T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MISIR PATOJENİ FUSARIUM VERTICILLIOIDES FUNGUSUNUN KONTROLÜNDE KONAK KAYNAKLI GEN SUSTURMA YÖNTEMİNİN NICOTIANA BENTHAMIANA'DA ARAŞTIRILMASI

ŞÜHEDA EBRAR YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MISIR PATOJENİ FUSARIUM VERTICILLIOIDES FUNGUSUNUN KONTROLÜNDE KONAK KAYNAKLI GEN SUSTURMA YÖNTEMİNİN NICOTIANA BENTHAMIANA'DA ARAŞTIRILMASI

ŞÜHEDA EBRAR YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DOÇ. DR. FATMA AYDINOĞLU

GEBZE
2023

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

INVESTIGATION OF THE HOST-INDUCED GENE SILENCING METHOD IN THE CONTROL OF FUSARIUM VERTICILLIOIDES IN NICOTIANA BENTHAMIANA

SUHEDA EBRAR YILMAZ

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

DOÇ. DR. FATMA AYDINOĞLU

GEBZE

2023

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05/01/2023 tarih ve 2023/02 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 31/07/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Şüheda Ebrar YILMAZ 'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU

ÜYE : Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE : Dr. Öğr. Üyesi Stuart James LUCAS

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

…..…/…..…/..…… tarih ve ……/…….. sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Fusarium verticillioides, pek çok bitkide çürüklük hastalığına neden olarak bitki büyüme ve verimini azaltan başlıca mısır (*Zea mays* L.) bitkisi patojenidir. Bu tez çalışması, *F. verticillioides sitokrom P450 lanosterol C-14α-demetilaz (CYP51C)* geni üzerinden, RNAi tabanlı Konak Kaynaklı Gen Susturma (HIGS) yönteminin, patojen kontrolündeki potansiyelinin araştırılmasını amaçlamıştır.

Bu çalışmada, brom mozaik virüs tabanlı vektör (BMV_1/BMV_3)'e fungal *CYP51C* geni klonlanarak *Nicotina benthamiana* yapraklarına agroinfiltrasyonuyla aktarılmıştır. Bu doğrultuda, bitkinin *F. verticillioides* ile enfeksiyonu sırasında ektopik olarak ifade olan *CYP51C* geninin RNAi mekanizması ile işlenerek, endojen fungus *CYP51C*'nin hedeflemesi sonucu, fungusta olası büyüme inhibisyonu araştırıldı. Bunun için *N. benthamiana* yapraklarına agroinfiltrasyonun ardından 10^4 konidi/ml *F. verticillioides* infiltre edildi. İnfiltrasyonun 72. saatinde yaprak örneklerinde gen ifadesi qRT-PCR ile belirlendi. Sonuçlar kontrole kıyasla endojen CYP51C ifadesinin yaklaşık 300 kat azaldığını gösterdi. Bununla birlikte klonlanan vektörün fungusa doğrudan agrotransformasyonunun gerçekleştirilmesiyle, fungusta meydana gelen büyüme inhibisyonunun radyal ölçümü, qRT-PCR ile gen ifadesi ve ergosterol inhibisyonuna bağlı olarak hücre içi ROS üretimi DCF-DA boyama yöntemi ile belirlendi. Fungusun doğrudan BMV_1/$BMV_{3:CYP51C}$ ile agrotransformasyonu sonucu mock grubuna kıyasla, radyal büyümede %21 oranında azalma, hücre içi ROS miktarında yaklaşık 1,5 kat artış saptandı.

Sonuçlarımız, HIGS metodunun *F. verticillioides* patojeninin kontrolünde etkili bir yöntem olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Virüs Kaynaklı Gen Susturma (VIGS), Konak-Kaynaklı Gen Susturma (HIGS), CYP51, RNAi, *Fusarium verticillioides, Nicotiana benthamiana*

SUMMARY

Fusarium verticillioides is a major maize (*Zea mays* L.) plant pathogen that causes rot disease in many plants, reducing plant growth and yield. This thesis study aimed to investigate the potential of the RNAi-based Host-Induced Gene Silencing (HIGS) method in pathogen control through the *F. verticillioides cytochrome P450 lanosterol C-14α-demethylase (CYP51C)* gene.

In this study, the fungal *CYP51C* gene was cloned into the brome mosaic virus-based vector (BMV1/BMV3) and transferred to *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration. In this direction, the *CYP51C* gene, which is ectopically expressed during the infection of the plant with *F. verticillioides*, was processed with the RNAi mechanism, and possible growth inhibition in the fungus was investigated as a result of targeting the endogenous fungus *CYP51C*. For this purpose, *N. benthamiana* leaves were infiltrated with 10^4 conidia/ml *F.verticillioides* after agroinfiltration. Gene expression in leaf samples was determined by qRT-PCR at 72. hour of infiltration. The results showed that endogenous CYP51C expression was reduced approximately 300-fold compared to control. However, by direct agrotransformation of the cloned vector into the fungus, radial measurement of growth inhibition in the fungus, gene expression by qRT-PCR, and intracellular ROS production due to ergosterol inhibition were determined by the DCF-DA staining method. As a result of direct agrotransformation of the fungus with BMV1/BMV3:CYP51C, 21% decrease in radial growth and an approximately 1.5-fold increase in the amount of intracellular ROS were detected compared to the mock group.

Our results revealed that the HIGS method may be effective in the control of the *F. verticillioides* pathogen.

Key Words: Virus-Induced Gene Silencing (VIGS), Host-Induced Gene Silencing (HIGS), CYP51, RNAi, *Fusarium verticillioides, Nicotiana benthamiana*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bizlere deneyimleriyle yol gösteren ve bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Sn. Doç. Dr. Fatma AYDINOĞLU'na yönlendirmeleri ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin bir kısmını gerçekleştirdiğim ve gözlemleme olanağı bulduğum Biyolojik Saat Laboratuvar'ına, danışmanım aracılığıyla bu imkânı sağlayan değerli hocamız Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK'e sağduyusu ve katkıları için teşekkür ederim.

Bir dönem aynı laboratuvarı paylaştığımız Bitki Biyoteknoloji Laboratuvar ekibine, sayın Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ ve Dr. Hüseyin BALCI'ya, Biyoteknoloji Enstitüsü AR-GE Sera'sının kullanımına olanak sağladıkları ve hoşgörüleri için KutmanLAB'a ve bu tezin değerlendirilmesine zaman ayıran sayın jüri üyelerim Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK, Dr. Öğr. Üyesi Stuart James LUCAS, Prof. Dr. Nuri ÖZTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Rahime CENGİZ'e katkıları için teşekkür ederim.

Son olarak destekleri için annem Songül YILMAZ ve babam İbrahim YILMAZ'a, kardeşlerime, Merve YILMAZ ve Ayşe BAHÇEKAPILI'ya, kıymetli arkadaşlarım Emine Merve DEMİRBAŞ, Kevser Sanhueza GÜREŞEN, Aslıhan KULOĞLU ve Nida ARSLAN'a ve çok kıymetli ablam Elif KIRGÖZ'e sevgilerimi sunarım.

2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2021/2 dönemi bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Model Organizma Olarak Tütün	3
2.2. Bitki Patojeni Olarak Fusarium Türleri	4
2.3. RNA İnterferans (RNAi)	8
2.3.1. RNAi Keşfi ve Genel Mekanizması	8
2.3.2. Virüs Kaynaklı Gen Susturma Mekanizması	10
2.3.3. Brom Mozaik Virüs	15
2.3.4. Bitki-Fungus Etkileşimleri ve RNAi	17
2.3.5. Konak Kaynaklı Gen Susturma (HIGS)	20
2.4. Hücre İçi ROS Ölçümü	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Genel Kitler ve Reaktifler	23
3.1.2. Tampon ve Solüsyonlar	23
3.1.3. Oligonükleotit Dizileri	24
3.1.4. Cihazlar	24
3.1.5. Hücre Kültür ve İndüksiyon Buffer İçeriği	25
3.1.6. Fungus İzolatı	25
3.1.7. Fusarium İzolatı Kültür Koşulu	26

3.1.8. Bitki Materyali ve Büyüme Koşulu 26
3.1.9. Bakteri Materyalleri ve Kültür Koşulları 27
3.1.10. VIGS'te Kullanılan Vektörler 27
3.1.11. Primer Tasarımı 28
3.2. Yöntem 28
3.2.1. BMV VIGS Vektörünün Oluşturulması 28
3.2.2. Moleküler Klonlama 29
3.2.2.1. Restriksiyon Enzim Kesimi 29
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu 29
3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi 30
3.2.2.4. DNA Ligasyonu ve Klonlama 30
3.2.2.5. Ligasyon Ürününün Kompetent Bakteriye Transformasyonu 31
3.2.2.6. Plazmit İzolasyonu 31
3.2.3. Kompetent Agrobacterium Hücrelerinin Hazırlanması 31
3.2.4. BMV Vektörlerinin Kompetent Bakteriye Transformasyonu 32
3.2.5. Agrobacterium Süspansiyonlarının Hazırlanması 33
3.2.6. *N. benthamiana*'nın Yaprak Agroinfiltrasyonu 33
3.2.7. BMV-Tabanlı Konak Kaynaklı Gen Susturma 34
3.2.7.1. Agroinfiltrasyon Sonrası Fungus Aşılama 34
3.2.8. *F. verticillioides*'te BMV-Tabanlı Gen Susturmanın Değerlendirilmesi 34
3.2.8.1. Birlikte Büyüme Koşulları 34
3.2.8.2. Fungal Büyümenin Radyal Ölçümü 35
3.2.8.3. DCF-DA Boyama Yöntemi Kullanılarak Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü 36
3.2.9. Moleküler Analizler 37
3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu 37
3.2.9.2. cDNA Sentezi 38
3.2.9.3. qRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri 38
3.2.10. İstatistiksel Analizler 39
4. BULGULAR 40
4.1. CYP51C ve PDS İçin Klonlama ve Analiz 40
4.2. BMV-Tabanlı VIGS Sonuçları 43
4.2.1. VIGS ile Geçici Ekspresyonun *N. benthamiana* Yapraklarında Değerlendirilmesi 43

4.2.2. VIGS Vektörü BMV ile Tütünde PDS Transkriptinin İfade Seviyesinin Değerlendirilmesi 44
4.3. Tütünde BMV-Tabanlı HIGS Sonuçları 46
4.3.1. VIGS Vektörü BMV ile Tütünde FvCYP51C Transkriptinin İfade Seviyesinin Değerlendirilmesi 46
4.4. Fungusta VIGS Tabanlı CYP51C İnhibisyonu 47
4.4.1. *F. verticillioides'in A. tumefaciens* Aracılı Transformasyonu için Analiz Sonuçları 47
5. TARTIŞMA 51

REFERANS 56
BİYOGRAFİ 64
EKLER 65

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	:	**Açıklamalar**
µl	:	Mikrolitre
µg	:	Mikrogram
°C	:	Santigrat derece
AGO	:	Argonoute
cDNA	:	Komplementer deoksiribo nükleik asit
Chs3b	:	Kitin sentaz geni
CYP51	:	Sterol 14 α -demetilaz
DCFH-DA	:	2',7'-dichlorofluorescein diacetate Deoksinukleotit
DCL	:	Dicer benzeri protein
DMI	:	Demetilasyon inhibitörleri
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	:	Deoksinükleotitfosfat
dsRNA	:	Çift zincirli RNA
EtOH	:	Etil alkol
H_2O_2	:	Hidrojen peroksit
HIGS	:	Konak-kaynaklı gen susturma
KCl	:	Potasyum klorür
KNO_3	:	Potasyum nitrat
LB	:	Luria Bertani
miRNA	:	Mikro RNA
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
PDS	:	Phytoene desaturase
PTGS	:	Transkripsiyon sonrası gen susturma
RDR	:	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
RISC	:	RNA multiprotein kompleksi
siRNA	:	Küçük karışan RNA
sRNA	:	Küçük RNA

ssRNA	:	Tek zincirli RNA
TGS	:	Transkripsiyonel gen susturma
VIGS	:	Virüs kaynaklı gen susturma

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	Asetil-CoA'dan Ergosterol Biyosentezi	7
2.2:	VIGS yöntemine ve moleküler mekanizmasına genel bakış.	13
2.3:	BMV genom organizasyonunun şematik gösterimi.	17
2.4:	Bitki-fungal patojen etkileşiminde RNAi'nin rolü.	18
3.1:	ImageJ&Fiji yazılımı kullanılarak doğrusal ölçüm için talimatlar.	36
4.1:	PDS ve CYP51C gen fragmanları için donör plazmit pC13/F3CP5'in klonlama stratejisinin şematik gösterimi.	40
4.2:	Aday klonların kesim enzimleri ile analizi.	42
4.3:	NJ yöntemi kullanılarak pC13/F3CP5:CYP51C izolatı ile oluşturulan filogenetik ağaç.	44
4.4:	*N. benthamiana*'da agroinfiltrasyondan 4 gün sonra infiltre yaprakların görüntüsü.	44
4.5:	*N. benthamiana*'da BMV tabanlı VIGS sonrası analizler.	45
4.6:	*N. benthamiana*'da BMV tabanlı VIGS sonrası ekspresyon analizi.	45
4.7:	*N. benthamiana* yapraklarından alınan örneklerde *F. verticillioides* CYP51C geninin qRT-PCR sonuçları.	46
4.8:	Birlikte kültür ortamının ardından *F. verticillioides*'in PDA ortamında radyal büyümesi.	48
4.9:	Yüzde radyal küçülme.	48
4.10:	*F. verticillioides* konidilerinin ROS üretim miktarı.	49

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
3.1:	Kit ve reaktiflerin listesi.	23
3.2:	Tampon ve solüsyonların listesi.	23
3.3:	Primer Listesi	24
3.4:	Cihaz listesi.	24
3.5:	Patates dekstroz agar (PDA) besiyeri içeriği.	25
3.6:	Patates dekstroz suyu (PDB) besiyeri içeriği.	25
3.7:	Sentetik nutrient agar (SNA) besiyeri içeriği.	25
3.8:	Agrobacterium indüksiyon buffer içeriği.	25
3.9:	PCR reaksiyon bileşenleri.	29
3.10:	PCR için kullanılan sıcaklık ve döngü şartları.	30
3.11:	cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve gerekli miktarları.	38
3.12:	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit için PCR koşulları.	38
3.13:	Kantitatif RT-PCR için gerekli bileşenler ve miktarları.	39
3.14:	Kantitatif RT-PCR için döngü şartları.	39

1. GİRİŞ

Fungal hastalıklar uzun zamandır tarımsal üretim ve küresel gıda güvenliği için yaygın bir tehdit olarak kabul edilmektedir ve dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır [Fones et al., 2020; Ristaino et al., 2021]. Fitopatojenik funguslar, yüksek virülansları, geniş konak yelpazesi, olumsuz çevre koşullarına toleransı ve yeni soylar geliştirme yetenekleri nedeniyle tipik olarak salgınlara daha yatkındır [Fisher et al., 2018]. En önemli fungal patojenler arasında yer alan *Fusarium verticillioides*, mısırda kulak ve sap çürüklüğü, fide yanıklığı gibi hastalıklara neden olur. Fusarium türleri tarafından üretilen en önemli mikotoksinler arasında fumonisinler bulunmaktadır. *F. verticillioides*, büyük ölçüde fumonisin üretiminden dolayı insanlar ve çiftlik hayvanları üzerinde olumsuz sağlık etkisine sahiptir [Shephard et al., 1996].

Bitki fungal hastalıklarının kontrolünde kimyasal/biyo-fungusitlerin kullanımı ve genetik olarak dirençli bitki çeşitlerinin ıslahı yer almaktadır. Kimyasal fungusitler yoluyla fungus kontrolü büyük ölçüde başarılı olmasına rağmen, tedavinin etkinliği fungusitin türünden, uygulanma zamanından ve abiyotik faktörlerden etkilenir [Bandara et al., 2020]. Bununla birlikte azol fungusitlerin uygulanması da fumonisin üreten *F. verticillioides* dahil olmak üzere Fusarium spp.'nin kontrolünde etkilidir. Ancak bu tür kimyasalların kullanımına bağlı olarak olumsuz çevre etkileri, direnç gelişimi ve sağlık riskleri bu kontrol yönteminin geçerliliğini olumsuz etkiler [Carmona et al., 2020].

Mikotoksin kontaminasyonunu kontrol etmek için etkili bir yol, belirli bir fungus geninin hedeflenmesiyle, RNA interferans (RNAi) aracılı gen inhibisyonunu içeren mahsullerin geliştirilmesidir. Kimyasal fungusit bazlı kontrol stratejilerinden farklı olarak, RNAi bazlı bitki koruma stratejileri çevre dostu yöntemler sunar. RNAi mekanizmasının yüksek özgüllüğü ve neredeyse tüm ökaryotlardaki varlığı, RNAi tabanlı hastalık kontrolünün avantajlı yönlerini oluşturur [Fletcher et al., 2020]. RNAi tabanlı Konak kaynaklı gen susturma (HIGS), bitki bağışıklığını tetiklemek için alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Kısaca HIGS'te, eksojen RNAi sinyalleri, gen inhibisyonu ve ekin direnci için patojen mRNA'larını hedeflemek üzere konakta ifade edilir. Geliştirilen bu yöntem küçük RNA'ların (sRNA) konak bitkiden patojene ve aynı şekilde tersi yönde geçiş yapabilme özelliğinden yararlanır.

Bu yaklaşım, *Blumeria graminis,* Puccinia türleri, Fusarium türleri, *Verticillium dahlia, Magnaporthe oryzae* ve *Aspergillus flavus* dahil olmak üzere çeşitli fungus patojenlerine karşı RNAi aracılı direnç sağlamak için başarıyla kullanılmıştır [Ray et al., 2022].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Kimyasal fungusitler ile fungal patojenlerin kontrol stratejilerinden farklı olarak RNAi bazlı bitki koruma yöntemleri, bitki fungus patojenleriyle mücadele için çevre dostu ve patojene özgün yöntemler sunar. RNAi, endojen veya sentetik olarak aktarılan çift sarmallı RNA (dsRNA) aracılığıyla mRNA degradasyonunu indükleyerek hedef genin ifadesini baskılayan biyolojik bir süreçtir.

Bu tez çalışmasında, ökaryotlarda doğal olarak var olan bu mekanizmayı, brom mozaik virüs (BMV) vektörü aracılığıyla tütün bitkisinde RNAi sinyallerinin tetiklenmesiyle konak kaynaklı gen susturma sağlayarak *F. verticillioides*'te ergosterol biyosentez yolunda görevli olan *CYP51C* (*sitokrom P450 lanosterol C-14α-demetilaz*) geninin inhibisyonunu ve *F. verticillioides'te CYP51C*'nin doğrudan BMV tabanlı virüs kaynaklı gen susturma (VIGS) yöntemi ile olası *CYP51C* inhibisyonunun, fungal büyüme üzerindeki etkisini morfolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede araştırmayı amaçlıyoruz.

Bu bağlamda çalışmamız, BMV-tabanlı virüs kaynaklı gen susturmanın değerlendirilmesi için tütünde *PDS* (fitoen desatüraz) geninin susturulması, ardından aynı mekanizma temel alınarak model organizma olan *N. benthamiana*'nın konak bitki, *F. verticillioides*'in patojen olarak seçildiği sistemde krallıklar arası mevcut sRNA geçişinin doğal süreçte meydana geldiği hipotezine dayanarak *F. verticillioides CYP51C* mRNA'sının, viral vektör BMV'nin süreci tetiklemesi ile dizi homolojisine bağlı olarak inhibisyonunu ve BMV tabanlı VIGS ile *F. verticillioides*'te olası büyüme inhibisyonunun analizlerini içerir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Model Organizma Olarak Tütün

Nicotiana cinsi [Solanaceae: Linnaeus 1753], çoğunluğu Güney Amerika ve Avustralya'da olmak üzere, dört kıtadan başlıca tropikal ve subtropikal dağılıma sahip 75 tür içermektedir. Her ne kadar haploid kromozom sayısı 12 olarak kabul edilse de 9 ila 24 ve hatta bazı *N. suaveolens* koleksiyonlarında 32 arasında değişmekte ve hem kromozom boyutunda hem de genom boyutunda büyük bir varyasyon göstermektedir [Molina et al., 2021; Knapp et al., 2004].

Tütünün birçok model ve ekin türüyle karşılaştırıldığında yüksek biyokütle verimine (hektar başına 100 ton yaprak biyokütlesine kadar) ve yüksek çözünür protein seviyelerine sahip olması, Agrobacterium veya viral indüksiyon yoluyla geçici ekspresyon ve stabil nükleer veya kloroplastik genom bazlı ekspresyon gibi çalışmalara dost olması, aynı zamanda gıda dışı bir mahsul olup gıda zinciri kontaminasyonu riskini en aza indirmesi onu "bitki moleküler tarımı" için en umut verici model organizmalardan biri yapar [Goodin et al., 2008; Hidalgo et al., 2022].

Nicotiana benthamiana, kendisini başarılı bir şekilde enfekte edebilen çok sayıda farklı bitki virüsü nedeniyle, bitki virolojisinde en yaygın kullanılan deneysel konaktır. Ek olarak, çok çeşitli diğer bitki-patojenik ajanlara (bakteriler, oomycetes, funguslar ve benzerleri gibi), tipik olarak tek çenekli konakçılarla sınırlı bitki virüslerine ve birkaç hayvan virüsüne dahi duyarlıdır. Yang ve ekibi (2004), *N. benthamiana*'nın neredeyse evrensel virüs duyarlılığının kısmen genomunda bulunan RNA'ya bağımlı RNA polimeraz geninde (NbRdRP1m) doğal olarak meydana gelen bir mutasyona bağlı olduğunu göstermiştir [Yang et al., 2004]. Bu özellikler tütünü doğal bağışıklık ve savunma sinyali çalışmalarında bu türü konak-patojen araştırmasının temel taşı haline getirmiştir. Ayrıca, iyi bir verimlilikle genetik olarak dönüştürülebildiği, rejenere edilebildiği ve virüs kaynaklı gen susturma (VIGS) veya geçici protein ekspresyonu gibi yöntemlere uygunluğu *N. benthamiana*'yı bitki biyolojisinde önemli bir yere koymaktadır [Clemente, 2006].

Ayrıca, *N. benthamiana* EST (expressed sequence tag) genellikle domates, patates, biber ve petunya gibi tarımsal olarak ilgili Solanaceous ekinleriyle oldukça benzerdir. Bu nedenle, *N. benthamiana*'da yürütülen konak-patojen etkileşimleriyle ilgili fonksiyonel genomik projeleri, büyük olasılıkla tarımsal açıdan önemli

mahsullerde benzer roller oynayan bir gen kadrosunu ortaya çıkaracaktır. Bu kapsamda Dong ve ekibi (2007) yüksek verimli bir VIGS yaklaşımı kullanarak domates EST'nin *N. benthamiana*'da gen ekspresyonunu etkili bir şekilde azaltabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte *N. benthamiana*'nın geniş haploid genomu, onun bir genetik sistem olarak kullanımını kısıtlasa da transformasyonunun kolaylığı bu türü bitki hücre biyolojisi için iyi bir model haline getirmektedir [Dong et al., 2007].

Sonuç olarak *N. benthamiana*'nın genetik mühendisliği yoluyla gen ekspresyonunu hızlı ve verimli bir şekilde modüle etme yeteneğine sahip olması, çeşitli *Agrobacterium tumefaciens* suşlarına karşı oldukça duyarlı olması, iç mekanda üretim için yeterli bir büyüklük ve diğer ilgili türlere göre daha kısa bir yaşam döngüsüne sahip olması aynı zamanda yaprak anatomisinin yoğun infiltrasyonu desteklemesi onu bitki aleminde gen ifadesini geçici olarak modüle etmek için yararlanılabilecek bir organizma konumuna getirmiştir [Tremblay et al., 2010].

