

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***LEA* (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) GENLERİNİN SALATALIK
(*Cucumis sativus* L.) GENOMUNDA BELİRLENMESİ, BİYOBİYOİNFORMATİK
ANALİZLERİ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GEN İFADE
PROFİLLERİNİN ÇIKARILMASI**

Pınar BALOĞLU

**Danışman Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS
Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nuray EMİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2016

TEZ ONAYI

Pınar BALOĞLU tarafından hazırlanan "**LEA (Late Embryogenesis Abundant) Genlerinin Salatalık (*Cucumis sativus* L.) Genomunda Belirlenmesi, Biyoinformatik Analizleri ve Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Profillerinin Çıkarılması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Kastamonu Üniversitesi

Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Jüri Üyesi Yrd. Doç. Dr. Nuray EMİN
Kastamonu Üniversitesi



15/04/2016

Enstitü Müdürü Prof. Dr. Ömer KÜÇÜK



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza

Pınar BALOĞLU



ÖZET

Yüksek Lisans

LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) GENLERİNİN SALATALIK (*Cucumis sativus* L.) GENOMUNDA BELİRLENMESİ, BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GEN İFADE PROFİLLERİNİN ÇIKARILMASI

Pınar BALOĞLU
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU

LEA proteinleri (late embryogenesis abundant) ilk olarak tohumlarda keşfedilmiş ve daha sonra farklı bitki türlerinin vejetatif dokularında belirlenmiştir. Salatalık bitkisinde genom seviyesinde farklı gen aileleri belirlenmiş olsa da, *LEA* genlerinin belirlenmesine yönelik böyle bir çalışma şu ana kadar yapılmamıştır. Salatalık genomunda toplam 79 *LEA* geni belirlenerek salatalık kromozomlarına yerleştirilmiştir. Genler kromozomlar üzerindeki yerleşimlerine göre *CsLEA-01*' den *CsLEA-79*' a kadar isimlendirilmiştir. Salatalıkta 44 adet *CsLEA* geninin intron içermediği saptanmıştır. Filogenetik olarak, *CsLEA* genleri 7 sınıfa ayrılmıştır. *CsLEA* genlerine ait en fazla tandem duplikasyon olayı 3 numaralı kromozom üzerinde olup, *CsLEA* genlerinin yaklaşık %70'inde bu olay gözlemlenmiştir. *CsLEA* genlerinin maksimum ortolog ilişkisinin %81 ile kavak genomunda bulunan *LEA* genleri ile olduğu belirlenmiştir. Mikro-RNA (miRNA) analizine göre, 37 adet *CsLEA* geni farklı miRNA' lar tarafından hedeflenmiş olup, özellikle mir854 ve mir414 en fazla belirlenen miRNA' larıdır. RNA-seq verisi, salatalığın farklı dokularındaki *CsLEA* gen ifade analizleri için kullanılmıştır. Ayrıca, kuraklık stresi uygulanmış salatalık kök ve yaprak dokularında 10 adet *CsLEA* geninin ifade değişiklikleri Eş Zamanlı PZR ile incelenmiştir. Bunların arasında, *CsLEA-54* geni hem yaprak hem de kök dokusunda stres uygulamasından sonra uyarılmıştır. *CsLEA09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-57* genleri ise kuraklık stresinin 3. saatinin sonunda cevap oluşturmuş ve bu genlerin su kıtlığı durumunda erken cevap oluşturabileceği düşünülebilir. Çalışmamızın *CsLEA* genlerinin, salatalıkta kuraklık tolerans mekanizmasını anlamamıza yardımcı olacağı ve yeni çalışmalara farklı bir bakış açısı oluşturacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *LEA* gen ailesi, *Cucumis sativus*, genom seviyesinde analizler, gen ifade analizi, kuraklık stresi

2016, 138 sayfa
Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

IDENTIFICATION, BIOINFORMATICS ANALYSIS OF *LEA* (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) GENES IN CUCUMBER GENOME AND ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILES UNDER DROUGHT STRESS CONDITION

Pınar BALOĞLU

Kastamonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU

Abstract: *LEA* (late embryogenesis abundant) proteins are firstly discovered in seeds and then identified in vegetative tissues of different plant species. Although genome wide studies of different gene family members have been performed in cucumber, there is no such a study for *LEA* genes. We have identified 79 *LEA* genes in the cucumber genome and they were located in cucumber chromosomes. Based on gene locations on chromosomes, *CsLEA* genes have been named as *CsLEA-01* to *CsLEA-79*. It was found that 44 *CsLEA* genes contain no introns. Based on phylogenetic analysis, *CsLEA* genes could be classified into 7 groups. The most abundant tandem duplication ratio was observed in chromosome 3 and this event was observed about %70 of total *CsLEA* genes. The maximum orthologous relationship of *CsLEA* genes was determined with *LEA* genes found in the poplar genome with 81% ratio. The *in silico* micro-RNA (miRNA) target analyses indicated that 37 *CsLEA* genes were targeted by different miRNAs, especially mir854 and mir414 are the most abundant identified ones. Public available RNA-seq data were analyzed for expression analysis of *CsLEA* genes in different tissues of cucumber. The expression profiles of 10 *CsLEA* genes in the root and leaf tissues of drought-stressed cucumber were examined using qRT-PCR. Among them, *CsLEA-54* induced after stress application in leaf and root tissues. *CsLEA-09*, *CsLEA-32* and *CsLEA-57* genes responded to drought after 3 h later and might be considered as early response genes to water limitation. It is thought that this research could help us to understanding of contribution of *CsLEAs* to drought tolerance mechanisms in cucumber and to create different insights for new studies.

Key Words: *LEA* gene family, *Cucumis sativus*, genome-wide analysis, gene expression analysis, drought stress

2016, 138 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, önerileri ile beni doğru yönlendiren, manevi olarak desteğini hiç esirgemeyen başta Tez Danışmanım Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU' na, deneylerimin tüm aşamalarında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Sefa PEKOL, Arş. Gör. Esra Nurten YER ve Sibel KARA' ya, tez çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürüme, idarecilerime ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

TÜBİTAK tarafından 1002 programı kapsamında 114O761 kodlu 'Cucurbitaceae Ailesinde Bulunan LEA (Late Embryogenesis Abundant) Genlerinin Tanımlanması, Biyoinformatik Analizleri ve Kuraklık Stresi Altında Gen İfade Analizlerinin İncelenmesi' isimli projesi ile Yüksek lisans süresince deneylerimi maddi olarak destekleyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU' na ayrıca çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana elinden gelen her türlü desteği sağlayan, başta annem, dedem, babam, annem ve kardeşlerim olmak üzere BÖREKÇİ ailesi ile, BALOĞLU ailesinin tüm bireyelerine, son olarak ta her zaman yanımda olan, beni gönülden destekleyen hayat arkadaşım, eşim, Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU' na ve varlığı ile yaşamımı renklendiren canım oğlum, Mert Can BALOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Pınar BALOĞLU

Kastamonu, Nisan, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	13
1.1. Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.) Hakkında Genel Bilgiler.....	14
1.1.1. Salatalığın Tarihçesi.....	14
1.1.2. Salatalığın Sınıflandırılması.....	15
1.1.3. Salatalığın Genel Morfolojik Özellikleri	15
1.1.4. Salatalık Bitkisi Yetiştirilirken Gerekli İklim ve Toprak İstekleri..	17
1.1.5. Salatalığın Besin Değeri Açısından Önemi	17
1.1.6. Salatalık Üretimi ve Ekonomik Önemi	17
1.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Kavramı	20
1.2.1. Kuraklık stresi	22
1.2.2. Tuz Stresi	24
1.3. Gen İfadesinde Kullanılan Yöntemler	26
1.3.1. PZR (Polimer Zincir Reaksiyonu)	27
1.3.2. Eş Zamanlı-PZR.....	29
1.3.3. Dizileme Yöntemleri.....	35
1.3.3.1. Basit dizileme yöntemleri.....	36
1.3.3.2. İleri Dizileme Yöntemleri.....	37
1.3.3.3. Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri	38
1.4. Bitkilerde Stres Koşullarında Gen İfadesinin Düzenlenmesi	42
1.4.1. Makromoleküllerin ve İyonların Homeostazisi	42

