

Fare Kulağı Teresi, *Arabidopsis thaliana*'da Konukçu Dışı Dayanıklılığın Erken Yanıklık Hastalık Etmeni *Alternaria solani*'nin Kontrolü İçin Araştırılması*

Özer ÇALIŞ

Çiğdem YAZAR

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Tokat

Özet: Bu çalışma model bitki *Arabidopsis thaliana* (Farekulağı teresi)'nin konukçusu olmadığı erken yanıklık hastalık etmeni *Alternaria solani*'ye karşı göstermiş olduğu reaksiyonları bir zaman çalışması içerisinde ortaya koymak için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla orijinal genleri taşıyan *Landsberg erecta* (Ler) ve Columbia (Col-0) ekotip bitkileri ile *PAD4*, *NPR1* ve *EDS1* genlerinin mutasyona uğratılmış mutant *A. thaliana* bitkileri (Pad4-2 and Npr1-1) *A. solani* hastalık etmeninin misel diskleri ve konidiosporlarıyla inokule edilmiştir. Pad4-2 ve Npr1-1 mutant bitkilerinde orijinal Ler ve Col-0 ekotiplerine göre nekrotik semptom oluşumu 5 ile 10 kat fazla bulunmuştur. Spor inokulasyonlarında Eds1-3, Pad4-2 ve Npr1-1 mutant bitkilerinde sporların çimlendiği fakat spor penetrasyonunun olmadığı, orijinal Ler ve Col-0 bitkilerinde spor çimlenmesi ve penetrasyonun gerçekleşmediği bulunmuştur. Bu sonuçlar *A. thaliana* orijinal bitkilerinin sahip olduğu *PAD4*, *EDS1*, ve *NPR1* genleriyle dayanıklılığı konukçu dışı yapısında sağladığını, orijinal bitkilerdeki savunma mekanizmasının her zaman aktif olduğunu işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, erken yanıklık, konukçu dışı dayanıklılık

Investigation of Non-Host Resistance in *Arabidopsis thaliana* (Mouse-Ear Cress) Plants To Control Early Blight Pathogen *Alternaria solani*

Abstract: This study was conducted to reveal non-host interactions between model plant *Arabidopsis thaliana* and early blight pathogen *Alternaria solani* in time-course experiments. Therefore, original Ler and Col-0 ecotypes that contain *PAD4*, *NPR1*, and *EDS1* resistance genes and their mutants, Pad4-2 and Npr1-1 plants were inoculated with mycelial discs and conidial suspension. The inoculated Pad4-2 and Npr1-1 mutants have shown necrotic symptoms 5 to 10 times higher than original Ler and Col-0 ecotypes. Conidiospor inoculated Eds1-3, Pad4-2 and Npr1-1 mutant plants supported spor germinations, however, neither spor germinations nor spor penetrations were occurred on original Ler and Col-0 ecotype leaves. These results indicate that wild-type *A. thaliana* ecotypes carrying *PAD4*, *EDS1* and *NPR1* resistance genes govern resistance in non-host manner, the resistance mechanisms are always active to all organisms in the original *A. thaliana* ecotypes.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, early blight, non-host resistance

1. Giriş

Erken yanıklık bir fungal hastalık olup, her yıl Solanaceae familyasına giren bitkilerde büyük ürün kayıplarına neden olmaktadır. Dünyada toplam domates üretimi 2009 yılında 152.956.115 ton (t) olup, Türkiye 10.745.600 t domates üretimi ile dünya domates üretiminde dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2011). Dünya'da ve Türkiye'de domateste minimum %10 ürün kaybına neden olan hastalık etmeni *Alternaria solani* fakültatif saprofitik bir fungustur. Hastalık etmeni fungus yapraklarda düzensiz kahverengi-siyah lekeler olarak başlar, ilerleyen dönemlerde yaprak ve gövdelerde çökükler, kahverengi ölü dokular ve bunların çevresinde hastalık etmeninin toksinlerinin oluşturduğu sarı bölgeler görülmektedir.

(Agrios, 1997; Lawrence ve ark., 2000; Anonymous, 2003). Bitki yapraklarında iç içe geçmiş nekrotik alanların yanıklığa benzer görünüm almasından dolayı hastalığa erken yanıklık denilmektedir. Bu nekrotik alanlar bitki yapraklarının deforme olarak dökülmesine, ürün miktarının düşmesine, meyve kalitesinin yok olmasına neden olmaktadır (Agrios, 1997; Zhang ve ark., 2003). Hastalıktan dolayı büyük oranlarda ürün kayıpları oluşabilmektedir. Ölü bitki dokularını kullanan nekrotrofik fungal hastalık etmeni *A. solani* başta domates ve patates gibi solanaceae familyası bitkileri olmak üzere sebzeleri (fasulye), süs bitkilerini (karanfil) ve meyve türlerini (elma, portakal) hastalandırmaktadır (Agrios, 1997).

