

## Arpada Hücresel Apoptoz Hassasiyet (CAS) Geninin Susturularak Külleme Hastalığına Karşı Dirençte Etkisinin Belirlenmesi\*

Figen ERSOY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Uludağ Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bursa  
Sorumlu yazar: figen@uludag.edu.tr

Geliş tarihi: 02.02.2017, Yayına kabul tarihi: 06.06.2018

**Özet:** Ekonomik olarak önemli bir tahıl bitkisi olan arpa, dünyada ekim alanı açısından buğday, çeltik ve mısırdan sonra gelmektedir. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) tarafından oluşturulan külleme hastalığı arpanın en önemli hastalıklarından biridir. Hücresel Apoptoz Hassasiyet (Cellular apoptosis susceptibility; CAS) geninin, arpada külleme hastalığı sırasında ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. *R* geni tarafından yönetilen sinyal iletim mekanizmaları hakkında kısıtlı bilgi bulunduğu için, CAS proteininin külleme direnci veya hassasiyeti sırasındaki fonksiyonu anlaşılmalı çalışılmıştır. CAS proteininin patojene karşı oluşan tepki sırasında rolünü anlamak için Arpa Çizgili Mozaik Virüsü (BSMV) tarafından indüklenen gen susturma metodu uygulanmıştır. *HvCAS* geni susturulan bitki örneklerinde kontrol grubuna (BSMV:00) göre mRNA seviyesi % 54 azalmıştır. Fakat *HvCAS* geni susturulan bitki örneklerinde külleme hastalığına karşı direnç veya hassasiyet tepkisinde önemli bir değişim saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Arpa, bitki hastalık direnci, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, külleme, Hücresel Apoptoz Hassasiyeti (CAS), virüs ile uyarılan gen susturma (VIGS).

### Determining the effect of Barley Cellular Apoptosis Susceptibility (CAS) gene silencing on powdery mildew disease resistance

**Abstract:** Barley, an economically important cereal plant, comes after wheat, rice and maize in terms of planting area in the world. Powdery mildew disease, caused by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*), is one of the important diseases of barley. Cellular Apoptosis Susceptibility (CAS) gene was over expressed during powdery mildew disease in barley. Since there is limited information on *R* gene-mediated signaling cascade, we sought to understand the way in which CAS protein function in powdery mildew resistance or susceptibility response. Towards understanding the role of *HvCAS* in pathogen response, the gene was silenced by Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) induced gene silencing. The level of *HvCAS* mRNA in silenced plant samples showed 54% reduction with respect to the control group (BSMV:00). However, there was no considerable change observed in resistance or susceptibility response to powdery mildew in *HvCAS*-silenced plant samples.

**Key words:** Bbarley, plant disease resistance, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, powdery mildew, Cellular Apoptosis Susceptibility (CAS), virus induced gene silencing (VIGS).

#### Giriş

Arpa, ülkemizde serin iklim tahılları arasında ekiliş alanı bakımından buğdaydan sonra gelmektedir. Buğday gibi ülkemizin tüm bölgelerinde yetiştirilebilmektedir. Ancak viral ve fungal hastalıklar, arpanın verimi ve niteliğini azaltmaktadır. Arpa

fungal hastalıklarından en önemlisi külleme hastalığıdır.

Külleme hastalığı bitkilerin en yaygın hastalıklarından biri olup, binlerce tek çenekli ve çift çenekli bitkiyi hasta etmektedir (Jørgensen, 1988; Zhou ve ark., 2001). Bu yüzden tahıllarda ürün verimini arttıracak çalışmalar çok önemlidir (Cakir ve

\*Çalışma TÜBİTAK 110T984 nolu proje ile desteklenmiştir.

ark., 2010). Külleleme hastalığı olarak da bilinen *Blumeria graminis*, dünya çapında monokotillerin farklı türleri ve dikotil bitkiler üzerinde hastalığa yol açan zorunlu bir parazittir (Ing, 1990). *Blumeria graminis* enfekte etmek ve gelişmek için, nispeten soğuk ve nemli çevre koşullarını tercih etmektedir (Ridout ve ark., 2006). Patojen epidermis hücrelerinde büyür, çoğalır ve besinini bitkinin hücrelerinden direkt olarak veya emeçler (haustorium) vasıtasıyla alır. Çoğalma konidya aracılığı ile olmaktadır. Konidya kendini konak üzerine yerleştirmekte ve yedi ile on gün arasında olgunlaşmaktadır (Ridout ve ark., 2006).

*Blumeria* familya üyeleri ot (*Poacea*) familyasını etkilemek için konak seçiminde yüksek özgünlük oluşturmaktadır (Eichman ve ark., 2008). *Blumeria graminis* patojeninin farklı ot familyası üyelerini enfekte edebilen sekiz farklı taksonomik grubu belirlenmiştir. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*), *Hordeum vulgare* bitkisini enfekte edebilen bir alttürdür (Wyand ve ark., 2003). *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* dışında yulaf (f. sp. *avenae*), çavdar (f. sp. *secalis*), salkım otu (*poae*), delice otu (*lolii*) ve kılıçık brom (*bromi*) gibi bitkileri enfekte edebilen diğer alt gruplar da bulunmaktadır (Inuma ve ark., 2007).

Verimi ve ekonomik yararı azalttığı için, üretim aşamalarında *Blumeria graminis* kontrol altında tutulmalıdır (Dean ve ark., 2012). Arpanın ekonomik önemi göz önüne alındığında, *Bgh*'nin en yoğun şekilde çalışılan külleleme hastalığı etmeni olduğu söylenebilir (Zhang ve ark., 2005). Günümüzde *Blumeria graminis* fungusunun enfeksiyon kapasitesini azaltmak için fungusitler kullanılmaktadır. Ancak fungus bu kimyasallara karşı hızlı bir şekilde dirençli hale gelmektedir. Bu sebeple arpayı *Bgh* patojeninden korumak için yapılan çalışmaların geliştirilerek sürdürülmesi gerekmektedir (Glawe, 2008).