2.2. Bitki Patojeni Olarak Fusarium Türleri

Fusarium (Nectriaceae, Hypocreales), karmaşık bir taksonomiye sahip çok sayıda filogenetik olarak çeşitli fungusları içeren Ascomycota sınıfına ait önemli ve iyi bilinen bir filamentli fungus cinsidir [Torbati et al., 2021]. Bu cins ilk olarak 1809 yılında Link tarafından tanımlanmıştır [Leslie et al., 2006]. Fusarium türü kavramına kriter getiren ilk büyük çalışma 1930'larda Wollenweber ve Reinking tarafından yürütülmüş ve 1935'teki yayınları modern fusarium taksonomik sistemlerinin başlangıç noktası olmuştur [Munkvold, 2017; Wollenweber and Reinking, 1935]. Çeşitli morfolojik, fizyolojik ve ekolojik özelliklere sahip türler bu cinsle ilişkilidir. Bu nedenle tanımlandığından bu yana literatüre baktığımızda Fusarium cinsinin taksonomisinin karmaşık olduğu ve birçok kez revize edildiği görülmektedir [Hermann et al., 2015].

Fusarium türleri toprakta saprofitik organizmalar olarak bulunur ve bitki patojenleri olarak tanınırlar. Buğday ve mısır, Fusarium mikotoksinlerinin en sık görüldüğü ve en büyük etkiye sahip olduğu mahsullerdir. Bununla birlikte, toksijenik Fusarium türleri, tüm küçük taneli mahsullerin yanı sıra kuşkonmaz, incir, soya fasulyesi ve diğer baklagiller, tıbbi bitkiler ve bazı fındık gibi diğer birçok mahsulde meydana gelebilir (EFSA Journal, 2013; Waskiewicz et al.,2012]. Fusarium

toksinleri aynı zamanda ekin kontaminasyonunun bir sonucu olarak hayvan yemleri ve bira gibi fermente edilmiş ürünler de dahil olmak üzere insan gıda ürünlerinde de bulunur [Munkvold, 2017].

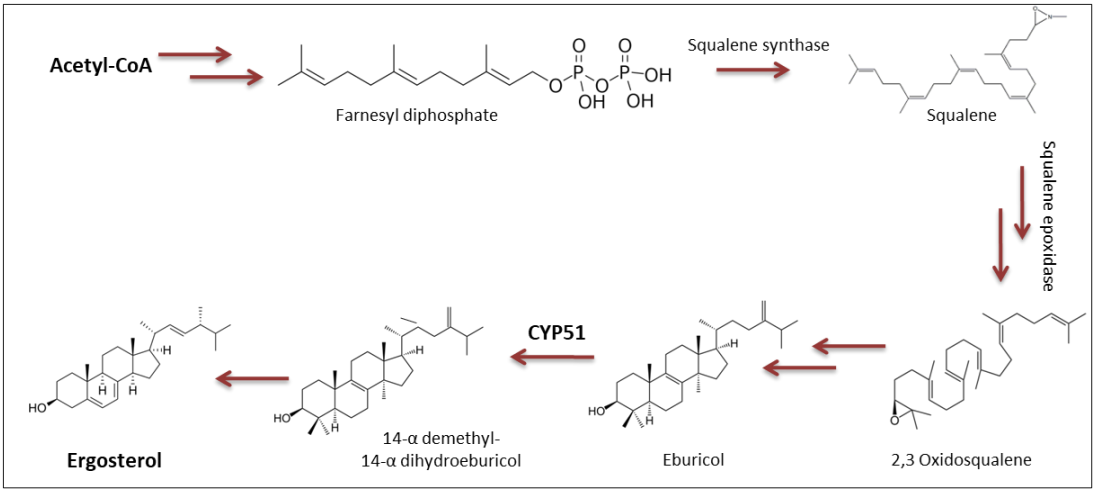
Fusarium türleri tarafından üretilen en önemli mikotoksinler arasında fumonisinler bulunmaktadır. Fumonisinler, ölümcül çiftlik hayvanı hastalıklarına neden olur ve insanlar için potansiyel olarak kanserojen mikotoksin olarak kabul edilir. Bunun yanında fusariumda çok sayıda taksonomik revizyon ve değişen tür kavramlarının bir sonucu olarak, toksijenik türlerin toplam sayısı net olmamakla birlikte mevcut en kapsamlı kaynaklardan biri olan Desjardins'in yayını (2006), 45 önemli toksijenik türün tür-toksin ilişkilerini belgelemiştir [Jennings, 2007; Cha et al.,2007; Aydınoğlu ve Aktuğ, 2017].

Çoğu Fusarium türü sadece eşeysiz sporlar oluştururken bazı türler askospor adı verilen eşeysi sporlar da oluşturabilmektedir. Toprak içinde ve bitki kalıntıları üzerinde klamidospor veya miselyum olarak uzun süre canlılığını koruyabilirler. Birincil enfeksiyon, tohumla taşınır ya da kök uçları veya yaralarda gerçekleşir. Uygun sıcaklık ve bağıl nem sağlandığı taktirde bitkinin diğer kısımlarını gelişimin herhangi bir aşamasında enfekte edebilir. Tohum çürümesi, fide hastalığı, sap çürümesi ve koçan çürümesi gibi hastalıklara neden olmanın yanında semptomsuz endofitik enfeksiyona da neden olabilir [Crous et al., 2021].

F. verticillioides ilk olarak 1877'de İtalya'da mısırdan *Oospora verticillioides* olarak tanımlanmış ancak hayvan toksikozları ile ilişkili olduğu keşfedildikten sonra *F. moniliforme* olarak tanınmaya başlamıştır. Şu anda kabul edilen terminoloji, *F. moniliforme* ve *O. verticillioides*'in eş anlamlı olduğunun belirlendiği 1976 yılında gösterilmiştir [Munkvold, 2017]. *F. verticillioides* asemptomatik bir endofit olarak hayatta kalabilen mikotoksin üreten filamentli bir askomisettir; aynı zamanda mısır tanelerinde (*Zea mays L.*) fumonisin üreten en yaygın toksijenik türdür [Bacon and Hinton, 1996]. Fumonisinler, *F. verticillioides* tarafından üretilen en önemli mikotoksindir ve ilk olarak 1988 yılında Güney Afrika'dan bir *F. verticillioides* türünden tanımlanmış ve biyosentetik yolu aynı şekilde bu türde gösterilmiştir. İnsanlarda, fumonisin bulaşmış mısır tüketimi özofagus kanseri ve karaciğer hasarı [Hester et al., 2015; Voss et al., 2001] ile ilişkilendirilmiştir. Kontamine yemdeki fumonisinler, çiftlik hayvanlarında at lökoensefalomalazi ve domuz akciğer ödemi ile kümes hayvanlarında ise bir dizi fizyolojik belirtiyle ilişkilendirilmiştir [Haschek et al., 2001]. Genele bakıldığında insanların fumonisinlere ve mikotoksinlere maruz

kalması, dünyanın yetersiz beslenmenin yaygın olduğu bölgelerinde, gıdayla ilgili çok az düzenlemenin bulunduğu popülasyonlarda ve kötü gıda işleme ve depolama yöntemlerinin yaygın olduğu yerlerde daha yaygındır [Bennett and Klich, 2003]. Bu faktörlerin daha az şiddetli olduğu ülkelerde, insanların tüketim yoluyla mikotoksinlere doğrudan maruz kalma olasılığı daha düşükken, hayvan yemi olarak mısırın büyük ölçüde kullanılmasıyla çiftlik hayvanları üzerindeki etkileri yüksektir [Shephard et al., 1996].

Bitkilerde *F. verticillioides* için mevcut ve potansiyel mücadele yöntemleri, dirençli bitkilerin ıslahı, biyolojik kontrollerin kullanımı, genetik mühendisliği, hasat sonrası mikotoksin detoksifiye edici enzimler ve özellikle tebuconazole ve prothioconazole gibi azol fungusitleri içeren sterol demetilasyon inhibitörlerinin (DMI) kullanımı şeklindedir [Anderson et al., 2017]. Bu sistemik fungusitler, fungus zarının bozulmasına yol açan ve sonunda fungusun büyümesini durduran *sitokrom P450 lanosterol C-14α-demetilaz*'ı (*CYP51)* hedefleyerek ergosterol biyosentezini inhibe eder. Ergosterol, funguslarda hücre zarının önemli bir bileşenidir. Memelilerdeki kolesterole benzer şekilde ergosterol, hücre zarı bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynar ve hücre zarı içindeki geçirgenliği ve akışkanlığı düzenler [Rodrigues, 2018]. CYP51, ergosterol biyosentezi için temel bir enzimdir ve bu nedenle fungus hücrelerinin çoğalması için gerekli olması, onu tarımda antifungal ajanlar için iyi bir hedef yapar [Zhang et al., 2017]. Azoller, fungal CYP51 ile etkileşime girer ve ergosterol biyosentez yolağındaki kritik adımı katalize etmesini engelleyerek, ergosterolün zarı bozan metillenmiş sterol öncüllerinin birikmesine yol açar ve bunun sonucu olarak fungus büyümesi engellenir. Bu metillenmiş sterol birikimi fungus zarı içindeki sertliği azaltır ve ergosterolün de tükenmesiyle zara bağlı enzimlerin aktivitesini bozarak oksidatif strese ve hücre zarı hasarına katkıda bulunur [Zhang et al., 2019].



Şekil 2.1: Asetil-CoA'dan Ergosterol Biyosentezi.

Sterol demetilasyon inhibitörleri (DMI), *F. verticillioides*'in büyümesini engellemede son derece etkilidir. Bunun yanında DMI'lar patojenler tarafından direnç gelişimine karşı bağışık değildir. *Blumeria Graminis*'de kiraz yaprağı lekesi [Holb et al., 2010], *Monilinia fructicola*'da meyvelerin kahverengi çürüklüğü [Luo ve Schnabel, 2008] ve *Venturia inaequalis*'de elma kara leke hastalığı dahil olmak üzere birçok bitki patojeninde DMI direnci rapor edilmiştir [Palani and Lalithakumari, 1999].

Fusarium graminearum'da, Fg-CYP51-B'nin birincil sterol 14α-demetilasyonu ve aynı zamanda üretken askospor oluşumu için gerekliyken, Fg-CYP51A'nın, ergosterol tükenmesiyle indüklenen ve bozulan Fg-CYP51B fonksiyonunu telafi eden ek bir sterol 14α-demetilazı kodladığı ve bozulan Fg-CYP51B fonksiyonunu telafi ettiği gösterilmiştir. Bunun yanında Fg-CYP51C'nin bir sterol 14α-demetilazı kodladığı gözlemlenmemiş olsa da sterol ara maddelerinin birikmesini önlemede önemli bir rol oynadığı dolayısıyla dolaylı olarak sterol 14α-demetilasyonu etkilediği ve tam bir virülans için gerekli olduğu varsayılmıştır. Bu nedenle Fg-CYP51, Fg-CYP51 aktivitesi için en azından kısmen birbirini tamamlamak üzere uyum içinde çalışan üç paralog tarafından kodlanır. Üç *Fg-CYP51* geninin DMI'lara karşı farklı duyarlılığı da fonksiyonel çeşitlendirmeyi destekler [Koch et al., 2013].

Fungusit uygulamasının ekonomik faydası, uygulama maliyetinden daha fazla olsa da modern tarımda ekin hastalıklarını yönetmek için yaygın fungusit uygulamasının kullanımı istenmeyen sonuçlar oluşturur. Azol fungusitlerin uzun süreli tarımsal kullanımının funguslarda dirence neden olmasının yanında, Fungal

CYP51'i inhibe etmek için tasarlanan azol bileşiklerin, hedef olmayan karasal ve sucul bitki türleri üzerinde olumsuz çevresel etkilere sahip olabileceği ve endokrin bozucular olarak hareket ettiği bilinen bu bileşiklerin insanlarda endokrin sistemi üzerinde önemli etkilere sahip olabileceği araştırılmaktadır. *F. verticillioides* gibi mikotoksin üreten fungusları kontrol etmek için daha güvenli, özgün ve çevre dostu stratejilere ihtiyaç vardır [Richter et al., 2016].

2.3. RNA İnterferans (RNAi)

2.3.1. RNAi Keşfi ve Genel Mekanizması

RNAi, ökaryotlarda transkripsiyonel veya transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve retrotranspozonların baskılanmasında küçük RNA'ların (sRNA) aracılık ettiği doğal ve korunmuş bir gen susturma sürecini ifade eder [Svoboda, 2020].

1928 yılında Wingard, *tütün halkalı leke virüsü* (TRSV) ile enfekte edilen tütün bitkilerinin sıklıkla iyileştiğini ve yeni genişleyen yaprakların, aşılanan yapraklarda görünen tipik halka lekelerini göstermek yerine sağlıklı göründüğünü, ayrıca bu asemptomatik yapraklar tekrar TRSV ile muamele edildiğinde TRSV tarafından süper-enfeksiyona karşı bağışıklık kazandığını göstermiştir [Wingard, 1928]. McKinney ve ekibi (1929), *tütün mozaik virüsünün* (TMV) zayıflatılmış formlarıyla enfekte olmuş bitkilerin, aynı virüsün sarı mozaiğe neden olan daha virülan suşları tarafından süper-enfeksiyona karşı dirençli olduğunu gösterdi. Ardından Ratcliff ve ekibi (1997) tarafından yapılan çalışma, geri kazanım fenotipleri gösteren bitkilerin özgüllüğünü daha fazla incelemek için *tomato blackring virus* (TBRV) ile enfekte edilmiş bitkilerden elde edilen yaprakların, sonraki TBRV aşılamalarına karşı bağışık olduğunu ancak TBRV ile ilgisi olmayan diğer virüslere karşı duyarlı olduklarını gösterdi ve bağışıklığın RNA dizisine dayalı olduğuna dair kanıt sağladı [Ratcliff, 1997]. Bu çalışmalar enfekte eden virüse karşı direnç ile sonuçlanan spesifik tepkinin homolojiye bağlı olduğu fikrini ortaya koydu. Eş zamanlı olarak farklı virüsler ve bitkiler kullanılarak yapılan birkaç çalışmada, bir virüsün bitkileri aynı veya yüksek oranda homolog virüs suşları tarafından sonraki enfeksiyonlara karşı koruyabildiğini göstermiştir. Edinilmiş bağışıklık, süper-enfeksiyon dışlama (superinfection exclusion) ve çapraz koruma gibi çeşitli terminoloji bu etkileşimi açıklamak için

kullanılmıştır. Direncin virüsün kendisinden kaynaklandığı fikri, parazit kaynaklı direnç kavramına ve direnç faktörünün patojenin kendi genetik materyalinden veya kodlanmış proteinlerden türetilebileceği fikrine katkıda bulunmuştur. Daha sonra 1990 yılında pigment üretiminde görevli kalkon sentaz proteinini kodlayan genin kopyalarının transformasyonuyla daha koyu renkli çiçekler elde etmek amacıyla petunya bitkisinde yapılan çalışmada rapor edildi [Napoli et al., 1990]. Araştırmacılar hipotezlerinin aksine yaprakların rengini kaybettiğini gözlemlediler ve çalışma ekzojen kaynaklı gen kopyalarının gen anlatımını baskıladığı fikrini destekledi. Bu bilgilerle aslında şu an RNAi olarak adlandırılan olgunun temeli atılmış, takip eden çalışmalarda organizma ve sürece bağlı olarak "quelling", ko-supresyon, post-trankripsiyonel gen susturma (PTGS) gibi farklı şekillerde ifade edilmiştir [Romano and Macino, 1992; Agrawal et al., 2003].

RNA susturma terimi ise ilk olarak *Caenorhabditis elegans* üzerinde yapılan bir çalışmada kullanılmış ve sens veya antisens RNA'nın eklenmesinin *par-1* geninin bozulmasına neden olduğu gözlemlenmiştir [Guo and Kempheus, 1995]. Ardından, dsRNA'ların daha kısa siRNA'lara dönüşebildiği ve bunların homolog hedef haberci RNA'larına (mRNA'lar) bağlanabildiği bulunmuştur [Muhammad et al., 2019].

RNA susturma mekanizması, Dicer benzeri protein (DCL), Argonaute (AGO) proteini ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RDR') gibi bir dizi anahtar bileşen aracılığıyla gerçekleşir. İlk olarak *Drosophila melanogaster*'den izole edilen DCL, RNAse III ribonükleaz ailesine aittir ve RNA interferansın ilk adımını başlatır [Bernstein et al., 2001]. DCL'ler, DExD-box Helicase-C, Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) domaini, bilinmeyen fonksiyon Alanı 283 (DUF283), RNaz III ve dsRNA-bağlama domaini (dsRBD)'lere sahiptir. Bu proteinler, bir dsRNA öncüsünden 20-26 nt uzunluğunda sRNA'lar üretilmesinde ve bunların RNA-kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yüklenilmesinde görevlidir. Kökenlerine ve oluşumlarına göre bu sRNA'lar siRNA'lara veya mikroRNA'lara (miRNA) ayrılır. Dicer enzimi bitki, fungus ve memelilerde korunmuş olmakla birlikte domainlerin spesifik işlevi farklılıklar gösterebilir. Farklı bitki türlerinde dört sınıfa ayrılan çeşitli DCL proteinleri tanımlanmıştır. Bu proteinler oluşturdukları sRNA boyutuna ve işlevsel hedefine göre DCL1, DCL2, DCL3 ve DCL4 şeklinde sınıflandırılmıştır [Muhammad et al., 2019].

AGO proteinleri, özelleşmiş sRNA bağlayıcı modüllerdir. Nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksi'nin (RISC) temel bileşenidir ve mRNA kesimi için ana

katalitik bölgeyi oluşturur. AGO proteinleri, susturmanın efektör fazını gerçekleştirir ve üretilen küçük RNA'lar, gen ekspresyonunun diziye özgü düzenlemesini yönlendirmek için AGO proteinlerine yüklenir. Yapısal analizler, AGO proteinlerinin PAZ, Middle (MID) ve P-elemanı ile indüklenen wimpy (PIWI) domaini olmak üzere üç korunmuş domain içerdiğini göstermiştir. N-terminal alanı, küçük RNA'ların ayrılmasını kolaylaştıran N-terminal bölgesi ve rehber zincirin 3' ucuna bağlanmada rol oynayan PAZ domaininden oluşur. C-terminal lobu, MID ve PIWI domainlerini ve bu domainlerin birleştiği yerde küçük RNA'ların 5' ucunu bağlayan bir bağlayıcı bölge ve RNaz H'ye benzer şekilde işlev gören PIWI domaini içerir [Fang and Qi, 2016; Muhammed et al., 2019].

İlk olarak 1971 yılında Çin lahanasında çalışılan RDR'ler bitkilerin küçük RNA'larının biyogenez yollarının ilk tanımlanmış bileşeni olarak kabul edilir ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz katalitik alanı (RdRp) ile karakterize edilir. Bu enzimler, şablon olarak tek sarmallı RNA'ları (ssRNA) kullanır ve dsRNA'ların sentezini sağlar. Sentezlenen dsRNA'lar DCL proteinleri tarafından işlenir ve yeni bir RNA susturma döngüsünü başlatır. Bunun yanında sRNA'lardan, fazlı ve tekrarla ilişkili siRNA'lar (phased and repeat-associated siRNA) biyogenez için RDR'lere bağımlıyken, miRNA'lar ve saç tokası türevli sRNA'lar, RDR'lerden bağımsız RNA'lardır [Saurabh et al., 2014; Muhammad et al., 2019].

Başta *Arabidopsis thaliana* modelinden yola çıkılarak belirlenmiş temel yolak şu şekildedir: Farklı kaynakların dsRNA'sı, yaklaşık 20-26 nükleotit uzunluğunda siRNA oluşturmak için DCL tarafından kesilir. Hedef RNA'yı tamamlayıcı olan rehber zincir, ana bileşeni AGO proteini olan RNA kaynaklı susturma kompleksine dahil edilir. RISC ile birleştirilmiş siRNA daha sonra baz eşleşmesi yoluyla hedef RNA'yı bulur ve onu AGO proteininin aktivitesiyle degrede eder [Muhammad et al., 2019].

2.3.2. Virüs Kaynaklı Gen Susturma Mekanizması

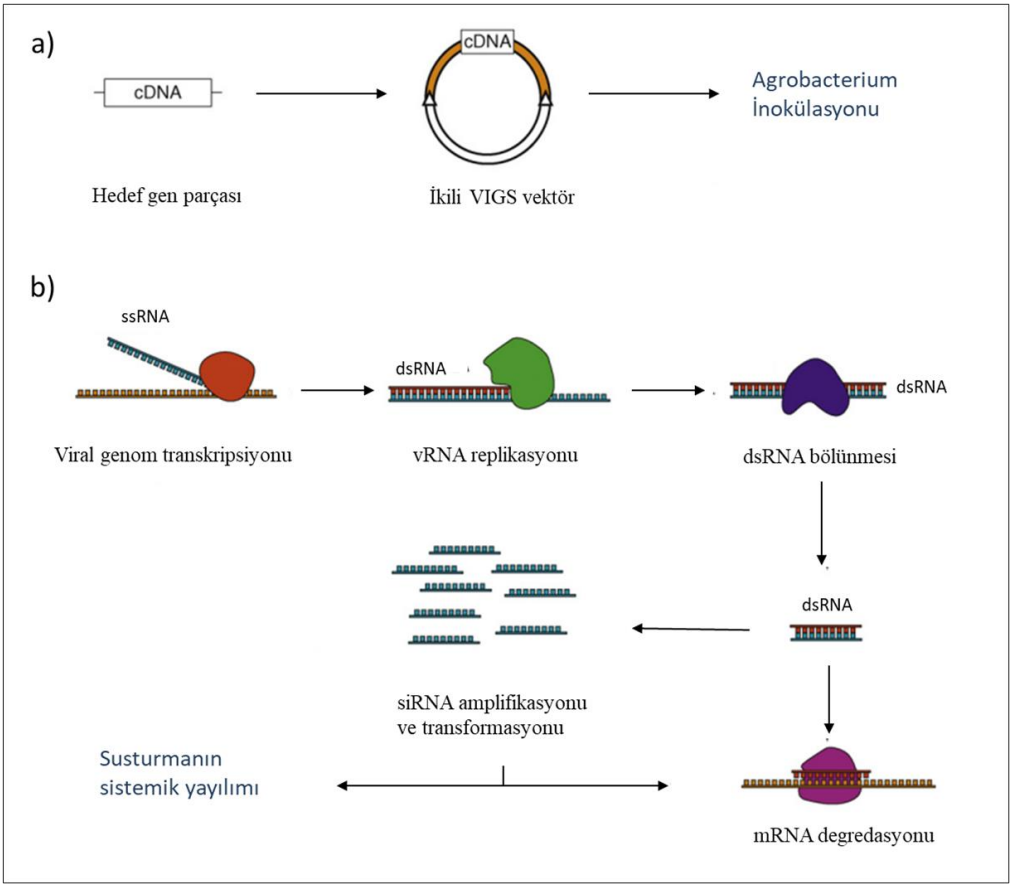
Virüsler bir konaktan diğerine geçmek için bir vektöre ihtiyaç duyar ve üremeleri ve yayılmaları için konağın kaynaklarını kullanır. Diğer patojenlerin aksine, virüsler konak hücre içinde çoğalır ve bu nedenle RNAi yolları, anti-viral savunmada çok önemli bir rol oynar [Fermin, 2018].