Günümüzde üretimi yapılan tüm ticari domates çeşitleri *A. solani* hastalık etmenine karşı duyarlı olup, hastalık etmeni kültürel önlemler ve rutin fungusit uygulamaları ile kontrol altında tutulmaktadır (Fooland ve ark., 2002; Anonymous, 2003). Gerek klasik gerekse biyoteknolojik yöntemlerle erken yanıklığa karşı dayanıklı çeşitler geliştirilmeye çalışılmasına rağmen hastalık etmeninin kompleks yapısı ve dayanıklı bitkilerdeki karmaşık genetik yapıdan dolayı istenen özellikte dayanıklı domates çeşitleri ortaya çıkarılamamıştır (Zhang ve ark., 2003). Kültür ve yabani çeşitlerinde dayanıklılığın poligenik bir yapıda olduğu, erken yanıklık hastalığını kontrol altına alabilen monogenik bir dayanıklılığın kültür domateslerinde veya onun akrabası türlerde henüz bulunmadığı rapor edilmektedir (Kemmitt, 2003; Zhang ve ark., 2003). Amerika Birleşik Devletlerinde ve Avrupa'da yapılan ıslah ve moleküler çalışmalarda erken yanıklık hastalık etmenine dayanıklı kültür domatesi çeşitlerinin tohumları piyasada bulunmakla birlikte bu çeşitlerin verim özelliklerinin düşük olması, üretici tarafından tercih edilmemesi nedeniyle üretimi yaygınlaşmamıştır (Gardner ve ark., 2010).

Bir model bitki olan farekulağı teresi, *Arabidopsis thaliana*, lahanagiller (*Brassicaceae*) familyasındandır. *A. thaliana* ekonomik yönden önemli bir bitki olmamasına rağmen, 50 yıl boyunca fizyolojik, biyokimyasal, genetik ve moleküler çalışmalarda model bitki olarak kullanılmıştır. *A. thaliana* bitkisinin ucuz ortamlarda gelişmesi, özel iklimsel isteklerinin olmaması, az miktarda mineral isteği nedeniyle genetik çalışmalar için uygundur. *A. thaliana* bitkisinin çok sayıda tohum üretmesi, hücrelerindeki toplam DNA miktarının oransal azlığı, mutant bireylerinin varlığı ve bu organizmanın gen aktarım çalışmalarına uygunluğu gibi özellikleri nedeniyle moleküler çalışmalar için ideal bitkidir. Farekulağı teresi belirtilen birçok özellik yanında genetik transformasyonun kolay olması, DNA polimorfizminin yüksek olması, gen izolasyonunda ve diğer genom çalışmalarında kullanılması açısından mükemmel olup laboratuvarda çalışmak için uygun bir organizmadır. Ayrıca *Arabidopsis*'in genom dizisi 2000 yılının sonlarında

tamamlanarak dünya üzerinde genom sekansı tamamlanan ilk bitki olmuştur (AGI, 2000; TAIR, 2011). Model bitki *A. thaliana* en küçük genom (120 mega base pairs (Mbp) yapısına sahip bir bitkidir. Mısır yaklaşık olarak 2400 Mbp olup *Arabidopsis* genomundan 20 defa daha büyüktür (Bennetzen, 2009).

Bitkilerde hastalık oluşturan organizmalar gen- için-gen teorisine göre konukçuda bulunan dayanıklılık genleri tarafından tanımlanarak bu organizmaya ya da organizmanın ırkına özel dayanıklılık oluşturlar. Fakat daha az anlaşılan konukçu dışı dayanıklılıkta bütün bitkilerin tüm patojen türlerine dayanıklı olduğu görülmektedir. Konukçu dışı dayanıklılık kompleks, çok sayıda dayanıklılık faktörünün bir arada bulunduğu patojene karşı oluşturulmuş savunma sistemidir. Bir başka deyişle konukçu dışı dayanıklılık hastalık oluşturan patojenlerin konukçu bitkilerinde gelişip, çoğaldığı yetiştirme habitatına zayıf adaptasyonu olarak tanımlanmaktadır (Zimmerli ve ark., 2004). Konukçu dışı dayanıklılığın farklı bileşenleri ortaya konmuş, yapılan çalışmalarda konukçu dışı patojenlere karşı bitkilerin doğasında bulunan farklı mekanizmaların dayanıklılığı kontrol ettiği bulunmuştur (Thordal-Christensen, 2003; Lipka ve ark., 2005).