Bitkilerde bulunan hastalık direnç mekanizması konukçu bitkinin, pestisit, fungus, bakteri ve virüslerden korunması için çok büyük önem taşımaktadır (Brunner ve ark., 2012). Bitkiler, insanlara ve hayvanlara göre daha sade bir bağışıklık sistemine sahiptirler. Bitkiler gezici bağışıklık hücrelerinden yoksundur ve

patojenleri algılamak için bir dolaşım sistemleri bulunmamaktadır (Spoel ve Dong, 2012). Bunun yerine bitki hücreleri doğal bağışıklık sistemini ve enfeksiyon bölgelerinden başlayan sistemik sinyalleri kullanmaktadır (Ausubel, 2005).

Patojen, bitki ile ilk defa etkileşime girdiğinde, Patojen İlişkili Moleküler Modeller (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) üretmektedir (Dubery ve ark., 2012). PAMPs, konukçu bitkide türetilmiş Model Tanıma Reseptörleri (Pattern-Recognition Receptors, PRRs) tarafından tanınmaktadır (Spoel ve Dong, 2012). Patojenler, bitki direnç sistemine karşı koymak için savunma mekanizmalarını baskılayan efektör moleküller kullanmaktadır (Jones ve Dangl, 2006). Patojenlerle beraber ortak bir evrim sürecinde, bitkiler efektör moleküllere karşı koymak için hücre içi bağışıklık reseptörlerini geliştirmişlerdir (Spoel ve Dong, 2012).

Bir bitki belirli bir hastalığa karşı dirençli ise; bitkilerde bulunan R (direnç) proteinleri hastalık yaratan organizmada bulunan Avr (avirülans) proteinini tanıır. Bu mekanizmaya "gene-gen direnci (gene for gene resistance)" denilmektedir (Flor, 1971). Bu tanımadan sonra, R proteini bir sinyal iletim mekanizması başlatır. Bitkilerde hastalığa karşı direnç sırasında ilk sentezlenen kimyasallardan birisi hidrojen peroksittir ( $H_2O_2$ ). Hidrojen peroksit birikimi enfekte olan bitki hücrelerinin ölümüne sebep olur ve patojenin diğer hücrelere yayılmasını engeller. R-Avr proteinlerinin etkileşiminden sonra aktive olan sinyal iletim mekanizması ise henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Sporun yaprağa yerleşmesinden sonra en önemli adım epidermisin ilk hücrelerinin ele geçirilmesidir. Patojenin konak hücre içine girebilmesi için, arpa mutlaka *Mildew locus O* (*Mlo*) genine sahip olmalıdır (Büsches ve ark., 1997). Buna ek olarak, diğer konaklar örneğin; *Arabidopsis thaliana* (Consonni ve ark., 2006), domates (Bai ve ark., 2008), ve bezelye (Humphry ve ark., 2011) de *Mlo* geni varlığında patojen tarafından ele geçirilebilmektedir. Bu durum, hastalık için ortak bir mekanizmanın olduğunu göstermektedir. *Mlo* gen ürünleri,

*in vivo* (Bhat ve ark., 2005) ve *in vitro* (Kim ve ark. 2002) koşullarda kalsiyum bağımlı kalmodulin bağlanmasına olanak sağlayan C-terminal sitoplazmik kalmodulin bağlanma domaini içermektedir. Fungal penetrasyon sırasında (ilk 12-24 saat) arpada Mlo proteinine bağlanan kalmodulin sayısı artmaktadır (Bhat ve ark., 2005).

Farklı arpa türleri *Bgh* patojeninin farklı izolatlarına karşı hassastır. R ve Avr etkileşimi özel bir ilişkidir. Örneğin; Pallas01 (*Mla1* geni içeren); *Bgh95*(53/01) patojenine karşı hassas olduğu halde, *Bgh103*(64/01) patojenine karşı dirençlidir.

CAS/CSE protein ailesi, memeli hücrelerinde apoptoz duyarlılık (CAS) proteinleri ve maya kromozom ayrılma proteinlerini (CSE1) içeren bir protein ailesidir (Brinkmann ve ark., 1995). CAS proteini hücresel apoptozda, üremede ve kanserde de rol almaktadır (Brinkmann ve ark., 1996; Scherf ve ark., 1996). CAS proteininin ekspresyonu hücre üremeye bağlantılı iken, CAS tükenmiş hücrelerde apoptoz önlenmektedir. CAS (CSE1) mitotik kontrol noktası için zorunlu bir proteindir ve mikrotübül ağı ve mitotik iğ iplikleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Scherf ve ark., 1996). CAS, hücre döngüsünde G1-S aralığında fonksiyonu olan birçok iyi bilinen kanser genlerinin aksine, hücre döngüsünde hücreyi G2 fazında durdurmaktadır. Hücre çekirdeğinde CAS importin metabolik yolunda nükleer transport faktörü olarak rol oynamaktadır (Kutay ve ark., 1997). İportin metabolik yolu, mitoz ve daha fazla gelişme için önemli olan birçok proteinin hücre çekirdeğine taşınmasına aracılık etmektedir. CAS proteininin, bu proteinlerin taşınmasındaki rolünden dolayı hücre döngüsünü etkilediği düşünülmektedir (Kutay ve ark., 1997). Apoptoz sırasında birçok proteinin (p53 ve transkripsiyon faktörleri gibi) hücre çekirdeğine girmesi için gereklidir. CAS proteininin, bu önemli proteinlerin bir kısmının hücre çekirdeğine girmesini kolaylaştırmasıyla apoptozla olanak sağladığı bilinmektedir (Brinkmann, 1998).

CAS proteinin programlanmış hücre ölümü ile ilişkisi ve buğdayda bir direnç proteini ile etkileşime girmesi bitkilerde hastalığa karşı direnç tepkisinde rol alması

ihtimalini kuvvetlendirmektedir (Yıldırım-Ersoy ve ark., 2011).

Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma (PTGS; Post Transcriptional Gene Silencing) RNA tarafından yönlendirilen sistemik bir susturma mekanizmasıdır. Bitkilerde PTGS için “RNAi'nin eşleniği” denilmektedir. PTGS için pek çok metod uygulanmaktadır ve bunlardan en başarılısı Virüs ile Uyarılmış Gen Susturması (VIGS) yöntemidir (Baulcombe, 1999; Dinesh-Kumar ve ark., 2003). Bitkiler RNA virüsleri ile enfekte oldukları zaman RNA tarafından kontrol edilen bir savunma mekanizması çalışmaya başlar. Bitkinin içine giren viral RNA ve bu RNA'lara eklenmiş olan transgenler parçalanır ve bitki virüse direnç gösterir (Voinnet, 2001). Transkripsiyon sonrası gen susturma sistemi, hem vektörün içinde bulunan endojen genin hem de bitkideki aynı diziyi parçalayarak geni işlevsiz hale getirmektedir. Böylece VIGS yöntemi ile diziye özel susturma yapılabilir.

'*Hordeivirus*' cinsine ait olan BSMV ilk olarak arpada (Holzberg ve ark., 2002) sonra buğdayda (Scofield ve ark., 2005) VIGS için kullanılmaktadır. BSMV üçe ayrılmış tek-iplikli (single-stranded) pozitif sens RNA virüsüdür. BSMV, arpa ve buğday için yaygın olarak kullanılmaktadır (Holzberg ve ark., 2002; Lacomme ve ark., 2003; Hein ve ark., 2005; Scofield ve ark., 2005).

Bu çalışmada, VIGS tekniği ile Arpa Çizgili Mozaik Virüsü'nün (*Barley Stripe Mosaic Virus*, BSMV) vektör olarak kullanılarak arpa CAS geninin susturulması, külleme hastalığına karşı direnç tepkilerinin ölçülmesi ve bitkilerin direnç göstermesinde rol alan genel sinyal iletim mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmiştir.

## Materyal ve Yöntem

### *Bitki materyali ve büyüme koşulları*

Çalışma kapsamında bitki materyali olarak Pallas01 arpa çeşidi (*Mla1* direnç geni içeren) CAS gen parçasının klonması için kullanılmıştır. Tohumlar nemli ortamda 3 gün karanlıkta bekletildikten sonra, toprağa aktarılmış ve bitki büyütme kabiniinde (Sanyo Versatile-Model MLR-351H) bitkilere 14 gün boyunca; 18°C'de 16

saat gündüz ve 12°C'de 8 saat gece fotoperiyot uygulanmıştır.

### HvCAS klonlanması

VIGS için kullanılan BSMV plazmitleri  $\rho\alpha$ ,  $\rho\beta\Delta\beta\alpha$  (kılıf protein çıkartılmış) ve  $\rho\gamma$  Large Scale Biology laboratuvarından elde edilmiştir.  $\gamma$  genom içeren plazmit ve pSL039B-1 ise Steven R. Scofield (Purdue Üniversitesi, ABD)'den alınmıştır. HvCAS hedef sekansı si-Fi yazılımı kullanılarak hedef tahmini yapılmıştır (<http://labtools.ipk-gatersleben.de/>).

HvCAS gen parçasının çoğaltılması için HvCAS-F-Pac

5'CACTTAATTAAGGAGTGCTCTCTTT ACTCGCT3' ve HvCAS-R-Not 5'CATGCGGCCGCAAGAGAACCTTTG ATCAAC3' primerleri kullanılmıştır. 200  $\mu$ L steril PCR tüpünün içerisinde 1X PCR tampon çözeltisi (75 mM Tris-HCl 25°C'de pH 8,8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% (v/v) Tween20), 0,25 mM dNTP Karışımı (DNamp), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (DNamp), 1 ünite *Taq* DNA polimeraz, 15 pmol ileri primer, 15 pmol geri primer ve steril distile su son hacim 20  $\mu$ L olacak şekilde karıştırılmıştır. PCR döngü koşulları: 94°C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonu, 35 döngü; 94°C'de 30 saniye, 50°C'de (optimizasyon sonrasında en iyi çalışan bağlanma sıcaklığı olarak tespit edilmiştir) 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika yapıldıktan sonra en son 5 dakika 72°C'de tutularak tamamlanmıştır. PCR ürünleri 1% agaroz jelde de görüntülenmiştir.

pSL039B-1 içindeki *PDS4* (*Fitoen desaturaz*) gen parçası *PacI* ve *NotI* enzimleri ile kesilerek çıkartılmış ve çıkartılan bölge yerine HvCAS gen parçası klonlanarak  $\rho\gamma$ -CAS-AS vektörü oluşturulmuştur. Plazmitler 'QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit' kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde izole edilmiştir. İzole edilen plazmidler (600 ng) M13 geri primeri kullanılarak 'ABI prism-310 Genetic Analyzer' kullanılarak sekanslanmıştır.

### Plazmitlerin lineer hale getirilmesi

$\rho\alpha$ ,  $\rho\beta\Delta\beta\alpha$ ,  $\rho\gamma$ -00,  $\rho\gamma$ -CAS-AS ve  $\rho\gamma$ -bpds4-AS plazmitleri restriksiyon enzimleri

ile kesilerek lineer hale getirilmiştir.  $\rho\alpha$  plazmit DNA'sı *MluI* enzimi,  $\rho\beta\Delta\beta\alpha$  plazmit DNA'sı *BcuI* enzimi,  $\rho\gamma$  plazmit DNA'ları ( $\rho\gamma$ -00,  $\rho\gamma$ -CAS-AS ve  $\rho\gamma$ -bpds4-AS) *BssHII* enzimi (New England Biolabs) kullanılarak kesilmiştir. 4  $\mu$ g plazmit DNA'sını kesmek için 10 U enzim kullanılmış, PCR suyu son hacim 50  $\mu$ L olacak şekilde PCR tüpünde birleştirilerek karışım 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Kesilen plazmit DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde ayrıştırılarak gözlemlenmiştir.

