

Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler

Mahmut TÖR

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Antalya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 25.11.1996

Özet: Bitkiler içerisinde buldukları ortamlarda biyotik ve abiyotik etmenler tarafından devamlı şekilde uyarılırlar. Bu uyarıcılar hücre membranında bulunan reseptörler tarafından alınarak sinyal iletişimi yoluyla hücre içerisindeki gerekli yerlere iletilirler. Alınan bu sinyallere göre de bitkide bir tepki oluşur. Söz konusu durum konukçu-patojen ilişkileri açısından incelendiğinde, patojenlerin *avr* genlerinin ürünleri, konukçunun *R* geninin proteini tarafından tanınmaktadır. Daha sonra bu *R* genleri, fosforilasyon yoluyla diğer genleri harekete geçirerek bitkideki tepki ve savunma mekanizmasını aktif hale getirmektedir. Sonuçta da bitki hücresi intihar ettiği gibi, apoptosis, kendisine saldıran patojeni de öldürmektedir. Gerek patojenlerin *avr* genleri ve gerekse bitkilerin *R* genlerinin moleküler klonlaması süratle devam etmektedir. Bu güne kadar klonlanan genlerden elde edilen bilgiler, *avr* genlerinin ürünlerinin suni olarak üretilebileceğini ve bitkiler üzerine püskürtüldüğünde, savunma sistemini çalıştırabileceğini göstermektedir. Bu yolla da klasik pestisidlere alternatif bulunarak, bitkilerin genetik manipülasyonuna gerek kalmadan patojenlere karşı korunması sağlanabilecektir.

Anahtar Sözcükler : Avirulent, dayanıklılık, konukçu bitki-patojen tanışması, gene-karşı-gen, HR, transpozon, gen aktivasyonu

Recent Developments In Molecular Plant-Microbe Interactions

Abstract: Generally, plants are affected by biotic and abiotic elicitors in nature. These elicitors are recognized by receptors on the plasma membrane and the information is passed to the responsible part of the cell via a signal transduction pathway. In terms of plant-pathogen interaction, the products of *avr* genes of the pathogens are recognized by the products of *R* genes of the host plant. Following recognition, the other genes, including kinases, in the cascade are phosphorylated and the defence mechanisms of the plant are activated. As a result, the plant cell commits suicide and the growth of the pathogen is restricted. Until now, several *avr* and *R* genes have been cloned or at advanced stages of being cloned. The data obtained from the molecular cloning of these genes indicate that *avr* gene products could be produced artificially, and when sprayed onto the plants, would activate the defence mechanisms in the absence of pathogens. This would mean, in the long term, alternative compounds to the classical pesticides could be found. As control agents, they may even find a place within the biotechnical control of plant diseases.

Key Words: Avirulent, resistance, plant-pathogen recognition, gene-for-gene, HR, transposon, gene activation.

Giriş

Bitkiler, yaşadıkları alan ve şartlar ne olursa olsun, içinde buldukları çevreyi tanıma ve o ortama adapte olma işlevini çeşitli moleküler ve fizyolojik olaylar sayesinde ger-

çekleştirirler. Hayatlarını idame ettirebilmek için, topraktan minarelleri bularak üst aksama taşıma, güneş enerjisinden faydalanarak fotosentezi gerçekleştirme, su alımını ve kullanımını düzenleme gibi faaliyetlerde bulunmak zorundadırlar. Bütün bu işlemler, içerden ve dışardan gelen moleküler sinyalleri alan ve bunlara cevap veren, yüksek düzeyde gelişmiş özel dokular sayesinde gerçekleştirilir. Bitkiler aynı zamanda, içerisinde buldukları ortamı diğer canlılarla (patojen ve simbiyontlar gibi) paylaşmak ve hatta onlarla zaman zaman rekabet etmek zorundadırlar. Bitkiler ve diğer canlılar arasındaki ilişki, botanik, ekoloji, fizyoloji, mikrobiyoloji gibi birçok ana bilim dallarının çalışma ve araştırma konusu olmuştur. İnsan-öğlü, bitkilerin patojenlerden nasıl korunduklarını anlamada özel bir çaba sarf etmiş ve bu taraflı yaklaşım sonucu, bitki patojen-ilişkilerinde ciltler dolusu araştırma sonuçları ortaya çıkmıştır.

Bitki hastalıklarının inceleyen bilim dalı "fitopatoloji"deki araştırmalar, çeşitli alanlara yönelerek, temel işlemlerin anlaşılmasına ve elde edilen bilgilerin tarımsal problemlerin çözümünde kullanılmasına imkan tanımıştır. Bununla birlikte, bitkilerin savunma mekanizmalarından sorumlu moleküler ve hücresele olayların anlaşılması, daha başlangıç safhasındadır. İnfeksiyonun erken döneminde görülen ve bitkide "aktif" savunmanın başlangıcı kabul edilen olaylar, patojenin tanınması ve ortaya çıkan sinyalin tüm hücreye ve komşu dokulara iletişimi göz önüne alındığında, elde edilen bilgiler daha çok yenidir ve son iki-üç yılda gerçekleştirilen çalışmaların ürünüdür. Bu olayların detaylı bir şekilde anlaşılması, temel ve uygulamalı fitopatoloji yönünden çok önemlidir. Çünkü, bitkide gözle görülebilen dayanıklılık fenotipinin tek sorumlusu bu olaylardır. Günümüzde yapılan ve gelecekte yapılacak olan moleküler çalışmalar, bitkilerin patojenleri nasıl tanıdıklarını, buldukları ortamdaki canlıların zararlı mı yoksa zararsız mı olduğuna nasıl karar verdiklerini anlamada büyük faydalar sağlayacaktır.

Bu makalenin amacı, konukçu-patojen ilişkilerinin genetiği ve biyokimyası üzerinde yapılan çalışmaları son gelişmeleriyle birlikte vermektir. Burada önce, genel bir yaklaşımla bu alanda kullanılan terminoloji açıklanarak, konukçu-patojen ilişkilerinin genetiği ve bu ilişkilerde ortaya çıkan biyokimyasal olaylar anlatılacaktır. Daha sonra da, son bir kaç yıl içerisinde ulaşılan gelişmeler ve moleküler teknikler kullanılarak elde edilen dayanıklılık genlerinin özellikleri verilecektir. En sonunda da, elde edilen bilgilerin ışığı altında moleküler ve genetik çalışmaların fitopatoloji alanında nereye doğru yol aldığı tartışılacaktır.

Bitkiler ve patojenler: Genel bakış ve terminoloji

Tarımsal alanda ekonomik öneme sahip hastalıklar daha fazla çalışıldığı için, konukçu patojen arasındaki ilişkileri tanımlamada kullanılan terminoloji de bu yönde gelişmiştir. Bunun sonucu olarak, fitopatoloji kendini daha çok ekonomik bitki-patojen ilişkileriyle sınırlamıştır. Çok sık kullanılan iki terim, parazit ve patojen, zaman zaman aynı anlamda kullanılmış ise de aralarında temel bir fark vardır. Bir organizmanın başarılı bir parazit olabilmesi için konukçuda yaşayabilmesi ve orada çoğalabilmesi gerekir. Bunun yanında konukçu bitkide hastalık meydana getirmesi gerekmez. Ne zaman bu parazit, konukçuya zarar verir ve hastalık meydana getirir, o zaman patojen olarak adlandırılır. Bir başka deyişle patojenin mutlaka bir parazit olması gerekirken, bunun tam tersi-parazitin patojen olması-gerekmez (1). Patojen

tarifinin bu şekilde sınırlı tutulması, bazan yanlış anlaşılmalara ve tartışmalara neden olmaktadır. Çünkü, bir etmen belirgin çevre koşulları altında bir bitkinin patojeni olurken, bir başka çevrede aynı bitkinin patojeni olamamaktadır. Bu da konukçu-patojen ilişkilerini anlamada sınırlama meydana getirmektedir.