Tahıllarda özellikle de arpada önemli ürün kayıplarına neden olan *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) konukçusu olmayan *A. thaliana* üzerine inokule edildiğinde hastalık etmeni fungus sporlarının büyük çoğunluğu haustorium oluşturmamakta ve penetrasyon görülmemektedir. Arpa külleme etmeni fungus konukçusu olmayan *A. thaliana* üzerinde gelişmemekte, eşeyli ya da eşeysiz spor oluşturmamaktadır. Konukçunun hastalık etmenine karşı savunma mekanizmaları incelendiğinde kallos miktarında farklılık bulunmuş, oluşturulan *Pen1* ve *Pen2* mutantlarıyla *A. thaliana* bitkisindeki arpa küllemesine dayanıklılığın dayanıklılık genlerinin kontrol ettiği bir bağışıklık sistemine dayandığı ortaya çıkmıştır (Thordal-Christensen, 2003; Lipka ve ark., 2005).

Konukçu olmama ya da konukçu dışı dayanıklılık mekanizmasına bir diğer güzel örnek buğdayda toprak kökenli hastalık etmeni olan *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*'

olup hastalık etmeni fungus yulaf bitkilerinin köklerini hastalandırmamaktadır. Fakat yulaflarda hastalık oluşturan diğer fungus *G. graminis*. var. *avenae* içermiş olduğu avenacin A-1 toksini yulaf bitkilerinin oluşturduğu saponin maddelerini detoksifiye ederek yulaflar üzerinde hastalık oluşturmaktadır. Yulaf bitkilerinde oluşturulan spesifik mutasyonla avenacin A-1 içermeyen mutant yulaflarının köklerinde *G. graminis* var. *tritici* fungal hastalık etmeni gelişmekte ve bu mutantlar hastalık etmenine duyarlılık göstermektedir. Burada *G. graminis* var. *tritici* yulafın konukçu dışı patojeni olup, yulafta bulunan avenacin A-1 maddesinin detoksifiye eden enzim içeren mutant yulaf bitkilerinde gelişebilmektedir (Thordal-Christensen, 2003; Parker, 2009).

Model bitki *A. thaliana*'da konukçu dışı dayanıklılık geni *NHO1* klonlanmıştır (Lu ve ark., 2001). Kimyasal mutasyon sonucunda ortaya konan *NHO1* geni içermeyen mutant *A. thaliana* bitkileri *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato* ve *P. fluorescens* bakterilerine karşı duyarlılık göstermektedirler. Bu durum bitkilerin sahip oldukları tüm dayanıklılık sistemlerini potansiyel hastalık etmenlerine karşı topyekün kullandıklarını göstermektedir. Genel olarak bitkilerin sahip oldukları bu kitlesel patojen imha silahları potansiyel patojenlere karşı spesifik olmayan bir yapıda aktif hale geçirilerek, hastalık etmenin gelişmesini sınırlamaktadır. Bitkilerde hastalığın oluşabilmesi için mikroorganizmanın tüm bitki savunma mekanizmalarını aşmış, bu savunma mekanizmalarını inaktive etmesi veya atlatması gerekmektedir (Lu ve ark., 2001; Thordal-Christensen, 2003; Parker, 2009; Lenk ve Thordal-Christensen, 2009).

Konukçu dışı dayanıklılığın varlığını domatesin önemli hastalık etmeni olan *A. solani*'ye karşı model bitki *A. thaliana*'da ortaya koyabilmek için doğadan toplanan *Arabidopsis* ekotipleri ile dayanıklılık genleri veya bu genlerin izlediği bir kimyasal reaksiyon yolu üzerinde özel olarak oluşturulmuş mutant *A. thaliana* bitkileri testlenerek hastalık reaksiyonları karşılaştırılmıştır. Çünkü dayanıklılık genlerinin veya onun komponentinin inaktive edilmesiyle oluşturulan mutantlar patojen etmenlerine duyarlı hale

gelmektedirler. Doğal ekotiplerde ise bu genler aktif olup konukçu olmayan patojenle inokule edildiğinde bu genler veya onların ürünleri aktif olduğu için bitki dayanıklı görülmektedir. Bu çalışma erken yanıklık hastalığının kontrolü için konukçu dışı dayanıklılığın alternatif bir çözüm olup olmadığını, hastalığı kontrol altına alabilecek gen ve/veya dayanıklılık mekanizmalarını ortaya çıkarabilmek için gerçekleştirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Erken Yanıklık Etmenlerinin İzolasyonu

Erken yanıklık etmeni *Alternaria solani* Tokat ile Turhal arasında sırık ve yer domatesi yetiştirilen tarlalardan toplanan örneklerin yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra patates dekstroz agar (PDA) besi ortamında gelişmeleri ile izole edilmiştir. PDA besi ortamında geliştirilen *Alternaria solani*'nin 2, 5 ve 6 no'lu izolatları domates besi ortamında geliştirilmişlerdir.

2.2. Spor İnokulasyonu

Koch postulatı uygulanarak besi ortamında geliştirilen *A. solani* 2 no'lu virulent izolatı distile su ile toplandıktan sonra sporlar Haemocytometer (Thoma lamı) ile sayılmıştır. Spor süspansiyon konsantrasyonu 2×10^6 spor ml^{-1} olacak şekilde ayarlanarak hazırlanan sporlar iklimlendirme odasında geliştirilen *A. thaliana* bitkilerine ve domates hatlarına sabah, öğle ve akşam püskürtülerek inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir.