### Virüs RNA'sının in vitro transkripsiyon ile hazırlanması

$\alpha$ ,  $\beta\Delta\beta\alpha$  ve  $\gamma$  lineer genomları (RNA'lar) 'mMessage mMachine T7 in vitro transcription kit' (cat no: 1340, Ambion, Austin, TX) kullanılarak sentezlenmiştir. 500  $\mu$ L steril PCR tüpüne her bir plazmit ( $\rho\alpha$ -*MluI*,  $\rho\beta\Delta\beta\alpha$ -*BcuI*,  $\rho\gamma$ -00-*BssHII*,  $\rho\gamma$ -bpds4-As-*BssHII* ve  $\rho\gamma$ -CAS-As-*BssHII*) ayrı ayrı 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L olarak hazırlanmıştır. Tüplere 1X tampon çözeltisi (Ambion), 1X NTP Cap'lı nucleotit karışımı (Ambion), 10x dNTP 5  $\mu$ L, 10x tampon çözeltisi 1  $\mu$ L ve 1  $\mu$ L T7 RNA polimeraz karışımı hazırlanıp, karışım 37°C de 2 saat bekletilmiştir. Transkriptler %1'lik agaroz jelinde ayrıştırılarak görüntülenmiştir.

VIGS uygulaması bitkiler ilk iki yaprağını çıkarttıktan sonra (yaklaşık filizlenmeden 14. gün sonra) yapılmıştır. BSMV transkriptleri 1:1:1 ( $\alpha$ :  $\beta$ :  $\gamma$ ) oranında yapraklara uygulanmıştır. Plazmitler (4  $\mu$ g) uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak liner (düz) hale getirilmiştir. pBSMV $\gamma$ :CAS için *BssHII*, pBSMV $\beta\Delta\beta\alpha$  *SpeI*, pBSMV $\alpha$  ve pBSMV $\gamma$  için *MluI* kullanılarak 50  $\mu$ L hacimde kesim işlemleri gerçekleştirilmiştir.

### Virüs RNA'sının inokülasyon işlemi

Transkripsiyon karışımına virüs RNA'ları (1  $\mu$ L  $\rho\alpha$ -*MluI*, 1  $\mu$ L  $\rho\beta\Delta\beta\alpha$ -*BcuI* ve 1  $\mu$ L  $\rho\gamma$ -00-*BssHII* veya 1  $\mu$ L  $\rho\gamma$ -bpds4As-*BssHII* veya 1  $\mu$ L  $\rho\gamma$ -CAS-As *BssHII*) ve 27,5  $\mu$ L FES (50 mL 10x GP (18,77 g glukoz; 26,13 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ddH<sub>2</sub>O ile 500 mL'ye tamamlanmış ve 20 dk otoklavlanmış; 2,5 g sodyum pirofosfat, 2,5 g bentonit, 2,5 g selit, ddH<sub>2</sub>O ile 250 mL'ye tamamlanmış ve 20 dk otoklavlanmış)

eklenmiştir. Bu karışım bitkilerin yapraklarına sürülerek virüs uygulanmıştır. BSMV ile enfekte edilen bitkiler 16 saat ışık, 8 saat karanlıkta ve %60 nem oranında 14 gün boyunca bitki büyütme dolabı içinde tutulmuştur. Virüs uygulamasından sonra sistemik yayılma 10-14 gün içinde gözlemlenmiştir. Susturma pozitif kontrolü olarak, *PDS4* genin susturulması kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak pγ-00 (boş gamma vektörü, BSMV:00) kullanılmıştır. Negatif kontrol bitkilerinde belirgin bir semptom gözlemlenmemiştir. *PDS4* geni susturulduğunda ise karetenoid sentezi etkilendiği için yapraklar beyaz renkli olmaktadır. Bu şekilde susturma işleminin ilerleyişi bitkilerde takip edilebilmektedir.

#### ***qRT-PCR ile susturma miktarının belirlenmesi***

Susturma yapılan örneklerden ve kontrol bitkilerinden RNA izolasyonu 'QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit' kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde yapılmıştır (QIAGEN, Almanya). RNA içinde DNA kalıntılarını temizlemek için 'DNase I' üreticinin tavsiye ettiği şekilde kullanılmıştır (Fermentas, MA, ABD). cDNA 'Invitrogen SuperScript®II Reverse Transcriptase' enzimi kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği şekilde sentezlenmiştir. *HvCAS* geninin transkript seviyesini belirlemek için 5' CGCTTACAGACTAGGCAAGCA 3' 'ileri primer ve 5' AGATTGGGAATCCAAAAACG 3' geri primer olarak tasarlanmıştır. RNA miktarının normalizasyonu için Übikütün ve Uzama (Elongation) Faktörü 1α primerleri kullanılmıştır (Übikütün ileri primeri 5'-GCCGCACCCCTCGCCGACTAC-3', Übikütün geri primeri 5'-CGGCGTTGGGGCACTCCTTC-3'; Uzama (Elongation) Faktörü 1α ileri primeri 5'-ATGATTCCCACCAAGCCCAT-3' Uzama (Elongation) Faktörü 1α geri primeri 5'-ACACCAACAGCCACAGTTTGC-3'). Normalizasyon analizi iki transkriptin de deneysel koşullar altında sürekli ifade edildiğini göstermektedir ve her cDNA örneği için normalizasyon faktörünü oluşturmaktadır (geNorm program v3.5

<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) (Vandessompele ve ark., 2002).

4,6 µL ddH<sub>2</sub>O, 5 µL cDNA (50 ng/ µL), 0,1 mM ileri ve geri primer kullanılmıştır. 10 µL SYBR yeşil karışımı (SybrGreen JumpStart™ Taq Ready mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) her reaksiyona eklenmiştir. PCR döngü koşulları 95°C'de 4 dakika, 30 döngü; 94°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniyedir. qRT-PCR reaksiyonları Stratagene MX3005p Q-PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi primerlerin dimer oluşturup oluşturmadığını görmek için analiz edilmiştir. Normalizasyon sonrası genlerin ekspresyonundaki farklılıklar delta eşik döngüsü (ΔCT -treshold cycle) değerlerine göre hesaplanmıştır (Pfaffl, 2001). Kantitasyon  $2^{\Delta\Delta CT}$  yöntemine göre belirlenmiştir.

qRT-PCR sonucunda elde edilen eşik değerleri arasındaki farklar *HvCAS* geninin susturulduğu bitkilerde ve negatif kontrol bitkilerinde (BSMV:00) analiz edilerek, genin susturulmasında ne kadar başarılı olduğu saptanmıştır. qRT-PCR reaksiyonları üçer kez tekrarlı olarak yapılmıştır.