Buna benzer bir başka taraflı yaklaşım da “dayanıklılık” terminolojisinde görülmektedir. Bir patojenin normal yaşımını devam ettirdiği konukçu bitki hassas, **patojen de virulent** olarak adlandırılmaktadır. Konukçu ile patojen arasındaki ilişki ise **uyumlu** olarak tarif edilir. Buna karşılık, patojen bitkide herhangi bir zararlama meydana getirmiyor, normal yaşımını devam ettiriyor ve bitkiyi istila ederek çoğalmasını sürdürüyorsa bu bitki o patojene **toleranttır**. Ancak, bitki bu patojenin gelişme ve çoğalmasını çeşitli nedenlerle (aşağıda açıklanmıştır) tamamıyla durduruyor ise bu bitki genel anlamıyla **dayanıklı** olarak kabul edilmekte de patojen de **avirulent** olarak adlandırılmaktadır. Dayanıklı bitki ile patojen arasındaki ilişki de uyumsuz olarak kabul edilir (1, 2, 3, 4). Zaman zaman yanlış anlaşılmalara da neden olan bu terminoloji Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Konukçu-Patojen ilişkilerinde kullanılan terminoloji. Konukçu-patojen ilişkilerini açıklamada 3 farklı terim seti kullanılmaktadır. Patojenin izolatları ya virulent ya da avirulent, bitkinin genotipleri ise ya dayanıklı ya da hassas, aralarındaki ilişki ise, ya uyumlu ya da uyumsuz olarak tarif edilir. Burada dikkat edilecek nokta, terimlerden herhangi biri, örneğin “virulent bir patojen”, kullanıldığında diğer terimlerin de “hassas bir bitki” ve “uyumlu bir ilişki”, kullanılması da gerekmektedir.

Patojenin İzolatları	Konukçu Bitkinin Genotipi		Konukçu Olmayan Bütün Bitkilerin Genotipi
	Dayanıklı	Hassas	Dayanıklı
Avirulent	Uyumsuz	Uyumlu	Uyumsuz
Virulent	Uyumlu	Uyumlu	Uyumsuz

Aralarındaki İlişki

Bitki türleri, Vavilov merkezlerinden, bir başka deyişle gen kaynağı dağılım merkezlerinden, diğer yerlere yayılmaları esnasında, bariz morfolojik, ekolojik ve coğrafik gru-

plar halinde farklılaşmaya uğramışlardır (5). Böyle bir süreç içerisinde, bu bitkilerin patojenleri de kendilerini bu değişmeye adapte etmişlerdir. Bu şekilde birlikte bir evrim geçirme sözkonusudur ve şüphesiz bu olay devam edip gidecektir. Bu gelişmeler esnasında, bitkiler kendilerini patojenlerden koruma yolları olarak çeşitli engeller de geliştirmişlerdir. Mumsu tabaka ve lignin birikmesi olan hücre duvarları, fiziksel engellere verilecek en güzel örneklerdir. Böyle bir savunma mekanizması, genelde bütün patojen türlere karşı etkilidir.

Daha aktif ve daha etkili bir savunma sistemi ise, aşırı duyarlılıktır (Hipersensitif Reaksiyon, HR) (6). Böyle bir dayanıklılık şekli, belirli bir patojenin bazı ırklarına karşı ortaya çıkabilirken (ırka-özü-dayanıklılık; vertikal dayanıklılık; rece-specific-resistance), patojenin tüm ırklarına karşı, (ırka-özü olmayan-dayanıklılık; horizontal dayanıklılık veya genel dayanıklılık; race-non-specific-resistance) da olabilmektedir (7,8). HR olayında patojen ile temasa geçen konukçu hücre ve bu hücreyi çevreleyen komşu hücreler hızlı bir şekilde ölmekte ve nekrotik lekeler halinde kurumaktadır (9). HR ile birlikte, hücre duvarlarında değişmeler, kalloz, fenolik polimerler, lignin, suberin, hidroksi prolince zengin glikoproteinler (109) ve en önemlisi antimikrobiyal bileşikler, fitoaleksinler (11), sentezlenmekte ve infeksiyon noktalarına lokazile olmaktadır. Bitki patojene karşı oluşturduğu böyle bir tepkiyle, patojenin besin alımını engelleyerek gelişmesini durdurduğu gibi bundan sonra olabilecek ikincil infeksiyonlardan da kendini korumaktadır (12,13).

Konukçu-patojen ilişkileri

Patojenlere konuculuk eden bitkiler, içerisinde buldukları ortamda defalarca gerek biyotik (mikro-organizmalar, simbiyontlar vb. gibi canlı etmenler) ve gerekse abiyotik (O_2 , CO_2 , toz, UV ışığı vb. gibi cansız etmenler) faktörler (uyarıcılar) tarafından etkilenirler. Bu uyarıcılar yine genelde hücre membranlarında yer alan çeşitli algılayıcılar (reseptörler) tarafından alınarak hücre içerisindeki gerekli yerlere iletilirler (sinyal iletimi). Alınan bu sinyallere göre de bitkide bir tepki oluşur (Tablo 2).

Uyarıcı	Reseptörün Yeri	Sinyal İlişkisi	Tepki
Kırmızı ışık	Hücre membranı	Ca^{2+}	Fotomorfogenezis
Mavi ışık	Hücre membranı	Ca^{2+}	Fototropizm
Dokunma	Hücre membranı	Ca^{2+}	Tendril kıvrılması
Sıcaklık	Hücre membranı	H^+/Ca^{2+}	Çiçek açma
H_2O	Hücre membranı	Elektrik değişimi	ABA birikimi
CO_2	Suda çözünür	H^+	Stoma kapanması
O_2	Hücre membranı	H^+	Büyümenin teşviki
Nitrat ve fosfat	Hücre membranı	H^+	Köklerde dallanma

Tablo 2.

Bitki hücrelerini etkileyen uyarıcılardan bazıları ve bu uyarıcıların alınmasında görev alan reseptörlerin yeri ile bitkinin bu uyarıcılara karşı gösterdiği tepki (14).