2.3. Miselyum İnokulasyonu

Model bitki *Arabidopsis* bitkilerinin yapraklarına uygulanan bir diğer inokulasyon metodudur. Domates besi ortamında geliştirilen *A. solani* miselyumları mantar-delici ile 5 mm çapında kesilerek iğne ile delinmiş *Arabidopsis* yapraklarına bırakılmış, nemin muhafazası için bitkiler 7 gün boyunca şeffaf plastik torba ile kapatılarak hastalığın gelişimi sağlanmıştır. İnokule edilen *A. thaliana* bitkisinin her bir yaprağı üzerine yukarıda belirtildiği gibi bırakılan miselyum disklerinin her biri ayrı bir tekrar olarak kabul edilmiş olup toplam 65 adet miselyum disk yapraklar üzerine yerleştirilmiştir. İnokulasyondan 7 gün sonra miselyum diskleri kaldırılarak faz-kontrast mikroskop altında semptomlar incelenmiştir.

2.4. Domates Besi Ortamının Hazırlanışı

Ticari olarak üretilen (DİMES, Tokat) %100 domates suyundan 30 ml alınarak 270 ml çeşme suyu ilave edilerek, domates suyu 10 kat su ile seyreltilerek 300 ml besi ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan domates suyunun pH'sı ölçülerek 5.5-6.0 olması için seyreltik HCl asit ilave edilmiştir. Domates ortamının katılaşması için %1.5 agar (4.5 gr agar agarı, Lab M, İngiltere) ilave edilerek 121°C'de 1 atmosfer basınçta 15 dakika otoklav edilmiştir. Otoklav edilen domates besi ortamı steril kabin içerisinde 9 cm çapındaki steril Petriler içerisinde ~25 ml besi ortamı olacak şekilde dökülmüştür. Petrilere dökülen besi ortamları donduktan sonra *A. solani* hastalık etmeninin miselyumları 5 mm çapında en güçlü gelişimin olduğu yerden kesilerek Petrinin ortasına ters olarak bırakılmıştır. İnokule edilen Petriler ters çevrilerek 26°C oda sıcaklığında gelişmeye bırakılmıştır.

2.5. *Arabidopsis thaliana* Bitkileri ve Domates Hatlarının Yetiştirilmesi

Çalışmalarda kullanılan *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları Prof Dr. John G. TURNER (School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, İngiltere) ve domates hatları Prof. Dr. Randolph G. GARDNER (Horticultural Science, North Carolina State University, Raleigh, ABD)'den temin edilmiştir. Model *A. thaliana* ekotip ve mutantlarının gelişebilmesi için: 2 volum toprak, 2 volum grit (küçük çakıl), 2 volum torf ve 1 volum vermiculit ile özel toprak karışımı hazırlanmış bu özel karışım *A. thaliana* toprağı ısıya dayanıklı fırın torbalarına konularak 121°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir. Hazırlanan steril toprak karışımı saksılara konulduktan sonra yüzeyin pürüzsüz bir halde olması sağlanarak *A. thaliana* (Col-0, Ler, Eds1-3, Npr1-1, Pad4-1) tohumları itinayla ekilmiştir. Daha sonra tohumları içeren saksılar bir tepsi içerisinde konularak sulaması alttan olacak şekilde streç film ile kaplanmıştır. Bu hazırlanan saksılar homojen bir çimlenme için 24 saat karanlık +4°C'de soğuk hava deposunda bekletilmiş ve sonra iklimlendirme odasında 22±5°C'de 16 saat gündüz 8 saat karanlık şartlarda gelişmeye bırakılmıştır.

Domates tohumları içerisinde turf bulunan viyollere ekilmiştir. Viyollerde 3-4 gerçek yapraklı döneme kadar gelişen domatesler (NC84173, EBR1, EBR2, EBR3, EBR4, EBR5 ve EBR6) içerisinde turf bulunan plastik saksılara (Akyüz plastik, No:7, İstanbul) şaşırtılmıştır. Bitkilerin gelişimi iklimlendirme odasında 22±5°C'de 16 saat ışık 8 saat karanlık koşullarda gerçekleştirilmiştir.

2.6. Epifluoresent Mikroskopi

Hastalık etmeni *A. solani* sporlarını ve ölü bitki dokularını görüntüleyebilmek için fluorescent 3-3 Dihexyloxacarboyanin iodide (DIOC₆) kimyasalı 0.5 mg ml⁻¹ olacak şekilde metil alkol içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır (Duckett ve Read, 1991). Stok solüsyon -20°C saklanmıştır. Hazırlanan stok 10 defa dsH₂O içinde seyreltilerek örneklerin fluorescent boyayı 30 saniye boyunca almaları sağlanmıştır. Örnekler Nikon faz kontrast mikroskoba entegre edilmiş B2A (450 490 nm excitation filtresi ve 520 nm barrier filtre) epifluoresent filtrede incelenmiştir.