#### ***Blumeria graminis f. sp. hordei inokülasyonu ve küleme hastalığının gelişiminin izlenmesi***

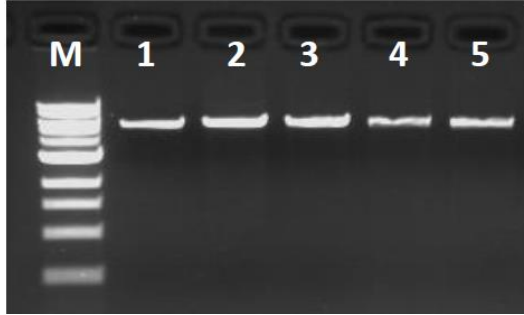
Susturma yapıldıktan 10 gün sonra arpa bitkisinden kesilmiş olan 4. ve 5. yapraklar %1,5'lik su agarı (%1 benzimidazol) üzerine alınmış ve *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* izolatu *Bgh-95(53/01)* yapraklara uygulanmıştır. Hif büyümesi ve hastalığın gelişimi hastalık uygulamasından 3 gün ve 5 gün sonrasında Tripan Mavisi kullanılarak (Hein ve ark., 2005) Leica DM4000B mikroskopu/DFC 280 kamera ile tespit edilmiştir.

#### ***İstatistiksel analiz***

Kontrol (BSMV:00) ve *HvCAS* susturulmuş bitkiler arasındaki farkı karşılaştırmak için 'MS Excell student's *t*-test' kullanılmıştır. Anlamlılık sınırı 0.05 olarak alınmıştır. Gözlemlenen bütün hif uzunlukları analiz için kullanılmıştır.

## Bulgular

Çalışmada kullanılan BSMV genomuna ait plazmitler olan  $\alpha$ ,  $\beta\Delta\beta$ ,  $\gamma$ -00,  $\gamma$ -CAS-AS ve  $\gamma$ -bpds4-AS uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilmiştir (Şekil 1).



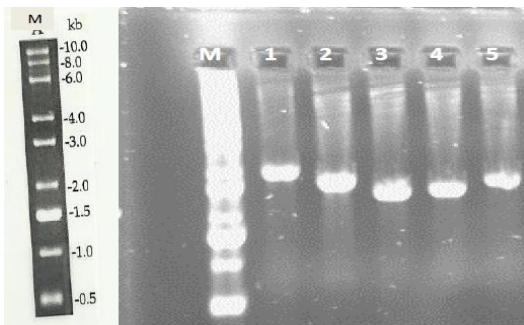
Şekil 1. Plazmitlerin liner (düz) hale getirilmesi

### Figure 1. Linearization of plasmids

M: DNA Markörü 1kb merdiven (NEB), 1 nolu kuyucuk:  $\alpha$  plazmit DNA'sını, 2 nolu kuyucuk:  $\beta\Delta\beta$  plazmit DNA'sını; 3 nolu kuyucuk:  $\gamma$ -00, plazmit DNA'sını; 4 nolu kuyucuk:  $\gamma$ -CAS-AS plazmit DNA'sını; 5 nolu kuyucuk:  $\gamma$ -bpds4-AS plazmit DNA'sını göstermektedir.

Represented as M: DNA Marker 1kb ladder (NEB), 1 st well:  $\alpha$  plasmid DNA, 2 nd well:  $\beta\Delta\beta$  plasmid DNA; 3 rd well:  $\gamma$ -00 plasmid DNA; 4 th well:  $\gamma$ -CAS-AS plasmid DNA; 5 th well:  $\gamma$ -bpds4-AS plasmid DNA.

$\alpha$ ,  $\beta\Delta\beta$  ve  $\gamma$  liner genomları 'mMessage mMachine T7 *in vitro* transcription kit' (cat no: 1340, Ambion, Austin, Tx) kullanılarak sentezlenmiştir (Şekil 2).



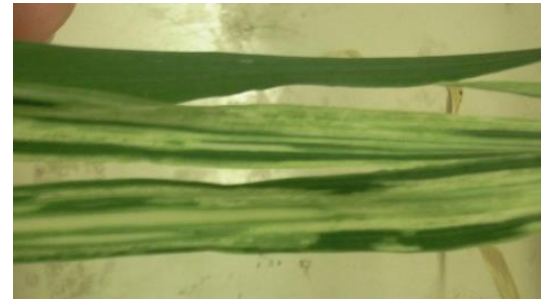
Şekil 2. *In vitro* sentezlenen transkriptlerin %1'lik Agaroz jel elektoforezinde kontrolü.

### Figure 2. Control of *in vitro* synthesized transcripts in 1% agarose gel electrophoresis

M: DNA Markörü 0.5-10kb merdiven (Gentaur), 1 nolu kuyucuk:  $\alpha$  transkriptini, 2 nolu kuyucuk:  $\beta\Delta\beta$

transkriptini, 3 nolu kuyucuk:  $\gamma$ -00 transkriptini, 4 nolu kuyucuk:  $\gamma$ -CAS-AS transkriptini, 5 nolu kuyucuk:  $\gamma$ : *pds4-As* transkriptini göstermektedir. Represented as M: DNA Marker 0.5-10kb ladder (Gentaur), 1 st well:  $\alpha$  plasmid transcript, 2 nd well:  $\beta\Delta\beta$  transcript; 3 rd well:  $\gamma$ -00 transcript; 4 th well:  $\gamma$ -CAS-AS plasmid DNA; 5 th well:  $\gamma$ -bpds4-AS plasmid DNA.

Gözlemlenen bir genin susturulması sonucu, susturmanın ne zaman etkin olarak gerçekleştiği takip edilebilmektedir. Çalışmada gen susturmasının gözle izlenebilmesi için pozitif kontrol olarak *PDS4* (fitoen desaturaz) geni susturulması yapılmıştır. *PDS4* geni susturulan bitkilerde karotenoid sentezi etkilendiği için bitki renginde ağarma söz konusudur (Şekil 3).