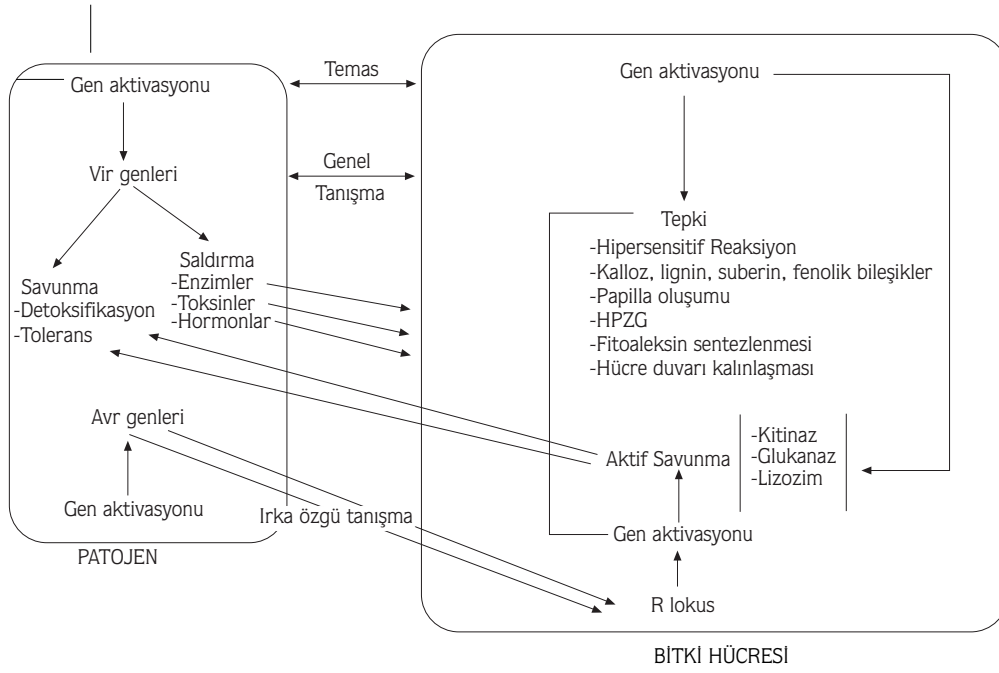
İşte, konukçu-patojen ilişkileri de bu açıdan incelenirse, bitkilerde patojene karşı bir tepki olarak ortaya çıkan dayanıklılık olgusu daha iyi anlaşılacaktır. Konukçu-patojen ilişkilerinde

ilk basamak, patojen ile konukçu bitki arasında fiziksel bir temasın kurulmasıdır (15). Bu temas bitkinin toprak üstü aksamında, "fillosfer", olduğu gibi, bitkinin toprak altında kalan aksamında, "rizosfer", da olabilir. Bu ilk temas kurulduktan sonra, patojen ile konukçu arasında bir tanışma olayı gerçekleşir (8, 16, 17, 18, 19). Bu olay ile patojen, karşılaştığı bitkinin kendi konukçusu olup olmadığına karar verirken, konukçu bitki de, gelen uyarıcının bir patojenden olup olmadığını ve ona karşı nasıl bir reaksiyon verebileceğini tespit eder. Her ne kadar bu tanışma olayı daha yeni anlaşılmaya başlanmış ise de, patojenin bitkiyi tanımada düşük pH'nın veya bitkide bulunan özel metabolitlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Diğer taraftan bitkinin patojeni tanınması için, iki farklı yolun izlendiği belirtilmiştir. Bunlardan birincisi, genel bir mekanizma sayılan ve patojenin hücre duvarından veya kütüküla tabakasından açığa çıkan bileşiklerin bitki tarafından algılanmasıdır. İkincisi ise, daha detaylı çalışılmış olan ırka özgü-dayanıklılık mekanizmasında görülmektedir. Burada, bitkide bulunan spesifik bir tanışma geni (*R*-Recognition) patojenin avirulent (*avr*) geni tarafından üretilen bir antijeni tanınması olayı vardır (11, 20, 21, 22, 23, 24). Heriki tanışma yolu da yukarıda açıklanan aktif savunma mekanizmalarının tamamını (HR, lignin, süberin, kalloz vb.) aktive eder. Konukçu-patojen arasında görülen böyle bir uyumsuz ilişki, yukarıda açıklanan uyarıcı reseptör modeline uygulanırsa, *avr* gen ürünleri uyarıcı olurken hücre duvarında bulunan *R* geni ürünleri de reseptör görevi görmektedir. *R* geni ürünleri tarafından alınan sinyal herhangi bir yolla hücre içerisinde gerekli yerlere iletilindiğinde, bitkide aktif savunma sistemi ve tepki mekanizmasını çalıştırmakta ve sonuçta da dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (25, 26).

Diğer taraftan patojenler hayatını devam ettirmek isteyen ve bitkileri tamamıyla istila edebilmek için konukçunun potansiyel dayanıklılık mekanizmasını kırmaya çalışacaktır. Bunu yapabilmek için, ya yeni bir ırkını oluşturacak (mutasyon, rekombinasyon, heterosis veya paraseksüel döngü yollarıyla) ya da başka bir yolu deneyecektir. Böyle durumlar, doğal koşullarda sürekli devam etmektedir. İslahçının piyasaya sürdüğü dayanıklı çeşitler bir kaç yıl içerisinde patojenler tarafından aşılmaktadır (epidemik hastalıklarda boom ve bust döngüsü). Başarılı şekilde hayatını devam ettiren bir patojene bakıldığında, özellikle mildiyö, külleme ve pas gibi biyotrofik funguslarda, konukçu ile patojen arasındaki tanışmanın olmadığı ve HR ile diğer aktif savunma mekanizmalarının çalışmadığı görülmektedir (20, 27, 28, 29). Burada tanışmanın ve tepkinin baskı altında tutulduğu ve antimikrobiyal bileşiklerin detoksifike edildiği belirtilmektedir (8). Böyle bir mekanizma ile de konukçu-patojen ilişkileri uyumlu hale gelmektedir. Bütün bu işlemler şematize edilerek Şekil 1 de verilmiştir.

Konukçu-patojen ilişkilerinin genetiği: Irka-özgü dayanıklılık, gene-karşı-gen

Mendel'in kalıtım üzerine çalışmalarını yeniden değerlendiren bitki ıslahçıları, bu yüzyılın başlarında bitkilerde patojenlere karşı oluşan dayanıklılığın patojenin ırkına göre varyasyon gösterdiğini ve kalıtsal olduğunu bulmuşlardır. Bu ilk çalışmaları takip eden yıllar içerisinde, dayanıklılığın genelde tek bir gen (*R* geni) tarafından kontrol edildiği tespit edilmiş ve bu tip genlerden yüzlercesi tanımlanarak ıslah programlarında başarı ile kullanılmıştır. Daha sonraları, H. H. Flor'un keten ve keten pası Melanpsora lini üzerindeki öncül çalışmaları, bitkilerdeki dayanıklılığı sağlayan her bir gene karşı, patojende bu gene denk gelen ve



Şekil 1. Mikrobiyal bir patojen ile konukçusu arasında görülen ilişki düzeyleri. Oklar moleküler akımların yönünü göstermektedir. Konukçu açısından bakıldığında, olayların gelişme sırası şu şekilde olabilir; 1- patojen ile temas (bitki yüzey yapısı, patojenin oraya tutunabilirliği vb. faktörler rol oynar); 2- ırka-özü tanıma (patojendeki *avr* genleri ile konukçudaki *R* genlerinin ürünleri ilişkiye geçer); 3- gen aktivasyonu (*avr* ürününü tanıyan *R* geni ürünü diğer genleri aktif hale getirir); 4- genel tanışma (erken dönemde görülür ve, konukçu veya patojenden açığa çıkan kütikula ya da hücre duvarı parçacıkları sinyal iletiminde görev alırlar); 5- sinyal iletimini sonucu gen aktivasyonu olur ve tepki mekanizması çalışır. Her ne kadar iki farklı tanışma sistemi varsa da tanışmadan sonra gelen sinyal iletim sistemleri aynı olabilir. Vir, virulent; Avr, avirulent, HPZG, hidroksi prolince zengin glikoproteinler.