3. Bulgular

Model bitki *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutant yaprakları üzerine bırakılan miselyum diskleri inokulasyondan 7 gün sonra kaldırılarak yaprak üzerindeki semptomlar ışık mikroskopunda incelenmiştir. *Landsberg erecta* (Ler) ve Columbia (Col-0) ekotip yaprakları üzerine bırakılan 65'er miselyum diskinden sırasıyla 3 ve 5 tanesinin bitki dokusunda nekrotik semptom oluşturduğu diğer 62 ve 60 adet miselyum diskinin herhangi bir renk değişikliği oluşturmadığı bulunmuştur (Şekil 1). Aynı sayıda miselyum diski bırakılan duyarlı fenotipe sahip fitoaleksinin oluşturmayan (*Phytoalexin deficient4*) Pad4-1 ve sistemik kazanılmış dayanıklılık üzerinde PR genlerinin oluşmadığı (*Nonexpressor of PR genes1*) Npr1-1 mutantlarında sırasıyla 29 ve 26 adet miselyum diskinin nekrotik semptom oluşturduğu bulunmuştur (Şekil 1). Çalışmada kullanılan Pad4-1 mutantında nekrotik semptom oluşumu Ler ekotipine göre ~7 kat, Col-0 ekotipine göre 5 kattan fazla olurken, Npr1-1 mutantında nekrotik semptom oluşumu sırasıyla Ler ekotipine göre ~10 kat, Col-0

ekotipine göre 6 kat fazla olduğu ortaya konmuştur (Şekil 1).

3.1. Konidiospor inokulasyonları

Arabidopsis ekotip ve mutantları üzerine 2×10^6 spor ml^{-1} konsantrasyonunda püskürtülen *A. solani* sporlarının yaprak üzerindeki gelişimleri her 12 saatte yapılan örneklemler ile 72 saat boyunca ışık mikroskopunda incelenmiştir. Bu incelemelerde inokule edilmiş yaprak yüzeyinde tesadüfen seçilmiş 100 konidiosporda çimlenme, penetrasyon sayıları araştırılmıştır. Aynı paralelde hazırlanan domates (EBR1-6 ve NC84173) hatlarında sporların çimlenme durumları ve penetrasyonu incelenmiştir. *Arabidopsis* ekotip ve mutant bitki yapraklarında inokulasyondan sonraki ilk 24 saat içerisinde herhangi bir spor çimlenmesi görülmez iken domates hatlarında *A. solani* sporlarının %2-6'sının ilk 24 saat içerisinde çimlendiği bulunmuştur (Şekil 2).

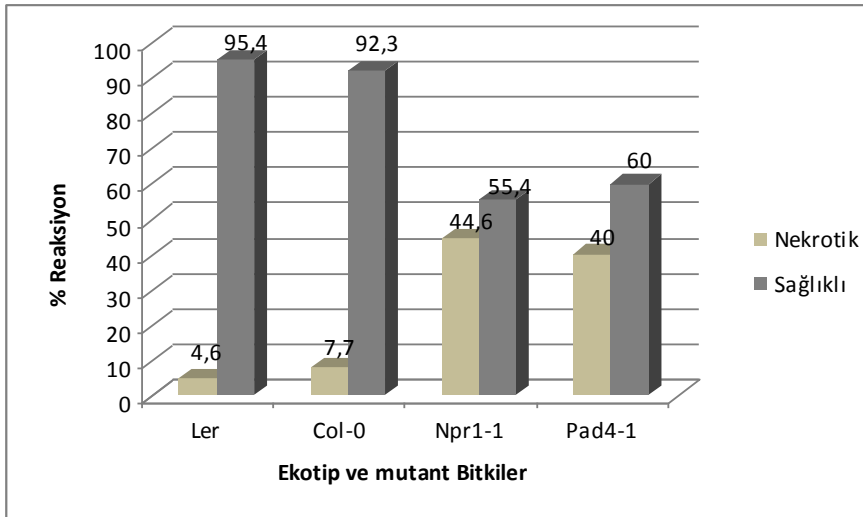
Arabidopsis thaliana ekotipleri üzerinde sayılan *A. solani* sporlarında herhangi bir çimlenme görülmemiştir (Şekil 2A). Fakat çok duyarlı (enhanced susceptible) Eds1-3 (25), fitoaleksin içermeyen Pad4-1 (22) ve patojenisite ile ilgili (PR) genleri içermeyen Npr1-1 (13) mutant bitkilerinin yapraklarında sayılan sporlarda çimlenme bulunmuştur (Şekil 2B).