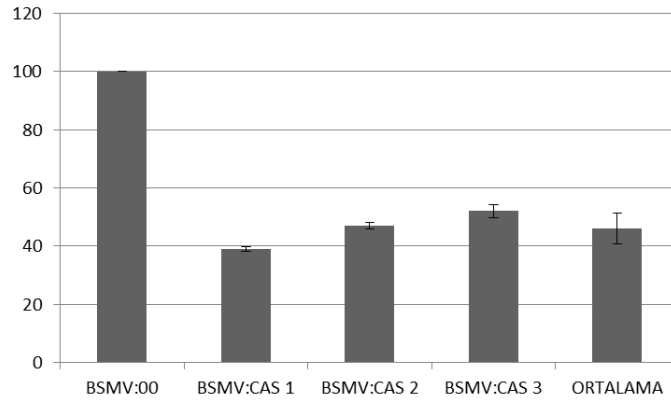


Şekil 3. Pozitif kontrol olarak kullanılan BSMV:PDS4. *PDS4* geni susturulan bitkinin rengindeki ağarma ile susturmanın miktarı ve zamanı izlenebilmektedir.

Figure 3. BSMV:PDS4 as positive control. Silencing level and time could be visualized by bleaching of the plant leaves after silencing *PDS4* gene.

Bu şekilde susturulan genin hangi yapraklarda ve ne miktarda susturulduğu takip edilebilmektedir. Uygulamanın çalıştığına tespit edilmesi ve yaprakta izlenmesi için kullanılan pozitif kontrol, susturma deneylerinin başarılı olduğunu göstermektedir.

Negatif kontrol bitkilerinde (BSMV:00) ve potansiyel olarak susturma yapılan bitkilerde *HvCAS* transkript miktarı qRT-PCR reaksiyonları ile ölçülmüştür. VIGS deneyi 3 ayrı biyolojik tekrar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR analizi 3 teknik tekrar yapılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda ortalama susturma değeri *HvCAS* geni için ortalama %54 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4).

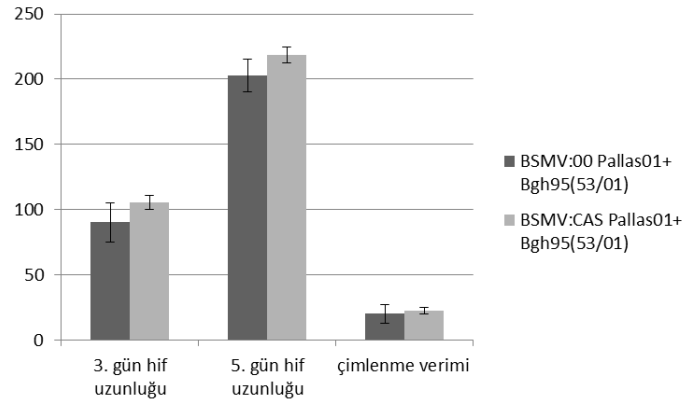


Şekil 4. Gen susturması sonrası % HvCAS ekspresyon seviyesi  
Figure 4. % HvCAS expression level after gene silencing

Susuturma yapılan bitkilerden pozitif kontrol (BSMV:PDS4) değerlendirilerek yaklaşık 14 gün sonra bitkinin 4. ve 5. yapraklarına hastalık uygulaması uygun bulunmuş ve yaprak kesitleri %1,5'lik su agarına (%1 benzimidazol) aktarılmıştır.

*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh95(53/01)) agar üzerindeki susuturma yapılmış bitkilere uygulanmıştır. Patojen uygulamasından sonra 3. ve 5. günlerde

örnekler alınarak mikroskop altında hif uzunluğu ölçülmüştür. 3. gün örneklerinde yapraklara düşen spordan çimlenmiş spor sayısının, yaprak başına düşen spor sayısına bölünmesi ve 100 ile çarpılması sonucunda elde edilen değer ile sporun çimlenme verimi ölçülmüştür (Şekil 5). Hif uzunlukları ve çimlenme verimi değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan önemli bir değişim gözlemlenmemiştir.

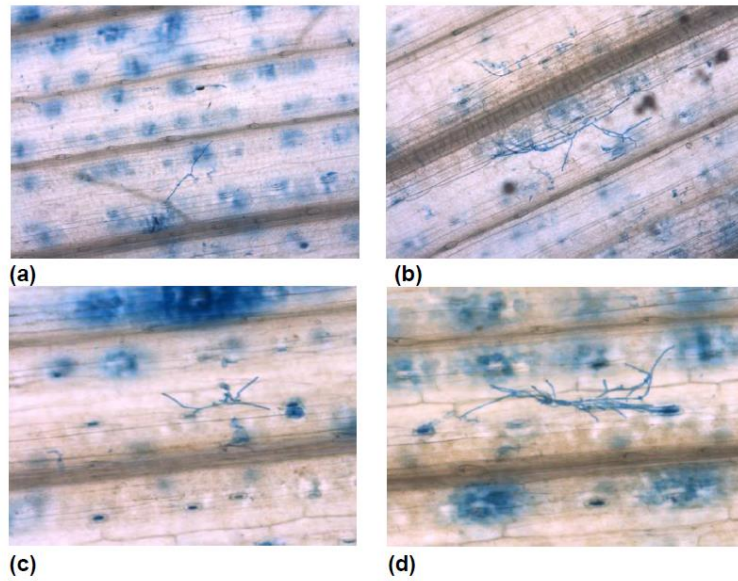


Şekil 5. HvCAS geni susturulan arpa bitkileri üzerinde *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* hif uzunluğu ve çimlenme verimi değerlendirilmesi

Figure 5. Evaluation of the *Blumeria graminis* f. p. *hordei* hyphal growth and spore germination efficiency on barley plants after HvCAS gene silencing

Negatif kontrol bitkileri üzerinde sporların gelişimi Şekil 6 (a,b) de gösterilmiştir. HvCAS geni susturulmuş ve Bgh95(53/01) uygulanmasından 3 gün ve 5 gün sonra sporların gelişimi negatif kontrol

bitkilerine göre değerlendirilmiştir. Susturma sonrasında 3. gün ve 5. gün yapraklarında büyümede istatistiksel açıdan önemli bir değişim saptanmamıştır (Şekil 6 c, d).



