üç açıklaması vardır [Glazebrook 1997]:

- 1-Mutasyon *R* geninde oluşmuştur.
- 2-Dayanıklılığın oluşumunu sağlayan sinyal iletim mekanizmasında yer alan genlerde oluşmuştur.
- 3-Dayanıklılığın oluşumuna sebep olan tepkilerin oluşumuyla ilgili genlerde oluşmuştur.

Columbia, mutasyonlar için çok popüler bir ekotip olmuştur. *Arabidopsis*'te oluşturulan suni mutasyonlar, normal koşullarda fenotipik olarak "incompatible" olarak gözlenen bir ilişkiyi, tam duyarlı bir fenotipe çevirebilmektedir. Bu saptamalar direkt olarak *R* geninde olduğu gibi, bitkinin savunma mekanizmasında yer alan genlerde de olabilmektedir. Örneğin birkaç araştırma grubu, direkt olarak konukçu savunma mekanizmasında meydana gelen mutasyonları seçmiş ve çalışmıştır. Çok fazla sayıda mutant bitki arasında en iyi bilinenleri fitoaleksin üretmeyen *pad* mutantları [Glazebrook ve Ausubel, 1994; Glazebrook ve ark., 1997], PR-proteini üretmeyen *npr1* mutantı [Cao ve ark., 1994] ve spesifik olmayan hastalıklara dayanıklılık mutantı *ndr1* [Century ve ark., 1995] mutantlarıdır. Ekstrem duyarlılık mutantı *Ws-eds1* ise *Ws-0* ekotipinden elde edilmiştir. Bu mutantlar farklı laboratuvarlarda bakteriyel etmen olan *P. syringae*'ye ve bazıları da mildiyö ve külleme etmenleri başta olmak üzere fungal etmenlere karşı da fenotipik olarak tanımlanmıştır.

Arabidopsis pad mutantlarına özellikle burada değinmekte fayda vardır, çünkü bunlar bilinen ilk fitoaleksin üretmeyen mutantlardır. Fitoaleksinlerin bitki savunmasındaki rolünü saptamak amacıyla Glazebrook ve Ausubel [1994] ve Glazebrook ve ark [1997] tarafından elde edilmişlerdir ve *pad1*, *pad2* ve *pad4*, *P. syringae*'nin bazı patovalarına karşı düşük miktarda camaleksin (*Arabidopsis*'in fitoaleksini) sentezlerken diğerlerine karşı ana ekotipi Col-0 kadar

sentezleyebilmektedir. Fakat *pad3* mutanti ne tür elisitör kullanıldığına bakmaksızın hiç camaleksinin oluşturmamıştır ve sonuç olarak *pad3*'teki mutasyonun camaleksinin sentezlenmesinden sorumlu olan genlerde meydana geldiği sonucuna varılmıştır. *Arabidopsis pad3* mutantının *P. syringae*'nin avirulent ırklarına karşı daha hassas olmadığı aynı çalışmada rapor edilmiştir ve camaleksinin en azından *Arabidopsis-P. syringae* interaksiyonunda bir öneme sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu mutantın *P. parasitica*'nın avirulent ırklarına karşı denenmesi sonucunda, ana ekotipe kıyasla az da olsa duyarlı olduğu saptanmıştır [Mert-Türk ve ark., 2003a , Mert-Türk ve ark., 2003b]. Bu sonuç camaleksinin *Arabidopsis*'in *P. parasitica*'ya karşı dayanıklılığında az da olsa bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Aynı mutant bitkiler *A. brassicae* ile inokule edildiğinde, ana ekotipine kıyasla enfeksiyona karşı çok fazla hassaslaştığı rapor edilmiştir [Thomma ve ark., 1999]. Elde edilen bu sonuçlar hastalıklara dayanıklılığın sonuçlanmasında farklı hastalık etmenlerine karşı bazı genlerin varlığı büyük önem taşırken, diğerleri için önemli olmadığını göstermektedir. Sonuç olarak direk *R* geninde değil de, sinyal iletim mekanizmasında yer alan yukarıdaki lokusların (*PAD*, *NPRI*, *NDR1* ve *EDS1*) bitkilerde bazı hastalık etmenlerine karşı mutlaka gerekli olduğu bulunmuştur.