3.2. Spor penetrasyonu

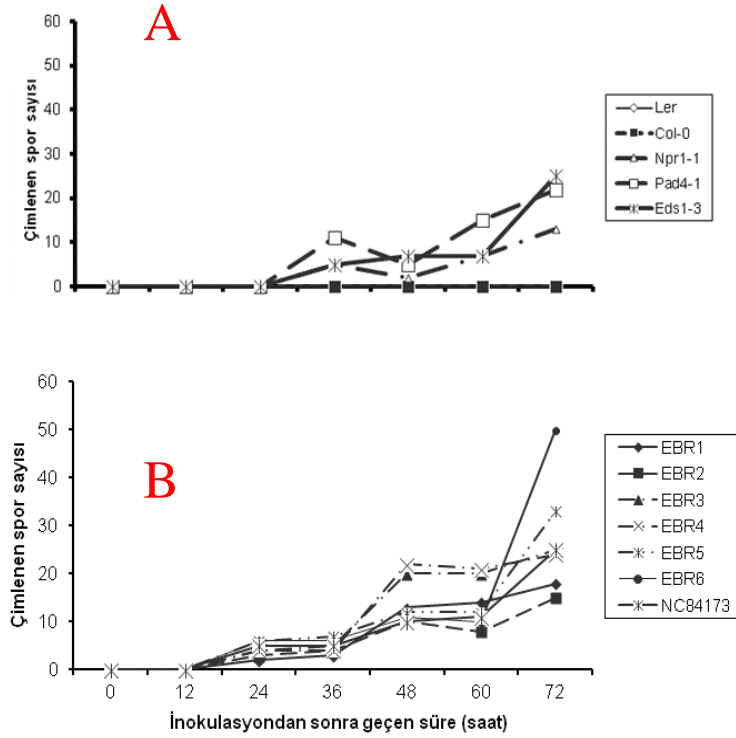
Arabidopsis ekotip ve mutantları üzerinde çimlenen sporlardan konukçu hücre içerisine penetre olanlar sayıldığında, çimlenen *A. solani* sporlarından hiç birinin konukçu hücrelerine penetre olmadığı ve sağlıklı hücrelerin DIOC₆ solüsyonunda kırmızı renkte oldukları bulunmuştur (Şekil 3A). Fakat domates hatları üzerinde çimlenen sporların hücre içerisine penetre oldukları, penetrasyonun olduğu domates hücrelerinin ölmesi nedeniyle DIOC₆ solüsyonunda bu hücrelerin karanlık görüldükleri bulunmuştur (Şekil 3B). Domates hatları üzerinde çimlenen sporlardan çoğunun konukçu hücre içine penetre olduğu ortaya konmuştur (Şekil 3B).

4. Sonuçlar ve Tartışma

Çalışmada domates başta olmak üzere Solanaceae familyasına dahil olan bitkilerde önemli bir hastalık etmeni olan *Alternaria solani*'n konukçusu olmayan model bitki *A. thaliana*'nın orijinal ekotip ve mutant bitkilerinde miselyum diskleri ile yapılan patojenisite testlerinde 7 gün sonra yaprakta semptom oluşturma durumları ve konidiosporlarla yapılan inokulasyonlarda spor çimlenme ve penetre olma durumları flüorescent boyama (DIOC₆) yöntemi



Şekil 1. Model bitki *Arabidopsis thaliana* ekotip (Ler, Col-0) ve mutant (Npr1-1, Pad4-1) yaprakları iğne ile delindikten sonra üzerlerine 5 cm çapında misel diskler bırakılmıştır. Yapraklara bırakılan misel diskler uygulamadan 7 gün sonra kaldırılarak nekrotik semptom oluşturanlar ve oluşturmayanlar (sağlıklı) ışık mikroskobu altında incelenerek yüzdeleri bulunmuştur. Örneğin *Landsberg erecta* bitkisi yapraklarında %95.4 sağlıklı, %4.6 nekrotik alan oluşurken Npr1-1 mutant bitkisi yapraklarında %44.6 nekrotik, %55.4 sağlıklı alan bulunmuştur.



Şekil 2. Erken yanıklık etmeni *Alternaria solani*'n 2 no'lu izolatu ile hazırlanarak inokule edilmiş *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları (A) ile domates çeşitlerinde (B) yapılan zaman çalışması. Bu çalışmada tesadüfen seçilen 100 spordan çimlenen sporların sayıları ile zaman arasındaki ilişki ortaya konmuştur.