1.4.2.	Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Detoksifikasyonu	43
1.4.3.	Koruyucu Moleküllerin Sentezi	43
1.5.	LEA Proteinleri	44
1.5.1.	LEA proteinlerinin yapısı.....	45
1.5.2.	LEA proteinlerinin sınıflandırılması	46
1.5.2.1.	<i>LEA proteinlerinin klasik sınıflandırılması</i>	46
1.5.2.2.	<i>LEA Proteinlerinin POPP Sınıflandırması</i>	48
1.5.3.	LEA proteinlerinin fonksiyonları.....	49
2.	KURAMSAL ÇERÇEVE	50
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	53
3.1.	Materyal.....	53
3.1.1.	Kimyasal madde ve kitler.....	53
3.1.2.	Kullanılan cihaz ve aletler.....	53
3.1.3.	Bitki materyali.....	54
3.2.	Yöntem	55
3.2.1.	Salatalık Genomunda <i>LEA</i> Genlerinin Belirlenmesi.....	55
3.2.2.	<i>LEA</i> Genleri Kromozomal Yerleşimlerinin Belirlenmesi ve Gen Yapısının Tahmini	55
3.2.3.	Dizi Hizalanması.....	56
3.2.4.	Filogenetik Analizler.....	56
3.2.5.	Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi	56
3.2.6.	Gen Ontoloji Analizleri.....	56
3.2.7.	LEA Proteinlerinin Farklı Türler ile Karşılaştırılması.....	57
3.2.8.	Homolog ve Homolog Olmayan Değişim Oranlarının Hesaplanması	57
3.2.9.	LEA Proteinlerinin Homoloji Modellemesi.....	58
3.2.10.	<i>LEA</i> Genlerini Hedef Alan miRNA' ların Tanımlanması	58
3.2.11.	Salatalık Bitkisinde Farklı Dokularda <i>LEA</i> Genleri İfade Profilinin Çıkarılması.....	58
3.2.12.	Salatalık Bitki Örneklerinin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulanması.....	60
3.3.	Moleküler Genetik Metotlar	61
3.3.1.	RNA İzolasyonu.....	61
3.3.2.	DNaz Muamelesi.....	64

3.3.3.	cDNA sentezi (Komplementer DNA sentezi).....	64
3.3.4.	Primer tasarlama.....	65
3.3.5.	PZR Analizleri	66
3.3.6.	Eş Zamanlı PZR Analizleri	67
3.4.	İstatistiksel Analizler	70
4.	BULGULAR	71
4.1.	<i>CsLEA</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizleri	71
4.1.1.	Salatalıkta LEA Protein Dizilerinin Belirlenmesi ve İsimlendirilmesi	71
4.1.2.	<i>LEA</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı	71
4.1.3.	<i>LEA</i> Genlerinin Yapısı ve Tandem ve Segmental Duplikasyonlar	72
4.2.	Salatalıkta Filogenetik Analizler	73
4.2.1.	<i>CsLEA</i> Genlerinin Filogenetik Ağaç Analizleri.....	73
4.2.2.	<i>CsLEA</i> Genlerinin Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi	75
4.2.3.	Salatalık ve Farklı Türlerdeki <i>LEA</i> Genlerinin Ortologları.....	77
4.2.4.	<i>CsLEA</i> Genlerinin Birbirlerinden Ayrılma Oranları	77
4.3.	Hedef miRNA Tanımlaması	78
4.4.	LEA Proteinlerinin Homoloji Modellemesi	79
4.5.	<i>CsLEA</i> Genlerinin Ontoloji Analizi.....	80
4.6.	Salatalıkta <i>LEA</i> Genlerinin Transkriptom Analizi	82
4.7.	<i>LEA</i> Genlerinin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	84
4.8.	Salatalıkta <i>LEA</i> Genlerinin İfade Seviyelerinin Belirlenmesi	84
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	88
	KAYNAKLAR	97
	EKLER	115
	EK 1 Hoagland çözeltilisinin kimyasal içeriği.....	116
	EK 2 10x TAE tamponunun içeriği	117
	EK 3 DNA Marker içeriği.....	118
	EK 4 Salatalıkta (<i>Cucumis sativus</i>) tanımlanan <i>LEA</i> genleri.....	119
	EK 5 <i>CsLEA</i> genlerinin ekzon-intron organizasyonu	123
	EK 6 <i>CsLEA</i> proteinlerinin motif analizi	124
	EK 7 <i>CsLEA</i> genleri ile kavak, mısır ve Arabidopsis <i>LEA</i> genlerinin ortolog gösterimi	125

EK 8 <i>CsLEA</i> genlerinin segmental duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları	126
EK 9 <i>CsLEA</i> genlerinin kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır <i>LEA</i> genleri ile ortolog ilişkileri ve birbirlerinden ayrılma oranları.....	128
EK 10 <i>CsLEA</i> genlerinin miRNA hedefleri.....	132
EK 11 <i>CsLEA</i> genlerinin kök ve yaprak dokularındaki erime eğri grafikleri	136
ÖZGEÇMİŞ	137



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

aa	Aminoasit
ABA	Absisik Asit
AFPs	Anti-Freezeing Proteins
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı)
bp	Base Pair (Baz çifti)
bZIP	Basic Leucine Zipper
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
<i>CsLEA</i>	<i>Cucumis sativus</i> için tanımlanan <i>LEA</i> genleri
CO ₂	Karbondioksit
Ct	Cycle Threshold (Döngü Eşiği)
Da	Dalton- Atomik kütle birimi
DEPC	Dietil pyrokarnonat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
E-value	Beklenti Değeri
FAO	Food and Agriculture Organization
Ka	Homolog Olmayan Değişim Oranı
kDa	Kilodalton
Ks	Homolog Değişim Oranı
Ks/Ka	Homolog Değişimlerin Homolog Olmayan Değişimlere Oranı
L	Litre
LEA	Late Embriogenesis Abundant (Geç Embriyogenez Proteinleri)
m	Metre
M	Molar
Mbp	Mega Base Pair (Bir Milyon Baz Çifti)
MEME	Multiple EM for Motif Elicitation
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
M.Ö	Milattan Önce
Mya	Milyonlarca Yıl Önce
ng	Nanogram
PEG	Polietilen Glikol 6000
PZR	Polimer Zincir Reaksiyonu
pl	İzoelektronik Etki Değeri
Ppi	Pirofosfat
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNAze	RiboNükleaz
rpm	Revolution Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

qRT-PZR	'Real Time' PZR (Eş Zamanlı PZR)
SMP	Seed Maturation Protein (Tohum Olgunlaşma Proteini)
sn	Saniye
SRA	Sequence Read Archive
TAE	Tris-Asetat Tamponu
T _m	Erime Sıcaklığı- Hidrojen Bağlarının Oluştugu Sıcaklık
Tris	Tris (hidroksimetil)aminomethane
UTR	Untranslated Region (Çevrilmeyen Bölgeler)
°C	Santigrad
~	Yaklaşık olarak
α	Alfa
μ	Mikro
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
Ψ _s	Çözünen Potansiyeli
β	Beta

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. 1. Salatalık bitkisinin morfolojik genel görünüşü.....	16
Şekil 1. 2. PZR çoğalmasının basamakları	28
Şekil 1. 3. DNA'nın PZR ile üstel çoğaltılması.....	29
Şekil 1. 4. İki basamaklı qRT-PZR.....	30
Şekil 1. 5. Tek basamaklı qRT-PZR.....	31
Şekil 1. 6. TaqMan prob çalışma prensibi	32
Şekil 1. 7. SYBR Green I boyasının çalışma prensibi.....	33
Şekil 1. 8. Ct değerlerine bağlı miktar tayini	34
Şekil 1. 9. Eş zamanlı PZR çalışma ve analiz aşamaları.....	35
Şekil 1. 10. Sanger dizileme yöntemi.....	37
Şekil 4. 1. <i>LEA</i> genlerinin salatalık kromozomlarına dağılımı	72
Şekil 4. 2. <i>CsLEA</i> proteinlerinin filogenetik sınıflandırılması	74
Şekil 4. 3. <i>CsLEA</i> proteinlerinin motif içerikleri ve E-değerleri.....	76
Şekil 4. 4. <i>CsLEA</i> genlerinin ortologları ve birbirinden ayrılma oranları.....	78
Şekil 4. 5. <i>CsLEA</i> proteinlerinin üç boyutlu tahmini yapısı	80
Şekil 4. 6. <i>CsLEA</i> genlerinin fonksiyonel analizleri	81
Şekil 4. 7. <i>CsLEA</i> genlerinin farklı dokulardaki transkriptom analizi	83
Şekil 4. 8. <i>CsLEA</i> genlerinin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi.....	84
Şekil 4. 9. <i>CsLEA</i> genlerinin farklı dokulardaki transkriptom analizi	87