VIGS, bitkilerde bir antiviral savunma mekanizmasından yararlanan etkili bir teknolojidir. Bitkideki genlerin genetik ve fonksiyonel karakterizasyonu için güçlü bir yaklaşım sağlar [Liu et al., 2016]. Özellikle kararlı transformasyonu zor olan bitki türlerinde yüksek verimli fonksiyonel genomik çalışmaları için kullanışlıdır. Bir gen susturma yöntemi olarak VIGS kolay ve hızlıdır, stabil bitki transformasyonu gerektirmez aynı zamanda kısmi sekans bilgisi bir geni susturmak için yeterlidir. PTGS, endojen mRNA'ların diziye özgü bozulmasıyla sonuçlanan epigenetik bir olgudur. Bitkilerde PTGS, RNA transkriptleri ve hedef endojen gen dizileri arasında nispeten yüksek derecede nükleotit homolojisine bağlıdır. Virüsler kendi başlarına belirli bitki türlerinde PTGS'yi tetikleyebilir. Bunun yanında virüsler, bitki savunması karşısında pasif değildir ve PTGS için baskılayıcı olarak hareket edebilen proteinler geliştirmişlerdir. PTGS'nin ana tetikleyici molekülü dsRNA'dır. Bu dsRNA, siRNA molekülleri üretmek üzere bölünür. siRNA'nın antisens ipliği, degradasyon için homolog RNA'yı hedeflemek üzere RISC ile birleşir. [Bekele et al., 2019].

VIGS ilk kez 1995 yılında Kumagai tarafından yapılan çalışmada gösterildi. Çalışmada *N. benthamiana* yapraklarını transfekte etmek için *PDS* kodlama dizi fragmanı bir viral vektöre aktarıldı. Sonrasında karakteristik sistemik beyaz yaprak fenotipi ile kombinasyon halinde PDS ifadesinin aşağı regülasyonu gözlendi. Sonuçları, modifiye edilmiş bir RNA vektörünün, diziye özgü bir şekilde hedef gen ekspresyonunu azaltmak için kullanılabileceğini göstermiş oldu. Bu bulgu, kalıcı transformasyon protokollerine veya büyük ölçekli mutant popülasyonlarının oluşturulmasına ihtiyaç duymadan bitkilerde gen ekspresyonunun aşağı regülasyonu için yeni bir yöntem sağladı [Kumagai et al., 1995].

VIGS için vektörler, bir viral genomun parçasının eklendiği *A. tumefaciens* aracılı bitki transformasyonu için kullanılan standart ikili Ti plazmitinden türetilmiş vektörlerdir. VIGS vektörü, konaktan endojen gen parçası taşıyabilecek şekilde tasarlanmış rekombinant bir virüstür [Becker and Lange, 2010]. Bitkileri doğrudan inoküle etmek veya bitki hücrelerini viral genomla transforme ederek modifiye edilmiş *A. tumefaciens* suşları yoluyla enfeksiyon elde etmek için tasarlanmış virüslerin, bitki hücresinin sitoplazmasındaki viral transkripsiyon ve replikasyonu, dsRNA üreterek geniş çapta sRNA'lar tarafından indüklenen gen ekspresyonunun diziye özgü bloke edilmesi olarak tanımlanan RNA sessizleşmesini tetikler [Zulfiqar et al., 2023].

Bir bitki virüsü bir konak hücreyi enfekte ettiğinde, viral genoma karşı hedeflenen RNA bazlı savunmayı aktive eder. Bu mekanizma dsRNA'nın siRNA'lara işlenmesini sağlar. Daha sonra RNaz kompleksi, dsRNA'lara benzer tek sarmallı hedef RNA'yı özel olarak hedefleyecek şekilde siRNA'ların baz eşleşmesi tarafından yönlendirilir. Başlangıçta enfekte olan hücrede, viral ssRNA, siRNA/RNaz kompleksinin bir hedefi olmaz çünkü bu replikasyon ara maddesi yüksek bir seviyede birikmez. Bununla birlikte, enfeksiyonun sonraki aşamalarında viral RNA replikasyon hızı arttıkça viral dsRNA ve siRNA daha bol hale gelir ve viral ssRNA hedeflenerek virüs birikimi yavaşlatılır [Marwal and Gaur, 2020; Scofield and Nelson, 2009].



Şekil 2.2: VIGS yöntemine ve moleküler mekanizmasına genel bakış. (a) Bir ikili vektörün T-DNA'sını içeren viral genoma hedef gen parçası eklenir. *A. tumefaciens* bu plazmitlerle transforme edilir ve transgenik suş bitki inokülasyonu için kullanılır. (b) Enfeksiyon üzerine vektör, konak RNA Polimeraz (kırmızı) tarafından kopyalanır. RdRP (yeşil), ssRNA viral transkriptinden dsRNA üretir. dsRNA, DICER benzeri enzimler (mavi) tarafından tanınır ve siRNA'lara bölünür. Bunlar RISC (mor) tarafından tanınır ve daha sonra hedef gen bozulması için şablon olarak kullanılan ssRNA'ları oluşturur. Tek sarmallı siRNA'lar amplifiye edilir ve bitki boyunca susturma sinyalleri olarak yayılır, bu da enfeksiyon bölgesinden uzaktaki bölgelerde hedef genin susturulmasına yol açar.

Şekil 2.2'de belirtildiği gibi, virüsten türetilen susturma sinyali daha da yükseltilir ve bitki boyunca sistemik olarak yayılır. Yaklaşık 21 uzunluğundaki siRNA'ların kısa menzilli taşımaya aracılık ettiği varsayılır ve muhtemelen susturma sinyalini yükselterek uzun menzilli taşıma için RdRP gereklidir. Susturma sinyalinin bu sistemik yayılımı, virüs partiküllerinin bitkideki başarılı hareketinden bağımsız olarak gerçekleşir [Becker and Lange, 2010].

Viral dsRNA'nın DCL yoluyla algılanması ve parçalanmasından sonra, birincil vsiRNA üretilecektir. Bununla birlikte Arabidopsis’te yapılan çalışmalar, etkili

antiviral savunma için amplifikasyon yoluyla yeterli sekonder vsiRNA gerekliliğini göstermiştir. Konak RdRP proteinleri, bitkilerde sekonder vsiRNA amplifikasyonu için temel faktörlerdir. Muhtemelen şablon olarak kesilmiş viral RNA'ları kullanarak vsiRNA biyogenezi için DCL substratları olarak hizmet eden viral dsRNA'yı üretirler. Arabidopsis'te altı RdRP proteini vardır (RDR1 ila RDR6). RDR1, RDR2 ve RDR6'nın Arabidopsis'te RNAi bazlı antiviral doğal bağışıklığı kontrol ettiği iyi bir şekilde gösterilmiştir, ancak Arabidopsis RDR3, RDR4 ve RDR5'in işlevi tanımlanmamıştır. RDR1, virüs ve viroid enfeksiyonu ile indüklenebilir. Özellikle RNA virüslerinin enfeksiyonu üzerine, RNAi bazlı antiviral doğuştan gelen bağışıklıkta 21 nt vsiRNA'yı amplifiye ettiği gösterilmiştir. RDR1, endojen siRNA biyogenezini veya bitki gelişimini düzenlemez. Bununla birlikte, RDR1'in, bitkilerde antiviral savunmaya katkıda bulunabilecek yeni bir konak siRNA sınıfı olan virüsle aktive olan endojen siRNA'nın (vasiRNA) üretimine aracılık ettiği gösterilmiştir [Jin et al., 2022]

Virüsler genellikle başlangıçta enfekte olmuş hücrelerden, çoğunlukla floem yoluyla yayılır. Daha sonra, VIGS'de olduğu gibi, diğer bitki hücrelerini enfekte etmek için elek hücrelerinden salınırlar. Viral veya hedef gen ekspresyonunun sistemik susturulması, muhtemelen plasmodesmata yoluyla hücrelerarası yayılmaya ve floem boyunca sistemik yayılmaya dayanır. Uzun-mesafeli susturma, türe özgü gereksinimlerle apikal-bazal yönde ve tersi yönde gerçekleşir. Örneğin Solanaceae, floem aracılı uzun mesafeli susturmada *A. thaliana*, susturma sinyalini bazal-apikal yönde yaymak için plasmodesmata yoluyla merkezi silindir hücrelerinin tekrarlanan hücreden hücreye taşınmasını kullanır [Liang et al, 2012; Qin ve diğ.2017].

Hedef endojen gen fragmanının boyutu genellikle VIGS'nin etkinliğini etkiler. Thomas ve ekibinin (2001) *N. benthamiana* ve rekombinant patates virüsü X (PVX) vektörü kullanarak bir transgen ile RNA dizisi kimliğinin uzunluğu ile PTGS' yi teşvik etme yeteneği arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada, susturmanın gerçekleşmesi için en az 23 nükleotit içeren bir DNA fragmanının gerekli olduğu görülmektedir [Thomas et al., 2001]. Bununla birlikte, 23 nt uzunluğundaki bir dizi susturmayı başlatmak için genellikle yeterli değildir ve bazen daha uzun özdeş diziler kullanılmalıdır. Hedeflenen dizinin nükleotit bileşimi, siRNA ve hedef dizi çiftinin termodinamik özellikleri gibi diğer faktörlerin de belirli bir hedef dizi tarafından susturmanın etkinliğini belirlemek için önemli olması mümkündür [Bekele et al., 2019]. Bunun yanında birkaç VIGS vektörü, 150 ile 800 bp arasında bir fragman

boyutunu taşıma kapasitesine sahiptir. Bunun yanında eklenen fragmanın 1500 bp'den büyük olması virüs çoğalmasını engelleyebilir ve VIGS vektörleri gen susturmayı indüklemede başarısız olabilir [Senthil-Kumar and Mysore, 2011; Bekele et al., 2019].

Viral enfeksiyonu başlatmak için VIGS gerekliliği, bazı ekin bitkilerinde uygulanmasını kısıtlamaktadır. Fasulye, salatalık, bezelye, biber, patates, domates gibi mahsul çeşitlerinde bilinen ve belirli virüslere karşı direnç sağlayan birkaç viral direnç geni vardır ve bu nedenle bunlardan türetilen vektörler VIGS'i etkisiz hale getirir. Gen susturma etkinliği, aşılama yöntemlerinin türlerinden etkilenebilir. Rekombinant virüs, bitki hücrelerine en sık *A. tumefaciens* aracılı geçici ekspresyon veya in vitro kopyalanmış RNA inokülasyonu veya doğrudan DNA inokülasyonu yoluyla iletilse de virüs vektör aktarımı için etkili bir yöntemin olmaması bitkilerde VIGS uygulamasında zorluk oluşturur. İkili VIGS vektörlerinin Agrobacterium aracılı iletimi, birçok çift çenekli bitkide verimli bir şekilde kullanılır. Bununla birlikte Agrobacterium aracılı transformasyona dirençli bitkiler için VIGS, virüs özü aşılama yöntemi, RNA transkript aşılaması veya DNA bombardımanı ile indüklenebilir. Belirli dokularda susturmanın olmamasıyla sonuçlanan düzensiz veya lokalize VIGS, esas olarak etkisiz virüs hareketinin sonucudur. Bu sorun, sistemik virüs hareketini destekleyen çevresel koşulları koruyarak çözülebilir. Ayrıca konak bitkide eki bozmadan sistemik olarak yayılabilen uygun virüs vektörleri seçilmeli ve bu tür vektörler güçlü bir susturucu süpresöre sahip olmamalıdır [Unver ve Budak, 2009; Bekele et al., 2019].

VIGS, tek bir geni, homologların bir alt kümesini veya tümünü ve hatta bir gen ailesini susturma yeteneğine sahiptir. Gen ekspresyonunu ortadan kaldırmak için stabil transformasyona bir alternatif olarak VIGS, bitkilerde gen fonksiyonu karakterizasyonu için basit, hızlı, ucuz, etkili ve geçici bir yol sağlar. Daha kesin ama aynı zamanda daha fazla zaman alan gen fonksiyon analizleri kullanılmadan önce, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları veya RNA dizileme analizi yoluyla tanımlanan aday genlerin yüksek verimli ön taraması için kullanılabilir.

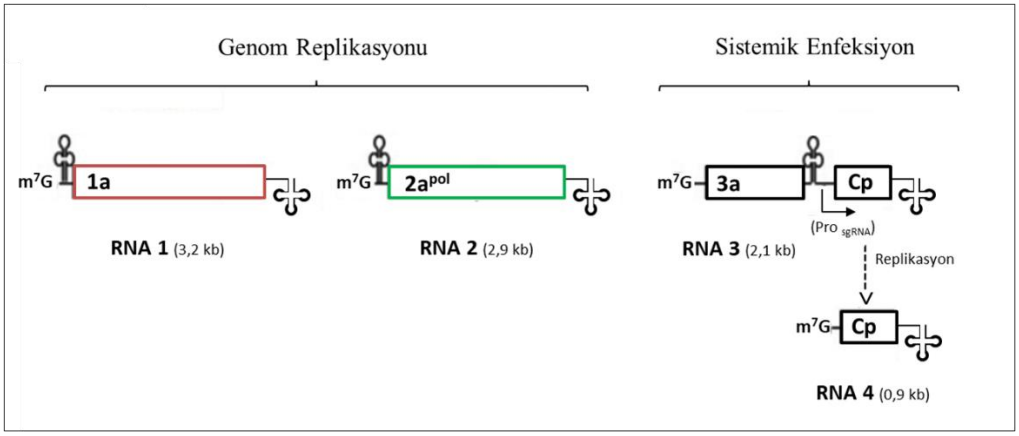
2.3.3. Brom Mozaik Virüs

Son yirmi yılda 50'den fazla bitki VIGS vektörü üretilmiştir. Brome mozaik virüsü (BMV) mısır, sorgum, pirinç, arpa ve uzun çayır gibi tek çenekli türler için

tercih edilen bir VIGS vektörüdür [Wang et al. 2021]. BMV RNA replikasyonu ve yayılması gereksinimlerini analiz etmek için bir dizi farklı sistem kullanılmıştır. Bunlar arasında in vitro RNA sentezini yönlendirebilen BMV RNA replikazı, BMV RNA'ları ile transfekte edilebilen arpa ve tütün protoplastları, lokal ve sistemik enfeksiyonları analiz etmek için kullanılabilen bitkiler yer alır.

Pozitif sarmallı RNA virüslerinin alfavirüs benzeri süper ailesinin bir üyesi olan brome mozaik virüs, 5' başlıklı RNA1, RNA2 ve RNA3 arasında bölünmüş bir genoma sahiptir. RNA3, in vivo RNA replikasyonu için vazgeçilmezdir. RNA3, doğal bitki konağında BMV enfeksiyonunun hücreden hücreye hareketi için gerekli olan 3a hareket proteinini (MP) ve bir subgenomik mRNA olan RNA4'ten eksprese edilen kaplama proteinini (CP) kodlar. RNA3'teki 250 bazlık bir intergenik bölge, subgenomik RNA4'ün negatif iplikçikli RNA3'ten transkripsiyonunu sağlayan promotörü barındırır (Şekil 2.3), bu da RNA3 replikasyonuna bağlı olarak kılıf proteininin veya onun yerini alan herhangi bir genin ekspresyonunu sağlar. RNA1, BMV RNA'larını metile eden ve kaplayan ve BMV RNA'larını ve replikasyonla ilişkili proteinleri RNA replikasyon bölgesine taşıyan çok işlevli protein la'yı kodlar. RNA2, BMV replikazının katalitik çekirdeği olan RNA'ya bağımlı RNA polimerazı olan protein 2a'yı kodlar. Protein 2a (94 kDa), merkezi bir polimeraz benzeri alan içerirken, 1a (109 kDa), C-terminal sarmal benzeri bir bölge ve viral RNA kaplanmasında yer alan bir N-terminal alanı içerir. BMV 1a, 1a'nın C terminali ve 2apol'ün N terminali aracılığıyla 2apol ile etkileşime girer ve BMV'ye özgü RNA sentezinin yeri olan endoplazmik retikulumla ilişkili bir replikasyon kompleksinde in vivo olarak kolokalize olur [Garcia-Ruiz and Ahlquist, 2006; Gopinath et al., 2005; Wang et al., 2021].

.



Şekil 2.3: BMV genom organizasyonunun şematik gösterimi. BMV, RNA3'ün 3' kısmı tarafından kodlanan üç genomik RNA'ya, RNA1, RNA2 ve RNA3'e ve bir alt genomik mRNA'ya, RNA4'e sahiptir. Bu dört BMV pozitif sarmallı RNA'nın her biri, 5' m7G başlığı ve 3' tRNA benzeri bir yapı taşır. RNA3'teki alt genomik RNA4'ün (Pro sgRNA) promotörü gösterilmektedir. Dikdörtgen kutular, RNA replikasyonu için gerekli olan viral proteinler 1a ve $2a^{pol}$ ile konak bitkide sistemik hareket için gerekli olan 3a ve kaplama proteinine ait genleri temsil eder.

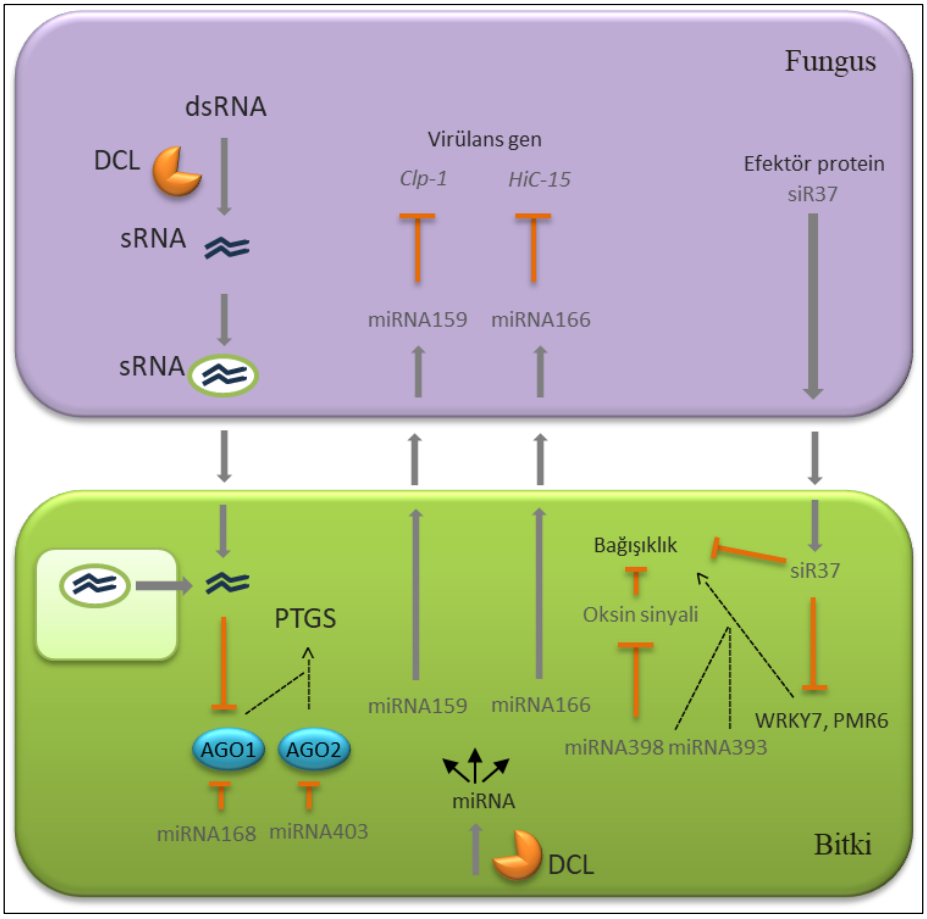
2.3.4. Bitki-Fungus Etkileşimleri ve RNAi

Bitkiler son derece büyük ve çeşitli çok hücreli organizmalar grubudur. Hücre çeperlerinin selülozdan yapılmış olması, kloroplastlarda fotosentez yapabilmeleri, klorofil a/b içeren çift zarlı kloroplast adı verilen organellerin varlığı tanımlayıcı özellikleri arasındadır. Transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel etkilere aracılık eden karmaşık bir birincil ve ikincil siRNA ağında işlev gören birçok Dicer, AGO ve RdRP'ın varlığı nedeniyle RNA susturma, bitkilerde son derece karmaşıktır. Bitkilerdeki sRNA'lar arasında miRNA'lar ve dsRNA'dan üretilen, kökenleri, biyogenez veya etkileri ile ayırt edilen çeşitli siRNA türleri yer alır. Bitkilerde RNA susturma, RNA interferans ve miRNA yolu olmak üzere birbiriyle ilişkili iki ana sisteme ayrılabilir. miRNA yolu, endojen protein kodlayan gen ekspresyonunu düzenlerken, RNAi virüsleri ve mobil elementleri hedefleyen doğuştan gelen bağışıklık biçimi olarak hizmet eder (Sanan-Mishra et al., 2021; Guo et al., 2016].

Fungal patojenler, konakçıya doğal bir açıklıktan veya yaradan özel hif yapılarıyla nüfuz eder. Fungusun gen organizasyonu, hücresel yapıları ve metabolik mekanizmaları, hayvanlar ve bitkiler gibi diğer yüksek ökaryotik organizmalara benzerdir. Patojenitenin yanı sıra, bazı fungus türleri farklı virüslerin bulaşması için de vektör görevi görür. Diğer ökaryotlara benzer şekilde, funguslar da antiviral

aktiviteler gerçekleştirmek için temel RNAi bileşenlerini içerir. RNAi bileşenlerinin varlığı birçok fungus türünde tanımlanmıştır [Segers et al., 2007] ve bu bileşenler, daha yüksek ökaryotik organizmalarda olduğu gibi benzer antiviral aktivite işlevlerine de sahiptir.

Bitki ve bitki fungal patojeni etkileşiminde, bir taraf kendini patojene karşı savunurken, diğer taraf büyüme, gelişme ve patogenez için benzer RNAi mekanizması kullanır. Patojenlerin sayısı ve RNAi yolunun karmaşıklığı geniş bir araştırma konusu olmakla birlikte Şekil 2.4'te çeşitli fungal patojenlere karşı bitki RNAi tepkileri daha önce yayınlanmış çalışmalar ışığında şematize edilmiştir. Birçok araştırma bitki fungus patojenlerinin virülansında yer alan RNAi bileşenlerinin önemini açıklamıştır. Fungal DCL'ler, RNAi mekanizmasını ele geçirmek ve konak bağışıklığını susturmak için bitki AGO1 proteinlerine bağlanan sRNA'lar üretir [Muhammad et al., 2019].



Şekil 2.4: Bitki-fungal patojen etkileşiminde RNAi'nin rolü. (PTGS:Transkripsiyon sonrası gen susturma; HiC-15: isotrichodermin C-15 hidroksilaz; Clp-1: Ca2+ bağımlı sistein proteaz)

Bitkiler, fungus patojenlerine karşı direnç veya duyarlılıkla ilgili belirli sinyalleri artıran veya engelleyen çeşitli sRNA'ların veya miRNA'ların biyogenezini aktive eder. Bazı miRNA'lar, etkileşen patojenlerin virülansla ilgili genlerini susturmak veya inhibe etmek için krallıklar arası RNAi aracılığıyla patojenlere iletilir. Ayrıca fungal patojenler konak savunması ile ilgili genleri baskılayan belirli efektör proteinler sağlar [Muhammad et al., 2019] (Şekil 2.4).

Botrytis cinerea ve Arabidopsis'te yapılan çalışmada Bc-sRNA'ları üretemeyen *B. cinerea* dcl1 dcl2 çift mutantının, aktif DCL genleri tarafından üretilen sRNA'ları baskılayan bitki bağışıklığının olmaması nedeniyle azaltılmış virülans sergilediği gösterildi. Böylece fungal patojeni, konakçı bağışıklığını bastırmak ve enfeksiyonu sağlamak için "virulan" sRNA efektörlerini konakçı bitki hücrelerine aktardığı öne sürüldü [Weiberg et al., 2013].

Colletotrichum higginsianum'da, iki DCL, iki AGO ve üç RDR için yapılan mutant çalışmada, çeşitli DCL, AGO ve RDR'lerin fungusun vejetatif büyümesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı, fakat dcl1 ve dcl1dcl2 çift mutantları ve ago1 mutantlarının konidi oluşumu ve morfolojisinde ciddi kusurlar sergilediğini ortaya koydu. Konidi oluşumu ve fungal patojenin konak hücrelere girişi, hastalık gelişiminde ve konak bağışıklığına karşı koymada önemli bir adımı ifade ettiği için ChDCL1 ve ChAGO1'i içeren RNA susturma işleminin bir antiviral mekanizma olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür [Campo et al., 2016].