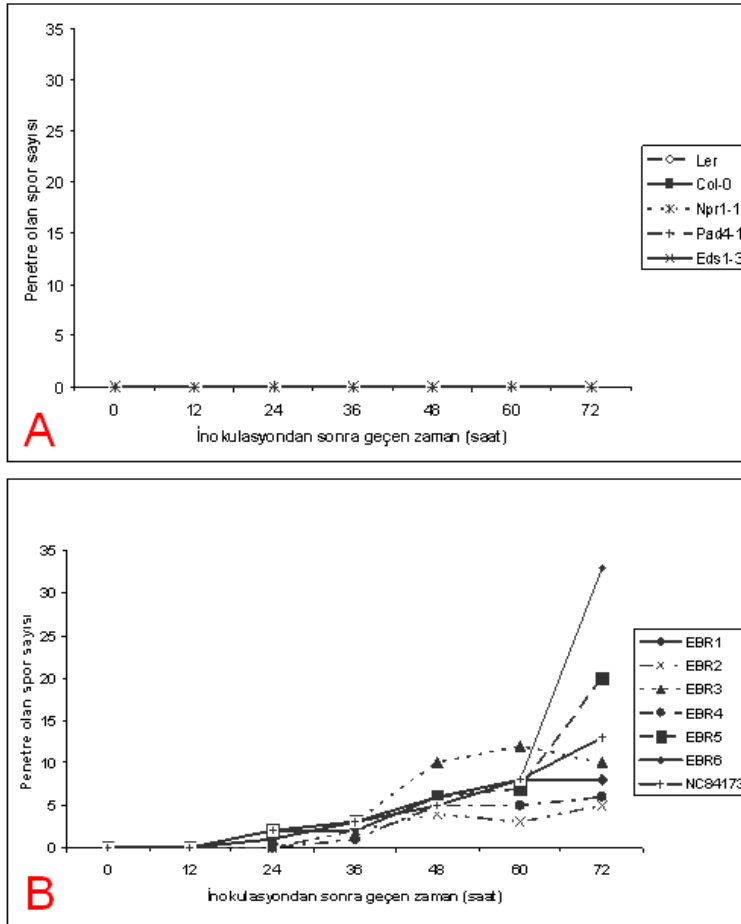
kullanılarak araştırılmıştır. İkinci çalışmada örnekler her 12 saatte bir *Arabidopsis* ve domates bitkileri üzerinden alınarak DIOC₆ solüsyonunda bekletildikten sonra fluorescent mikroskopta incelenmiştir. Bu fluorescent örneklerde tesadüfen seçilen 100 adet spor, çimlenen spor, penetre olan spor sayıları 72 saat (3 gün) boyunca kayıt altına alınmıştır. *Arabidopsis thaliana* ekotipleri ve bu ekotiplerdeki dayanıklılık genlerinin mutasyona uğratılmasıyla elde edilen mutant farekulağı teresi bitkileri üzerindeki *A. solani* sporlarının gelişimleri arasında önemli farklar ortaya konmuştur.

Erken yanıklık etmeni *A. solani* miselyumları ile yapılan ilk çalışmada *Arabidopsis thaliana* ekotipleri üzerine bırakılan miselyum disklerinden %4.6'sının Ler ve %7.7'sinin Col-0 ekotipleri üzerinde nekrotik semptom oluşturduğu bulunmuştur.

Aynı çalışmada patojene özelleşmiş proteinlerin mutasyona uğratıldığı Npr1-1 mutant bitkilerinde %45 ve fitoaleksin

oluşturmayan Pad4-2 mutant bitkilerinde %40 oranında nekrotik semptom oluşumu bulunmuştur (Şekil 1). *Arabidopsis thaliana* Ler ve Col-0 ekotiplerinde hem *NPR1* geni hem de *PAD4* geni aktif olup bu ekotipler üzerine bırakılan miselyal diskler sınırlı sayıda nekrotik semptom oluştururken bu dayanıklılık genlerinin bulunmadığı Npr1-1 ve Pad4-2 mutant bitkilerinde miselyumlardan dolayı oluşan nekrotik semptomların sayısı 5 ile 10 kat daha fazla olmaktadır (Şekil 1).

Paralel sonuçlar aynı bitkilere yapılan spor inokulasyonlarında bulunmuştur. *Arabidopsis* ekotiplerinde spor çimlenmesi bulunmamışken, *Arabidopsis* mutantlarında ilk spor çimlenmesi inokulasyondan 24 saat sonra gözlenmiştir. En fazla spor çimlenmesi çok duyarlı Eds1-3 mutant bitkilerinin üzerinde, en az spor çimlenmesi ise Npr1-1 mutantlarda bulunmuştur. Kontrol olarak kullanılan domates (*Solanum lycopersicum*) hatları üzerinde ilk spor çimlenmesi inokulasyondan 12 saat sonra kayıt edilmiştir. Domates hatları üzerindeki



Şekil 3. *Alternaria solani* sporları ile inokule edilen *Arabidopsis thaliana* ekotip ve mutantları (A) ile domates hatlarında (B) penetre olan spor sayıları. İnokule edilen bitkilerde penetre olan ve olmayan sporlar fluorescent boya DIOC_6 ile belirlenmiştir. Penetrasyonun gerçekleştiği hücreler DIOC_6 solüsyonunda karanlık görülmüştür.

spor çimlenmesinin *Arabidopsis* mutantlarındaki spor çimlenmesine göre inokulasyondan 72 saat sonra en az 2 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Şekil 2). Erken yanıklık hastalık etmeni *A. solani* konukçusu olmayan *Arabidopsis* mutantları üzerinde çimlense bile çalışmada herhangi bir şekilde penetre olan sporlar bulunmamıştır (Şekil 3).