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. 1. <i>Salatalığın (Cucumis sativus L.) sistematik sınıflandırması</i>	15
Tablo 1. 2. <i>Ülkelere göre salatalık ekim alanı ve üretimi</i>	18
Tablo 1. 3. <i>Türkiye’de yıllara göre salatalık üretimi</i>	19
Tablo 1. 4. <i>Türkiye’nin örtü altı salatalık üretimi</i>	19
Tablo 1. 5. <i>Türkiye’nin salatalık ihraç ettiği ülkeler</i>	19
Tablo 1. 6. <i>Türkiye’nin yıllara göre salatalık ihracatı</i>	20
Tablo 1. 7. <i>Stres genleri</i>	22
Tablo 1. 8. <i>Eş Zamanlı PZR’de kullanılan prob sistemleri ve boyalar</i>	32
Tablo 3. 1. <i>Transkriptom analizinde kullanılan dokular ve erişim numaraları</i>	59
Tablo 3. 2. <i>DNazI enzimi ile RNA örneklerinin muamelesi</i>	64
Tablo 3. 3. <i>cDNA sentezi</i>	65
Tablo 3. 4. <i>Eş Zamanlı PZR çalışmasında kullanılan Primer dizileri</i>	66
Tablo 3. 5. <i>Genlerin bağlanma sıcaklıklarını bulmak için kullanılan PZR koşulları</i>	67
Tablo 3. 6. <i>Gen ifade analizi çalışmaları için hazırlanan PZR karışımı</i>	69
Tablo 3. 7. <i>Genlerin ifade analiz çalışmaları için kullanılan PZR koşulları</i>	69

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 3. 1. Jel Görüntüleme Sistemi Quantum	63
Fotoğraf 3. 2. Bağlanma sıcaklık optimizasyonlarında kullanılan PZR cihazı.	67
Fotoğraf 3. 3. Eş zamanlı PZR çalışmalarında kullanılan cihaz.	68



1. GİRİŞ

Kuraklık, abiyotik stres faktörlerinden (kuraklık, tuzluluk, soğuk vb.) olup, dünyada karşılaşılan en büyük sorunlardan birisidir. Küresel ısınma gibi iklim değişimleri neticesinde meydana gelen kuraklığın başta tarım olmak üzere tüm ekolojik sistem üzerinde zararlı etkilere sebep olacağı tahmin edilmektedir (Kaplukan, 2013).

Dünyada tarımsal ürün olarak çok tüketilen ve geniş bir yayılış gösteren salatalık bitkisinin (*Cucumis sativus* L.), kabakgiller (*Cucurbitacea*) familyası içerisinde yer aldığı bilinmektedir (Günay, 1970). Salatalık bitkisi, 2009 yılında genom dizisi yayınlanan yedinci model bitki olmuştur (Huang, Li R, Zhang, Li L, Gu vd., 2009). 2013 yılında yapılan çalışmalar da ise, yabanıl tip salatalık genomuna ait 115 derin dizileme yöntemi kullanılmış ve salatalık genomuna ait varyasyon haritası oluşturulmuştur. Ayrıca bunlar ıslah edilerek salatalık genomu ile karşılaştırılmıştır (Qi, Liu, Shen, Miao, Xie vd., 2013). Bu tip genomik araştırmaların, bu önemli ürünlerin ıslahında ve çeşitliliğin genetik temelini ortaya çıkartılması için yeni bir bakış açısı oluşturulması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir (Muthamilarasan, Theriappan, Prasad, 2013).

Kuraklık gibi abiyotik stres koşulları altında, organizmaların yaşam döngüsünün olumsuz bir şekilde etkilendiği bilinmektedir. Bu nedenle organizmalar, bu stres koşullarına karşı enzim aktivitelerinde birtakım değişiklikler meydana getirirler ve gen ifadelerinin düzenlenmesi için de birçok strateji geliştirirler. Genel olarak bitkilerin strese karşı birçok fizyolojik değişim geçirdiği ve olumsuz koşullara adaptasyonları için de çok sayıda gen indükledikleri bilinmektedir. Yüksek bitkilerin bu çevresel değişimlere karşı LEA proteinleri (late embryogenesis abundant) gibi gen ekspresyon düzeyleri farklı olan ve bununla ilgili birçok mekanizmalarının olduğu düşünülmekte ve araştırılmaktadır. LEA proteinlerinin susuzluk, soğuk stresi ve tuz stresi altında abiyotik stres toleransına bağlı proteinler oldukları tespit edilmiştir (Close, 1997; Jimenez, Alonso-Ramirez ve Nicolas, 2008 ; Dalal, Tayal, Chinnusamy, Bansal 2009; Wang, Li, Chen ve Liu, 2009; He vd., 2011; Park vd., 2011). LEA proteinleri, ilk defa embriyo gelişiminin ileri safhalarındaki tohumlarda

keşfedilmiştir (Dure ve Galau, 1981). Buna rağmen LEA proteinlerinin sadece tohumda değil, vejetatif dokularda da bulunduğu görülmüştür (Borovskii, Stupnikova, Antipina, Vladimirova ve Voinikov, 2002; Oztur vd., 2002; Dalal, Tayal, Chinnusamy ve Bansal, 2009; George, Usha ve Parida, 2009; Olvera-Carrillo, Campos, Luis Reyes, Garciarrubio ve Covarrubias, 2010; Monteiro Costa vd., 2011). Yapılan bazı araştırmalarda bakteri ve hayvanlarda da LEA proteinlerinin homologlarının da olduğu belirlenmiştir (Stacy ve Aalen, 1998; Boswell, Menze ve Hand, 2009; Denekamp, Reinhardt, Kube ve Lubzens, 2010; Warner vd., 2010; Wu vd., 2011). Tanımlanan LEA proteinleri için dizi benzerlikleri ile belirlenmiş motiflerin varlıklarına bakılarak sınıflandırmalar yapılmıştır. Ancak bu proteinlerin evrensel olarak sınıflandırılması için hala açık bir ölçüt tam olarak belirlenememiştir (Dure vd., 1989; Hunault ve Jaspard, 2010).

Salatalık bitkisinin de genom dizileri belirlenmiş olmasına rağmen, tüm genom dizisi kullanılarak yapılan gen tanımlamalarının ve onların karakterizasyon çalışmalarının sınırlı olduğu görülmüştür. Salatalık bitkisinde ayrıca şu ana kadar hiçbir LEA proteini tanımlanmamış ve izole edilmemiştir. Bu bakımdan salatalık genomunda bulunabilecek LEA proteinlerinin tanımlanmasının da çok önemli olduğu düşünülmektedir (Ling vd., 2011; Hu, Liu, 2012; Li, Zhang, Li, Wang ve Ren, 2012; Wan vd., 2013; Baloglu, Eldem, Hajyzadeh ve Unver, 2014; Yu vd., 2014; Wang vd., 2015).

1.1. Salatalık (*Cucumis sativus* L.) Hakkında Genel Bilgiler

1.1.1. Salatalığın Tarihçesi

Salatalığın sulu bir besin olmasından ve çiğ olarak yenilebilmesinden dolayı çok eski zamanlardan beri tüketildiği tahmin edilmektedir. Salatalık bitkisinin ana vatanının nerede olduğu, ne zaman ve ne şekilde yayılış gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Ancak aşiret göçlerinden dolayı bu yayılmaların olduğu tahmin edilmektedir. Salatalık yetiştiriciliğinin Hindistan' da M.Ö. 3000 senelerine kadar dayandığı, birçok araştırmacı tarafından ileri sürülmektedir. Ayrıca en eski tarihi delillere Mısır' da rastlanılmış, Theben' de Kahun' un mezarında (M.Ö. 2000-1788) Cucurbitaceae

familyasına ait bitkilerinin yetiştirildiği düşünülmektedir. Macaristan’ da yapılan kazılarda ise tarih öncesi devirlere ait salatalık çekirdeklerinin bulunması da buna kanıt olarak gösterilmektedir (Günay, 1970).

1.1.2. Salatalığın Sınıflandırılması

Cucumis kelimesi ilk defa cins ismi olarak Varro tarafından M.Ö. 36 senelerinde kullanılmıştır (Günay,1970). *Cucumis* L. cinsinin genellikle sıcak bölgelerde yayılış gösterdiği, yaklaşık 30 türünün olduğu ve ayrıca ülkemizde iki türünün kültürünün yapıldığı bilinmektedir ki bunlar *Cucumis sativus* L. ile *Cucumis melo* L.’ dir (Engin, 1991). Salatalık bitkisinin bilimsel sınıflandırılması (Tablo1.1)’ de gösterilmiştir (Davis, 1972).

Tablo 1. 1. *Salatalığın (Cucumis sativus L.) sistematik sınıflandırması* (Davis, 1972).