Şekil 6. Negatif kontrol bitkileri ve *HvCAS* geni susturulmuş arpa bitkileri üzerinde *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* büyümesi

Figure 6. *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* growth on control and *HvCAS* silenced barley.

(a) BSMV:00 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95*(53/01) uygulanmasından 3 gün sonrası sporların gelişimi (10X), (b) BSMV:00 ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95*(53/01) uygulanmasından 5 gün sonrası sporların gelişimi (10X) (c) BSMV:CAS ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95*(53/01) uygulanmasından 3 gün sonrası sporların gelişimi (10X), (d) BSMV: CAS ile enfekte edilmiş Pallas01 bitkisine *Bgh95*(53/01) uygulanmasından 5 gün sonrası sporların gelişimi (10X)

a) 3rd day spore germination (Powdery mildew inoculations with *Bgh-95*(53/01)) on BSMV:00 treated Pallas01 (10X) (b) 5th day spore germination (Powdery mildew inoculations with *Bgh-95*(53/01)) on BSMV:00 treated Pallas01 (10X) (c) 3rd day spore germination (Powdery mildew inoculations with *Bgh-95*(53/01)) on BSMV:CAS treated Pallas01 (10X) (d) 5th day spore germination (Powdery mildew inoculations with *Bgh-95*(53/01)) on BSMV:CAS treated Pallas01 (10X)

## Tartışma

Külleme hastalığı arpanın en önemli hastalıklarından biri olup, bu hastalığa karşı çözüm önerileri hazırlamak için hastalık mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Arpada külleme hastalığına karşı direnç mekanizmasının anlaşılması için VIGS yöntemi verimli bir şekilde kullanılmaktadır (Dagdas ve ark., 2009; Yin ve ark., 2011). CAS geninin susturulması ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Genlerin tamamen susturulması canlı için ölümcül sonuçlar doğurabilmektedir. Bu sebeple VIGS yöntemi, gende geçici susturma yapılması ve genin tamamen etkisiz hale (knock-out) getirilmemesi sebebi ile tercih edilmektedir. CAS geni susturmaları sonrasında arpada fenotipik bir değişim gözlenmemiştir.

Bitkilerde hastalığa direnç mekanizması sırasında patojen tarafından salgılanan

moleküllerin, bitki hücrelerinin tanınması ile aşırı hassasiyet tepkisi gerçekleşmektedir (Flor, 1971). Bu tanınmadan sonra bitki hücresi kendi hücrelerini apoptoza sürükleyerek patojenin yayılmasını engellemektedir. CAS proteininin, apoptozun gerçekleşmesi için önemli olan bazı proteinlerin hücre çekirdeğine girmesini kolaylaştırmasıyla apoptoza olanak sağladığı bilinmektedir (Brinkmann, 1998). Aynı zamanda *HvCAS* gen ekspresyonunun arpada külleme hastalığına karşı direnç sırasında ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Yıldırım-Ersoy ve ark., 2011). Bu nedenle yapılan çalışmada *HvCAS* gen ekspresyonu %54 oranında susturularak külleme hastalığında direnç/hassasiyet mekanizmasında rol alıp almadığı anlaşılmaya çalışılmıştır. Gen susturma seviyesi 3 biyolojik tekrarda qRT-PCR reaksiyonu kullanılarak ve 3 teknik tekrar yapılarak tespit edilmiştir. İlk biyolojik



tekrarda *HvCAS* ekspresyon seviyesi  $39\pm 0,82$ , ikinci tekrar bitkisinde  $47\pm 1,25$  ve üçüncü tekrar bitkisinde ise  $52\pm 2,16$  olarak saptanmıştır. Ortalama *HvCAS* gen ekspresyon seviyesi  $\%46\pm 5,35$  olarak dolayısı ile genin susturulma oranı  $\%54$  olarak hesaplanmıştır.  $\%30$  üzerindeki değerler gen susturulması için başarılı sayılmaktadır. Bununla birlikte  $\%10$  susturulma oranı olan çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Yin ve ark., 2011).

Çalışmada, susturma yapıldıktan 14 gün sonra çıkan bitkinin 4. ve 5. yaprakları kesilerek agar ortamına alınmış, kesilen yapraklara *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* uygulanmış, uygulamadan sonra 3. ve 5. günler alınan örnekler mikroskop altında incelenmiştir. Değerlendirmeler negatif kontrol bitkisine göre (BSMV:00) yapılmıştır. Negatif kontrol örneklerinde susturma için kullanılan  $\gamma$  vektörü boş bir şekilde yollanmış ve sistem tarafından bitkide yaratılabilecek olan tepkiler dikkate alınmıştır.

Susturulan genin pozitif veya negatif etkisi olması durumunda hassasiyet tepkisinin çok belirgin olarak artması (hassas bitkinin direnç göstermesi) veya azalması (hif uzunluğunun 2-3 katına çıkması gibi) beklenmektedir (Hein ve ark., 2005; Dagdas ve ark., 2009; Yuan ve ark., 2011). Çalışmada hastalık uygulamasından sonra kontrol bitkileri (BSMV:00) ile *HvCAS* geni susturulmuş bitkiler arasında karşılaştırma yapılmıştır. Patojen uygulamasından sonra 3. gün çimlenme verimi  $20,14\pm 7,27$ 'den  $22,33\pm 2,5$ 'e, 3. gün hif uzunlukları  $90,18\pm 15,16$ 'dan  $105,33\pm 5,33$ 'e ve 5. gün çimlenme verimi ise  $202,67\pm 12,5$ 'den  $218,67\pm 5,33$ 'e yükselmiştir. Değerlendirmeler sonucunda direnç veya hassasiyet tepkisinde beklenen belirgin etki istatistiksel açıdan saptanamamıştır. *HvCAS* genini ile ilgili literatürde bulunan tek çalışma arpa külleme hastalığı sırasında ekspresyonunun artmasıdır (Yıldırım-Ersoy ve ark., 2011). Fakat fonksiyonel genomik çalışmamızda *HvCAS* genin arpada külleme hastalığına karşı oluşan tepki sırasında önemli bir etkisinin olmadığını gösterilmiştir.