Hemibiyotrofik fungus olan *Colletotrichum gloeosporioides*'da yapılan çalışmada, DCL knock-out mutantlarının konak hücreye penetrasyon kabiliyetinde ciddi azalma olduğu ve bunun sonucu olarak konak bağışıklığının zayıf şekilde manipüle edilmesine yol açtığı gösterildi [Wang et al., 2017].

Bununla birlikte birçok miRNA'nın fonksiyonel olarak fungus stres tepkisine dahil olduğu bildirilmiştir. *Brassica napus* ve nekrotrofik patojeni *Sclerotinia sclerotiorum* ile yapılan çalışmada *S. sclerotiorum* ile enfekte edilmiş ve edilmemiş yapraklar arasında 68 miRNA'yı farklı şekilde ifade ettiği gösterilmiştir. Bu miRNA'ların bir setinin, reaktif oksijen türleri (ROS) ile ilişkili ve nükleotit-bağlayıcı lösince zengin tekrarlı direnç genleri (NB-LRR)'ni hedeflediği ve bu genlerin çeşitli patojenlere karşı bitki savunma yanıtında yer aldığı gösterilmiştir [Cao et al., 2016]. Bitki miRNA'larından miR160a, miR396a, miR398b, miR482, miR1444, miR2118 ve miR7695'in, fungus patojenlerine karşı gen regülasyonu ve bağışıklıkta yer aldığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. [Tayeb et al., 2019]

Arabidopsis ve nekrotrofik fungus *Botrytis cinerea* ile yapılan diğer bir çalışmada, konak Arabidopsis hücrelerinin, sRNA'ları fungus patojeni *Botrytis cinerea*'ya iletmek için eksozom benzeri hücre dışı veziküller salgıladığı ve patojenite için kritik olan fungus genlerinin susturulmasını indükleyen bu sRNA'ları içeren veziküllerin enfeksiyon bölgelerinde birikip fungus hücreleri tarafından alındığı gösterildi [Cai et al., 2018].

Pamuk bitksi ve birçok mahsulde solgunluk hastalıklarından sorumlu vasküler bir fungal patojeni olan *Verticillium dahliae* ile yapılan bir çalışmada, pamuk bitkilerinde *V. dahliae* enfeksiyonu üzerine iki spesifik miRNA'nın (miR166) ve miR159) biyogenezinin indüklendiği ve bitkinin her ikisini de spesifik susturma için fungus hiflerine transfer ettiği gösterilmiştir. Bu miRNA'lar fungus patojenlerinin virülansla ilgili farklı genlerini (sırasıyla *Clp-5* ve *HIC-15*) hedefler ve hastalık direnci sağladığı ortaya konulmuştur [Zhang et al., 2016].

Tüm bu çalışmalar bitki-patojen etkileşiminde sRNA gruplarının gen susturma yoluyla konak bağışıklığına katkıda bulunurken patojenden türetilen sRNA'ların da patojen virülansını tetiklediğini göstermiştir. Bazen bu etkinin diğer krallıklara yayılabildiği ve etkileşen organizmada gen susturmayı düzenlediği önerilmiştir. Krallıklar arası RNAi olarak adlandırılan bu tür bir etkileşim patojenlere dirençli transgenik bitkilerin geliştirilmesi için de bir perspektif sağlamıştır.

2.3.5. Konak Kaynaklı Gen Susturma (HIGS)

VIGS ve PTGS susturma sinyalinin sistemik yayılmasına dayandığından, susturmanın kapsamı bireyler, organlar ve dokular arasında değişir ve kısmen vektörün hareket kabiliyetine bağlıdır [Wege et al., 2017]. Bitkilerin değiştirilmiş virüsler tarafından manipüle edilebiliyor olması bir dizi uygulamanın temelini oluşturur. Bununla birlikte VIGS, konak bitkiden viral partiküller veya RNA'lar alan bitki patojenlerinin genlerini susturmak için de kullanılabilir. Bu yaklaşım, konak kaynaklı gen susturma (HIGS) veya alemler arası VIGS (TK-VIGS) olarak adlandırıldı. Bu uygulamaların tümü, sRNA'ların konak bitkiden patojene ve aynı şekilde tersi yönde geçiş yapma yeteneğini kullanır. HIGS, bitki koruma için biyoteknolojik bir uygulama olarak geniş bir potansiyel sağlayan VIGS tarafından geçici olarak iletilebilen dsRNA'lar tarafından etkili bir şekilde tetiklenir [Koch and Wassenegger, 2021; Rössner et al., 2022].

HIGS'de, eksojen yapay RNAi sinyalleri, gen baskılaması ve ekin direncini artırmak için patojen mRNA'ları hedeflemek üzere ifade edilir. Bu yaklaşım, *Blumeria graminis, Puccinia türleri, Fusarium türleri, Verticillium dahlia, Magnaporthe oryzae* ve *Aspergillus flavus* dahil olmak üzere çeşitli fungal patojenlere karşı RNAi aracılı direnç sağlamak için başarıyla kullanılmıştır [Ray et al., 2022].

N. tabacum ve S. sclerotiorum ile yapılan çalışmada tütün bitkisi, fungus kitin sentaz geninin susturulması için interfering intron-saç tokası RNA (shRNA) yapısı ile transforme edildi ve transgenik hatların, transgenik olmayan hatlara kıyasla hastalık şiddetinde %55.5 ila %86.7 arasında değişen bir azalma gösterdiği rapor edildi [Andrade et al., 2016].

Benzer şekilde, *F. graminearum* ve buğday bitkisinde yapılan çalışmada temel bir fungal kitin sentaz geni (*Chs3b*)'nin inhibe edildiği diğer bir HIGS çalışması, buğdayda fusarium yanıklığına karşı direnci arttırdığını gösterdi. Yapılan benzer çalışmalarla çeşitli fungal türlerin neden olduğu hastalıkları baskılamada konak kaynaklı gen susturmanın benzer rolü ortaya koyuldu [Cheng et al., 2015].

Sonuç olarak, kimyasal fungusit bazlı kontrol stratejilerinden farklı olarak, RNAi bazlı bitki koruma yöntemleri, bitki fungus patojenleriyle mücadele etmek için çevre dostu yöntemler sunar. RNAi mekanizmasının yüksek özgüllüğü, hemen hemen tüm ökaryotlarda bulunması ve insanlar tarafından taze meyve ve sebzeler şeklinde düzenli olarak RNA tüketimi, RNAi bazlı hastalık kontrolünün muhtemelen toksik olmadığını düşündürmektedir [Fletcher et al., 2020].

2.4. Hücre İçi ROS Ölçümü

Reaktif oksijen türleri (ROS), metabolik aktivite sırasında mantarlar tarafından oluşturulur. Açlık, ışık, mekanik hasar ve diğer bazı canlı organizmalarla etkileşim gibi çeşitli stres etkenlerinden dolayı mantarlarda ROS üretimi artmaktadır. Stres koşullarında yüksek enerji durumuna sahip elektronlar moleküler oksijene (O_2) transfer edilerek reaktif oksijen türleri oluşturulur. Uygun koşullar altında, ROS sürekli olarak bazal seviyelerde üretilse de farklı antioksidan mekanizmalar tarafından temizlenirler ve hücrede hasara neden olamaz. ROS oluşumu ve temizliği arasındaki bu hassas denge, farklı stres faktörleri tarafından bozulabilmektedir. ROS; süperoksit anyonu (O^{-2}), hidroksil radikali (OH^{-}) gibi serbest radikallerin yanında

hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen ($^1O_2$) gibi radikal olmayan molekülleri de içerir.

ROS birikiminin tespiti için histokimyasal boyama, floresans, lüminesans, elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi veya ROS sensörlerine dayana birçok yöntem geliştirilmiştir. Serbest radikallerin kararsız, kısa ömürlü ve reaktif yapıları nedeniyle biyolojik ve biyolojik olmayan ortamlarda tespit edilmeleri zordur. Floresan probları yüksek duyarlılığı, hücre zarından geçebilmeleri ve veri eldesindeki kolaylıkları nedeniyle reaktif türlerin tespitine yönelik en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Yüksek hassasiyeti ve veri eldesindeki kolaylığı bu yöntemi üstün kılmaktadır. Floresan diasetat (DCFH-DA), geniş bir ROS spektrumunu saptamak için yaygın olarak kullanılan floresan probları arasındadır. ROS tarafından okside edildiğinde floresan hale gelen floresan olmayan moleküllerden oluşur ve yayılan floresan, florimetri ve/veya floresan mikroskopi ile gözlemlenebilir. Hücre membranı boyunca yayılma kabiliyeti nedeniyle hücresel çalışmalarda kullanılabilen bu prob oksidasyona bağlı olarak genellikle hücre içi redoks durumlarının doğrudan ölçümü için kullanılır. DCFH-DA hücre membranından kolayca difüze olarak hücre içine geçer ve hücresel esterazlar floresan olmayan DCFH-DA' yı yine floresan olmayan bir bileşik olan DCFH' ye enzimatik olarak hidrolize eder (Deasetilasyon). Membrandan geçemediği için hücre içinde kalan bu ara ürün daha sonra ortamdaki reaktif türler tarafından oksitlenir ve floresan bileşik olan 2', 7'- diklorofloresein (DCF)' e dönüşür. Daha önce yapılan çalışmalarda DCF' nin neden olduğu floresan yoğunluğunun hücrelerdeki oksidatif stres seviyeleri ile ilişkili olduğunu kanıtlanmıştır [Gomes et al., 2005; Liu et al., 2022).

Yapılan bu çalışmada, oksidatif stres ölçümü için bir florometrik analiz olan 2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Genel Kitler ve Reaktifler

Tablo 3.1: Kit ve reaktiflerin listesi.

100 bp DNA Ladder	B7025 (New England Biolabs-USA)
AMPIGENE® qPCR Green Mix	Enzo / ENZ-NUC103
DNA Loading Dye	Sigma / 1000119522854
High Capacity cDNA Reverse Transcription	Invitrogen / 4368814
Nucleospin Plasmid Kit	740588.50 (Macherey Nagel-Germany)
PCR clean-up Gel extraction Kit	740609.50 (Macherey Nagel-Germany)
PureLink Genomic DNA Mini Kit	K1820-02 (Invitrogen-USA)
Taq DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen / 2236785

3.1.2. Tampon ve Solüsyonlar

Tablo 3.2: Tampon ve solüsyonların listesi.

5X-Tris Borate EDTA (TBE)	54 g Tris-Base 27.5 g Boric-Acid 20 mL 0.5 M EDTA (pH:8.0)
LB Agar	LBP04 (Caisson Labs-USA)
LB Broth Medium	LBP03 (Caisson Labs-USA)

3.1.3. Oligonükleotit Dizileri

Tablo 3.3: Primer Listesi

CYP51C_F	5’- CCTCCTAGGCCCTTGACGTGGGAGAATTTA -3
CYP51C_R	5’- CTTCCATGGTGACGGACTTGCTCATCATAC -3’
PDS_F	5’- CCTCCTAGGCTGACGAGCTTTCGATG -3’
PDS_R	5’- CTTCCATGGCATATATGGACATTTATC -3’
qCYP51A_F	5’- TCTATTCTGCGAAAGGTCAAGAG -3’
qCYP51A_R	5’- CAGTTGGTGAAGCGAGGATAA -3’
qCYP51B_F	5’- GTGGCGATGACGAAGAGAAG -3’
qCYP51B_R	5’- AGCACCAAAGGGCAGATAAG -3’
qCYP51C_F	5’- CCCTTGACGTGGGAGAATTTG -3’
qCYP51C_R	5’- ACTTGACCTGTCGGAGAATAG -3’
qPDS_F	5’- CCTCCTAGGCTGACGAGCTT-3’
qPDS_R	5’- CTTCCATGGCATATATGGAC -3’
β-Tubilin_F	5’- GCAGGGCTTCCAACATCTTA -3’
β-Tubilin_R	5’- TATCGACCGTTGCGGAAATC-3’

3.1.4. Cihazlar

Tablo 3.4: Cihaz listesi.

Agaroz Jel Elektroforezi	Claver Scientific / MP300
Güç kaynağı	Bio-Rad-USA
Laminar Kabin	Heraeus
NanoDrop	Thermo Scientific / EC 1000 XL
PCR Termal Döngü	Biorad / T100
Santrifüj	MWP / MWP-150R 521-2844 (Mini Star-VWR-USA)
Shaker	Wisd Shaking Incubator/ WITEG_34009
Vorteks	Scientific Industries-USA

3.1.5. Hücre Kültür ve İndüksiyon Buffer İçeriği

Tablo 3.5: Patates dekstroz agar (PDA) besiyeri içeriği.

Bileşen	**Miktar**
Agar	15 g/L
Glikoz	20 g/L
Patates	200 g/L

Tablo 3.6: Patates dekstroz suyu (PDB) besiyeri içeriği.

Bileşen	**Miktar**
Glikoz	20 g/L
Patates	200 g/L

Tablo 3.7: Sentetik nutrient agar (SNA) besiyeri içeriği.

Bileşen	**Miktar**
Agar	13,2 g/L
Glikoz	0,2 g/L
K_2HPO_4	1g/L
KCl	0,5 g/L
KNO_3	1g/L
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,5 g/L
NaOH	0,6 g/L
Sükroz	0,2 g/L

Tablo 3.8: Agrobacterium indüksiyon buffer içeriği.

Bileşen	**Miktar**
2-(N-morfolino) etansülfonik asit (MES)	10 mM (pH:5,6)
MgCl2	10 mM
Asetosiringon	0.1 mM

3.1.6. Fungus İzolatı

Çalışmamızda kullanılan fungus izolatı Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (MAEM)'nden (Ankara) temin edilmiştir. İzolatın, morfolojik ve moleküler teşhisi ve monospor kültürü MAEM tarafından yapılmıştır. Tez

çalışmasında, stok fungus izolatı, *Fusarium verticillioides*, uzun süreli saklama için sentetik nutrient agar (SNA) besi ortamında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.7. Fusarium İzolatı Kültür Koşulu

F. verticillioides izolatı amaca uygun olarak SNA, PDA ve PDB olmak üzere üç farklı besiyeri kullanılarak kültürlendi (Tablo 3.5-3.6-3.7). SNA izolatın uzun süreli muhafazasında ve sporlanmanın teşvikinde, PDA kültürlerin devamlılığının sağlanmasında ve büyümenin hif boyutunda gözlemlenmesinde, PDB besiyeri ise antibiyotik direncinin belirlenmesinde, birlikte kültürleme çalışmalarında ve kültürlerin devamlılığının sağlanmasında kullanıldı. Herbir besiyeri 121ºC'de, 1.2 atm basınç altında 15 dakika otoklav ile steril edildikten sonra kullanıldı.

F. verticillioides izolatına ait SNA besiyerindeki kültürler agar-miselyum parçasının besiyerine konması ile steril kabinde başlatıldı. İzolatlar uygun ışık ve gece-gündüz oda sıcaklığı koşullarında yaklaşık bir hafta inkübe edildi. Sıvı kültür eldesi için, SNA'da çoğaltılan bir haftalık kültürler pastör pipeti kullanılarak RNaz içermeyen su ile süpürülerek sıvı besiyerine aktarıldı ve çalkalamalı inkübatörde 28 ºC'de 180 rpm hızda kültürlendi. -80 stok için hücreler gliserol (%15; v/v) ile muamele edildi ve uzun süreli saklamaya bırakıldı.

Çalışmada hazırlanan fungus süspansiyon konsantrasyonlarının belirlenmesi için sıvı kültür steril filtre kağıdı ile süzüldükten sonra %0,4 trypan blue ile 1:1 (v/v) hacimde seyreltilerek boyandı ve mikroskop altında (Leica DM250 Fluorescence microscope) thoma lamı kullanılarak spor sayımı ImageJ yazılımı (www.imagej.nih.gov) ile Formül 3.1'de belirtilen formüle göre gerçekleştirildi [Purwati and Nurul, 2008].

$$\text{Hücre sayısı/ml} = 16 \text{ büyük karede sayılan hücre sayısı} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4 \quad (3.1)$$

3.1.8. Bitki Materyali ve Büyüme Koşulu

Çalışmada bitki materyali olarak tütün (*N. benthaiana*) tohumları kullanılmıştır. Uzun süreli saklama için tohumlar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Bitki tohumları Lu ve ekibi (2012) tarafından önerilen protokol revize edilerek yapılmıştır. Protokol doğrultusunda ilk adımda, tohumlar %10 sodyum hipoklorit sulu çözeltisi ile oda sıcaklığında 15 dk boyunca çalkalandı. 3 kez %70 EtOH ardından 5 kez ddH_2O ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar 25°C'de 12 sa inkübasyonun ardından çimlenme için 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık ışık periyodunda, 15.000 lux ışık yoğunluğunda, % 65-85 nem ve 26 °C'de dereceli büyütme odasında çimlenmeye bırakıldı.

Çalışmada fungus ile muamele edilmek üzere yetiştirilen tütün fideleri için tohumlar mikrobiyal yükü en aza indirmek adına 121ºC'de 1 atm basınçta 20 dk sterilizasyona tabi tutulan toprakta kısmen korumalı sera koşullarında çimlendirildi.

3.1.9. Bakteri Materyalleri ve Kültür Koşulları

Escherichia coli DH5α kompetent bakteri suşu ve *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suşu Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonundan elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan *A. tumefaciens* EHA105 suşu pDE-CAS9Kr ve modifiye pDONR207 vektörlerini içerir ve gentamisin direnç genine sahiptir [Charrier et al., 2019].

Luria Broth (LB) besiyeri 121ºC'de 1.2 atm basınç altında 20 dk sterilizayon adımından sonra transformantların oluşturulmasında, seçilimde, yeterli miktarda kültür üretiminde ve uzun süreli saklama için -80 stoklarının oluşturulmasında gliserol (% 15; v/v) ile kullanılmıştır.

3.1.10. VIGS'te Kullanılan Vektörler

BMV VIGS vektörü olan BMVCP5, pC13/F1+2 plazmiti pF1-11 ve pF2-2'den amplifiye edilmiş 35S promotorun arkasına yerleştirilmiş RNA1-2 sekanslarını içeren pC13/F1+2 plazmitinden ve iki kesim bölgesi (NcoI ve AvrII) ile kapsit proteini ORF'nin arkasında klonlama bölgesine sahip modifiye BMV RNA3 sekansını içeren, pC13/F3CP5 vektöründen oluşur [Ding et al., 2006; Ding et al., 2018].

3.1.11. Primer Tasarımı

Primer tasarımı için ilgili genlere ait mRNA dizileri FASTA formatında NCBI veri bankasından elde edildi. Bu diziler kullanılarak çevrimiçi biyoinformatik bir araç olan OligoAnalyzer™ Tool (https://eu.idtdna.com) ile erime sıcaklığı (Tm), saç-tokası oluşumu ve self ve counter dimer oluşum parametreleri değerlendirilerek primer tasarımı gerçekleştirildi. Primer özgünlükleri BLASTn (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) kullanılarak değerlendirildi. *F. verticillioides CYP51C* geni ve *N. benthamiana PDS* geni için qRT-PCR primerleri (sırasıyla qCYP51C_F, qCYP51C_R; qPDS_F, qPDS_R) gen sekans sonucuna göre tasarlandı. *F. verticillioides CYP51A* geni için qRT-PCR primerleri (qCYP51A_F ve qCYP51A_F), XM_018899353.1 ve KC527017.1; *CYP51B* geni için qPCR primerleri (qCYP51B_F ve qCYP51B_F), XM_018887915.1 ve KC527018.1 dizileri temel alınarak korunmuş alanlar üzerinden tasarlanmıştır. *N. benthamina PDS* geni için klonlama primerleri (PDS_F ve PDS_R), EU165355.1, DQ469932.1, EU165355.1, AJ571700.1, XM_019388479.1 dizileri temel alınarak korunmuş alanlardan, *F. verticillioides* CYP51C klonlama primerleri (CYP51C_F ve CYP51C_R), XM_018901738.1 dizisi temel alınarak tasarlandı.

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. BMV VIGS Vektörünün Oluşturulması

N. benthamiana PDS geninden 370 bp'lik fragman, 5' uçlarına NcoI, AvrII kesim bölgeleri eklenen bmv_PDS_F (5'-CCTCCTAGGCTGACGAGCTTTCGATG -3') ve bmv_PDS_R (5'-CTTCCATGGCATATATGGACATTTATC -3') primerleri kullanılarak cDNA'dan amplifiye edildi ve amplikonlar pC13/F3CP5 sekansı içindeki NcoI/AvrII alanına klonlandı. HIGS deneyleri için ise *F. verticillioides CYP51C* geninden 313 bp'lik fragman, CYP51C_F (5'-CCTCCTAGGCCCTTGACGTGGGAGAATTTA-3) ve CYP51C_R (5'-CTTCCATGGTGACGGACTTGCTCATCATAC-3') primerleri kullanılarak cDNA'dan amplifiye edildi ve amplikonlar pC13/F3CP5 sekansı

içindeki NcoI/AvrII alanına klonlandı. Tüm rekombinant RNA3 vektörleri dizileme ile ayrıca doğrulandı.

3.2.2. Moleküler Klonlama

3.2.2.1. Restriksiyon Enzim Kesimi

pC13/F3CP5 plazmiti bir mikrosantrifüj tüpünde uygun kesim enzimleri (RE) ile muamele edildi. RE reaksiyonları, 1x Restriksiyon Enzim tamponu, 1-3 µg plazmit DNA veya 0,5-3 µg amplifiye DNA fragmanı ve uygun miktarda RE içeren toplamda 20 µl hacimde gerçekleştirildi. Kesimler, 1-3 saat boyunca 37°C'de gerçekleştirildi. İki RE için reaksiyonlar, uygun bir tamponda üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Spesifik gen bölgelerini çoğaltmak için PCR gerçekleştirildi. Kit bileşenleri üreticinin talimatlarına uygun şekilde (Invitrogen) 0.2 ul'lik bir mikrofüj tüpünde birleştirildi ve uygun döngü ve sıcaklıklar için cihaza alındı.

Tablo 3.9: PCR reaksiyon bileşenleri.

Stok Solüsyon Konsantrasyonu	**25 rxn için gerekli hacim (µl)**
PCR Buffer (10X) -Mg (B9015S)	2,5
MgCI2 (50mM) (B9021S)	0,75
dNTP (10 mM) NEB (N0447S)	0,5
Primer (10 µM) Forward – Reverse Mix	2,5
Taq DNA polymerase (5 U/µl) (M0320S)	0,1
DNA (1-500 ng/µl)	1
ddH2O	17,65

Tablo 3.10: PCR için kullanılan sıcaklık ve döngü şartları.

	Sıcaklık (°C)	**Zaman**
	94	3 dk
25-35 döngü	94	45 sn
	57/56*	30 sn
	72	90 sn/kb
	72	10 dk
	4	∞

* *N. benthamiana* PDS gen bölgesi için bağlanma sıcaklığı 57°C, uzama adımı 35 sn; *F. verticillioides* CYP51C gen bölgesi için bağlanma sıcaklığı 56°C, uzama adımı 45 sn olacak şekilde gerçekleştirildi.

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde analiz edildi.

3.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ile amplifiye edilen veya RE ile kesilen DNA numuneleri, 1X TBE ile hazırlanmış yatay bir elektroforez sisteminde 1X RedSafe™ Nucleic Acid Stain içeren % 0.8-2 agaroz jel üzerinde yürütüldü.

Geri kazanım için ilgilenilen DNA fragmanları agaroz jel üzerinde ayrılması sağlandıktan sonra 366 nm aydınlatma altında steril bir bistüri kullanılarak jelden çıkarıldı. DNA, Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up kiti kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda jelden ekstrakt edildi.