Alem	<i>Plantae</i>
Şube	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Takım	<i>Cucurbitales</i>
Aile	<i>Cucurbitaceae</i>
Cins	<i>Cucumis</i>
Tür	<i>Sativus</i>
Binomial adı	<i>Cucumis sativus</i> L.

1.1.3. Salatalığın Genel Morfolojik Özellikleri

Tek yıllık otsu bir bitki olan *Cucumis sativus* L.’nin gövdesinin sürünücü ve tırmanıcı nitelikte olduğu, yapraklarının iri, koyu yeşil renkte, uçlarının hafif sivri, kenarlarının dilimli ve üzerlerinin de tüylü olduğu bilinmektedir. Çiçeklerinin tek evcikli (monoecious) yani erkek (androecious) ve dişi çiçeklerin (gynoecious) aynı bitki üzerinde ayrı ayrı yerlerde olduğu görülmektedir. Taç yapraklarının da beşli ve sarı renklere olduğu bilinmektedir (URL-1, 2015). Salatalık bitkisinin morfolojik olarak genel görünüşü de (Şekil1.1)’ de gösterilmiştir.



Şekil 1. 1. Salatalık bitkisinin morfolojik genel görünüşü (URL-2, 2015).

Salatalık meyvelerinin genelde silindir biçimde oldukları, uzunluklarının da çeşitlerine göre değişiklik göstermekte oldukları bilinmektedir. Çeşit karakterine göre de oluklu veya düzgüne yakın şekilleri bulunmaktadır. Meyvelerinin renkleri de beyaz, açık yeşil, yeşil, koyu yeşil renklerde olup çeşitlerine göre değişiklik göstermektedir. Tohumları ise sarımtırak beyaz renkte ve basık yumurta şeklinde olup, kavun tohumlarına benzeseler de daha küçük, daha ince kabuklu ve daha hafiftirler. Bazı meyvelerinde ise alkaloidden kaynaklı bir acılık meydana gelmektedir ki, bu acılık aslında genetik olarak dominantlık belirten karakteristik özelliklerden kaynaklanmaktadır. Salatalığın diploid kromozom sayısının $2n=14$ olduğu bilinmektedir. Salatalık bitkisinin bazılarının sadece dişi çiçekten, bazılarının dişi ve erkek çiçekten, bazılarının da hermafrodit çiçekten meydana geldiği bilinmektedir. Ülkemizde sera yetiştiriciliğinde daha çok dişi çiçekli çeşitlerin tercih edildiği görülmektedir. Bunun nedeni de bitkinin tozlaşma ve dölleme olmadan yani erkek çiçeğe gereksinim duymadan partenokarp olarak, bitkinin meyve verebilmesinin daha kolay olmasından kaynaklanmaktadır (Bayraktar, 1970).

Cucumis sativus L. bitkisinin köklerinin, toprak içerisinde 1 m' den fazla ilerleyebildiğini ve toprak üzerindeki genişliklerine yakın çok sayıda yan köklerden

meydana geldikleri görülmüştür. Ayrıca bu yan köklerin de ana kökleri oluşturdukları tespit edilmiştir (Bayraktar, 1970).

1.1.4. Salatalık Bitkisi Yetiştirilirken Gerekli İklim ve Toprak İstekleri

Salatalık bitkisi, ılık iklim koşullarında yetişmektedir. Sıcaklık sıfırın altına düştüğünde ise hemen etkilenen bir bitkidir. Yani soğuktan, durgun, rutubetli havalardan, rüzgârdan çabuk etkilendiği bilinmektedir. Tohumlarının iyi çimlenebilmesi için de ilkbaharda ekim yapılması istenilir. Çünkü çimlenme için en elverişli toprak ısısının ortalama 11-18°C arasında olması gereklidir. Salatalık kumlu-killi, suyu süzücü, humuslu, gübrece zengin, su tutma kabiliyeti yüksek organik maddelerce zengin topraklarda daha iyi yetişir. Bu nedenle de toprağın iyi hazırlanmış olması için önceden toprağın çiftlik gübresi ile gübrenmesi yani azot, fosfor ve potaslı gübrelerle takviye edilmesi gereklidir (URL-3, 2015).

1.1.5. Salatalığın Besin Değeri Açısından Önemi

Salatalık bitkisi, ilkbahar ve sonbahar aylarında fazlaca tüketilen ve %96 'sının sudan oluştuğu bilinen bir sebzedir. Özellikle yaz aylarında susuzluk giderici ve serinletici etkisiyle sıcak havalarda çok tüketilmektedir. Yapılan çalışmalarda hesaplamalar sonucunda 100 gram salatalıkta 0.16 mg B2 vitamini, 0.57 mg B6 vitamini, 0.8 mg B3 vitamini (Niacin) ve 52 mg C vitamininin bulunduğunu ve toplam olarak 12 kalori olduğu belirlenmiştir. Salatalık, bazik sebzeler arasında yer alması sebebiyle de insan sağlığı açısından çok önemlidir. Çünkü proteinli besinler vücuda alındığında asit birikimine neden olabileceğini ve bu asitin zararlarını da salatalık ile giderilebileceği tespit edilmiştir (Sevgican, 1982).

1.1.6. Salatalık Üretimi ve Ekonomik Önemi

Salatalık üretimi FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) verilerine göre 2013 yılında dünyada 2 milyon 118 bin hektar alanda, 71 milyon 365 bin 573 tondur. Çin, dünyadaki salatalık üretiminin % 76,1'ini yani 54 milyon 315 bin 900 tonunu üretmektedir. Çin' den sonra salatalık üretiminde Türkiye, dünya da ikinci sırada olup, 1.754.613 ton üretim yapmaktadır. Sonra sırasıyla İran' da 1.570.078 ton,

Rusya’ da 1.068.000 ton ve Ukrayna’ da ise 1.044.300 ton salatalık üretilmektedir (Tablo1.2). TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2014 yılındaki verilerine göre, Türkiye’ de salatalık üretiminin yıllara göre dağılımına bakılmış ve 2014 yılında toplam olarak 1.845.749 ton salatalık üretiminin yapıldığı belirlenmiştir (Tablo1.3). Ülkemizde başta Akdeniz Bölgesi ve Ege Bölgesi olmak üzere, hemen hemen her bölgesinde salatalık yetiştirildiği görülmüştür. Saltalık üretimimizin %59,3’ ünün örtü altında yapıldığı belirlenmiştir (Tablo1.4). Salatalığın dış ticaretine bakıldığında ise üretim olarak dünya sıralamasına giremeyen ülkelerin, ihraç bakımından ise ilk sıralarda olduğu görülmektedir. İspanya, 545 bin 805 ton ile en fazla salatalık ihraç eden ülke olurken, bu ülkeyi; Meksika (497.030 ton), Hollanda (408.559 ton), İran (178.209 ton) ve Ürdün (147.865 ton) izlemektedir. Ülkemizin ise salatalık üretimi bakımından dünyada ikinci sırada yer aldığı ancak ihracatta ilk 10’a bile giremediği görülmüştür (Tablo1.5). 2014 yılında Türkiye 97 bin 719 ton salatalık ihraç ederken, bu ihracattan 74 milyon 187 bin 229 dolar gelir sağlamış olduğu (Tablo1.6)’da görüldüğü üzere belirlenmiştir (URL-4, 2015).

Tablo 1. 2. *Ülkelere göre salatalık ekim alanı ve üretimi* (URL-4, 2015).

Ülkeler	Ekim Alanı (ha)	Üretim (ton)
Çin	1.164.350	54.315.900
Türkiye	62.964	1.754.613
İran	66.146	1.570.078
Rusya	67.267	1.068.000
Ukrayna	57.000	1.044.300

Tablo 1. 3. *Türkiye’de yıllara göre salatalık üretimi (URL-4, 2015).*

Yıllar	Üretim (ton)
1990	1.000.000
1995	1.250.000
2000	1.825.000
2005	1.745.000
2010	1.739.191
2011	1.749.174
2012	1.741.878
2013	1.754.613
2014	1.845.749

Tablo 1. 4. *Türkiye’nin örtü altı salatalık üretimi (URL-4, 2015).*

Üretim Şekli	Üretim (ton)
Alçak Tünel	14.666
Cam Sera	284.615
Plastik Sera	566.807
Yüksek Tünel	229.538

Tablo 1. 5. *Türkiye’nin salatalık ihraç ettiği ülkeler (URL-4, 2015).*

Ülkeler	Miktar (ton)	Değer (dolar)
Rusya	63.268	50.590.083
Ukrayna	10.120	6.739.641
Gürcistan	7.140	2.554.487
Bulgaristan	3.786	2.888.872
Belarus	2.925	2.539.330
Moldova	2.778	1.314.057
Almanya	1.770	2.107.446
Romanya	1.086	939.339

Tablo 1. 6. *Türkiye'nin yıllara göre salatalık ihracatı* (URL-4, 2015).