virülensliği kontrol eden bir genin (gene-karşı-gen, gene-for-gene) bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (30). Flor'un bu hipotezi o zamandan günümüze kadar funguslar, bakteriler, virüsler, nematodlar ve hatta böcekleri de içeren bir çok bitki-parazit ilişkilerine uygulanmıştır (12). Birçok durumda, patojende avirulentlik ve konukçuda da dayanıklılık dominanttır, fakat nadir olan bunun tersi de görülebilmektedir. Genel olarak, patojenin *avr* genindeki bir değişmeyle (mutasyon gibi herhangi bir nedenle), bitki patojeni tanımamakta ve sonuçta da dayanıklılıktan ziyade normal hastalık seyri devam etmektedir. Dolayısıyla, tanışmanın sağlanabilmesi için, bitkideki *R* geninde de belirgin bir değişikliğin yayılması gerekmektedir. Yine buradan da anlaşılıyor ki, dayanıklılık; konukçu ve patojen arasındaki özel bir tanışma sonucu ortaya çıkmaktadır.

Flor'un öncül çalışmalarından buyana 40 yıl gibi bir süre geçmesine rağmen, keten ve keten pası, *M. lini*, üzerindeki çalışmalar, genetiği en iyi irdelenmiş ve detaylı olarak çalışılmış konukçu-patojen ilişkileri olmaya devam etmektedir (Tablo 3). Gerek Flor ve ge-

rekse onu takip eden araştışıcıların bu zamana kadar yaptıkları çalışmalarda patojenin genetiğinden ziyade konukçu genetiğine doğru bir eğilim görülmektedir. Örneğin Flor'un çalışmalarında, virulensin tespiti için fungusun 20 farklı ırkı birbirleriyle melezlenirken, dayanıklılığın tespiti için 150 den fazla konukçu bitki birbirleriyle melezlenmiş ve bitki genomunda en az 5 farklı lokusun (K, L, M, N, P) dayanıklılıktan sorumlu olduğu belirlenmiştir (31, Jeff Ellis, şahsi görüşme). Benzer çalışmalarda, bu durum daha açık ve net olarak ortaya çıkmaktadır.

Tablo 3. Konukçu ve patojenin genetik düzeyde ilişkileri ve bu ilişkinin fenotipe yansımaları, ya hassas (H), ya da dayanıklı (D). Söz konusu genomlar, konukçuda RR: Rr ve patojende AA: Aa: aa.

		Konukunun Genotipi		
Patojenin Genotipi	RR	Rr	rr	
AA	D	D	H	
Aa	D	D	H	
aa	H	H	H	
		Interaksiyon fenotipi		

Arpada külleme hastalığına (*Erysiphe graminis*) karşı dayanıklılık sağlayan M1-a lokusları ve mısırdaki pas hastalık etmeni *Puccinia sorghii*ye karşı *Rp* gen kümeleri (13) verilebilecek en iyi örneklerdir. Bu taraflı yaklaşım büyük bir ihtimalle, dayanıklılık sağlayan genlerin ekonomik öneminden ve bitkilerin melezlemelerinin patojenlerinkinden daha kolay olmasından kaynaklanmaktadır.

Konukçu-patojen arasındaki taņıřmanın ve doğal populasyonlarda gene-karşı-gen ilişkilerinde görülen evrimin moleküler düzeyde anlaşılması uzun yıllar sır olarak kalmıştır. Fakat bu sır, recombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle yavaş yavaş ortadan kalkmış ve gerek *avr* ve gerekse *R* genlerinin yapısı aydınlatılmış konukçu-patojen ilişkilerine bambaşka bir açıdan bakabilme fırsatı yakalanmıştır.

Avr genlerinin moleküler klonlanması

—Bütün çalışmalar *R* genleri eğilimli olmasına rağmen, moleküler klonlanması yapılan ilk gen, bu *R* genlerine karşılık gelen *avr* genlerinden gelmiş ve fungal patojenlerden değil de bakteriyel patojenlerden izole edilmiştir. Bakterilerin moleküler manipulasyonlarının daha kolay olması, bakterilerin transformasyonunun çok basit bir şekilde gerçekleştirilmesi *avr* genlerinin izolasyonunda önemli katkıları olmuştur. Bakteriyel *avr* genlerini izolasyonunda izlenen yol genelde şu şekildedir; Dayanıklı bir çeşitte HR oluşturan bakterinin genomik kütüphanesi hazırlanıp, elde edilen rekombinant klonlar bakterinin aynı çeşitte hastalık oluşturan uyumlu ırkına (virulent ırka) aktarılır ve tüm klonlar teker teker konukçu bitkiye inokule edilerek testlenir. Testleme sonucunda konukçu bitkide HR oluşturan koloni aranır (normalde hastalık yapan virulent ırk, *avr* genini taşıdığı için ve *avr* dominant olduğu için HR ortaya çıkacaktır). Böylelikle, *avr* genini taşıyan klon tespit edilir ve baz dizilim (sequenz) analizi yapılarak genin yapısı ve ürünü hakkında bilgi edinilir. Bir başka yöntem ise, avirulent ırka transpozan geni aktararak *avr* geninde mutasyon oluşması beklenir ve yine bu yolla da *avr* geni izole edilir. Her iki yöntem de günümüze kadar başarı ile kullanılmıştır. Transpozan yöntemi bakteriyel genetikte daha çok kullanılmakta ve daha kolay sonuç getirmektedir.

Bakteriyel *avr* genlerinde ilk çalışmaları başlatan Staskawicz ve arkadaşlarıdır. Bu araştırmacılar (32) *Pseudomonas syringae* pv. *glycinia* ve soya fasulyesi üzerine yaptıkları çalışmalarda, bu bakterinin Psg1, Psg4 ve Psg5 izolatlarının soyanın Acme, Chippewa, Harasoy ve Pekin kültürlerinde hastalık oluşturduklarını (virulent ırklar) fakat Psg6 izolatının bu kültürlerle avirulent olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra bu araştırmacılar, Psg6 izolatından avirulentliği kodlayan 1.4kb uzunluğundaki bir DNA parçacığını izole ederek diğer virulent ırklara başarılı bir şekilde aktarılmışlar ve bu ırkların da gen aktarımından sonra avirulent olduklarını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmayı takip eden yıllarda, farklı bakteri-konukçu ilişkilerinden yararlanılarak yeni *avr* genleri izole edilmiştir. Yine Staskawicz'in laboratuvarında, biber ve bakteriyel hastalık etmeni *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* üzerinde yapılan çalışmalardan bu patojenin bir ırkının (Race 1), biber çeşidi ECW-30R'te HR oluşturduğu tespit edilmiş ve daha sonra bu ırktan izole edilen *avr* geninin, *avrBs3*, biberde HR oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir (33). Yine aynı şekilde ve aynı laboratuvardan, ve soya fasulyesi ile *Arabidopsis*'in bakteriyel patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*'nın *avr* geni izole edilmiştir (34).