3.2.2.4. DNA Ligasyonu ve Klonlama

Ligasyon reaksiyonları için uygun restriksiyon enzimleri ile (NcoI ve AvrII) kesilen ve agaroz jelden izole edilen fragmanlar ile pC13/F3CP5 vektörü kullanıldı. Insert ve vektör fragmanları, 1x T4 ligasyon tamponu ve 1 ünite T4 ligaz enzimi içeren 10 µl'lik bir ligasyon reaksiyonunda 5:1 mol oranında karıştırıldı ve gece boyu 4°C'de inkübe edildi.

3.2.2.5. Ligasyon Ürününün Kompetent Bakteriye Transformasyonu

Transformasyon için *Escherichia coli* DH5α kompetent suşları kullanıldı. Kompetent hücreler -80°C dondurucudan alındı ve buz üzerinde çözünmeye bırakıldı. Ligasyon ürünlerinin yarısı (5 µl), 80 µl kompetent hücrelere ilave edildi ve 25 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Bir ısı bloğunda 42°C'de 1 dakika boyunca ısı şoku uygulandı ve ardından numuneler 2 dakikalık inkübasyon için buza geri bırakıldı. 900 µl Luria Broth (LB) hücrelere eklendi ve 37°C'de 1 saat boyunca çalkalayıcı etüvde kültüre bırakıldı. Bu kültür, uygun formda ligasyonu gerçekleşmiş plazmitleri de içine alan hücrelerin, kanamisin direnç markırlarını ifade etmesini sağladı. İnkübasyonun sonunda, uygun hacimde (50-80 µl) kültür, uygun antibiyotik içeren LB agar besiyerlerine ekildi. Yaklaşık beş dakikalık bir inkübasyonun ardından petriler ters çevrildi ve uygun ligasyon ürünlerini alan tek hücreden türetilmiş kolonilerin oluşumuna izin vermek için 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tek koloniler, uygun antibiyotiği içeren (50 µg ml^{-1} kanamisin) 3.5 ml LB ortamına alındı ve gece boyu kültürlendi.

3.2.2.6. Plazmit İzolasyonu

Transformantların ilk taraması için hücreler 3,5 ml gece boyu büyütülmüş kültürlerden elde edildi. Plazmid izolasyonu için MiniPrep Plazmid İzolasyon kiti (Macherey-Nagel) kullanıldı ve üretici firmanın talimatları izlendi. Transformant adayları doğrulama için RE analizi ile tarandı. Büyük miktarda plazmit gerektiğinde, miniprep izolasyonundan elde edilen plazmit tekrar bakteriye transformasyonda kullanıldı. Ardından tek hücreden türetilen koloniler uygun antibiyotiği içeren 25 ml LB ortamında kültürlendi

Her iki gen fragmanı için (*CYP51C* ve *PDS*) RE ile doğrulanmış transformant adaylarından biri ileri çalışmalar için Sanger yöntemi ile dizilendi.

3.2.3. Kompetent Agrobacterium Hücrelerinin Hazırlanması

A. tumefaciens EHA105 kompetent hücrelerin hazırlanmasında, Wise ve ekibinin (2006) oluşturduğu protokol temel alınarak gerçekleştirildi.

Agrobacterium suşu uygun antibiyotik eşliğinde (gentamisin) 2 ml LB büyüme ortamına ön kültür için inoküle edildi ve 28°C'de 200 rpm'de çalkalayıcı etüvde gece boyu büyütüldü. 2 ml kültürün tamamı 50 ml besiyerini inoküle etmek için kullanıldı ve hücreler OD_{600} için 0,5-1 arasında bir değere ulaşıncaya kadar inkübasyon sürdürüldü. İstenilen değere ulaşan kültürler +4°C'de 4000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 5 ml soğuk 20 mM $CaCl_2$ ile resüspanse edildi ve +4°C'de 4000 rpm'de 8 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet soğuk 1 ml (20 mM CaCl2) ile çözüldü ve uzun süreli saklama için -80 stok atıldı.

3.2.4. BMV Vektörlerinin Kompetent Bakteriye Transformasyonu

BMV vektörlerinin kompetent bakteriye transformasyonu agroinfiltrasyon metoduna uygun şekilde gerçekleştirildi [Goodin et al., 2002]. pC13/F1+2 plazmitine sahip *A. tumefaciens EHA105* suşu BMV_1; pC13/F3CP5 plazmitini içeren bakteri suşu BMV_3; klonlanmış PDS ya da CYP51C gen fragmanlı pC13/F3CP5 vektörünü içeren bakteri suşları sırasıyla $BMV_{3:PDS}$, $BMV_{3:CYP51C}$ şeklinde anılacaktır. Çalışmada "mock" grubu yabancı gen fragmanı içermeyen $BMV_{3:}BMV_1$ bakterileri suşlarını ifade etmektedir. Agroinfiltrasyon için 2 adet BMV vektörleri ayrı ayrı *A. tumefaciens* EHA105 suşuna Bundock ve ekibinin (1995) protokolü temel alınarak donma-çözülme tekniğiyle transforme edildi.

-80°C dondurucudan alınan kompetent hücreler buz üzerinde çözünmeye bırakıldı. İzolasyon ürünleri 1 µg olacak şekilde uygun hacimle 50 µl kompetent hücrelere ilave edildi. 10 dakika buz üzerinde inkübasyondan sonra ısı bloğunda 37°C'de 5 dakika boyunca ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından numuneler 2 dakikalık inkübasyon için buza geri alındı. Hücrelerin üzerine yaklaşık 900 µl LB hücrelere eklendi ve 28°C 200 rpm'de 3 saat boyunca çalkalayıcı etüvde kültüre bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, uygun hacimde (50-100 µl) kültür, uygun antibiyotik (gentamisin) içeren LB agar besiyerlerine ekildi. Yaklaşık beş dakikalık bir inkübasyonun ardından petriler ters çevrildi ve transformasyonu gerçekleşen hücrelerden türetilmiş kolonilerin oluşumuna izin vermek için 28°C'de karanlıkta 48 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tek koloniler, gentamisin antibiyotiği içeren 3.5 ml LB ortamına alındı ve gece boyu kültürlendi.

3.2.5. Agrobacterium Süspansiyonlarının Hazırlanması

BMV vektörlerinin bitki yapraklarına aktarım için *A. tumefaciens* EHA105'e daha önce belirtildiği gibi transforme edildi. Elde edilen tek koloniler gece boyunca 28°C'de çalkalamalı etüvde uygun antibiyotikleri içeren (50 μg ml^{-1} kanamicin, 100 μg ml^{-1}gentamisin) 3,5 ml LB içinde ön kültüre alındı. Daha sonra, aynı antibiyotikleri içeren 50 ml LB'yi inokule etmek için kültür kullanıldı ve OD_{600}'de 0.8 değeri için 28°C'de çalkalamalı etüvde büyütüldü. Kültürler, 4000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen her bir pellet 2,5 ml infiltrasyon tamponuyla çözüldü. Transforme bakteri süspansiyonları 1:1 hacimde karıştırılarak 25 °C'de 200 rpm'de 3 saat inkübasyona bırakıldı ve ardından bitkilerin enfekte edilmesi için kullanıldı.

Yang ve ekibinin (2018), çalışması temel alınarak yapılan ön optimizasyon aşamasından sonra 50 ml kültür hacmi için OD_{600} = 0,8'de sabit tutularak farklı hacimde indüksiyon tamponu ile konsantrasyon optimize edilmiştir. HIGS deneyleri için de optimize edilen yukarıdaki koşullar kullanılmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi optimize süspansiyon konsantrasyonu çalışmamızda 4x şeklinde ifade edilecektir.

Asetosiringon, virülansı artırmak için Tablo 3.8'de belirtilen kimyasallarla hazırlanan indüksiyon tamponuna [Bundock, 1995], 121°C'de 1 atm basınç altında 20 dk otoklav işleminden sonra kullanım sırasında eklendi.

3.2.6. *N. benthamiana*'nın Yaprak Agroinfiltrasyonu

İndüksiyon tamponunda 28 °C'de 200 rpm'de 3 saat inkübasyonun ardından Agrobacterium süspansiyonları dört ile altı gerçek yaprak aşamasındaki *N. benthamiana* fidelerine 1 ml'lik iğnesiz bir şırınga ile infiltre edildi. Agroinfiltrasyon işleminden önce stomaların açılmasını sağlamak için bitkiler 6 saat su ile dolu bir kabda bekletildi. Uygulama yapılan bitkiler gece boyu karanlıkta bırakıldı. Ardından bitkiler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık 25°C'lik büyüme ortamına alındı. Her bir deney grubu 2 ile 3 farklı tütün fidesi üzerinde değerlendirildi.

3.2.7. BMV-Tabanlı Konak Kaynaklı Gen Susturma

3.2.7.1. Agroinfiltrasyon Sonrası Fungus Aşılama

BMV_1/$BMV_{3:CYP51C}$ yapılarının *F. verticilllioides'*e karşılık gelen endojen CYP51C geninin susturma etkisini test etmek için vektörler daha önce belirtildidği gibi *A. tumefaciens* EHA105'e tranforme edildi. Elde edilen 50 ml OD_{600}= 0,8 değerli BMV_1 ve $BMV_{3:CYP51C}$ bakteri kültürleri 4000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen her bir pellet 2,5 ml infiltrasyon tamponuyla çözüldü. Transforme bakteri süspansiyonları 1:1 hacimde karıştırılarak 25 °C'de 200 rpm'de 3 saat inkübasyona bırakıldı ve ardından bitkilerin enfekte edilmesi için kullanıldı. Agroinfiltrasyondan yaklaşık 5 gün sonra 10^4 konidi/ml konsantrasyonlu *F. verticillioides* kültürü agroinfiltrasyonu gerçekleştirilen yapraklara infiltrasyon yöntemi ile verildi. *A. tumefaciens* ve *F. verticillioides* süspansiyonlarının infiltrasyonu 4-6 gerçek yaprak aşamasındaki tütün bitkisinin tamamen genişlemiş iki yaprağı üzerinde gerçekleştirildi ve fideler 25 ºC'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan bir büyüme odasına alındı.

Fungus aşılamasından 72 saat sonra CYP51C ekspresyon seviyelerinin analizi için, uygulama yapılan yapraklardan toplanan örnekler sıvı azot içerisine alındı ve kullanımlarına kadar -80'de muhafaza edildi.

3.2.8. *F. verticillioides*'te BMV-Tabanlı Gen Susturmanın Değerlendirilmesi

Fungusta BMV-tabanlı olası bir susturma, pC13/F1+2 ve *CYP51C* fragmanını içeren pC13/F3CP5 plazmitine sahip sırasıyla BMV_1 ve $BMV_{3:CYP51C}$ Agrobacterium suşları ile *F. verticillioides'*in birlikte kültür edilmesinin ardından yapılan fungal büyümenin radyal ölçümü, ROS tayini ve qRT-PCR ile gen ekspresyonu analizleri ile morfolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede belirlenmştir.

3.2.8.1. Birlikte Büyüme Koşulları

F. verticillioides'in *A. tumefaciens* aracılı olası transformasyonu Rodrigues ve ekibinin (2013) protokolü temel alınarak oluşturuldu. Daha önce belirtildiği şekilde

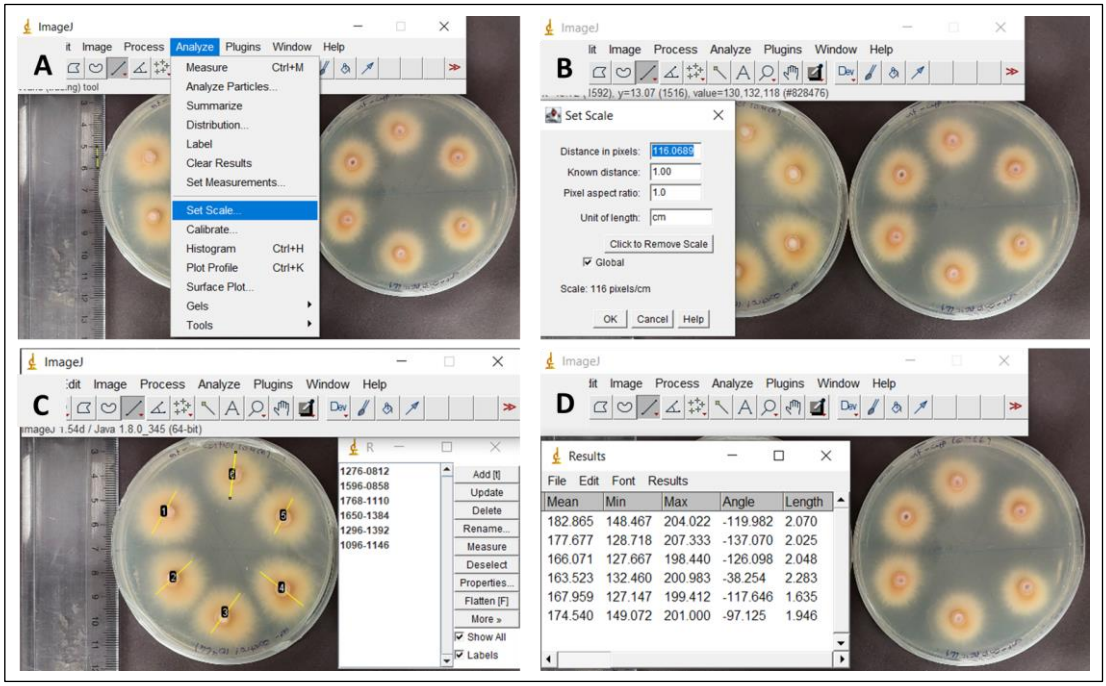
hazırlanan OD_{600} için 0,8 değerli BMV_1 ve $BMV_{3:CYP51C}$ bakterileri 1:1 hacimde birleştirildi. Total falkon hacmi 12 ml olan $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ bakteri karışımları 10 dakika oda sıcaklığında 4000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından pellet 1 ml indüksiyon tamponuyla [Bundock, 1995] çözüldü. Ardından 4 saat boyunca 28°C'de 200 rpm'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Birlikte büyüme için, 4 saat inkübasyonun ardından bakteri karışımları 10^4 konidi/ml konsantrasyonlu 1ml *F. verticillioides* kültürleriyle birleştirildi. Birlikte büyüme için falkonlar 25°C 180 rpm'de çalkalamalı etüve kaldırıldı. Aynı adımlar mock (BMV_1/BMV_3) grubu için de gerçekleştirildi. Birlikte büyümenin 32. saatinde kültürler agrobacterium eliminasyonu için timentin antibiyotiği ile muamele edildi. Transformasyon etkinliğini gözlemlemek için kültür ortamından alınan 10 µl örnekler, PDA besi ortamında (9/1,5 cm petri için 30 ml besiyeri) 0,75 cm çapında oluşturulan kuyucuklara bırakıldı. 28°C'de büyümeye bırakılan örnekler fungal büyüme için takip edildi.

Karşılaştırmalı deneyler için OD değeri ve indüksiyon tampon hacmi sabit tutulmuş, total hacimdeki değişiklikler üzerinden pellet yoğunluğundaki farklılıklar ile konsantrasyonlar değiştirilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ süspansiyon konsantrasyonu çalışmamızda 1,5x şeklinde ifade edilecektir.

3.2.8.2. Fungal Büyümenin Radyal Ölçümü

Miselyum büyümesi, fungus konsantrasyonu 10^4 konidi/ml'de sabit tutularak *A. tumefaciens* konsantrasyonundaki farklılıklar üzerinden değerlendirildi. Birlikte büyümenin 32. saatinin ardından fungal büyüme takibi için PDA besi ortamında 28°C'de büyümeye bırakılan örneklerin 24. saatinde çap ölçümleri gerçekleştirildi. Deney grubu ($BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$) ve mock grubu (BMV_1/BMV_3) için misel büyümesi (cm cinsinden zon çapı) ImageJ&Fiji programı kullanılarak ölçüldü (https://imagej.net/software/fiji/downloads).

Ölçüm için izlenen adımlar (Şekil 3.3); "A: File» Open » Select the image » Straight (ölçeklendirme için referans uzunluk işaretlenir) » Analyse » B: Set scale (bilinen uzunluk ve birim belirtilir) » C: Straight (istenilen uzunluklar işaretlenir) » Analyse » Tools »D: ROI Manager » Measure" şeklindedir.



Şekil 3.1: ImageJ&Fiji yazılımı kullanılarak doğrusal ölçüm için talimatlar.

Yüzde fungal büyüme inhibisyonu Formül 3.2'de belirtildiği gibi hesaplandı.

F. verticillioides CYP51A ve *CYP51B* paralog genlerinin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırmalı analizi için, en yüksek yüzde çap küçülmesine sahip deney grubunun qRT-PCR analizi ve ROS ölçümü gerçekleştirildi.

Fungus büyümesinin yüzde inhibisyonu (%) = (kontrol grubu doğrusal büyüme – test grubu doğrusal büyüme) x 100 /kontrol grubu doğrusal büyüme

(3.2)

3.2.8.3. DCF-DA Boyama Yöntemi Kullanılarak Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Ölçümü

Hücre içi ROS üretimi Forkink ve ekibinin (2010), protokolü temel alınarak DCFH-DA (2',7' dichlorofluorescin diacetate) kullanımıyla gerçekleştirildi.

Daha önce belirtildiği şekilde hazırlanan OD_{600} için 0,8 değerli BMV_1 ve $BMV_{3:CYP51C}$ bakterileri 1:1 hacimde birleştirildi. Total hacmi 12 ml olan $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ bakteri karışımları 10 dakika oda sıcaklığında 4000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından pellet 1 ml indüksiyon tamponuyla [Bundock, 1995] çözüldü. Ardından 4 saat boyunca 28°C'de 200 rpm'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Birlikte büyüme için, 4 saat inkübasyonun ardından bakteri karışımları 10^4

konidi/ml konsantrasyonlu 1ml *F. verticillioides* kültürleriyle birleştirildi. Birlikte büyüme için falkonlar 25°C 180 rpm'de çalkalamalı etüve kaldırıldı. Aynı adımlar mock (BMV_1/BMV_3) grubu için de gerçekleştirildi. Birlikte büyümenin 16. saatinde örnekler 20 µM 2',7' dichlorofluorescin diacetate ile muamele edildi veya edilmeden bırakıldı. Boyamanın akabinde örnekler 180 rpm'de 30°C'de 30 dk karanlıkta çalkalamalı etüve bırakıldı. Örneklerin floresan yoğunluğu (FI) 96 kuyucuklu plakada, bir spektral tarama mikroplate okuyucu (eksitasyon 485 nm; emisyon 538 nm; 37°C Thermo Scientific Varioskan Flash) ile 4 saat boyunca her 10 dk için ölçüldü.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Deney sırasında ışık ile etkileşim en az seviyede tutuldu. Deneyler 3 biyolojik ve dört teknik replika şeklinde gerçekleştirildi Gruplar için ROS üretimi, DCFH-DA ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin floresan yoğunluğu farkı ile belirlendi [Kobayashi et al., 2002].

3.2.9. Moleküler Analizler

3.2.9.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu fungus ve bitki yaprak dokusu için TRIzol yöntemi temel alınarak gerçekleştirildi.

4mm çapında steril çelik boncuklar ile 2 ml mikrosantrifuj tüpüne alınan yaprak/fungus hif örnekleri sıvı azotla fikse edildi. Agar plakadan alınan fungus örneği ve yaprak örneğinden ayrı olarak sıvı kültür ortamındaki fungustan RNA izolasyonu için hücreler 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek toplandı. Fikse edilen örnekler 25 saniye/25 frekans ayarıyla homojenizatörde toz hale getirildi. Örneklerin doku parçalanması bu aşamada kontrol edildi ve gerekli olduğu taktirde parçalama adımı tekrarlandı. Örnek tüplerine 1 ml TRIzol (Invitrogen) eklendi ardından vorteks edildi ve 5 dakika 15-30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 1 ml TRIzol içeren her bir mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kloroform eklendi ve alt üst edildi. Örnekler 3-4 dakika 15-30°C'de inkübasyona bırakıldı. 4°C'de 11.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenen örneklerde oluşan faz ayrımı sayesinde süpernatant yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ardından süpernatanta 1:1 hacimde izopropanol eklendi. Örneklerin 15-30°C'de10 dakika inkübasyonundan sonra 4°C'de 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüjü gerçekleştirildi. Santrifüjlemenin

ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, 1 ml TRIzol için 1 ml %75 EtOH ile yıkandı. Örnekler 4°C'de 11.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve EtOH dökülerek uzaklaştırıldı. Pellet 15-30°'de 20-30 dakika kurumaya bırakıldı. Pelletin kurumasıyla birlikte tüplere 25-50 µl nükleaz içermeyen su ilave edildi.

RNA konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. OD260/280 absorbans oranı RNA'ların saflığını belirlemek için kullanıldı ve 1.8-2.0 aralığındaki değerlere sahip örnekler sonraki deneysel adımlar için kabul edilebilir bulundu.

3.2.9.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher) üreticinin talimatına uygun şekilde kullanıldı. Bileşenler 0.2 µl'lik mikrofüj tüpüne ilave edildi ve uygun sıcaklık ve süre için termal döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 3.11: cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri ve gerekli miktarları.

Bileşen	**Hacim/Reaksiyon (µL)**
RT Buffer	2,0
25XdNTP Mix (100 mM)	0,8
10 RT Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Nuclease-free H_2O	4.2
Reaksiyon Başına Toplam	10,0

Tablo 3.12: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit için PCR koşulları.

	Adım 1	**Adım 2**	**Adım 3**	**Adım 4**
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman (dk)	10	120	5	∞

3.2.9.3. qRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri

Hedef mRNA ekspresyon seviyelerini değerlendirmek adına kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde AMPIGENE® qPCR Green Mix (ENZO) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kantitatif RT-PCR, StepOnePlus Real-Time PCR (ABI) ile gerçekleştirildi sinyaller izlendi. Aksi belirtilmediği sürece normalizasyon için β-tubulin (β-Tubilin_F ve β-Tubilin_R) kullanıldı ve analizler üç biyolojik ve iki teknik tekrarlı tapıldı.

Kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.13: Kantitatif RT-PCR için gerekli bileşenler ve miktarları.

Bileşen	**20 rxn için gerekli hacim (µl)**
AMPIGENE® qPCR Green Mix Lo-ROX	10
Primer (10µM) Forward-Reverse Mix	1,6
DNA (<100 ng cDNA, <1µg genomic)	1
ddH2O	7.4

Tablo 3.14: Kantitatif RT-PCR için döngü şartları.

Döngü	**Sıcaklık (°C)**	**Zaman**
1	95	2 dk
40	95	5 sn
	62,5	25 sn

3.2.10. İstatistiksel Analizler

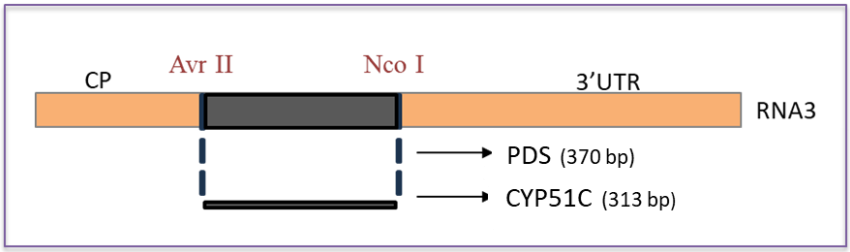
VIGS için deney ve mock gruplarının istatistiksel farklılıkları, üç biyolojik ve üç teknik kopyanın ortalaması alınarak analiz edildi ve grafikteki hata çubukları standart hata olarak etiketlendi. Gruplar arasındaki farkın anlamlılığı, Excel 365'te "Student's t-test" kullanılarak belirlendi. $P<0.05$ için gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar "*" işareti ile ifade edildi.