Yıllar	Miktar (ton)	Değer (dolar)
2000	4.023	1.725.282
2005	23.766	14.117.229
2010	94.078	67.351.866
2011	73.726	52.925.436
2012	81.331	60.767.324
2013	73.741	60.262.029
2014	97.719	74.187.229

1.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Kavramı

Bitkilerde stres, bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyen faktörlerdir. Bu faktörler biyotik ve abiyotik stres olarak ikiye ayrılmaktadır. Biyotik stres faktörleri, mikroorganizma ya da zararlı hayvanlardır. Abiyotik stres faktörleri ise; su, sıcaklık, radyasyon, kimyasal maddeler ve elektriksel alanlardır (Levitt, 1972; Lichtenhaler, 1996).

Küresel ısınmanın etkisiyle son yıllarda meydana gelen düzensiz iklim değişiklikleri çok önemli olup, abiyotik stres faktörlerinin önemini ortaya çıkartmıştır. Abiyotik faktörler sonucu oluşan stres, dünyada tarımsal ürünlerin ortalama verimlerinin yaklaşık yarıdan fazla azalmasına da neden olmaktadır (Pinto, Mota, de Varennes, Pinto, 2004).

Dünyada kullanılabilir alanlara bakılarak stres faktörlerinin sınıflandırılması yapılmış olup, kuraklık stresinin en büyük payı almakta olduğu ve % 26'lık bir alanı etkilediği, mineral stresinin % 20'lik, soğuk ve don stresinin ise % 15'lik ve bunların dışında ki diğer tüm streslerin ise % 29'luk alanı etkilediği bilinmektedir. Geriye kalan yaklaşık % 10'luk bir alanda bulunan kısmın ise herhangi bir stres faktöründen henüz etkilenmediği bilinmektedir (Blum, 1986).

Abiyotik strese maruz kalan bitkilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere uğramaları nedeniyle büyüme ve gelişmeleri olumsuz yönde

etkilemektedir. Bu yüzden bitkiler bu olumsuz etkileri azaltmak ya da engelleyebilmek için birtakım moleküler savunma mekanizmaları geliştirmektedirler. Bu savunma mekanizmaları ise bitkinin türüne, toleransına ve adaptasyon yeteneklerine bağlı olarak değişmektedir. Sonuç olarak stresin neden olduğu zararların da bitkiden bitkiye farklılık göstererek değiştiği görülmektedir (Madhova Rao, Raghavendra, Janardhan Reddy, 2005; Kadıoğlu, 2004).

Strese maruz kalsalar da, stres koşullarına doğal olarak adapte olabilen bitkiler ise tuzcul (halofitler), kurakçıl (kserofitler) ya da alçı taşlı (cipsli) topraklarda yetişen bitkilerdir (Boscaiu vd., 2008).

Stres direnci ya da toleransı, elverişsiz çevre faktörlerine karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine denilmektedir. Yani bitkinin herhangi bir strese önceden maruz kalması sonucu toleransı artmışsa, bitkinin alışmış ya da direncinin gelişmiş olduğu söylenilebilir. Strese karşı bitkilerin verdiği tepkiler genel olarak kaçınma ve toleranstır. Kaçınma, stres faktörlerinin bitki dokularına girişlerinin önlenmesi, tolerans ise stres faktörlerinin etkisinin azaltılması ya da tamir edilmesi olarak ifade edilebilir (Stewart, 1996).

Bitkilerin abiyotik strese karşı gösterdikleri tolerans, stres genleri olarak adlandırılan birçok gen ile kontrol edilebilir (Chinnusamy, Schumaker ve Zhu, 2004) Genel olarak stres genlerini üç grup altında incelenir (Tablo 1.7).

Tablo 1. 7. *Stres genleri* (Chinnusamy vd., 2004).

1.Grup	<ul style="list-style-type: none">• Transkripsiyonel kontrolde görevli proteinler (MAP kinaz, MyC, SOS kinaz)• Transkripsiyon faktörlerini üreten genler (HSF, CBF/DREB, ABF/ABRE)
2.Grup	<ul style="list-style-type: none">• Isı şoku proteinleri ve şaperonlar• LEA proteinleri• Osmotik koruyucular• Serbest radikal süpürücüler
3.Grup	<ul style="list-style-type: none">• Su ve iyon alımı ve taşınımında görevli por ve iyon taşıyıcıları üreten genler

Strese yanıt genleri ise erken yanıt genleri ve geç yanıt genleri olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Erken yanıt genleri, hızlı ve anlık uyarılmakta olup indüksiyonları için yeni protein sentezi gerekli değildir. Çünkü tüm sinyal verici bileşenler yerlerindedir. Geç yanıt genleri ise daha yavaş şekilde aktive olur ve ekspresyonları sürekli olup transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadırlar (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2006).

1.2.1. Kuraklık stresi

Kuraklık stresi, bitkilerde üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres etmenlerinden birisi olup, tarımsal ve ekolojik sistemler üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Reddy, Chaitanya, Jatur ve Sumithra, 2004; Jaleel vd., 2007). Tüm canlıların biyokimyasal aktivitelerinin gerçekleşmesini sağlayan en önemli yaşam kaynağı sudur. Su, tarımda da verimi etkileyen en önemli faktörlerdendir. Kuraklık; topraktaki su içeriğinin yetersizliğinden bitkilerin olumsuz olarak etkilendiği ve belirgin bir yağışın olmadığı periyodlara denilmektedir (Özcan, Babaoğlu ve Gürel, 2004).

Kuraklığı bazı araştırmacılar genel olarak su noksanlığı ve kuruma olmak üzere iki tipe ayırmaktadırlar. Bu ayrıma göre su noksanlığı; stomaların kapanması sonucu gaz değişiminin kısıtlanmasına neden olan orta düzeydeki su kaybına denilir. Kuruma ise; reaksiyonların katalizlenmesini durdurarak bitkinin aşırı su kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır (Smirnoff ve Cumbes, 1989)

Kuraklık stresi, bitkilerin büyüme ve verim, hücre içi yapılar, fotosentez ve azot metabolizması üzerine olumsuz etkilerinin bulunması nedeniyle bitki metabolizmasını bozmaktadır (Kocaçalışkan, 2003). Su stresi, toprakta bitkiye yarayışlı su miktarının azalması, atmosferik koşulların etkisiyle transpirasyon ve evaporasyon sonucu su kaybının sürmesi durumunda ortaya çıkmaktadır. Stres, günlük ya da uzun süreli olabilir. Su stresinin uzun sürmesi ve yeterince su alımının gerçekleşmemesi bitkilerde ölüme yol açabilir (Kacar, Katkat ve Öztürk, 2002).

Bitkilerde kuraklık stresinin oluşması ise bitkinin strese olan toleransına ve genotipine, stresin süresine ve şiddetine, toprağın su tutma kapasitesine ve transpirasyon hızına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bitkilerin vejetatif dokularında kuraklığa karşı bazı direnç mekanizmaları bulunur. Bunlar, kuraklıktan kaçınma ve kurumaya karşı toleranstır. Kuraklıktan kaçınma mekanizmaları; bitkinin hayat döngüsünün kısa olması, su kaybının engellenmesi ya da kuraklığa karşı dirençte olduğu gibi protoplazmada turgoru devam ettirmesidir (Mitra, 2001). Bitkiler dokularındaki su kaybını tolere edebilmek yani en aza indirebilmek için bazı morfolojik, fizyolojik ve metabolik değişimler göstermektedirler (Anami, Block, Machula ve Lijsebetens, 2009; Mitra, 2001). Bitkiler, dokularındaki suyu korumak için kurak ortam koşullarında yapraklarında meydana gelen bazı morfolojik değişimler (tüy, kutikula ve stoma yapıları vb.) sayesinde kaybedilen su miktarlarını azaltırlar. Ayrıca köklerinde meydana gelen bazı morfolojik farklılaşmalar ile topraktaki suyun daha iyi absorbe edilmesini sağlarlar (Çırak ve Esendal, 2006).