Staskawicz'in çalışmalarına benzer araştırmalar diğer laboratuvarlarda da devam etmiş, ve *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (35), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (36, 37), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (38), *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* (39) gibi diğer fitopatojenik bakterilerden de *avr* genleri izole edilmiştir.

Bakteriyel patojenleri takiben fungal patojenlerin *avr* genleri da bu konularda çalışmalar yapan araştırmacıların ilgi alanına girmiştir. Funguslardan *avr* genlerini klonlamak bakterilerindeki kadar kolay olmamıştır. Bu da tamamiyle organizmadan kaynaklanmaktadır.

Fungal patojenlerde *avr* üzerine yine ilk detaylı çalışmalar Flor'un patojeni de diyebileceğimiz *Melampsora lini* den gelmiştir. Timmis ve ark (40) *M. lini*'nin avirulent ırkını gamma radyasyonuna tabi tutarak delesyon mutasyonu yaklaşımı ile *avr* genini izole etmeyi başarmıştır. Bu çalışmalarından bir çok mutant tipler elde etmişler, ve daha sonra, subtraktif hibridizasyon metodunu kullanarak, yabancı tipte olupta mutant tipte delesyona uğrayan 250bp lik bir DNA parçacığını izole etmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarıyla, bu DNA parçacığının *avr* genlerine bağlantılı (linkage) olduğunu göstermek istemişlerdir. Bunu yapabilmek için bu DNA'nın virulent bir ırka aktarılması ve bu ırkın avirulent hale dönüşmesi gerekmektedir. Ne yazıkki, keten pası için henüz bir transformasyon sistemi kurulmamıştır.

Üzerinde büyük çalışmalar yapılmış ve genetik olarak iyi karakterize edilmiş bir başka fungus ise, marul mildiyö etmeni *Bremia lactucae*'dir. Gerek Crute (14) ve gerekse Hulbert ve ark. (42)'nin yaptığı çalışmalarda *B. lactucae*'da en az 13 *avr* geni tespit edilmiş ve bunların tamamının tek ve dominant genler oldukları gösterilmiştir. Bu genlerin ürünleri hakkında bilgi edinmek için yapılan biyokimyasal çalışmalar ne yazıkki başarılı bir sonuç vermemiştir (20, 43). Michelmöre'un grubu daha sonra moleküler bir yaklaşım izliyerek RFLP ve RAPD tekniklerini kullanarak *avr* genlerini hatırlamaya gitmişlerdir (42, 44, 45). Yapılan haritalama ve kromozomlarda yürüme sonucunda *avr* gelerinden bir tanesi 160kb lık bir bölgeye sınırlanmış olup geni klonlama çalışmaları hızla devam etmektedir. Bukadar çalışma ve çabalara rağmen tıpkı *M. lini*'de olduğu gibi, *Bremia* da genetik transformasyon zorluğu ile karşı karşıyadır.

Avr genlerinin çalışıldığı fakat henüz bir sonuca ulaşılmayan iki fungal patojen ise *Magnophorthe grisea* (çeltik ve diğer tahıllarda etkili) ve *Rhynchosporium secalis* (arpada önemli) tir. Her iki fungusta da konukçu patojen ilişkileri detaylı olarak çalışılmış *avr* genlerinin sayısı belirlenmiş ve o genleri klonlamak için gerek biyokimyasal ve gerekse moleküler düzeyde çalışmalar devam etmektedir (46, 47, 48, 49, 50).

Klonlanan ilk fungal *avr* geni, domateste mavi küf hastalığından sorumlu, hemibiyotrof bir fungus olan *Fulvia fulvum* (*Cladosporium fulvum*)'dan elde edilmiştir. Uzun yıllardır bu konuda çabalar gösteren de Wit ve grubu bu fungustan *avr* genlerini izole edebilmek için farkı bir yöntem izlemişlerdir. Genelde genden proteine gidilerek yapılan çalışmaların tersine, de Wit ve grubu proteinden gene doğru gitmişlerdir. Diğer çalışmalarda olduğu gibi, onlarda önce fungus ile konukçusu arasındaki ilişkileri detaylı olarak incelemişler (51) ve fungus ile konukçusu arasında gene-karşı-gen ilişkilerinin olduğunu tespit etmişlerdir (50). Daha sonra, aynı araştırmacılar fungusla infekteli hassas bir bitkiden izole ettikleri apoplastik sıvıyı (hücrelerarası boşluktaki sıvı) dayanıklı domates çeşitlerinin yapraklarına injekte etmişlerdir. Dolayısıyla fungusun spor veya hifleri olmadan da dayanıklı bitkide tepki mekanizmasının aktive edilebileceğini göstermişlerdir. Aynı sıvı hassas çeşitlere injekte edildiğinde herhangi bir tepki ise görülmemiştir (52). Apoplastik sıvıda bulunan ve dayanıklı bitkideki *R* genini (*Cf-9*) tanıyan protein, daha sonra saflaştırılarak amino asit sekansı elde edilmiş ve bu amino asit zincirini kodlayabilecek DNA parçacığından oligonükleotidler sentezlenmiştir. Bunlarla fungusunun cDNA kütüphanesi taranarak o proteini kodlayan cDNA klonu tanımlanmış, yapılan moleküler çalışmalarla bu klonun aynı *avr* genini (*avr9*) taşımayan diğer fungal izolatlarda

bulunmadığı gösterilmiştir. Ayrıca bu klon *Cf-9* da hastalık yapan virulent bir izolata aktarıldığında bu izolat avirulent hale gelmiş ve *Cf-9* geni tanınarak HR görülmüştür (53).

Dayanıklılık genlerinin moleküler klonlanması

Uzun yıllardır beklenen, konukçu-patojen ilişkilerinin köşe taşı da sayılabilecek ve *avr* genlerini tamamlayacak olan dayanıklılık, *R*, genlerinin moleküler klonlanması nihayet başarılmıştır. Son birkaç yıl içerisinde bakteriyel, fungal ve viral patojenlere dayanıklılık sağlayan en az 7 farklı *R* geni klonlanmış ve konukçu-patojen ilişkilerinin anlaşılmasında bir dönüm noktası başlatılmıştır. İzole edilen bu genler ile dayanıklılık fenotipinin oluşması için gerekli UYARICI-RECEPTÖR-SİNYAL İLETİŞİM mekanizmalarını içeren KARAKUTU'nun genetik ve biyokimyasal olarak açılması sağlanmıştır. Bilim adamları, bu genleri klonlamak için ilkönceleri bu genlerde mutasyon oluşturmuşlar ve bu yolla *R* genlerini daha detaylı ve inceleme fırsatı elde etmişlerdir. Genelde kullandıkları mutasyon yöntemi ise transpozon tekniğidir (transposon tagging) (22). Asalanağzı bitkisinden izole edilen *Tam* elementleri, mısır bitkisinden klonlanmış *Acl*, *Ds*, *Spm* ve *Mu* elementleri transpozan tekniğinin temelini oluşturmaktadırlar. Bu elementler kullanılarak, mısır, tütün, domates ve kenten *R* genleri izole edilmiştir. Bilim adamlarının kullandıkları bir başka yöntem ise, genetik haritalamadır. *Arabidopsis* ve domates gibi genomları küçük ve tekrarlanan DNA organları çok az olan bazı bitkilerde genom haritalamaları çok daha kolay olmakta ve genin kromozomlar üzerindeki yeri tam olarak bilinmektedir. Genetik haritalama tekniği kullanılarak ta gerek *Arabidopsis*'ten ve gerekse domates bitkisinden *R* genleri izole edilmiştir.