4. BULGULAR

Bu tezin ana amacı model bitki *N. benthamiana* üzerinden konak kaynaklı gen susturma ile *F. verticillios*'te *CYP51C* geninin ifade seviyesinin araştırılmasıdır. Bu çerçevede *N. benthamiana*'da VIGS aracılı susturma yalnızca sürecin optimizasyonu için gerçekleştirilmiş, susturma fenotipleri kolayca puanlanabileceği için indikatör gen olarak *PDS* geni tercih edilmiştir. Bununla birlikte aynı vektörün kullanımı ile *F. verticillioides*'in *A. tumefaciens* ile doğrudan olası transformasyonu, susturmayla birlikte *CYP51* için paralog genlerin (*CYP51B* ve *CYP51C*) ekspresyon seviyelerinin ve susturmanın etkinliğinin değerlendirilmesi için gerçekleştirildi. Çalışmamızda, hedeflenen spesifik genler için RNAi sinyallerinin tetiklenmesi amacıyla BMV vektörü kullanıldı. Aşağıda daha ayrıntılı şekilde ifade edilen klonlama stratejisi *PDS* ve *CYP51C* genleri için aynıdır, bu sebeple değerlendirmeler tek başlık altında verilmiştir.

4.1. CYP51C ve PDS İçin Klonlama ve Analiz

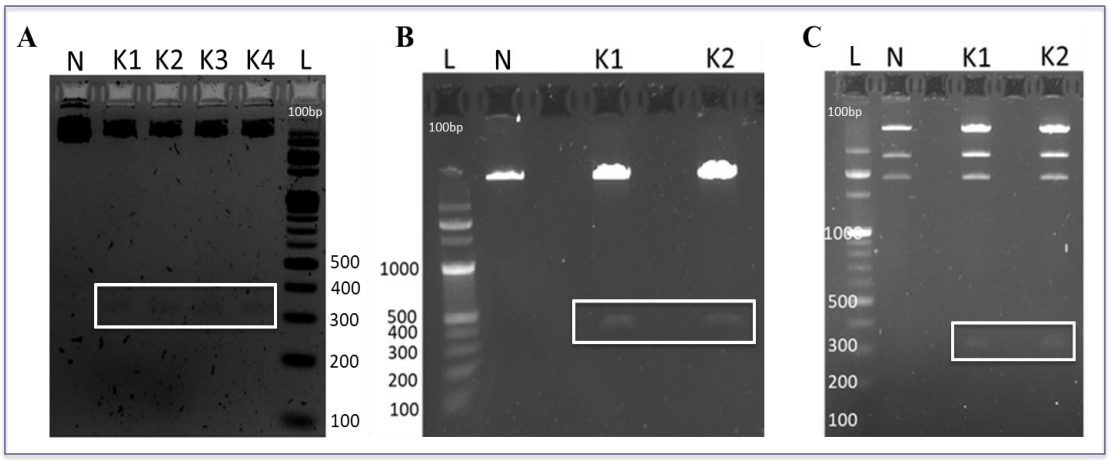
pC13/F3CP5 vektörü için klonlama stratejisi Şekil 4.1'de şematize edilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi enzim kesim bölgelerine sahip primerler ile cDNA'dan amplifiye edilen fragmanların AvrII ve NcoI kesim bölgesine sahip vektöre ligasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4.1: PDS ve CYP51C gen fragmanları için donör plazmit pC13/F3CP5'in klonlama stratejisinin şematik gösterimi.

Restriksiyon enzim kesim yöntemi, *N. benthamiana PDS* (NbPDS) ve *F. verticillioides CYP51C* (fvCYP51C) için klonlama adımları sırasında doğru şekilde ligasyonu gerçekleşen aday kolonileri doğrulamak için kullanıldı. Şekil 4.2 (A),

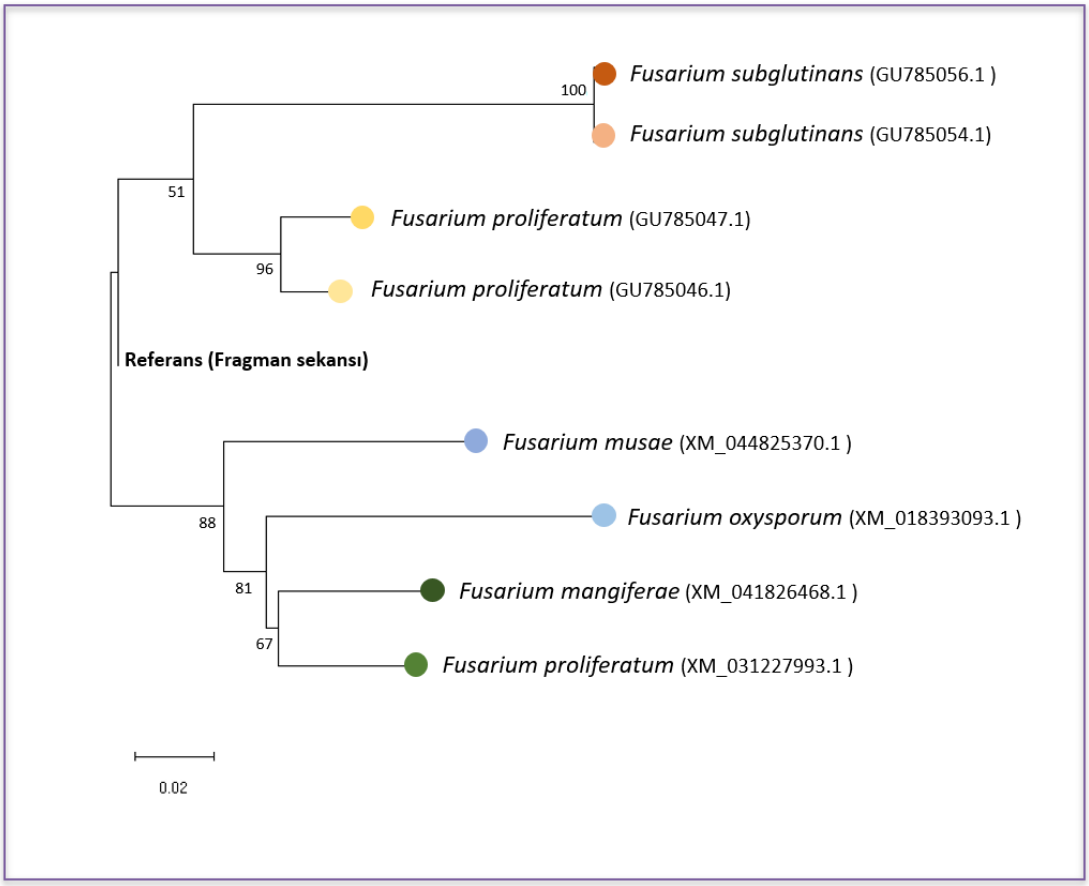
pC13-F3CP5:CYP51C plazmid klonlarının RE analizini göstermektedir. RE kesimiyle birlikte pozitif klonlarda beklenen 313bp'lik RE ürünleri, %2'lik agaroz jel üzerinde beklenen boyutta K1, K2, K3 ve K4 bantlarını verdi (beyaz dikdörtgenler). Şekil 4.2 (B-C), pC13-F3CP5:PDS plazmid klonlarının RE analizlerini göstermektedir. RE kesimiyle birlikte pozitif klonlarda beklenen 370 (A) ve 280 bp'lik (B) RE ürünleri, %2'lik agaroz jel üzerinde beklenen boyutta K1 ve K2 bantlarını verdi (beyaz dikdörtgenler).



Şekil 4.2: Aday klonların kesim enzimleri ile analizi. (A) Nco I ve Avr II kesimi ile pC13-F3CP5:CYP51C adaylarının RE analizi. Kuyucuk 1(N); pC13/F3CP5 vektör. Kuyucuk 2-5; pC13/F3CP5:CYP51C klonları. Kuyucuk 6; 100 bp ladder. (B) Nco I ve Avr II kesimi ile pC13-F3CP5:PDS adaylarının RE analizi. Kuyucuk 1(L); 100 bp ladder. Kuyucuk 2 (N); pC13/F3CP5 vektör. Kuyucuk 4 ve 6; pC13-F3CP5:PDS klonları. (C) Avr II ve Hind III kesimi ile pC13-F3CP5:PDS adaylarının RE analizi. Kuyucuk 1 (L); 100 bp ladder. Kuyucuk 2 (N); pc13/F3CP5 vektör. Kuyucuk 4 ve 6; pC13/F3CP5:PDS klonları.

RE enzim kesimi ile doğrulanan aday klonların *PDS* ve *CYP51C* gen fragmanları için (pC13-F3CP5:PDS ve pC13-F3CP5:CYP51C vektörleri) dizi bilgisi Sanger yöntemi ile elde edildi. Ardından izolatların sekans sonucunun BLASTn taraması (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn) yapıldı. Dizileme sonuçları CYP51C fragmanı için *Fusarium proliferatum*'daki sitokrom P450 lanosterol C-14α-demetilaz (GU785046.1) gen fragmanı ile 99% benzerlik gösterirken, *F. proliferatum* (GU785047.1), *F. mangiferae* (XM_041826468.1), *F. musae* (XM_044825370.1), *F. oxysporum* (XM_018393093.1), *F. subglutinans* (GU785054.1) ile sırasıyla %95, %91, %91, %88, %88 benzerlik gösterdi.

MAEM'den (Ankara) temin ettiğimiz *F. verticillioides*, klonlama için kullandığımız *F. verticillioides* XM_018901738.1 veri dizisiyle %91 oranında benzerlik gösterdi (Şekil 4.3). *N. bentamiana PDS* gen fragmanı sekans sonucu *N. benthamiana* (LC543532.1) ile %100 benzerlik gösterdi. Filogenetik ağaç, nükleotit dizilerinin karşılaştırılmasına dayalı olarak Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 (MEGA 11) ile Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılarak oluşturuldu.



Şekil 4.3: NJ yöntemi kullanılarak pC13/F3CP5:CYP51C izolatı ile oluşturulan filogenetik ağaç. Evrimsel akrabalık Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak çıkarılmıştır. Önyükleme testinde (500 kopya) ilişkili taksonların bir arada kümelendiği kopya ağaçların yüzdesi, dalların yanında gösterilir (Kumar et. Al. 2018). Ağaç, filogenetik ağacı anlamak için kullanılan evrimsel mesafelerle aynı birimlerde dal uzunlukları ile ölçeğe göre çizilmiştir. Evrimsel mesafeler, MCL (Maximum Composite Likelihood) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

RE ve dizileme analizleri sonucu *CYP51C* ve *PDS* gen fragmannın başarılı şekilde klonlandığını gösterdi.

Doğrulamalar sonrasında *N. benthamiana'da* VIGS ile *NbPDS*'in, *F. verticillioides*'te VIGS aracılı konak kaynaklı gen susturma ile *FvCYP51C*'nin

inhibisyonunun değerlendirilmesi için vektörler Agrobacterium aracılı transformasyon için kullanıldı.

4.2. BMV-Tabanlı VIGS Sonuçları

4.2.1. VIGS ile Geçici Ekspresyonun *N. benthamiana* Yapraklarında Değerlendirilmesi

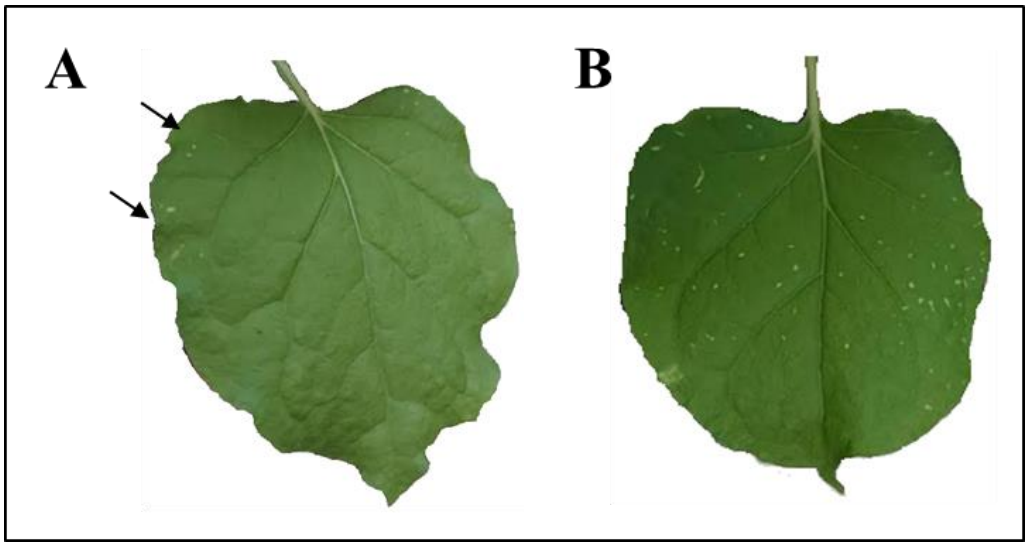
$BMV_1/BMV_{3:PDS}$ VIGS sisteminin aracılık ettiği *PDS* gen susturma etkinliği (yaprak başına görünür susturma miktarı) ve verimliliği (susturmayı gösteren yaprakların sayısı ve konumu) başlangıçta fenotipteki belirtiler ile değerlendirildi. Bu özellikler, hedef NbPDS için bitki gelişimi sırasında sistemik yapraklarda analiz edildi. 1x konsantrasyonlu Agrobacterium süspansiyonu yaprak tarafından kolaylıkla alınsa da sistemik yapraklarda görünür herhangi bir belirti meydana gelmedi. Aynı zamanda agroinfiltre edilen yaprakta susturma fenotipi gözlemlenmedi. Konsantrasyon 2x ve 4x için sistemik yapraklarda erken dönem belirtileri aynı yaprak konumunda ve sırasıyla 11 dpi'de ve 9 dpi'de gözlemlenmiştir. Bunun yanında konsantrasyon 4x için foto-ağartma belirtilerinin sayısı çok daha fazlaydı ve ağartma fenotipi daha yoğun (daha beyaz) gözlendi. 4x konsantrasyonlu Agrobacterium süspansiyonu yaprak dokusuna, kıyasla infiltre edilemedi veya infiltre edilebilen yapraklarda kuruma gerçekleşti ve sistemik belirtiler gözlenmedi. (Konsantrasyon değerleri için 3.2.2.3'e bknz).

Fenotipik gözlem sonucunda 1x, 2x ve 4x konsantrasyonda uygulama yapılan gruplar arasından 4x konsantrasyonlu süspansiyonun belirtilen parametreler dahilinde daha etkin olduğuna karar verildi ve tütünde *PDS* gen inhibisyonunun transkript seviyesinde değerlendirmesi için kullanıldı. 4x konsantrasyonlu Agrobacterium süspansiyounun agroinfiltrasyonundan 4 gün sonra infiltre yaprakların belirgin semptomları gözlemlendi. Fakat fenotipik gözlemde negatif kontrol olarak hiçbir müdahalede bulunulmayan *N. benthamiana* yapraklarının değerlendirilmesi agroinfiltrasyonun gerçekleştirildiği yaprakta negatif kontrole kıyasla, *PDS* geninin susturulmasıyla ortaya çıkan fenotipik farkı net yansıtmayacaktır.

4.2.2. VIGS Vektörü BMV ile Tütünde PDS Transkriptinin İfade Seviyesinin Değerlendirilmesi

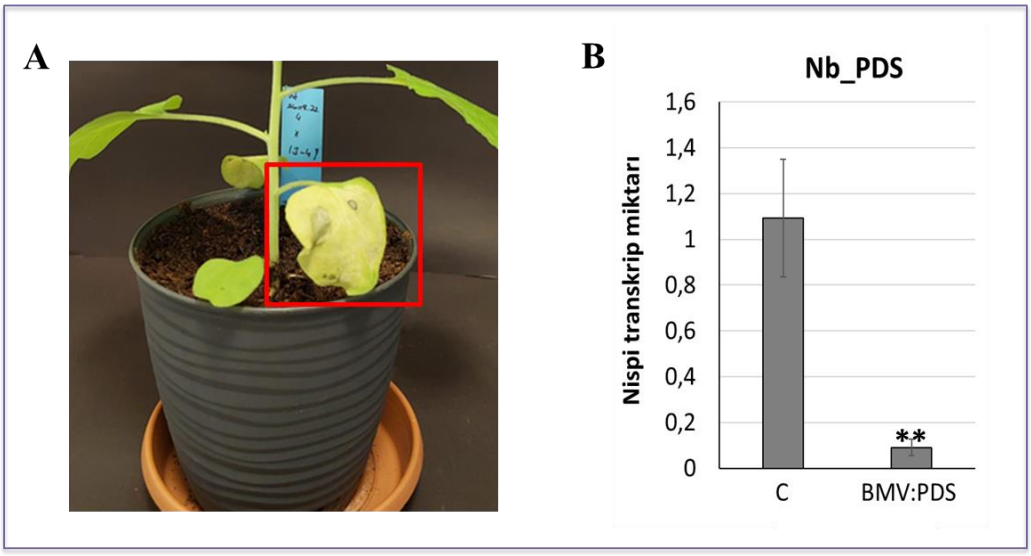
$BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ bakterilerinin *N.benthamiana*'da karşılık gelen endojen *PDS* geninin susturma etkisini test etmek için vektörler *A. tumefaciens* EHA105'e tranforme edildi. Elde edilen $BMV_1/BMV_{3:PDS}$ bakteri süspansiyonu agroinfiltrasyon yöntemi kullanılarak yaprak içine aşılandı. Agroinfiltrasyondan 4 gün sonra infiltre yapraklarda belirgin semptomları gözlendi (Şekil 4.4.). $BMV_1/BMV_{3:PDS}$ bakterilerinin aşılandığı fidelerde infiltrasyonun gerçekleştirildiği yapraktan sonraki 3. 4. ve 5. yapraklarda infiltrasyondan yaklaşık 11 gün sonra foto-ağartma fenotipleri gözlemlendi (Şekil 4.5.). Bitki çiçek aşamasında kadar takip edilmiş yeni geliştirilen yapraklarda foto-ağartma fenotipleri gözlenmemiştir. Ek olarak $BMV_1/BMV_{3:PDS}$ vektörleri ile elde edilen susturma fenotiplerinin erken susturma aşamasında ilk olarak yaprak kenarlarında meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.5A).

Şekil 4.4: *N. benthamiana*'da agroinfiltrasyondan 4 gün sonra infiltre yaprakların görüntüsü.



Şekil 4.5: *N. benthamiana*'da BMV tabanlı VIGS sonrası analizler. A) Agroinfiltrasyondan 11 gün sonra sistemik susturmanın 3. yaprakta foto-ağartma fenotipi. B) Agroinfiltrasyondan 15 gün sonra sistemik susturmanın 3. yaprakta foto-ağartma fenotipi.

Foto-ağartma fenotiplerinin endojen *PDS* geninin susturulmasıyla ilişkili olup olmadığını değerlendirmek için agroinfiltrasyona tabi tutulan yapraklar *PDS* ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi için infiltrasyondan 9 gün sonra toplandı (Şekil 4.6A) sıvı nitrojen içinde fikse edildi ve kullanıma kadar -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil 4.6: *N. benthamiana*'da BMV tabanlı VIGS sonrası ekspresyon analizi. (A). $BMV_1/BMV_{3:PDS}$ ile infiltre yaprakların 9 gün sonra sergilediği susturma fenotipi. (B). VIGS işleminden 9 gün sonra, infitre yapraklarda NbPDS gen ifade seviyeleri. Kontrol grubu (C) için örnekler uygulma yapılmayan gerçek yaprak aşamasındaki yapraklardan oluşturuldu. Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir. (** = P<0,01 Student ttestine göre hesaplanmıştır.)

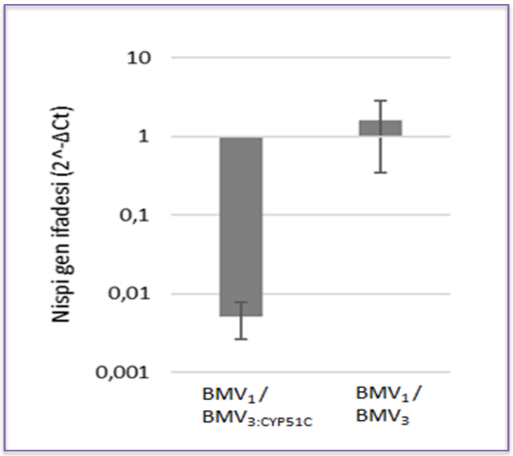
qRT-PCR sonuçlarıyla, susturulmuş fide yapraklarında *PDS* ifade seviyelerinin, kontrol fidelerin yapraklarına kıyasla istatiksel olarak önemli ölçüde yaklaşık %80 oranında azaldığı tespit edildi ($P<0.01$) (Şekil 4.5B). qRT-PCR sonuçlarına göre foto-ağartma fenotiplerinin *PDS* gen susturma tarafından indüklendiği gösterilmiştir.

4.3. Tütünde BMV-Tabanlı HIGS Sonuçları

4.3.1. VIGS Vektörü BMV ile Tütünde FvCYP51C Transkriptinin İfade Seviyesinin Değerlendirilmesi

RNAi hedef bölgesi, tütün genlerinin spesifik olmayan susturulmasını önlemek için veri tabanındaki tütün sekanslarına yapılan homoloji araştırmaları ile *F. verticillioides*'e spesifik olacak şekilde seçildi.

pC13/F1+2 ve pC13/F3CP5:CYP51C vektörlerinin *F. verticilllioides'*e karşılık gelen endojen *CYP51C* geninin susturma etkisini test etmek için vektörler *A. tumefaciens* EHA105'e tranforme edildi. Elde edilen $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ bakteri süspansiyonu 4 saat agroinfiltrasyon yöntemi kullanılarak yaprağa infiltre edildi. Agroinfiltrasyondan yaklaşık 5 gün sonra 10^4 konidi/ml konsantrasyonlu *F. verticillioides* kültürü $BMV_1/BMV_{3:PDS}$'in infiltre edildiği yapraklara infiltrasyon yöntemi ile verildi. Fungus aşılamasından 72 saat sonra alınan yaprak örnekleri CYP51C ekspresyon seviyelerinin analizi için toplandı.



Şekil 4.7: *N. benthamiana* yapraklarından alınan örneklerde *F. verticillioides* CYP51C geninin qRT-PCR sonuçları. Hata çubukları standart hatayı temsil etmektedir.

Konak kaynaklı gen susturma etkinliğinin değerlendirilmesi için *F. verticillioides CYP51C* ekspresyon seviyeleri, mock (BMV_1/BMV_3) ve deney grubu ($BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$) sonuçları karşılaştırılarak değerlendirildi. Sonuçlar, CYP51C gen ifadesinin BMV-VIGS yoluyla yaklaşık 300 kat binhibisyonunu gösterdi (Şekil 4.7).

Bununla birlikte ilk deney gruplarında, fungus infiltrasyonu, $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ infiltrasyonundan sonra iki zaman noktasında (1 ve 5. Gün) gerçekleştirildi. Agrinfiltrasyondan 1 gün sonra fungus infiltrasyonu gerçekleştirilen grubun 72 saat sonra ve her iki grubun fungus infiltrasyonundan 24 saat sonra CYP51C transkripsiyon seviyeleri qRT-PCR ile değerlendirildi ve örneklerin hiçbirinde *CYP51C* inhibisyonu görülmedi.