Kuraklık stresine bağlı olarak bitkinin su kaybetmesiyle birlikte, hücre içi iyon yoğunluğunun artması sonucunda, hücredeki zar bütünlüğünün ve proteinlerin yapısı bozulmaktadır ki bunların kuraklık stresinin metabolik etkisinden kaynaklandığı bilinir. Ayrıca kuraklık stresinin bitki hücrelerinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT)

birikmesine ve oksidatif stres oluşumuna da yol açtığı çeşitli araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. Hücrenin metabolik işlevlerini devam ettirebilmesi, moleküllerin taşınması ve çözünmesi için su önemlidir. Su kaybı, aminoasitlerin su ile etkileşimlerinin bozulmasına ve proteinlerin denatüre olmasına neden olur. Sonuç olarak enzimler inhibe olurlar ve amonyak (NH₃) gibi toksik bileşikler açığa çıkararak, bitkide metabolik dengenin bozulmasına ve ayrıca suyun yukarı doğru taşınmasına da engel olmaktadır. Bununla birlikte bazı çalışmalarda kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin hücrelerinde karbohidratlar ve prolin gibi metabolitleri de biriktirdiği tespit edilmiştir (Campbell, 1991; Bray, 1997; Kalefetoğlu vd. , 2005).

1.2.2. Tuz Stresi

Tuz stresi, dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde bulunan tahıl üretimini sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir (Shannon ve Grieve 1998; Allakhverdiev, Sakamoto, Nishiyama, Inaba ve Murata, 2000). Yıllık yağış miktarının kurak ve yarı kurak bölgelerde çok az olması, topraktaki tuz oranının artmasına ve tarımsal bitkilerin gelişimlerinin de olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır (Winicov, 1998).

Yağışlı bölgelerde topraklar su ile yıkandığı için tuzlar yer altı sularına karışır ve tuzluluk olmaz. Ülkemizde bulunan kurak ve yarı kurak bölgelerde drenajların iyi olmaması nedeniyle sulamalar yapılmaktadır. Ancak sudan gelen tuzların zamanla topraklarda birikmesi sonucu toprağın tuzlu hale gelmesine neden olmaktadır (Uygan, Havgören ve Büyüktaş, 2006). Bununla birlikte bazı bölgelerde evaporasyonun yüksek olması nedeniyle de suların beraberinde taşıdıkları tuzları toprak yüzeyinde bırakması sonucunda da, bu bölgelerde tuzluluğun artmasına ve toprakların su tutma kapasitesinin düşmesine sebep olmaktadır (Shannon ve Grieve, 1999).

Yüksek tuz konsantrasyonlarının bitki hücresinde meydana getirdiği olumsuzluklar üç ana başlık altında toplanabilir: Bunlardan ilki su stresinden kaynaklanan zararlardır, diğeri iyon toksisitesinden kaynaklı hücrede meydana gelen zararlardır ve

üçüncüsü ise Na^+ ve Cl^- birikmesi sonucu Ca^{2+} ve K^+ iyonlarının hücre dengesini bozması sonucu oluşan zararlıdır. Tuz stresinden dolayı bitkilerin hücrelerarası boşluklarında Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikmesine neden olmaktadır. Bu iyonların enzim aktivitesini, protein sentezini ve mRNA oluşumlarını engellediği görülmüştür (Zhu, 2001; Forment, Naranjo, Roldan, Serrano ve Vicente, 2002). Ayrıca topraktaki tuz seviyesinin düşmesi, suyun ozmotik basıncının düşmesine ve dolayısıyla bitkilerin fizyolojik olarak kuraklık stresine girmesine neden olmaktadır (Levitt, 1980).

Tuz stresi sonucunda bitkilerin büyümelerinin yavaşladığı, yaş ve kuru ağırlıklarının azaldığı, klorofil miktarının azaldığı, meyve kalitelerinin bozulduğu ve verimlerinin de azaldığı görülmektedir (Shannon vd., 1999; Ashraf, 2004).

Bitkiler tuz stresi sırasında transpirasyonu azaltarak su kaybını önlemek için bazı fizyolojik değişimler geçirirler. Örneğin, stomalarını kapatırlar ya da yaprak alanlarını küçültürler. Ancak bu durum sonucunda bitkilerin fotosentez yapmayı azalttığı ve bitkinin büyüme ile gelişmesinde de azalma olduğu görülmektedir (Karanlık, 2001; Yaşar, 2003).

Bitkilerin tuz stresine tepki gösterme yeteneklerinin, strese maruz kaldıkları gelişim evresinde ifade edilen genlere bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Tuza toleranslarını arttıran aday genler üç ana fonksiyonel gruba ayrılmaktadır: Bunlar tuz alımı ve transportunu kontrol eden genler, ozmotik veya koruyucu fonksiyona sahip genler ve tuzlu koşullarda bitki büyümesini hızlandıran genlerdir. Genel olarak bitkilerin tuz stresine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarının protein sentezine bağlı olduğu görülmektedir. Tuzlu topraklarda yetişen bitkilerin, su eksikliği ve iyon toksik etkisinin olması nedeniyle bazı proteinlerin sentezlerini azalttığı görülmüştür. Ayrıca bazı bitkilerin tuz toleransını arttıran yeni proteinleri sentezlediği tahmin edilmektedir. Ancak bu proteinlerin tamamı henüz aydınlatılamamıştır. Rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak gen transformasyonu ile tuza dayanıklı transgenik bitkiler elde edilmeye çalışılmaktadır (Türkyılmaz, 2004).

1.3. Gen İfadesinde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde hücre ve dokularda ifade edilen genler ile ilgili farklılıkların anlaşılması için halen birçok araştırma yapılmakta ve yeni teknolojik yöntemler geliştirilmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar iki ana gruba ayrılmaktadır: Birincisi RNA düzeyinde yapılan çalışmalar olup gen anlatımı analiz yöntemleri kullanılmaktadır. İkinci grup ise proteom araştırmalarını içeren yöntemler olup kütle spektrometri dizileme yöntemi, iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ve protein array gibi yöntemler kullanılmaktadır. RNA düzeyindeki gen anlatımı analiz yöntemleri ise genel olarak dört ana gruba ayrılmaktadır. Bu yöntemler kodlanan proteinin fonksiyonu hakkında yeterli olmasa da, gen anlatım sonucundaki farklılıkların belirlenmesi için kullanılmaktadırlar (Kömürcü ve Ünaltuna, 2011).

PZR temelli teknikler

- Eş zamanlı kantitatif PZR
- DD (Differential display)

Dizileme Temelli Yöntemler

- EST (Expressed Sequence Tags) dizileme
- SAGE (Serial Analysis of Gene Expression)
- MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing)

Hibridizasyon temelli teknikler

- DNA mikroarray
- Dot/Northern blot tekniği
- Nükleaz koruma analizi
- Ayırıcı plak hibridizasyonu
- İn situ Hibridizasyon

Hibridizasyon ve PZR kombinasyonuyla oluşan teknikler

- RDA (Representational Difference Analizi)
- ESD (Equalization of cDNAs, Subtractive hybridization and Differential display)
- SHL (Subtractive Hibridizasyon Kütüphanesi)