SONUÇ

Bitkilerin fizyolojik, selüler ve biyokimyasal özelliklerinden sorumlu genel moleküler mekanizma, bütün bitkilerde olduğu gibi *Arabidopsis*'te de mevcuttur. Bu yüzden bitkilerde hayati fonksiyonların genetik tanımını anlamak için bilmek istediğimiz genlerin çoğunu bu bitki içermektedir. Bu yüzden bu bitkinin genomunun daha detaylı bir şekilde çalışılmak istenmesi akıllıca ve aynı zamanda da mutlak bir ihtiyaçtır. Dünyada bir çok bilimci bu avantajların farkına varmakta ve özellikle moleküler genetikte model bir sistem olarak olağanüstü deneysel avantajlarından yararlanmaktadır. Gelecek on sene içerisinde yapılacak çalışmalar bitki fizyolojisi ve gelişme biyolojisine ışık tutabilir. Bu bilgilerin önemi bitki ıslahındaki kullanım alanı ve böylece üretimin çok daha fazla olduğu tarımın sürekliliği küçümsenemez boyutlarda olacaktır.

KAYNAKLAR

Aarts, N., M. Metz, E. Holub, B.J. Staskawicz, M.J. Daniels, J. Parker. 1998. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signalling pathways in *Arabidopsis*. P. Nat. Acad. Sci. USA, 96: 10307-10311.

Adam, L., S.C. Somerville. 1996. Genetic characterisation of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 9: 341-356.

Adam, L., S. Ellwood, I. Wilson, S. Xiao, G. Saenz, R. Oliver, J.G. Turner, S. Somerville. 1999. Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. Mol. Plant-Mic. Int., 12:1031-1043.

Bent, A.F., B.N. Kunkel, D. Dahlbeck, K.L. Schmidt 1994. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Science, 265 (1994): 1856-1860.

Bittner-Eddy, P., C. Can, N. Gunn, M. Pinel, M. Tor, I. Crute, E. Holub and J. Beynon. 1999. Genetic and physical mapping of the *RPPI3* locus in *Arabidopsis* responsible for specific recognition of several *Peronospora parasitica* (downy mildew) isolates. Plant Journal, 21: 177-188.

Botella, M.A., J.E. Parker, L.N. Frost, P.D. Bittner-Eddy, J.L. Beynon, M.J. Daniels, E.B. Holub, J.D.G. Jones. 1998. Three genes of *Arabidopsis RPP1* complex resistance locus recognise distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. Plant Cell, 10: 1847-1860.

Buell, C.R., S.C. Somerville. 1995. Expression of defense-related and putative signalling genes during tolerant and susceptible interactions of *Arabidopsis* with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Mol. Plant-Microbe Int, 8: 435-443.

Cao, H., S.A. Bowling, A.S. Gordon, X. Dong. 1994. Characterisation of an *Arabidopsis* mutant that is non-responsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell, 6: 1583-1592.

Century, K.S., E.B. Holub, B.J. Staskawicz. 1995. *NDR1*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and fungal pathogens. P. Nat. Acad. Sci. USA, 92: 6597-6606

Crute, I.R., J. Beynon, J. Dangl, E. Holub, B. Mauch-Mani, A. Slusarenko, B. Staskawicz, F. Ausubel. 1994. Microbial pathogenesis of *Arabidopsis*. In *Arabidopsis*. Eds. E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville. pp. 705-747. Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York.

Dangl, J.L. 1993. The emergence of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant-pathogen interactions. Adv. Plant Pathol., 10: 127-156.

Dangl, J.L. 1992. The major histocompatibility complex a la carte: are there analogies to plant disease resistance genes on the menu? Plant Journal, 2: 3-11.

Davis, K.R. 1992. *Arabidopsis thaliana* as a model host for studying plant-pathogen interactions. In: Molecular signals in plant-microbe communication. Eds. DPS Verma. CRC Pres, Boca Raton. 393-406.