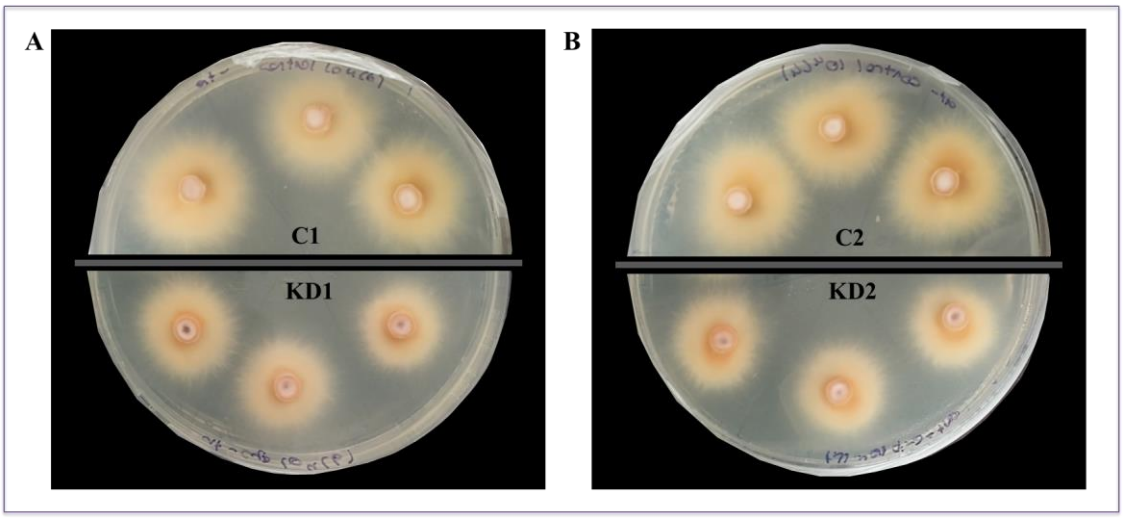
4.4. Fungusta VIGS Tabanlı CYP51C İnhibisyonu

4.4.1. *F. verticillioides'in A. tumefaciens* Aracılı Transformasyonu için Analiz Sonuçları

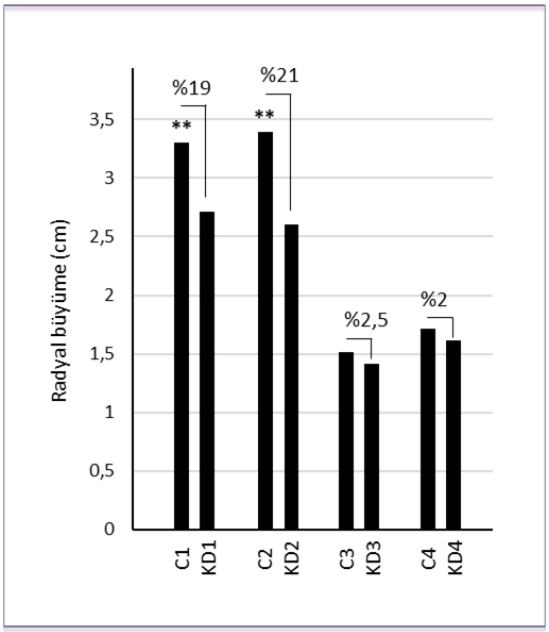
BMV'nin *F. verticillioides'e* olası transformasyonu ve akabinde muhtemel CYP51C'nin inhibisyonuna bağlı olarak farklılık gösterebilecek fungus çap boyutu, fungus konsantrasyonu (10^4 konidi/ml) sabit tutularak $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ konsantrasyonundaki farklılıklar üzerinden değerlendirildi.

$BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ bakterilerinin *F. verticillioides*'te karşılık gelen endojen *CYP51C* geninin susturma etkisini test etmek için vektörler *A. tumefaciens* EHA105'e tranforme edildi. Öncesinde ifade edildiği gibi, total hacmi 2 ml olacak şekilde birleştirilen 10^4 *F. verticillioides* ve farklı konsantrasyonlardaki $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ süspansiyonları indüksiyon tamponunda birleştirildi. Miselyum büyümesindeki farklılıkların değerlendirilmesi için mock ($BMV_{1:}BMV_3$) ile deney grubu örnekleri PDA büyüme ortamına alındı (Şekil 4.8).

Büyüme inhibisyonu radyal ölçüm ile belirlendi. Sonuçlar, mock grubuna kıyasla $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ ile muamaele edilen deney grubunun çap boyutunda %21 oranında küçülme olduğunu gösterdi (Şekil 4.9).



Şekil 4.8: Birlikte kültür ortamının ardından *F. verticillioides*'in PDA ortamında radyal büyümesi. Birlikte büyümenin 32. saatinde alınan 10 µl örnekler ön analiz için PDA'da oluşturulan kuyucuklara bırakıldı. (A). Ayrılmış bölüm C1, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 1,5x BMV_1/BMV_3; KD1 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 1,5x $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ (B). Ayrılmış bölüm C2, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides* – 1x BMV_1/BMV_3; KD2, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides* – 1x $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ birlikte büyüme örnekleri.

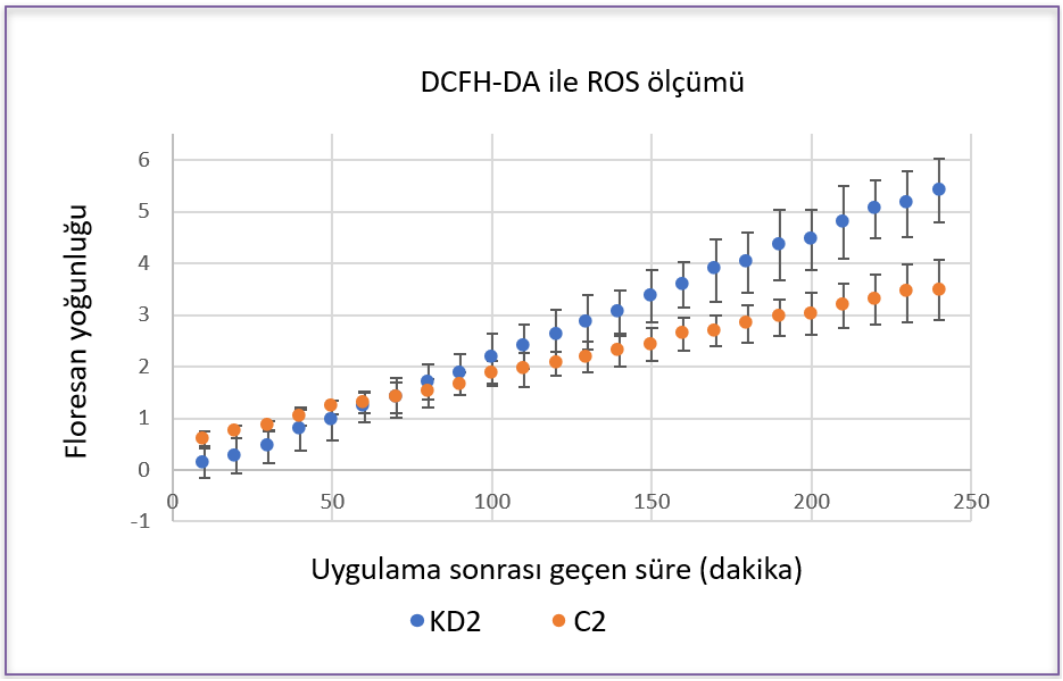


Şekil 4.9: Yüzde radyal küçülme. C1, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 1,5x BMV_1/BMV_3; KD1 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 1,5x $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$; C2, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides* – 1x BMV_1/BMV_3; KD2, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides* – 1x $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$; C3, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 2,5x BMV_1/BMV_3; KD3 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 2,5x $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$; C4 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 3x BMV_1/BMV_3; KD4, 10^4 konidi/ml *F. verticillioides*- 3x $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$

Radyal büyüme temel alınarak hesapladığımız % küçülmenin oranla yüksek olduğu dolayısıyla *CYP51C*'nin inhibisyonun kısmen fazla olduğunu öngördüğümüz deney grubu için (C2-KD2), *F. verticillioides* konidileri tarafından üretilen endojen reaktif oksijen türlerinin (ROS) karşılaştırmalı analizi gerçekleştirildi.

CYP51C inhibisyonunun ROS üretim miktarı üzerindeki etkisini araştırdığımız deneyde, $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ ile muamele edilmiş *F. verticillioides* konidileri (KD2) ile BMV_1/BMV_3 ile transforme edilen mock grubu *F.verticillioides* konidileri (C2) kullanıldı. 2',7' dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA) kullanımı ile 4 saat boyunca 10 dakikada bir ölçümlerin alındığı deneyde gruplar için ROS üretimi, DCFH-DA ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin floresan yoğunluğu farkı ile belirlendi.

Ölçümlere göre; her iki grup (C2-KD2) için de ROS üretimi zamanla doğru orantılı olacak şekilde artmıştır. Bununla birlikte ölçümün 2. ve 4. saat aralığı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlendi ($P<0,05$). Sonuçlar, mock grubuna kıyasla deney grubunda hücre içi ROS miktarının yaklaşık 1,5 kat artışını gösterdi.



Şekil 4.10: *F. verticillioides* konidilerinin ROS üretim miktarı. Mavi daireler (KD2) BMV:CYP51C ile transformasyona tabi tutulmuş *F.verticillioides*; turuncu daireler (C2) BMV ile transforme edilen *F.verticillioides*. Her veri noktası, üç bağımsız örneğin ortalamasını temsil eder. ROS üretim düzeyi, DCFH-DA ile muamele edilen deney grubundan DCFH-DA ile muamele edilmeyen deney grubunun floresan yoğunluğunun farkı ile belirlendi.

qRT-PCR için tasarlanan CYP51A ve CYP51B primer çiftlerinin özgüllüğünün belirlenmesi için PCR ile büyütülmüş ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Primer çiftleri beklenen boyutta tek bantlar oluşturdu ve görünür bir primer-dimer oluşumu gözlemlenmemesinin yanında *Agrobacterium* ve *F. verticillioides* ile gerçekleştirilen birlikte büyümenin ardından alınan örneklerde CYP51A ve CYP51B primerlerinin erime eğrisi (mellting curve) tek bir tepe noktası vermemiş primerler paralog genlerin ekspresyon seviyelerinin analizi için uygun bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

RNAi teknolojisi, sürdürülebilir mahsul üretim sistemlerinde önemli bir araç haline gelmektedir. Mahsul koruma, iyileştirme ve biyotik streslerin neden olduğu ekonomik kayıplara karşı direnç dahil olmak üzere çok sayıda faydaya sahiptir. Genel olarak, gıda güvenliğini sağlarken çevrenin korunmasına öncelik veren sürdürülebilir tarım uygulamalarının geliştirilmesi için RNAi teknolojisinin kullanımı önemlidir. Yüksek özgüllüğü, etkinliği, basitliği, iletilebilirliği nedeniyle bitki genetik mühendisliğinde önemli bir yere sahiptir. Geleneksel yöntemlere nazaran patojenle mücadelede hızlı, etkili ve hedefe özel dsRNA stratejisi spesifik bir yöntem sunar.

Virüs kaynaklı gen susturma (VIGS), bitki ters genetiği için bir araç olarak bitkilerde antiviral savunma mekanizmasından yararlanır. VIGS kullanılarak PDS'in susturulması, domates, biber ve patlıcan yaprakları dahil olmak üzere çeşitli bitkiler için rapor edilmiştir. Çalışmamızda *PDS* inaktivasyonunun neden olduğu foto-ağartma belirtileri nedeniyle indikatör gen olarak kullanılmıştır. Beklenildiği gibi, *N. benthamiana*'da endojen *PDS* genini susturmak için *PDS* gen fragmanının kullanılması, literatürde bildirilen fenotiplere benzer sonuçlar vermiştir. Bitkilerde, susturma sinyali başlangıçta bitişik hücrelere hareket eder. Bazı durumlarda, sinyal organizma boyunca yayılır, böylece hedef gen çoğu hücre tipinde susturulur. Bitkilerde, sistemik hareket, floem ve ksilemden oluşan vasküler sistemi içerir, sinyal hedef dokuya ulaştığında, bitişik hücreler arasında tekrar hareket ederek yayılabilir. Vektörün etkinliğine ve sistemik olarak hareket etme kabiliyetine bağlı olarak, transfekte edilmiş bitkilerin dokularının çoğunun enfekte olması için iki ile üç hafta gerekir. Fenotipik gözlemimiz, BMV tabanlı geçici ekspresyonun sistemik olarak yayıldığı fikrini desteklemiştir. Bununla birlikte sistemik bir anti-fungal yanıtın tetiklenip tetiklenmeyeceğini belirlemek için bitkinin üst yapraklarında *CYP51C* ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesiyle anti-fungal direnç için zamansal ve bölgesel bağımlılık değerlendirilebilir.

Hedef endojen genin eklenen fragmanının boyutu genellikle VIGS'nin etkinliğini etkiler. Yapılan çalışmalar genel VIGS vektörleri için, 150 ile 800 bp arasında bir fragman boyutunu taşıma kapasitesine sahip olduğunu gösterdi. Insert fragmanı 1500 bp'den büyükse, VIGS vektörleri gen susturmayı indüklemede

başarısız olabilir. Bunun yanında bazı çalışmalar, 23 bp'lik bir eklemenin VIGS'i indükleyebileceğini gösterse de 200 ile 400 bp uzunluğundaki fragmanlar çoğunlukla daha yüksek susturma etkinliği sağlamak için tercih edilir. Bu boyutlardaki fragmanlar hedef dışı genlerin susturulma olasılığını azaltır. Bunun yanında daha küçük fragmanlar susturma etkinliğini azaltırken büyük fragmanlar bazı viral vektörlerde kararsız olabilir. Bununla birlikte Wang ve diğerlerinin (2021), çalışmamızda kullandığımız BMVCP5 ile gerçekleştirdiği *PDS* susturması çalışmasında gerçekleştirdiği zamana bağlı deneyler daha küçük fragmanların (~100bp) BMVCP5'te daha kararlı olduğunu, daha büyük eklere kıyasla daha yüksek susturma etkinliği ve daha uzun susturma süresi sağladığını ortaya koydu. VIGS sırasında yabancı eklerin silinmesinin altında yatan moleküler mekanizma çoğunlukla incelenmemiş olsa da replikaz şablon değiştirmenin BMV rekombinasyonu için kabul edilen bir model olduğu ön görülmektedir. [Bujarski, 2013; Rao and Kao, 2015; Fantini and Giuliano 2016; Bekele et al., 2019]. Sonuç olarak, BMV vektörümüzde RNA3 3' insert bölgesine yerleştirilen yabancı bir sekans, potansiyel olarak bu aktivite yoluyla uzaklaştırılabilir ve bu da susturma kaybına yol açar. Çalışmamızda susturma için kullandığımız *PDS* ve *CY51C* gen fragmanlarının boyutu genel kabule uygundur bunun yanında sürecin daha etkin kılınabilmesi için süreç optimize edilebilir. Bunun yanında analizimiz BMV- tabanlı gen susturma yöntemi temel alınarak *N. benthamiana* genomuna karşılık gelen geçici olarak eksprese edilen eksojen RNA'nın, bitki dokusunda güçlü ve spresifik bir RNA bozulması indükleyicisi olduğu fikrini desteklemektedir.

HIGS ile bitki fungal hastalıklarının kontrolünün başarısı, kritik olarak, fungusun hayatta kalması için vazgeçilmez olan hedef genlerin seçilmesine dayanır. RNAi etkinliğinin böceklerde çeşitli türlerin aynı transkriptleri arasında, aynı türün dokuları arasında ve ayrıca aynı transkriptin farklı bölgeleri arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiği genel olarak bilinmektedir [Silver et al, 2021]. Bitki patojenik funguslarda bu tür ayrıntılı incelemeler çok geniş olmasa da RNAi'nin fitopatojenik funguslara karşı çalışıp çalışmadığını belirlemek için son yıllarda çeşitli gen adayları test edilmiştir. Sonuç olarak fungus büyümesinin azalmasına yol açan hedef genler sınırlıdır ve çoğunluğunu hücre duvarı değiştiricileri ve kitinazlar oluşturur. Bunun nedeni gen susturma etkinliklerinin her zaman patojen büyümesini engelleme derecesi ile ilişkili olmamasıdır. Örneğin Höfle ve ekibinin (2020) yaptığı çalışma, üç *F. graminis* ergosterol biyosentez geninin, (*CYP51A*, *CYP51B* ve *CYP51C*) HIGS

tabanlı hedeflemesi, FgCYP51B ve FgCYP51C'ye (%58) kıyasla CYP51A'nın daha yüksek susturulmasına (~%85), fakat benzer seviyelerde fungus büyümesi inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Koch ve diğerlerinin (2018) yaptığı çalışmada benzer gözlemler *F. culmorum*'un in vitro kültürlerinde kaydedilmiştir. Bu çalışmada FcCYP51A ekspresyonunun %90 oranında susturulması patojen büyümesinin inhibisyonuna veya morfolojik değişikliklere yol açmazken, %40 oranında FcCYP51B'nin susturulması fungus büyümesinde %30'luk bir azalma ve anormal hifal morfolojisi ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle, başarılı bir RNAi sonucu hedef gen seçiminin önemini vurgulayarak susturma etkinliğinden ziyade hedef genin temel doğası tarafından belirlendiği sonucuna varmışlardır. Bu sebeple çalışmamızda elde ettiğimiz susturma oranının *CYP51C* geni için HIGS'in *F. verticillioides*'i kontrol etmede etkili bir strateji olup olmayacağı değerlendirilmelidir.

Koch ve ekibinin (2019) yaptığı çalışma, *F. graminearum*'un *CYP51* genlerini hedeflemek üzere tasarlanmış arpa ve Arabidopsis'teki çift dsRNA yapısının (*CYP-AC, CYP-BC, CYP-AB*) ekspresyonunun, fungus büyümesini tekli dsRNA yapılarından (CYPA, CYPB, CYPC) daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve fungal enfeksiyonu azalttığı bildirildi. Bu ve benzer çalışmalar çoklu transkriptlerin eş zamanlı olarak hedeflenmesinin artan RNAi etkinliğine yol açtığını ve aynı genin farklı bölgelerinden üretilen dsRNA'ların, çeşitli RNAi etkinliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bunun yanında *F. verticillioides'*te *CYP51*'in gen kopyalarının varlığı muhtemeldir, bu nedenle ileri çalışmalarda üç paralog genin tümünü hedefleyen bir RNAi yapısı *F. verticillioides'*e karşı çok daha yüksek bağışıklık sergileyebilir. RNAi etkinliği, bir genin belirli bölgeleri içinde değişebilir. Örneğin Guo ve ekibinin (2019) yaptığı çalışmada, kültür ortamına transkripsiyon faktörü geni MoAP1'in farklı bölgelerini hedefleyen yapay siRNA'ların eklenmesi, *M. Oryzae* büyümesini ve patojenitesini farklı seviyelere indirmiştir. Aynı şekilde Gu ve ekibinin (2019) gerçekleştirdiği çalışma, *F. asiaticum* β2-tubulin geninin ~1,7 kb bölgesinin dört farklı ancak örtüşen segmentine karşılık gelen dsRNA'ların uygulanmasının, %20-%90 arasında çeşitli gen susturmayla sonuçlandığını gösterdi. *F. asiaticum* hedef β2-tubulin genindeki 917-1406 nükleotitlerine karşılık gelen dsRNA segmenti, %20-30 susturma ve lezyon boyutunda %30 azalmaya sahip diğer segmentlerle karşılaştırıldığında en yüksek düzeyde susturma (%90) ve lezyon boyutunda (%92) azalma gösterdi.

RNAi bazlı fungal hastalıkların kontrolünün başarısı, öncesinde ayrıntılı belirtildiği üzere bitki-fungus RNAi mekanizması, dsRNA/siRNA alım verimliliği, dsRNA/siRNA tasarım parametreleri, hedef gen seçimi ve uzunluğu, dsRNA stabilitesi ve yayılma stratejisi, hedef dışı etkiler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

HIGS için sonuçlarımız $BMV_1/BMV_{3:CYP51C}$ infiltrasyonu ve *F. verticillioides* infiltrasyonu arasındaki sürenin HIGS etkinliği için kritik olabileceği fikrini desteklerken virüs enfeksiyonundan sonraki 5 günün, gen susturma elde etmek için bu sistemde yeterli olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak ileri çalışmalar için *N. benthamiana*'nın fungal enfeksiyonu üzerine *F. verticillioides*'te ilgili genin transkriptlerindeki azalmanın, fungusun patojenitesini azaltmak için yeterli olup olmadığı dolayısıyla gerçekleştirilen susturmanın istenilen etkiyi verip vermeyeceği kesin değerlendirme için test edilmelidir. Bununla birlikte HIGS için yaptığımız optimizasyonların sonucu olarak, fungus ile inoküle fidelerde susturmanın BMV-VIGS infiltrasyonundan sonra çeşitli zaman aralıklarıyla değerlendirilmesinin, susturmanın zaman aralığı ve seviyesi hakkında daha geniş bilgiler sağlayacağı kesindir.

Fungus sporlarının bazı bitki virüslerine taşıyıcı olabileceği gösterilmiştir [Grogan et al., 1966]. Hem tütün mozaik virüsünün (TMV) hem de tütün nekroz virüsünün Pythium sp.'yi enfekte edebileceği bilinmesine rağmen, bitki virüslerinin funguslarda çoğaldığına dair doğrudan bir kanıt Mascia ve ekibi (2014) tarafından sağlandı. Çalışmada bir bitki virüsü olan TMV'nin üç fungus türünü (*Colletotrichum acutatum, C. clavatum, and C. theobromicola*) enfekte edebildiğini gösterdi. İleri çalışmasında fungustaki bir raportör geni susturmak için virüs kaynaklı gen susturma için bir TMV vektör yapısı kullandı. Yabancı geni (GFP) ifade etmek üzere tasarlanmış TMV-VIGS vektörü tarafından fungusun enfeksiyonu, ilgili genin fungus hiflerinde ve konidilerde ifade edildiğini ve *C. acutatum*'da raportör gene karşılık gelen transgeni susturabildiği gösterdi.

*F. verticillioides'*in *A. tumefaciens* aracılı transformasyonu Mascia ve ekibi (2013), temel alınarak oluşturuldu. Yapılan çalışmalar, çoğu türde RNAi'nin korunduğunu bildirse de bazı fungus grupları ve türleri için dicer, argonaute veya her iki genin kaybından dolayı aktif bir RNAi mekanizmasının olmadığını gösterilmiştir [Nicolas ve Garre, 2016]. *F. verticillioides'te A. tumefaciens* aracılı BMV-tabanlı gen susturma çalışmamız, Fusarium türlerinde yapılan RNAi çalışmaları doğrultusunda

F. verticillioides'in tam bir RNAi mekanizmasına sahip olduğu doğrultusunda gerçekleştirildi.

Bu tez çalışmasında, $BMV_1/BMV_{3:CYP51}$ ile muamele edilen *F. verticillioides*'te kontrole kıyasla radyal büyümede azalış saptanmıştır. Benzer çalışmalar her bir fungal türün optimal bir birlikte yetiştirme sürecine sahip olduğunu göstermiştir. *A. tumefaciens* ve fungus arasındaki oran, fungusun *A. tumefaciens*'e duyarlılığı, birlikte yetiştirme süresi, sıcaklığı ve pH'ı transformasyon sürecini etkileyecektir. Dolayısıyla varsayılan *F. verticillioides* için *A. tumefaciens* transformasyon verimliliğinin maksimize edilmesi için optimizasyon şarttır. Bununla birlikte büyüme hızının azaldığı gözlemlenen grupta *CYP51C*'nin yine varsayılan inhibisyonuyla ergosterol biyosentetik geninin aşağı regülasyonu ve dolayısıyla ergosterol içeriğindeki azalma beklenildiği gibi ROS miktarının artmasıyla sonuçlandı. Bunun yanında kesin sonuçlar için hücre zarı bütünlük testi, ergosterol içerik analizi, ergosterol biyosentez yolunda yer alan genlerin göreli ekspresyon analizi ve/veya direkt olarak inhibisyonu hedeflenen CYP51C için ekspresyon seviye analizi daha fazla örnekle gerçekleştirilerek sonuçlar moleküler yöntemler ile desteklenmelidir. Fungusta bitki virüsleriyle yapılan çalışmalar çok sınırlıdır. Bu sebeple BMV-VIGS sisteminin *F. verticillioides* endojenlerini susturmak için kullanılıp kullanılamayacağını bilmemekle beraber fungusta BMV'nin etkinliği çalışılması gereken geniş bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmıştır.