1.3.1. PZR (Polimer Zincir Reaksiyonu)

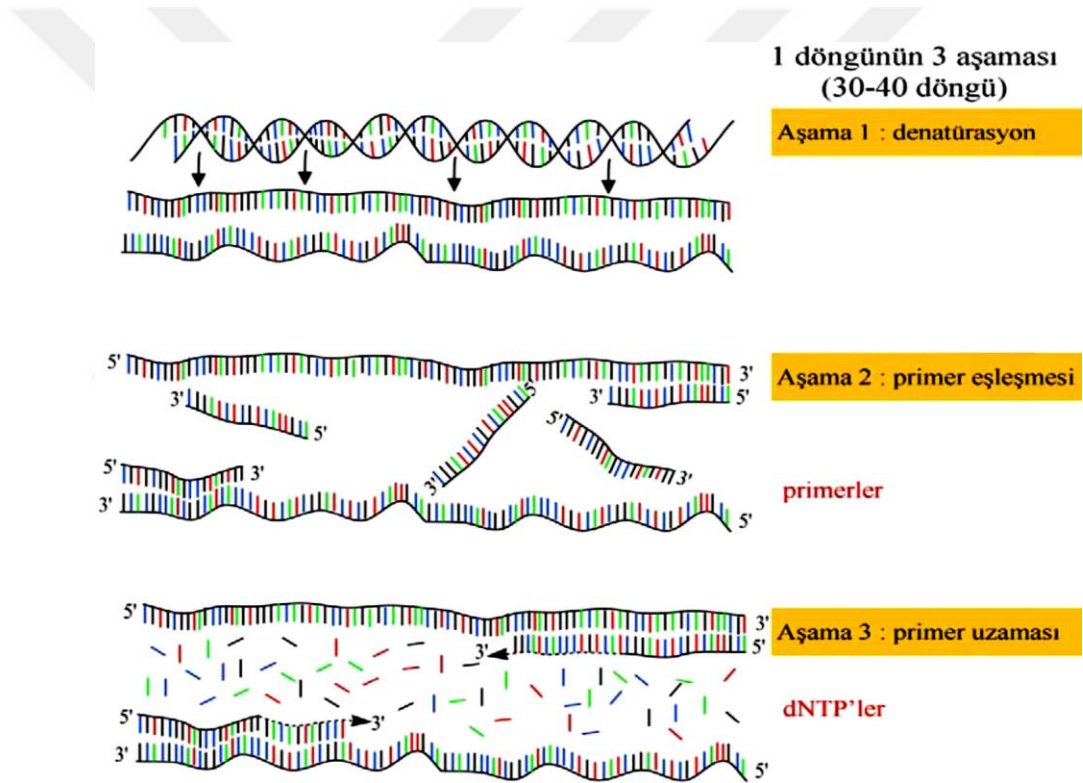
Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA replikasyonunun tüp içerisinde hızlı bir şekilde ardarda tekrarlanmasıyla birlikte DNA miktarının milyonlarca kat artırılarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. DNA replikasyonu kısaca, DNA'nın kendini eşlemesi yani DNA ipliğinin kalıp olarak kullanılıp çoğaltılması olayına denilmektedir. Prokaryot hücrelerde DNA replikasyonu, halkasal bakteri kromozomunda tek bir nokta olan replikasyon orjininden başlayarak, DNA'nın tümüyle kendini eşleyene kadar iki yönde ve aynı hızda sentezi yapılmaktadır. Ökaryot hücrelerde ise DNA replikasyonu birçok bölgeden başlamakta ve her iki yöne doğru komşu bölgeler birleşene kadar devam etmektedir. Replikasyon çatalında ise iki DNA ipliğinin her biri yeni DNA sentezi için kalıp olarak kullanılmaktadır. Replikasyon bir iplikte kesintisiz olarak ilerlemekte iken diğer iplikte kesintili yeni DNA, 1000-2000 bazlık kısa DNA parçaları şeklinde sentezlenmektedir. Replikasyonun başlaması için kısa bir primer dizi gereklidir. Daha sonra RNA primeri uzaklaştırılır ve yeri polimeraz I tarafından üretilen nükleotitlerle doldurulur. Doldurulan bölgeler DNA ligaz ile birleştirilmektedir. Replikasyon sonucunda oluşan hatalar da düzeltme mekanizmalarıyla düzeltilerek giderilmektedir (Wright, 2000).

PZR reaksiyonu için kısa DNA dizilerine yani primerlere, Taq DNA polimerazın substratı olan dNTP'lere (ATP, GTP, TTP, CTP), kofaktör olarak kullanılan Mg^{+2} iyonuna, DNA moleküllerinin komplementerleriyle eşlenmesi ve onların çoğaltılmasını sağlayan termostabil karakterli Taq DNA polimeraz enzimine ve çoğaltılacak hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA'ya ihtiyaç duyulmaktadır. PZR reaksiyonu hazırlanırken kullanılacak kimyasalların miktarları ve konsantrasyonları hesaplanırken, çoğaltılması istenilen DNA dizisine bakılmaktadır. PZR'de hedef DNA'nın çoğaltılması için ortalama olarak 20-40 döngü gerçekleşmesi gereklidir. Ayrıca her bir döngü de 3 farklı adımdan yani farklı farklı sıcaklıklar içeren basamaklardan oluşur. PZR işlemi de bu 3 basamağın tekrarlanmasıyla gerçekleşmektedir (Şekil 1.2).

I. Basamak (Denatürasyon) Kalıp DNA çift zincirinin açılması için gerekli olan sıcaklıktır ki ortalama olarak bu sıcaklık 90-100°C'dir.

II. Basamak (Annealing) Bağlanma basamağı olup, DNA'nın primerlerle birleşmesi gerçekleşir ve ortalama 50-60°C'deki sıcaklıklarda gerçekleşir.

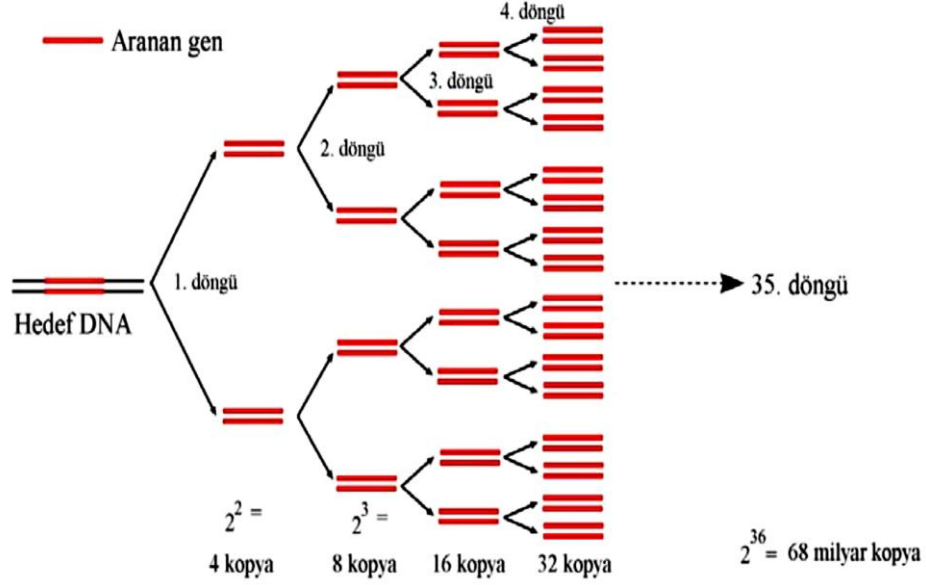
III. Basamak (Extension) Uzama basamağı denir ve ortalama sıcaklık 72°C'de DNA polimeraz enziminin maksimum aktiviteye sahip olduğu zaman gerçekleşir. Yani tek sarmal hedef DNA'nın komplementeri primerle zincir yapmaya başlamakta ve Taq polimeraz da ortamdaki dNTP'leri kullanarak zincirin uzamasını sağlamaktadır. Sonuç olarak tek iplikli DNA zinciri, çift iplikli hale gelmiş olacaktır (Okutucu ve Pehlivan, 2003).



Şekil 1. 2. PZR çoğalmasının basamakları (URL-5, 2015).

DNA'nın çoğaltılması, başlangıçtaki ana zincirin reaksiyon sonundaki kopya sayısı olup $(2^n - 2n)x$ formülüyle açıklanmaktadır. Formüle göre n döngü sayısı, 2n ilk ve ikinci döngüden sonra elde edilen uzunluğu bilinmeyen ürünler, x ana zincirin kopya sayısıdır (Şekil 1.3). Potansiyel olarak 20 döngüden sonra her döngü %100 başarı ile 220 kez amplifikasyonu olacaktır. PZR'nin başarısı, uygulanan optimizasyon

düzeyine ve atadan ataya bağlı olarak değişkenlik gösterecektir (Sambrook, Fritsch ve Maniatis, 1989).



Şekil 1. 3. DNA'nın PZR ile üstel çoğaltılması (URL-5, 2015).

PZR yöntemi, DNA'nın klonlanmasından daha basit ve daha hızlı olması sebebiyle genetik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. PZR sadece farmasotik ve klinik alanlarda değil, ayrıca antropoloji, arkeoloji ve ziraat gibi birçok uygulama alanlarında da kullanılmaktadır (Winter, Hickey ve Fletcher, 1998).

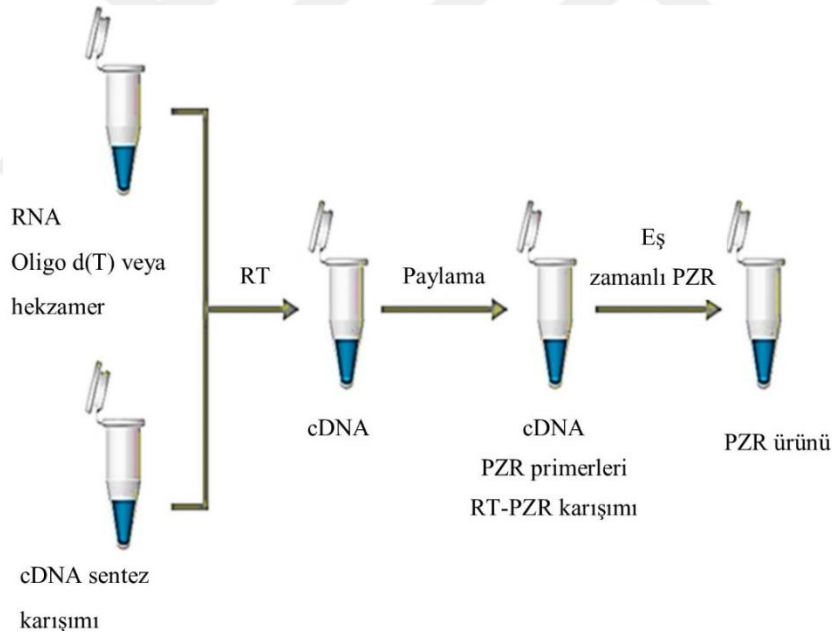
1.3.2. Eş Zamanlı-PZR

Eş Zamanlı PZR, “Sayımsal Gerçek Zamanlı – Polimer Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)”, “İzlenebilir Polimeraz Zincirleme Tepkimesi (PZT)”, “Floresan Sayımsal RT-PZR” gibi farklı isimlerle de adlandırılmaktadır (Kubista, 2008).