Hernekadar birçok araştırmacı Flor'un modelini takip ederek çalışmalarını devam ettirmiş ve ilk dayanıklılık geninin de böyle bir modele dayalı konukçu-patojen ilişkisinden geleceği tahmin edilmiş ise de, ilk klonlanan gen tahminlerin dışında modele uymayan bir sistemden, *Helminthosporium*-mısır, çalışmalarından izole edilmiştir. Fungus, *H. carbonum*, toksin (HC toksin) üretmekte ve mısır bitkilerinin yapraklarında önemli zararlanmalar meydana getirmektedir. Bu fungusun 1 nolu izolatına karşı dayanıklılık sağlayan *Hml* geni *Mu* (*Mutator*) elementi kullanılarak mutasyona uğratılmış ve transpozan tagging yöntemi ile klonlanmıştır (54). *Hml* geni nikotinamide adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-a bağımlı HC toksin rektaz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim, patojenin 1 nolu izolatı tarafından üretilen HC toksini inaktif hale getirmekte ve dolayısıyla mısır kültürünü bu fungusu karşı dayanıklı kılmaktadır.

Klasik gene-karşı-gen ilişkilerine uyan ilk klonlanmış gen ise domates bitkisinin *PTO* genidir (55). *PTO* geni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*; bakterinin ırkı *avrPto* genini taşımakta)'ya karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Bu genin klonlanması için, genetik haritalama tekniği kullanılmış ve önce RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) problemleri ile *PTO* geninin 5 nolu kromozom üzerindeki yeri tespit edilmiştir. Daha sonra, bu genin olduğu yerdeki suni kromozomlar (YAC-Yeast Artificial Chromosome) belirlenerek, bu bölgedeki cDNA genleri izole edilmiştir. Takip eden çalışmalarla, *PTO* genine denk gelen cDNA klonu saptanarak bu gen hakkında bilgi edinilmiştir. *PTO* geni, serine-threonine protein kinase enzimini kodlamakta ve sinyal iletişiminde rol aldığı ileri sürülmektedir. Aynı gen has-

sas domates çeşitlerine transform edildiğinde, *avrPto* genini taşıyan bakteri ırklarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır.

Genetik haritalama yöntemi kullanılarak klonlanan bir başka gen ise *Arabidopsis thaliana*'nın *RPS2* genidir. Bu gen bakteriyel patojenlerden, *avrRpt2*'yi taşıyan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Ps. pv maculicola*'ya karşı dayanıklılık sağlamaktadır (56, 57). Bu genin ürünü, sinyal iletişimde rol almakta, nükleotik trifosfat bağlanmasında ve protein-protein ilişkilerinde görev yapmaktadır. Ayrıca, avirulent patojen tarafından üretilen *avr* gen ürününü tanımada reseptör görevini yüklenmektedir.

Klonlanan bir başka *Arabidopsis* geni ise, *RPM1* genidir. Bu gen de tıpkı *RPS2* gibi gene-karşı-gen sistemine uymakta ve haritalama yöntemi ile klonlanmıştır. Yine aynı şekilde, *Pseudomonas syringae*'nin iki farklı *avr* genini (*avrRpm1* ve *avrB*) tanımakta ve bu *avr* genlerini taşıyan bakterilere karşı dayanıklılık sağlamaktadır (58). Bu genin analizleri ve gen ürünü hakkındaki çalışmalar hâlâ devam etmektedir.

Fungal patojen *Cladosporium (Fulvia) fulvum* domateslerde önemli zararlar meydana getirmektedir. Bu patojenin 9 nolu izolatına (*avr9* genini taşıyan) karşı dayanıklılık sağlayan domatesin *Cf-9* geni mısır bitkisinin *Ds* transpozon elementi kullanılarak klonlanmıştır (59). Bu gen membrana bağımlı, ekstrasitoplazmik glikoproteinlerden sorumludur. Bu proteinler *avr9* geninin proteinleri ile bağlanarak bitkinin savunma sistemini aktif hale getirmektedir. *Cf-9* geni içermeyen hassas domates bitkileri patojenin *avr9* genleri ile transform edilmiş, ve bu hat daha sonra *Cf-9* geni ve *Ds* elementi taşıyan bir hat ile melezlenmiştir. Elde edilen F1 lerin çoğunluğunun öldüğü gözlenmiştir (59). Çünkü, *avr9* gen ürünü ile *Cf-9* gen ürünü birbirine bağlandığında sistemik HR (Hipersensitif Reaksiyon) gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, *Ds* elementi ile inaktif hale getirilen mutantlar yaşamıştır.

Fungal patojenlere karşı dayanıklılık sağlayan ve klonlaması yapılmış bir başka gen ise ketenin L⁶ genidir. Bu gen Flor'un fungusu *Melompsora lini*'nin 6 nolu izolatına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Mısır bitkisinin *Ac* (Activator) elementi kullanılarak önce bu gende mutasyon yapılmış ve sonra da normal transpozan tekniğindeki gibi gen klonlanmıştır (60). Bu gen iki farklı mRNA üretiminden kaynaklanan 1294 ve 705 amino asitten oluşan iki ürünü kodlamaktadır ve diğer *R* genlerindeki gibi patojenin *avr* gen ürününü tanımada rol oynamaktadır.

Fungal ve bakteriyel patojenlere ilaveten, bitki viral patojenlerine de dayanıklılık sağlayan gen klonlanması gerçekleştirilmiştir. Tütün Mozaik Virüsü (TMV)'ne dayanıklılık sağlayan tütün *N* geni yine mısır bitkisinin *Ac* elementi kullanılarak transpozan yöntemiyle klonlanmıştır (Whitham ve ark, 1994). *N* geni TMV'ye hassas tütün bitkilerine aktarıldığında bu bitkileri TMV'ye karşı dayanıklı kılmaktadır. Söz konusu gen 131.4 kDa büyüklüğünde bir polipeptidi kodlamakta, fonksiyonunun ise intercelluler reseptör olarak bitkideki tepki mekanizmasını teşviklemek olduğu ileri sürülmektedir (61).