Davis, K., R. Hammerschmidt. 1993. *Arabidopsis thaliana* as a model for plant-pathogen interactions. American Phytopathological Society Pres, St Paul, MN. USA.

Debener, T., H. Lehnackers M. Arnold, J.L. Dang. 1991. Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a *Pseudomonas syringae* isolate. Plant Journal, 1: 289-302.

Dixon, T.C. 1981. Vegetable Crop Disease. Macmillan, London.

Glazebrook, J. 1997. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. Annu. Rev. Genet., 31: 547-569.

Glazebrook, J., M. Zook, F. Mert, I. Kagan, E.E. Rogers, I.R. Crute, E.B. Holub, R. Hammerschmidt, F.M. Ausubel. 1997. Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. Genetics, 146: 381-392.

Glazebrook, J., F.M. Ausubel. 1994. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterisation of their interactions with bacterial pathogens. P. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 8955-8959.

Grant, M.R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald. 1995. Structure of *Arabidopsis RPM1* gene which enables dual-specificity disease resistance. Science, 269: 843-846.

- Holub, E.H. 1997. Organisation of resistance genes in *Arabidopsis*. In: The gene-for-gene relationship in plant-parasite interactions. Eds. I.R. Crute, E.B. Holub and J.J. Burdon. CAB International. pg: 5-26.
- Holub, E.B., J.L. Beynon. 1997. Symbiology of mouse-ear cress (*Arabidopsis thaliana*) and Oomycetes. Adv. Bot. Res., 24: 227-272.
- Holub, E.B., J.L. Beynon, I.R. Crute. 1994. Phenotypic and genotypic characterisation of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant. Mic. Int., 7: 223-239.
- Kranz, A.R. ve B. Kircheim. 1987. *Arabidopsis* Inf. Serv. 24.
- Laibach, F. 1951. *Bitr. Biol. Pflanzen*, 28: 173-210
- Lee, S., D.C. Stenger, D.M. Bisaro. 1994. Identification of loci in *Arabidopsis* that confer resistance to geminivirus infection. *Plant Journal*, 6: 525-535.
- Leutwiler, L.S., B.R. Hough-Evans, E.M. Mayerowitz., 1984. *Mol. Gen. Genet.*, 194: 15-23.
- Mert-Türk F., M.H. Bennett, J.W. Mansfield, E.B. Holub 2003a. Camalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* following abiotic elicitation or inoculation with virulent or avirulent *Hyaloperonospora parasitica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 62: 137-145.
- Mert-Türk F, Bennett MH, Mansfield JW, Holub EB. 2003b. Quantification of camalexin in several accessions of *Arabidopsis thaliana* following inoculation with *Peronospora parasitica* and UV-B irradiation. *Phytoparasitica*, 31: 81-89.
- Mindrinos, M. F. Katagari, G-L. Yu, R.M. Ausubel. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*. 78: 1856-1860.
- Parker J.L., E.B. Holub, L.M. Frost, A. Falk, N.D. Gunn, M.J. Daniels. 1996. Characterisation of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* which suppresses resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell*, 8: 2033-2046.
- Röbbelen, G. 1965. *Arabidopsis* Inf. Serv., 2: 36-47.
- Sijmons, P.C., von Mende, N., F.M.W. Grundle. 1994. Plant-parasitic Nematods. In *Arabidopsis*. Eds. E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville). pp. 685-704. Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York.
- Simon, A.E. 1994. Interaction between *Arabidopsis thaliana* and viruses. In *Arabidopsis*. Eds. E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville).pp. 749-767. Cold Spring Harbour Laboratory Pres, New York.
- Tör M., E.B. Holub, E. Brose, R. Musker, N. Gunn, C. Can, I.R. Crute, J.L. Beynon. 1994. Map position of three loci in *Arabidopsis thaliana* associated with isolate-specific recognition of *Peronospora parasitica* (downy mildew). *Mol. Plant-Mic. Int.*, 7 : 214-22.
- Thomma, B.P.H.J., I. Nelissen, K. Eggermont, F. Broekaert. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicola*. *Plant Journal*, 19: 163-171.