KAYNAKLAR

Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K., (2003), "RNA interference: biology, mechanism, and applications", Microbiology and molecular biology reviews MMBR, 67(4), 657–685.

Anderson R., Romero P., Ravellette D., Wise, A., (2017), "Impact of foliar fungicides on Gibberella ear rot and deoxynivalenol levels in Indiana corn", Plant Health Progress, 18, 186-191.

Andrade C.M., Tinoco M.L.P., Rieth A.F., Maia F.C.O., Aragao F.J.L., (2016), "Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen Sclerotinia sclerotiorum", Plant Pathology 65(4):626-632.

Aydınoğlu F., Aktuğ G., (2017), "Bitki Biyoteknolojisi'nde MikroRNA Tabanlı İnterferans Uygulamaları", Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21 (2), 227-238.

Bacon W., Hinton M., (1996), "Symptomless Endophytic Colonization of Maize by Fusarium moniliforme", Canadian Journal of Botany, 74, 1195-1202.

Bandara A.Y., Weerasooriya D.K., Conley S.P., Bradley C.A., Allen T.W., Esker P.D., (2020), "Modeling the relationship between estimated fungicide use and disease-associated yield losses of soybean in the united states I: Foliar fungicides vs foliar diseases", *PloS One* 15, e0234390.

Becker A., Lange M. (2010), "VIGS—genomics goes functional. Trends in plant science", 15(1), 1–4.

Bekele D., Tesfaye K., Fikre A., (2019), "Applications of Virus Induced Gene Silencing (VIGS) in Plant Functional Genomics Studies", Journal of Plant Biochemistry & Physiology, 7 (1). Pp. 1-7. ISSN 2329-9029.

Bennett J.W, Klich M. (2003), "Mycotoxins", Clin Microbiol Rev. Jul;16(3):497-516. Doi: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003. PMID: 12857779; PMCID: PMC164220.

Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P.J., (1995), "Trans-kingdom T-DNA transfer from Agrobacterium tumefaciens to Saccharomyces cerevisiae", The European Molecular Biology Organization journal, 14(13), 3206–3214.

Cai Q., Qiao L., Wang M., He B., Lin F.M., Palmquist J., Huang S.D., Jin H. (2018), "Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes", Science (New York, N.Y.), 360(6393), 1126–1129.

Campo S., Gilbert K.B., Carrington J.C. (2016), "Small RNA-Based Antiviral Defense in the Phytopathogenic Fungus Colletotrichum higginsianum", PloS pathogens 12(6), e1005640.

Cao J.Y., Xu Y.P., Zhao L., Li S.S., Cai X.Z., (2016), “Tight regulation of the interaction between Brassica napus and Sclerotinia sclerotiorum at the microRNA level”, Plant molecular biology, 92(1-2), 39–55.

Carmona M., Sautua F., Pérez-Hérnandez O., Reis E. M. (2020), “Role of fungicide applications on the integrated management of wheat stripe rust”, *Front. Plant Sci.* 11, 733.

Cha S.D., Jeon Y.J., Ahn G.R., Han J.I., Han K.H., Kim S.H., (2007), “Characterization of Fusarium oxysporum Isolated from Paprika in Korea”, Mycobiology. 2007 Jun;35(2):91-6. Epub Jun 30. PMID: 24015078; PMCID: PMC3763136.

Chen W., Song X.S., Li H.P., Cao L.H., Sun K., Qiu X.L., Xu Y.B., Yang P., Huang T., Zhang J.B., Qu B., Liao Y.C., (2015), “Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to Fusarium head blight and seedling blight in wheat”, Plant biotechnology journal, 13(9), 1335–1345.

Clemente, T., (2006), “Nicotiana (Nicotiana tobaccum, Nicotiana benthamiana)”, Wang, K. (eds) Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 343. Humana Press.

Crous P.W., Lombard L., Sandoval-Denis M., Seifert K.A., Yilmaz N., (2021), “Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell”, Studies in Mycology, August 17;98:100116.

Ding X.S., Mannas S.W., Bishop B.A., Rao X., Lecoultre M., Kwon S., (2018), “An improved Brome mosaic virus silencing vector: greater insert stability and more extensive VIGS”, Plant Physiology, 176, 496–510. 10.1104/pp.17.00905.

Ding X.S., Schneider W.L., Chaluvadi S.R., Mian M.A., Nelson R.S., (2006), “Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts”, Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 19(11), 1229–1239.

Dong Y., Burch-Smith T.M., Liu Y., Mamillapalli P., Dinesh-Kumar S.P., (2007), “A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for NbMADS4-1 and -2 in floral development”, Plant physiology vol. 145,4 (2007): 1161-70.

Edel-Hermann V,, Gautheron N., Mounier A., Steinberg C., (2015), “Fusarium diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach”, Journal of Microbiol Methods 111:64–71.

Fang X., Qi Y., (2016), “RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View”, The Plant cell, 28(2), 272–285.

Fermin G., (2018), “Host Range, Host–Virus Interactions, and Virus Transmission”, Viruses 101–134.

Fisher M.C., Hawkins N.J., Sanglard D., Gurr S.J., (2018), Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security", *Science* 360:739–742.

Fletcher S.J., Reeves P.T., Hoang B.T., Mitter N., (2020), "A perspective on RNAi-based biopesticides", Frontiers in Plant Science, 11, 51.

Fones H.N., Bebber D.P., Chaloner T.M., (2020), "Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens", Nature Food 1, 332–342.

Forkink M., Smeitink J.A., Brock R., Willems P.H., Koopman W.J., (2010), "Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells", Biochimica et Biophysica Acta, 1797(6-7), 1034–1044.

Garcia-Ruiz H., Ahlquist P., (2006), "Inducible yeast system for Viral RNA recombination reveals requirement for an RNA replication signal on both parental RNAs", Journal of virology, 80(17), 8316–8328.

Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C., (2005), "Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 65(2–3), 45–80.

Goodin M.M., Zaitlin D., Naidu R.A., Lommel S.A., (2008), "Nicotiana benthamiana: its history and future as a model for plant-pathogen interactions", Molecular Plant Microbe Interaction, August 21(8):1015-26.

Goodin M.M., Dietzgen R.G., Schichnes D., Ruzin S., Jackson A.O., (2002), "pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves", The Plant journal : for cell and molecular biology, 31(3), 375–383.

Gopinath K., Dragnea B., Kao C., (2005), "Interaction between Brome mosaic virus proteins and RNAs: effects on RNA replication, protein expression, and RNA stability", Journal of virology, 79(22), 14222–14234.

Guo Q., Liu Q., Smith N.A., Liang G., Wang M.B., (2016), "RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops", Current genomics, 17(6), 476–489.

Guo S., Kemphues K.J., (1995), "Par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed", Cell, 81(4), 611–620.

Haschek W.M., Gumprecht A., Smith G., Tumbleson E., Constable D., (2001), "Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives", Environ Health Perspect, 109 Suppl 2.

Holb I.J., Lakatos P., Abonyi F., (2010), "Some aspects of disease management of cherry leaf spot (Blumeriella jaapii) with special reference to pesticide use", International Journal of Horticultural Science 16 (1): 45–49. Agroinform Publishing House, Budapest, Printed in Hungary ISSN 1585-0404.

Jennings P., (2007), “Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology by Anne E. Desjardins”, Plant Pathology, 56: 337-337.

Jin L., Chen M., Xiang M., Guo Z., (2022), “RNAi-Based Antiviral Innate Immunity in Plants”, Viruses, 14(2), 432.

Knapp S., Chase M.W., Clarkson J.J., (2004), “Nomenclatural changes and a new sectional classification in Nicotiana (Solanaceae)”, Taxon, 53, 73-82.

Koch A., Wassenegger M., (2021), “Host-induced gene silencing-mechanisms and applications”, The New phytologist, 231(1), 54–59.

Koch A., (2013), “Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14α-demethylase-encoding genes confers strong resistance to Fusarium species”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 110,48: 19324-9.

Kumagai M.H., Donson J., della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L.K., (1995), “Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(5), 1679–1683.

Leslie J.F., Summerell B.A., (2006), “A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance”, The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Hoboken, 1-2.

Liang D., White R.G., Waterhouse P.M., (2012), “Gene silencing in Arabidopsis spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement”, Plant physiology, 159(3), 984–1000.

Liu N., Xie K., Jia Q., Zhao J., Chen T., Li H., Wei X., Diao X., Hong Y., Liu Y., (2016), “Foxtail Mosaic Virus-Induced Gene Silencing in Monocot Plants”, Plant physiology, 171(3), 1801–1807.

Liu W., Liu Y., Fan H., Liu M., Han J., An Y., Dong Y., Sun B., (2022), “Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Dual-Target COX-2/CYP51 Inhibitors for the Treatment of Fungal Infectious Diseases”, *Journal of medicinal chemistry*, *65*(18), 12219–12239.

Lu L.M., An Y., (2012), “Effects of Different Disinfectant on Sterilization Effect and Germination of Tobacco Seeds”, Seed 31, 93–95.

Luo C., Guido S., (2008), “Adaptation to fungicides in Monilinia fructicola isolates with different fungicide resistance phenotypes”i Phytopathology vol. 98,2: 230-8.

Rodrigues M.L., (2018), “The Multifunctional Fungal Ergosterol.” mBio vol. 9,5 e01755-18. 18 Sep.

Marwal A., Gaur R.K., (2020), “Host Plant Strategies to Combat Against Viruses Effector Proteins”, Current genomics, 21(6),401–410.

McKinney H.H., (1929), “Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar.” Journal of Agricultural Research 39: 557.

Molina-Hidalgo F.J., Vazquez-Vilar M., D'Andrea L., Demurtas O.C., (2021), “Engineering Metabolism in Nicotiana Species: A Promising Future.” Trends in biotechnology vol. 39,9, 901-913.

Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y., (2019), “RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors” Cells, 8(1), 38.

Munkvold G., (2017), “Fusarium Species and Their Associated Mycotoxins”. In: A. Moretti, A. Susca, Editors, Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology-, Vol. 1542, Humana Press, New York, NY, 51-106.

Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., (1990), “Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans”, The Plant cell, 2(4), 279–289.

Palani P.V., Lalithakumari D., (1999), “Resistance of Venturia inaequalis to the sterol biosynthesis-inhibiting fungicide, penconazole [1- (2-(2,4-dichlorophenyl) pentyl) -1H-1,2,4-triazole]”, Mycology Research. 103, 1157–1164.

Purwati RD., Nurul H., (2008), “Inoculation Methods and Conidial Densities of Fusarium oxysporum f.sp. cubense in Abaca”, Journal of Biosciences, 15(1), 1–7.

Qin C., Li B., Fan Y., Zhang X., Yu Z., (2017), “Roles of Dicer-like proteins 2 and 4 in intra- and intercellular antiviral silencing” Plant Physiol. 174(2):1067–81.

Ratcliff F., Harrison B.D., Baulcombe D.C., (1997), “A similarity between viral defense and gene silencing in plants”, Science 276: 1558–1560.

Ray P., Sau D., Animedi R., Chandar D., (2022), “Concepts and considerations for enhancing RNAi efficiency in phytopathogenic fungi for RNAi-based crop protection using nanocarrier-mediated dsRNA delivery systems”, Frontiers in Fungal Biology, 3:977502.

Richter E., Roller E., Kunkel U., Ternes T.A., Coors A., (2016), “Phytotoxicity of wastewater-born micropollutants-Characterisation of three antimycotics and a cationic surfactant”, Environmental pollution (Barking, Essex: 1987), 208(Pt B), 512–522.

Ristaino J.B., Anderson P.K., Bebber D.P., Brauman K.A., MacDonald G.K., Wei Q., (2021), “The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Jun 8;118(23):e2022239118.

Rodrigues M.B., Fávaro L.C., Pallu A.P., Ferreira A., Sebastianes F., Rodrigues M. J., Spósito M.B., de Araújo W.L., Pizzirani-Kleiner A.A., (2013), “Agrobacterium-mediated transformation of Guignardia citricarpa: an efficient tool to gene transfer and random mutagenesis”, Fungal biology, 117(7-8), 556–568.

Romano N., Macino G., (1992), “Quelling: transient inactivation of gene expression in Neuro spora crassa by transformation with homologous sequences”, Molecular Microbiology, 6: 3343–3353.

Rössner C., Lotz D., Becker A., (2022), “VIGS Goes Viral: How VIGS Transforms Our Understanding of Plant Science”, Annual review of plant biology, 73, 703–728.

Sanan-Mishra N., Abdul Kader Jailani A., Mandal B., Mukherjee S.K., (2021), “Secondary siRNAs in Plants: Biosynthesis, Various Functions, and Applications in Virology”, Frontiers in plant science, 12, 610283.

Saurabh S., Vidyarthi A.S., Prasad D., (2014), “RNA interference: concept to reality in crop improvement”, Planta, 239(3), 543–564.

Scofield S.R., Nelson R.S., (2009), “Resources for virus-induced gene silencing in the grasses”, Plant physiology, 149(1), 152–157.

Segers G.C., Zhang X., Deng F., Sun Q., Nuss D.L., (2007), “Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104:12902–12906.

Senthil-Kumar M., Mysore K.S., (2011), “New dimensions for VIGS in plant functional genomics”, Trends in plant science, 16(12), 656–665.

Shephard G.S., van der Westhuizen L., Thiel P.G., Gelderblom W.C., Marasas W.F., van Schalkwyk D.J., (1996), “Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing Fusarium moniliforme culture material”, Toxicon. May;34(5):527-34.

Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S., Sydenham E.W., (1996), “Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products”, Journal of Association Of Agricultural Chemists International 79, 671 – 687.

Svoboda P., (2020), “Introduction to RNAi and miRNA pathways” Karolinum Press.

Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D.C., Maule A.J., (2001), “Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in Nicotiana benthamiana using a potato virus X vector”, The Plant journal : for cell and molecular biology, 25(4), 417–425.

Torbati M., Arzanlou M., da Silva Santos A.C., (202), “Fungicolous Fusarium Species: Ecology, Diversity, Isolation, and Identification”, Current Microbiology, Aug;78(8):2850-2859. PMID: 34184111.

Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S., (2010), “Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins”, Biotechnology Advances, Mar-Apr;28(2):214-21.

Unver T., Budak H., (2009), “Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method”, International journal of plant genomics, 198680.

Voss K.A., Riley R.T., Norred W.P., Bacon C.W., Meredith F.I., Plattner R.D., Collins T.F., Hansen D.K., Porter J.K., (2001), “An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and Fusarium moniliforme”, Environmental Health Perspectives, May;109 Suppl 2(Suppl 2):259-66.

Wang M., Dean R.A., (2020), “Movement of small RNAs in and between plants and fungi”, Molecular plant pathology, 21(4), 589–601.

Wang Y., Chai C., Khatabi B., Scheible W.R., Udvardi M.K., Saha M.C., Kang Y., Nelson R.S., (2021), “An Efficient Brome mosaic virus-Based Gene Silencing Protocol for Hexaploid Wheat (Triticum aestivum L.)”, Frontiers in plant science, 12, 685187.

Wang, Q., An B., Hou X., Guo Y., Luo H., He C., (2018), “Dicer-like Proteins Regulate the Growth, Conidiation, and Pathogenicity of Colletotrichum gloeosporioides from Hevea brasiliensis”, Frontiers in microbiology, 8, 2621.

Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Huang H.D., Jin H., (2013), “Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways”, Science, 342(6154), 118–123.

Wingard S.A., (1928), “Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants”, Journal of Agricultural Research. 37, 127–153.

Wise A A., Liu Z., Binns, A.N., (2006), “Three methods for the introduction of foreign DNA into Agrobacterium”, Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 343, 43–53.

Wollenweber H.W., Reinking O.A., (1935), “Die fusarien, ihre beschreibung, schadwirkung und bekaampfung”, Paul Parey; 1935.

Yang S.J., Carter S.A., Cole A.B., Cheng N.H., Nelson R.S., (2004), “A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by Nicotiana benthamiana”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 20;101(16):6297-302.

Yang J., Zhang T.Y., Liao Q.S., He L., Li J., Zhang H.M., Chen, J.P., (2018), “Chinese Wheat Mosaic Virus-Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots at Low Temperature”, Frontiers in plant science, 9,

Zhang H.Z., Gan L.L., Wang H., Zhou C.H., (2017), “New progress in azole compounds as antimicrobial agents”, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 17 122–166.

Zhang J., Li L., Yan L., Wang Y., Jiang Y., (2019), “The Fungal CYP51s: Their Functions, Structures, Related Drug Resistance, and Inhibitors”, Front Microbiol. 24;10:691.

Zhang T., Zhao Y.L., Zhao J.H., Wang S., Jin Y., Chen Z.Q., Fang Y.Y., Hua C.L., Ding S.W., Guo H.S., (2016), “Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen”, Nature plants, 2(10), 16153.

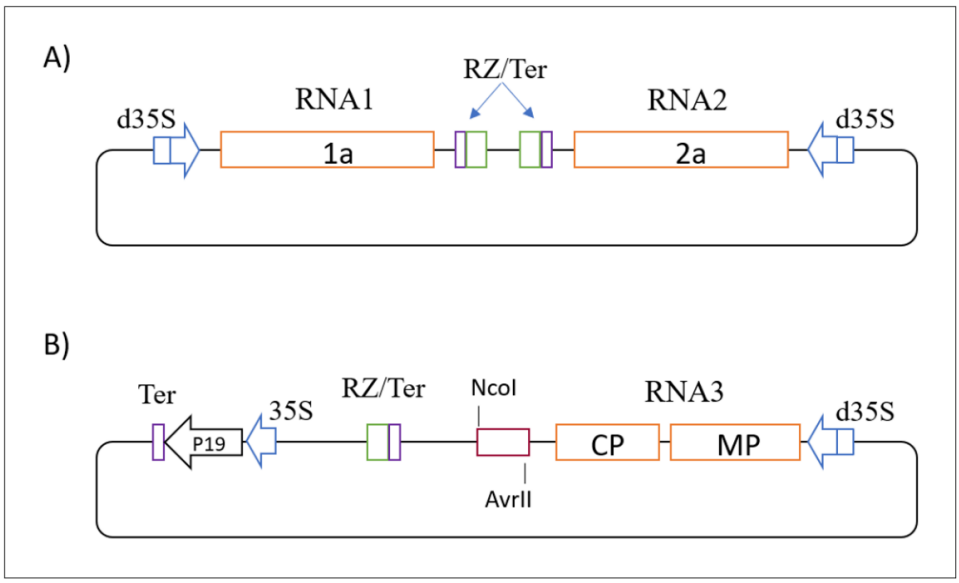
Zulfiqar S., Farooq M.A., Zhao T., Wang P., Tabusam J., Wang Y., Xuan S., Zhao J., Chen X., Shen S., Gu A., (2023), “Virus-Induced Gene Silencing (VIGS): A Powerful Tool for Crop Improvement and Its Advancement towards Epigenetics”, International journal of molecular sciences, 24(6), 5608.

ÖZGEÇMİŞ

Şüheda Ebrar YILMAZ, 2015 yılında başladığı Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2019 yılında başarıyla tamamlayarak, 2020 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Anabilim Dalında başladı. 2022 yılından bu yana Bitki Sistemleri Biyolojisi laboratuvarında yürütülmekte olan TÜBİTAK Cost projesinde araştırmacı öğrenci olarak çalışmaktadır.

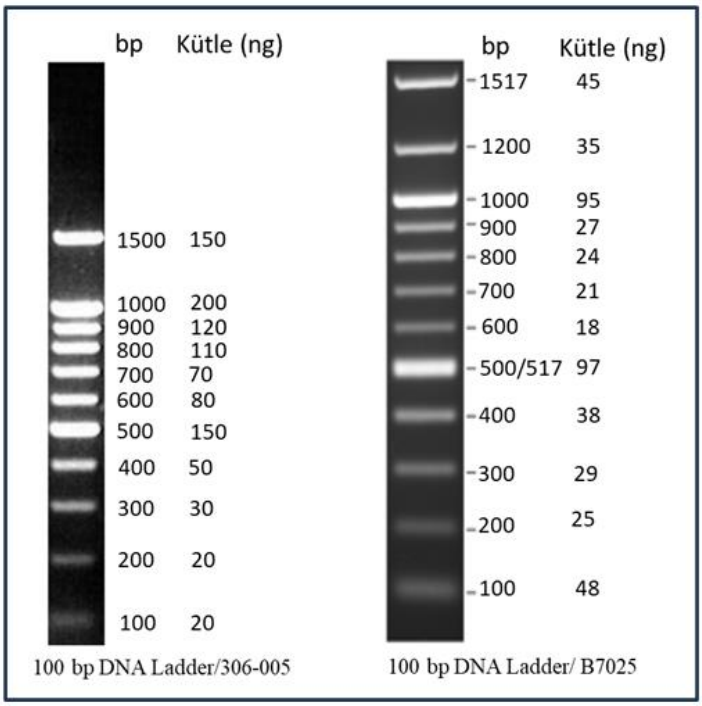
EKLER

Ek A: BMVCP5 Plazmit Haritası



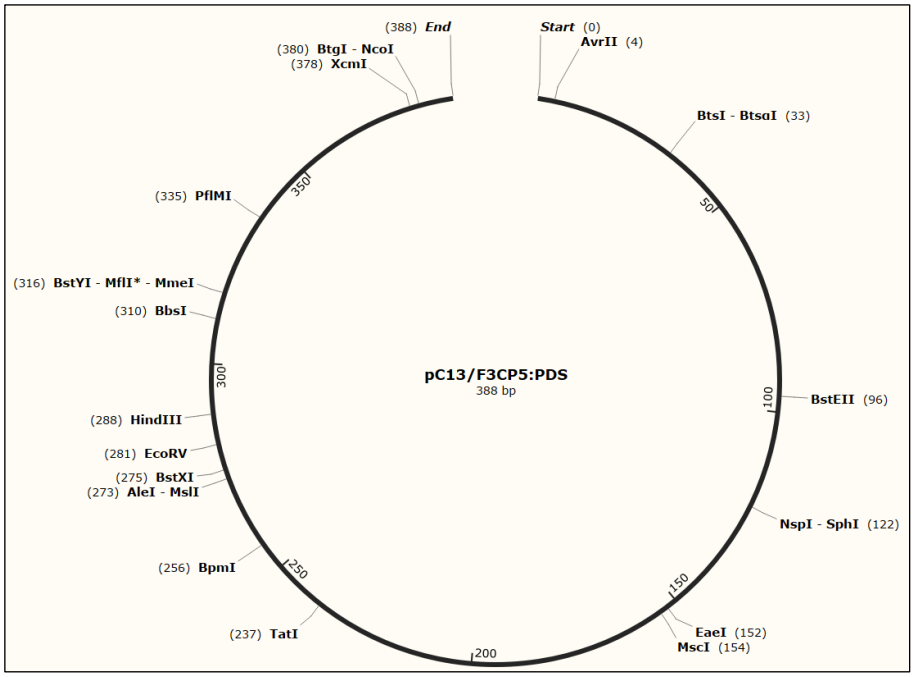
Şekil 1. BMVCP5 plazmit haritası. A) pC13/F1+2. B) pC13/F3-13m.

Ek B: DNA Marker



Şekil 2. DNA Marker

Ek C: Dizi RE Analizi



Şekil 3. pC13/F3CP5:PDS dizisinin RE Analizi. (SnapGene Viewer pragramı kullanılarak oluşturulmuştur.)

Ek D: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Yilmaz S.E., Aydinoglu F., (2022), “Host-Induced Gene Silencing of Fusarium verticillioides Pathogenicity Genes Mediated by the Brome Mosaic Virus " 7. GTÜ Fen Bilimleri Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Gebze, Kocaeli, Türkiye, 1-2 Haziran.

Aydinoglu F., Yilmaz S.E., (2022), “Inhibition of Pathogenicity of Maize Fungal Pathogen *Fusarium verticillioides* by Targeting CYP51 Gene Based on Host-Induced Gene Silencing Approach”, Antalya, Türkiye, 3-6 November.