## Sonuç

Arpada *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* enfeksiyonu sırasında gen ekspresyonu artışı tespit edilen arpa *CAS* geni çalışmada BSMV-VIGS yöntemi kullanılarak ortalama  $\%54$  oranında susturulmuştur. Susturma yapılan bitkiler negatif kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında külleme hastalığına karşı oluşan direnç ve hassasiyet tepkilerinde belirgin bir değişim saptanamamıştır. Çalışmada susturulan *HvCAS* geni arpada külleme hastalığına karşı direnç tepkisi sırasında ekspresyonunda artış olmasına rağmen gen fonksiyonel olarak tek başına direnç tepkisinin değişiminde etkili bulunmamıştır.

## Teşekkür

Çalışma TÜBİTAK 110T984 nolu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Ausubel, F. M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature Immunology*, 6(10), 973-9.
- Bai, Y., Pavan, S., Zheng, Z., Zappel, N.F., Reinstädler, A., Lotti, C., ve De Giovanni, C. 2008. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of mlo function. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(1), 30-9.
- Baulcombe, D. C. 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 109-13.
- Bhat, R. A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., ve Panstruga, R. 2005. Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 3135-40.
- Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., ve Pastan, I. 1995. Cloning and

- characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(22), 10427–31.
- Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., Scherf, U., ve Pastan, I. 1996. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biochemistry*, 35(21), 6891–9.
- Brinkmann, U. 1998. CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *American Journal of Human Genetics*, 62(3), 509–13.
- Brunner, S., Stirnweis, D., Diaz Quijano, C., Buesing, G., Herren, G., Parlange, F., ve Barret, P. 2012. Transgenic Pm3 multilines of wheat show increased powdery mildew resistance in the field. *Plant Biotechnology Journal*, 10(4), 398-409.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., ve van Daelen, R. 1997. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *The Cell*, 88(5), 695-705.
- Cakir, C., Tör, M. 2010. Factors influencing Barley Stripe Mosaic Virus-mediated gene silencing in wheat. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 1-24.
- Consonni, C., Humphry, M. E., Hartmann, H. A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., ve Vogel, J. 2006. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature Genetics*, 38(6), 716-20.
- Dagdaz, Y. F., Dagdas, G., Unver, T., ve Akkaya M. S. (2009). A new ZTL type F-box functions as a positive regulator in disease resistance: VIGS analysis in barley against powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 41–44.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ve Rudd, J. J. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-30.
- Dinesh-Kumar, R., Anandalakshmi, R., Marathe, M., ve Schiff, L., 2003. Virus-induced gene silencing. *Methods in Molecular Biology*, 236, 287-94.
- Dubery, I. A., Sanabria, N. M., ve Huang, J. C. 2012. Nonself perception in plant innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 738, 79-107.
- Eichman, R., ve Huckelhoven, R. 2008. Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology*, 165, 5-18.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-96.
- Glawe, D. A. 2008. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 27-51.
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen M., Soenderby, I. E., Sundar. S. Jarmolowski. A., Shirasu, K., ve Lacomme, C. 2005. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiology*, 138, 2155-64.
- Holzberg, S., Brosio, P., Gross, C., ve Pogue, G. P. 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, 30(3), 315-27.
- Humphry, M., Reinstädler, A., Ivanov, S., Bisseling, T., ve Panstruga, R. 2011. Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea *er1* plants is conferred by natural loss-of-function mutations in *PsMLO1*. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 866-78.
- Ing, B. 1990. An introduction to British powdery mildews-1. *Mycologist*, 4(2), 88-90.
- Inuma, T., Khodaparast, S. A., ve Takamatsu, S. 2007. Multilocus

- phylogenetic analyses within *Blumeria graminis*, a powdery mildew fungus of cereals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(2), 741-51.
- Jones, J.D.G., ve Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature.*, 444(7117), 323-9.
- Jørgensen, J. H. 1988. *Erysiphe graminis*, powdery mildew of cereals and grasses. *Advances in Plant Pathology*, 6, 135-57.
- Kim, M. C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., ve Park, H. C. 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 416(6879), 447-51.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., ve Gorlich, D. 1997. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *The Cell*, 90(6), 1061-71.
- Lacomme, C., Hrubikova, K., ve Hein, I. 2003. Enhancement of Virus-induced Gene Silencing through viral-based production of inverted-repeats. *The Plant Journal*, 34, 543-53.
- Pfaffl M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29(9)**: e45.
- Ridout, C. J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J. D. G., ve Brown J. K. M. 2006. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *The Plant Cell*, 18, 2402-14.
- Scherf, U., Pastan, I., Willingham, M. C., ve Brinkmann, U. 1996. The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), 2670-4.
- Scofield, S. R., Huang, L., Brandt, A. S., ve Gill, B. S. 2005. Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the Lr21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiology*, 138, 2165-73.
- Spoel, S. H., ve Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89-100.
- Vandessompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., ve Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (7), research 0034.1-0034.11.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, 17, 449-59.
- Wyand, R. A., ve Brown, J. K. M. 2003. Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. *Molecular Plant Pathology*, 4(3), 187-98.
- Yildirim-Ersoy, F., Ridout, C. J., ve Akkaya, M. S. 2011. Detection of physically interacting proteins with the CC and NB-ARC domains of a putative yellow rust resistance protein, Yr10, in wheat. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 118 (3/4), 119-26.
- Yin, C., Jurgenson, J. E., ve Hulbert, S. H. 2011. Development of a Host-Induced RNAi System in the Wheat Stripe Rust Fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 554-561.
- Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A. O., Liu, Z., Han, C., Yu, C., ve Li, D. 2011. A high throughput barley stripe mosaic virus vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PLoS ONE*, 6, e26468.
- Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Skamnioti, P., ve Gurr, S. J. 2005. Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. *Molecular Plant Pathology*, 6, 561-75.

Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Valè, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., ve Schulze-Lefert, P. 2001. Cell-autonomous expression of barley Mla1 confers

race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a Rar1-independent signaling pathway. *Plant Cell*, 13, 337-350.