Klonlanan *R* genlerinden ortaya çıkan gerçekler şu şekilde sıralanabilir. 1- hastalıklara dayanıklılık sağlamada iki sınıf genler söz konusu, bunlar *Hm1*'de olduğu gibi toksinleri detoksifike eden ve gene-karşı-gen sistemi içerisinde yer almayan genler. Hernekadar de-

toksifike eden genlerden günümüze kadar sadece bir tanesi klonlanmış ise de bunun örneklerini artacağı beklenmektedir. 2- gene-karşı-gen sistemi içerisinde yer alan genler (*RPS2*, *N*, *Cf-9*, *L⁶*, *RPM1*) bakteriyel, viral ve fungal patojenlere dayanıklılık sağlamaktaysa da, bu genlerin ürünleri incelendiğinde hepsinde üretilen proteinlerde bir Lusince zengin tekrar (LRR-Leucine-Rich Repeats) bölgesi dikkat çekmektedir. LRR motifleri genelde birçok hayvan ve bitki proteinlerinde bulunmakta ve protein-protein ilişkilerinde rol aldığı bilinmektedir (62). 3- *RPS2*, *N* ve *L⁶*, DNA düzeyinde önemli derecede birbirlerine benzerlik göstermekte bir başka deyişle aralarındaki homoloji çok yüksektir ve bu genler LRR'lara ilaveten Nükleotid Binding Site (NBS, ATG/GTP) içermektedir. 4- *R* genlerinin ürünleri reseptör olarak görev yapmakta ve genelde *avr* genlerinin ürünlerini tanımakta ayrıca *Cf-9*'da olduğu gibi ekstraselluler ve *N* ve *PTO* genlerinde olduğu gibi interselluler de olabilmektedir. 5- viral patojenlerde bakteriyel ve fungal patojenlerde olduğu gibi bir *avr* geni bulunmamakta, zira viral genomu bilindiği gibi daha basittir. Örneğin TMV 4 proteini kodlamaktadır (126 ve 183K, replikase enzimini; 30K hücreden hücreye hareketi ve 17.5K protein mantoyu oluşturmakta). Burada 126K proteinin tütünde HR oluşmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (61). Dolayısıyla, *avr* geni olmadan da dayanıklılık mekanizası teşvik edilebilmekte bir başka deyişle bazı diğer genler de *avr* geni vazifesi görebilmektedir.

Sonuç

Konukçu-patojen arasındaki ilişkilerin ilk basamağı olan tanışma olgusu açıklığa kavuşmaktadır. Gerek patojenin avirulent ve gerekse konukçu bitkinin tanışma genlerinden birkaç tanesi klonlanmış ve bundan sonra da bu konulardaki çalışmalar mutlak surette devam edip gidecektir. Birçok laboratuvar da gen klonlama ve yeni gen bulma çalışmaları süratle devam etmektedir. Dolayısıyla, bundan sonraki günlerde yukarıdaki listeye yenilerinin eklenmesi ve tanışma işleminin diğer patojenlerde de aynı olup olmadığı gözler önüne serilecektir. Bu bilgilerin elde edilmesiyle birlikte bu alanlarda faaliyet gösteren büyük firmalarda, özellikle dayanıklılık ıslahı yapan tohum şirketlerinde, pestisid üretiminde bulunan dev dünya şirketlerinde de bu konularda kıpırdanma görülmektedir. Zira bulunan dayanıklılık genlerinin patentleri bu firmalar tarafından elde edilmekte ve kendi programlarına kazandırılmaktadır. Diğer taraftan, genlerdeki homoloji, benzerlik, kullanılarak diğer bitkiler ve patojenler taranmaktadır. Buna ilaveten gerek *avr* genlerinin ürünleri, uyarıcılar, ve gerekse *R* genlerinin, reseptörler, ürünlerini suni olarak üretme çalışmaları devam etmektedir. *R* geni ile yeni çeşitler üretilirken, bu gene denk gelen *avr* gen ürünleri de pestisid üreten firmalar için yeni bir gelir kaynağı olacaktır. Suni olarak üretilen bir *avr* gen ürünü, bu molekülü tanıyan bitkiler üzerine püskürtüldüğünde buradaki savunma sistemini aktif hale getirerek bitkiyi önceden dayanıklı kılacaktır. Çevre kirlenmesi azalacak, klasik pestisidlere alternatif teşkil edebilecek, bitkilerde genetik manipulasyona da gerek duymadan bir başka mücadele yöntemi ortaya çıkmaktadır ki bu da **biyoteknik savaş** içerisinde yerini alacaktır.

Kaynaklar

1. Crute, I. R., Investigations of gene-for-gene relationships: the need for genetic analyses of both host and parasite. *Plant Pathology*, 35: 15-17, 1986.
2. Ellingboe, A. H., Genetics of host-parasite relations: an essay. *Advances in Plant Pathology*, 2: 131-152, 1984.
3. Bennetzen, J.L., Jones, J.D.G., Approaches and progress in the molecular cloning of plant disease resistance genes. New York: Plenum Press, 1992.
4. Lindsay, J.P., Lamb, C.J., Dixon, R.A., Microbial recognition and activation of plant defense systems. *Trends in Microbiology*, 4: 181-187, 1993.
5. Hawkes, J.G. *The Diversity of Crop Plants*. Cambridge, Massachusetts, 1983 Harvard University Press.
6. Klement, Z. Hypersensitivity. In M.S. Mount ve G.H. Lacy (Eds.), *Phytopathogenic Prokaryotes* (pp. 149-177). New York, 1982 Academic Press.
7. Newton, A.C. ve Crute, I.R., A consideration of the genetic control of species specificity in fungal plant pathogens and its relevance to a comprehension of the underlying mechanisms. *Biological Reviews*, 64: 35-50, 1989.
8. Mansfield, J.W.: Recognition and response in plant/fungus interactions. In R.S.S. Fraser (Ed.), *Recognition and Response in Plant-Virus Interactions* (pp.31-52). Berlin, 1990 Springer Verlag.
9. Mansfield, J.W.: Plant cell death during infection by fungi. In I.D.A.D.O.Sigee (Ed.), *Cell ageing and death* (pp.323). Cambridge, 1984 Cambridge University Press.
10. Ride, J.P.: Induced structural defences in plants. In G.W. Gould, M.E. Rhodes-Roberts, A.K.Charnley, R.M. Cooper, R.G. Board (Eds.), *Natural antimicrobial systems in plants and animals* (pp. 159). Bath, 1986 University Press.
11. Mansfield, J.W.: Antimicrobial compounds. In J.A. Callow (Ed.), *Biochemical Plant Pathology* (pp. 237). Cichester, 1983 Wiley and Sons.
12. Crute, I.R., de Wit, P.J.G.M., Wade, M.: Mechanisms by which genetically control resistance and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites. In R.S.S. fraser (Eds.), *Mechanisms of Resistance of Plant Diseases* (pp. 197-309). Boston, 1985 Nijhoff/Junk.
13. Dangl, J.L., The major histocompatibility complex a la carte: are there analogies to plant disease resistance genes on the menu? *Plant Journal*, 2: 3-11, 1992.
14. Gilroy, S., Trewavas, A., Signal sensing and signal transduction across the plasma membrane. In C. Larsson ve I.M.Moller (Eds.), *The Plant Plasma Membrane: Structure, Function and Molecular Biology*. (pp. 203-232). Berlin, 1990 Springer-Verlag.
15. Romantschuk, M., Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 225-243 1992.
16. de Wit, P.J.G.M.: Elicitation of active resistance mechanisms. In J. A. Bailey (Ed.), *Biology and molecular biology of plant pathogen interactions* (pp. 149). Berlin, 1986 Springer-Verlag.
17. Callow, J.A., Ray, T., Estrade-Garcia, T.M., R. G.J.: Molecular signals in plant cell recognition. In S. Scannerini, D. Smith, P. Bonfante-Fasolo, V. Gianinnazi-Pearson (Eds.), *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis* (pp. 167). Berlin, 1988 Springer-Verlag.
18. Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M., Dixon, R.A., Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, 56, 215-224, 1989.
19. Dangl, J.L., Piece de resistance: novel classes of plant disease resistance genes. *Cell*, 80: 363-366, 1995.
20. Mansfield, J.W.: Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. In B. Lutenberg (Ed.), *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions* (pp. 434). Berlin, 1986 Springer-Verlag.
21. Day, P.R., Plant-parasite interactions: a genetical perspective. *Plant Pathology*, 35: 263-269, 1986.
22. Ellis, J.G., Lawrence, G.J., Peacock, W.J., Pryor, A.J., Approaches to cloning plant genes conferring resistance to fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 245-263, 1988.