Bitki patojenleri konukçusuna özelleşmiş olup aynı konukçunun bir başka çeşidinde yada yakın bir türünde hastalık yapamayabilir. Burada konukçu ile patojen arasındaki ilişki hala çözümlenmesi gereken önemli bir problemdir. Bugüne kadar yapılan konukçu olmama çalışmalarında, konukçu olmayan bitkiler sahip oldukları savunma sisteminin tamamını veya bir kısmını aktif olarak tuttuğu görülmüştür (Lipka ve ark., 2005; Nakao ve ark., 2011). Nitekim bu çalışmada kullanılan

Arabidopsis mutantlarında bulunmayan *PAD4*, *EDS1* ve *NPR1* genlerinin *A. solani* sporlarının çimlenmesine izin verdiği fakat mutantlarda var olan diğer gen(ler)in sporların penetrasyonunu engellediği anlaşılmaktadır. *Arabidopsis* mutantları arasında dahi sporların çimlenmesinde ortaya çıkan değişkenlikler genlerin sporların çimlenmesinde farklı derecelerde etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Konukçu olmama ya da konukçu dışı dayanıklılık bitkilerde görülen aktif ve pasif dayanıklılık mekanizmalarını içeren daha büyük boyutları olan bitki savunma mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu konuda çok detaylı araştırmalar yapılmakta olup yapılan çalışmalar bitki bağışıklık sisteminin detaylarını ortaya koymaktadır.

Fare Kulağı Teresi, *Arabidopsis thaliana*'da Konukçu Dışı Dayanıklılığın Erken Yanıklık Hastalık Etmeni *Alternaria solani*'nin Kontrolü İçin Araştırılması

Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde bizlere yardımlarını esirgemeyen Zir. Müh. Vasfiye ILIKPINAR ve Zir. Müh. Birgül KÖLEMEN'e teşekkür ederiz. Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Komisyonu tarafından 2006/07 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

- AGI: The Arabidopsis Genome Initiative (AGI). 2000. Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796-815.
- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology .Academic press. San Diego.
- Anonymous, 2003. APS net education center. Plant disease lessons.
- Bennetzen J. 2009. Maize genome structure and evolution in Handbook of maize genetics and genomics. Edited Jeff Bennetzen, Sarah Hake. Published by Springer press. 179-200.
- Duckett and Read, 1991. The use of fluorescent dye 3-3'-dihexyloxycarbocyanin iodide for selective staining of ascomycete fungi associated with liverwort rhizoids and ericoid mycorrhizal roots. New Phytologist 118:250-272.
- FAO: Food and Agricultural Organization of the United Nations 2011. <http://www.fao.org/>
- Fooland, M. R., Zhang, L. P. Khan, A., Nino-Liu, D. and Lin, G. Y. 2002. Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross population of a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. Theoretical and Applied Genetics 122:870-895.
- Gardner, R.G. and D. R. Panthee. 2010. NCEBR1 and NCEBR2 : Early blight and late blight resistant fresh market tomato breeding lines. HortScience 45: 975-976.
- Kemmitt, G. 2003. Early blight of potato and tomato at <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungus/i/ascomycetes/Pages/PotatoTomato.aspx>
- Lawrence, C. B. Singh, N. P., Qiu, J. Gardner, R. G. , Tuzun, S. 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanisms. Physiological and Molecular Plant Pathology 57:211-220.
- Lenk, A. and Thordal-Christensen, H. 2009. From nonhost resistance to lesion-mimic mutants: useful for studies of defense signaling. Advances in Botanical Research 51:92-112.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brand, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. And Schulze-Lefert, P. 2005. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. Science 310:1180-1183.
- Lu, M., Tang, X. and Zhou J. M. 2001. Arabidopsis *NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. the Plant Cell. 13:437-444.
- Nakao, M., Nakamura, R., Kita, K., Inukai, R., Ishikawa, A. 2011. Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis*. Scientific Reports 1 171:1-9.
- Parker, J. 2009. Molecular aspects of plant disease resistance. Annual Plant Reviews 34:2-371.
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource 2011. at <http://www.arabidopsis.org/>
- Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. Current Opinion in Plant Biology 6:351-357.
- Zhang, L. P., Lin, G. Y., Nino-Liu, D. and Foolad, M. R. 2003. Mapping QTLs conferring early blight (*Alternaria solani*) resistance in a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross by selective genotyping. Molecular Breeding 12:3-19.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Somerville, S. 2004. Host and non-host pathogens elicits different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. The Plant Journal 40:633-64.