23. Crute, I.R., From breeding to cloning (and back again?): a case study with lettuce downy mildew. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 485-506, 1992.
24. de Wit, P.J.G.M., Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 391-418, 1992.
25. Dixon, R.A., Lamb, C.J., Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 339-367, 1990.
26. Lamb, C.J., Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, 78: 419-422, 1994.
27. Vanderplank, J.E., Specific susceptibility and specific in gene-for-gene systems. *Advances in Plant Pathology*, 5: 199-233, 1986.
28. Heath, M. C., Fundamental questions related to plant-fungus interactions: recombinant DNA technology provide the answers? In J.A. Bailey (Ed.), *Biology and molecular biology of plant-pathogen interaction* (pp. 15). Berlin, 1986 Springer-Verlag.
29. Mitchelmore, R.W., Iltott, T.W., Hulbert, S.H., Farrara, B.F.: The downy mildews. In G.S.Sidhu, P.H. Williams, ve D.S.Ingram (Eds.), *Advances in Plant pathology* (pp. 53). London, 1988 Academic Press.
30. Flor, H.H., Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296, 1971.
31. Flor, H.H., Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296, 1971.
32. Staskawicz, B.J., Dahlbeck, D., Keen, N.T., Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 81: 6024-6028, 1984.
33. Bonas, U., Stall, R.E., Staskawicz, B.J., Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* form *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Gene Genetics*, 218: 127-136, 1989.
34. Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., Staskawicz, B.J., Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, 3: 49-59, 1991.
35. Kobayashi, D.Y., Tamaki, S.J., Keen, N.T., Molecular characterization of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3, 94-102, 1990.
36. Jenner, C., Hitchin, E., Mansfield, J.W., Walters, K., Betteridge, P., Taylor, J., Gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Phaseolus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4: 553-562, 1991.
37. Mansfield, J.W., Jenner, C., Hockenull, R., Bennet, M.A., Stewart, R., Characterization of *avrPpHe*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *MPMI*, 7: 726-739, 1994.
38. Fillingham, A.J., Wood, J., Bevan, J.R., Crute, I.R., Mansfield, J.W., Taylor, J.D., Vivian, A., Avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pathovars *phaseolicola* and *pisi* confer specificity towards both host and non-host-species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40: 1-15, 1992.
39. Parker, J.E., Barber, C.E., Mi-jiao, F., Daniels, M.J., Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X. c.* pv. *raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 6: 216-224, 1993.
40. Timmis, J.N., Whisson, D.L., Binns, A.M., Mayo, M.J., G.M.E., Deletion mutation as a means of isolating avirulence genes in flux rust. *Theor. Appl. Genet.*, 79: 411-416, 1990.
41. Crute, I.R., The host specificity of Peronosporaceous fungi and the genetics of the relationship between host and parasite. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30: 39-54, 1981.
42. Hulbert, S.H., Hott, T.W., Legg, E.J., Lincoln, S.E., Lender, E.S., Michelmore, R.W., Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, 120: 947-958, 1988.
43. Mansfield, J.W., Woods, A.M., Street, P.F.S., Rowell, P.M., Recognition processes in lettuce downy mildew disease. In G.P. Chapman, C.C. Ainsworth, C.J. Chathan (Eds.), *Eukaryotic Cell Recognition: Concepts and Model Systems* (pp. 241-256). Cambridge, 1988 Cambridge University Press.

44. Hutt T.W., Hulbert, S.H., ve Michelmore, R.W.. Genetic analysis for the gene-for-gene interaction between lettuce (*Lactuca sativa*) and *Bremia lactucae*. *Phytopathology*, 79, 888-897. (1989)
45. Michelmore, R.W., Paran, I., Keselli, R.V.. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828-9832, 1991.
46. Valent, B., Chumley, F.G., Genes for cultivar specificity in the rice blast fungus, *Magnaphorte grisea*. In B.J.J. Lugtenburg (Ed.), *Signal Molecules in Plants and Plant-Microb Interactions*. (pp. 415). Berlin, 1989 Springer-Verlag.
47. Valent, B., Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, 80: 33-36, 1990.
48. Valent, B., Chumley, F.G., Molecular genetic analysis of the rice blast fungus, *Magnophorte grisea*. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 443-467, 1991.
49. Knogge, W., Hahn, M., Lehnackers, H., Rüpping, E., Wevelseip, L., Fungal signals involved in the specificity of the interaction between barley and *Rhyncosparium secalis*. In H. Hennecke ve D.P.S. Verma (Eds.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. (pp. 250). Dordrecht, 1991 Kluwer Academic.
50. Knogge, W., Hahng, M., Lehnackers, H., Rüpping, E., Wevelseip, L., Fungal signals involved in the specificity of the interaction between barley and *Rhyncosparium secalis*. In H. Hennecke ve D.P.S. Verma (Eds.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. (pp. 250). Dordrecht, 1991 Kluwer Academic.
51. de Wit, P.J.G.M., Oliver, R.P. The interaction between *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulvum*) and tomato: a model system in molecular plant pathology. In H. Nevalianen ve M. Penttila (Eds.), *Molecular Biology of Filamentous Fungi* (pp. 227). 1989 Found. Biotech. Industr. Ferment. Res.
52. de Wit, P.G.M., Spikeman, G., Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiological Plant Pathology*, 21: 1-11, 1982.
53. Van den Ackerveken, A.F.J.M., Van kan, J.A.L., de Wit, P.J.G.M., Molecular evidence supporting the gene-for-gene hypothesis in the *Cladosporium fulvum*-tomato interaction. *Plant Journal*, 2: 359-366, 1991.
54. Meeley, B., Johal, G.S., Briggs, S.P., Walton, J.D., A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell*, 4: 71-77, 1992.
55. Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D., Tanksley, S.D., Map-based cloning of protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436, 1993.
56. Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B.J., RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeats class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1860, 1994.
57. Mindrinos, M., Fumiaki, K., Yu, G.-L., Ausubel, F.M., The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell*, 78, 23: 1089-1099, 1994.
58. Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Asfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R., W., Dangl, J.L., Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269:843-846, 1995.
59. Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., Jones, J.D.G., Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266: 789-793, 1994.
60. Lawrence, G.L., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A., Ellis, J.G., The L6 gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *The Plant Cell*, 7: 1195-120, 1995.
61. Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B., The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78: 1101-1115, 1994.
62. Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D.G., Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661-667, 1997.