Eş Zamanlı PZR, “PZR” çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Eş Zamanlı PZR ile hücrelerden izole edilen RNA molekülleri, retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizleri hızlı ve hassas bir biçimde yapılabilir (qRT-PZR). Bu sebeple

Eş Zamanlı PZR ile az miktarda RNA ile oluşan mesajlar saptanabilir, ekspresyon miktarı da tespit edilebilir. Oluşan Eş Zamanlı PZR ürünleri, klonlama vektörü olarak kullanılabilir ve cDNA kütüphaneleri oluşturulabilir (Santagati, Garnier, Carlo vd., 1997).

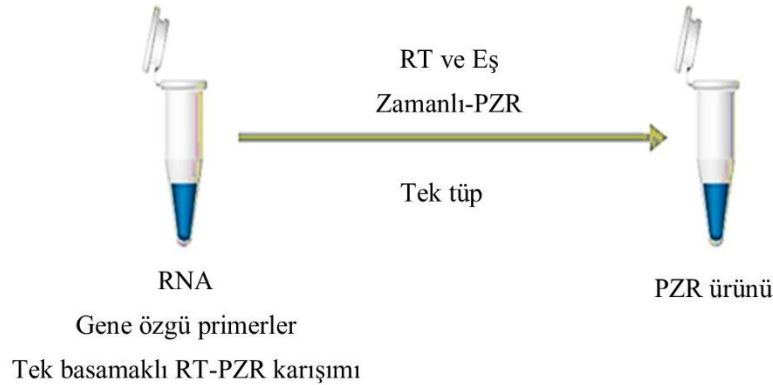
qRT-PZR iki basamaklı ya da tek basamaklıdır. İki basamaklı qRT-PZR’de, cDNA sentezi reaksiyonlarında random-hegzamer primerleri, oligo dT primerleri ya da gen spesifik primerleri kullanılmaktadır. Sentez için de Retrovirüslerden elde edilen ters transkriptaz enzimleri işlev görmektedir. İki basamaklı qRT-PZR’de, tek RNA örneğinden çoklu mesajların saptanmasında kullanılmak üzere tek zincirli cDNA’lar, oligo dT, random hegzamer veya gen spesifik primerlerle eşleşmektedir. İki basamaklı qRT-PZR, tek örnekten oluşan farklı mesajların saptanması ve kantitasyonu için kullanılmaktadır (Şekil1.4).



Şekil 1. 4. İki basamaklı qRT-PZR (URL-6, 2015).

Tek basamaklı qRT-PZR yöntemi, RNA örneği fazla ise daha kullanışlı bir yöntem olup, ters transkripsiyon ve PZR aynı tüpte aynı koşullarda gerçekleştirilmektedir (Şeki1.5). Tek basamaklı qRT-PZR’ de, terstranskriptaz ile amplifikasyon enzimlerinin birlikte çalıştığı ve çok hassas olduğu görülmektedir. Basamak sayısının

azalması, daha az pipetleme yapılmasını sağladığı için, kontaminasyon riskini azaltmış olacaktır (Okutucu vd., 2003).



Şekil 1. 5. Tek basamaklı qRT-PZR (URL-6, 2015).

qRT-PZR sonuçlarının kabul edilebilir olması için yüksek kalite ve saflıkta örneklerin hazırlanması, uygun enzimlerle çalışılması, uygun primerlerin seçilmesi, farklı tampon ve ilave ajanların kullanılması ile döngü parametrelerinin iyi ayarlanması çok önemlidir. İyi bir cDNA eldesi için yüksek saflıktaki RNA ile çalışılmalıdır. RNA'nın bulunduğu ve en çok çalışıldığı örnekler kan, serum, hücre kültürleri, bitki dokuları, hayvan dokuları ve bakteri kültürleri olarak sıralanmaktadır. Lifli dokular ve proteince zengin dokulardan RNA izolasyonlarının iyi yapılması gereklidir. Başarılı bir RNA izolasyonu için de protein, lipid, DNA ve nükleazların ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Bunun için DNaz parçalaması, fenol: kloroform ekstraksiyonunun tekrarlamalı olarak yapılması ve LiCl çöktürme gibi işlemlerin yapılması gereklidir (Okutucu vd., 2003).

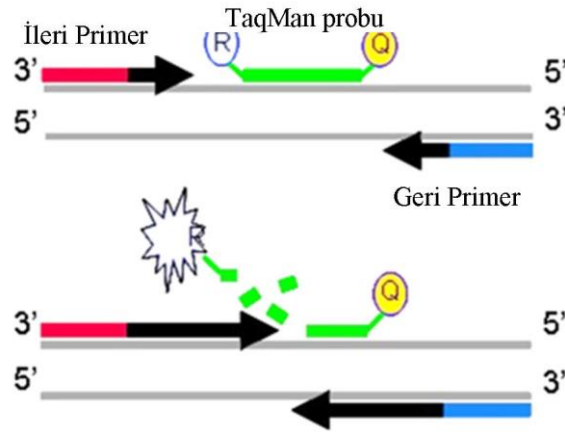
Eş Zamanlı PZR, hızlı, dinamik, kontaminasyon riski az olan yani kapalı sistemlerde gerçekleşen, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyaline dayalı bir PZR yöntemidir. Klasik PZR'da, DNA'nın çoğaltılması sonucu elde edilen PZR ürünleri, jel elektroforezinde yürütüldükten sonra jelde görüntülenerek tespit edilmektedir. Eş Zamanlı PZR'de ise çoğaltma ve görüntüleme basamakları aynı anda yapıldığı için çok daha hızlı ve güvenilir sonuçlar alınmaktadır. Eş Zamanlı PZR'de klasik PZR'in bileşenlerine ek olarak (Tablo1.8)'de de gösterilen floresan işaretli prob ya da boyalar kullanılmaktadır. Eş

Zamanlı PZR analizleri için, floresan görüntüleme özelliği olan termal döngü cihazları kullanılmaktadır.

Tablo 1. 8. Eş Zamanlı PZR’de kullanılan prob sistemleri ve boyalar (URL-7, 2015).

I. Özgül Floresan İşaretli Problar	II. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar
<ul style="list-style-type: none">• FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)• Taqman• Molecular Beacons• Scorpion Primerleri• Hibridizasyon Probları	<ul style="list-style-type: none">• Syber Green I• Etidyum Bromid

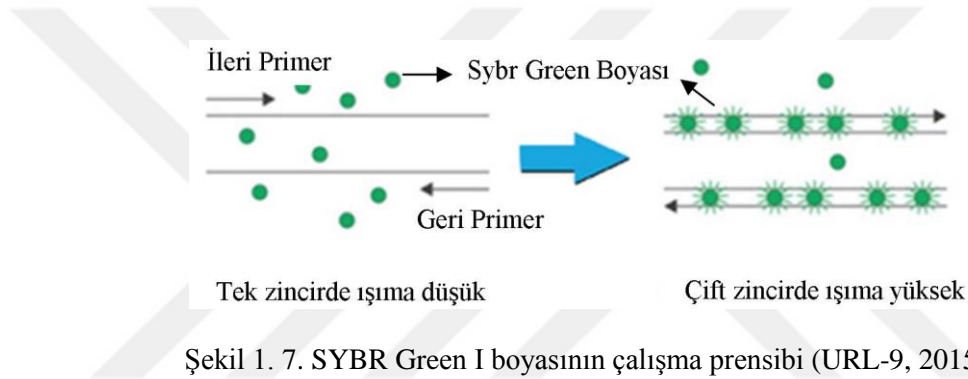
Çoğaltılmak istenilen DNA parçasının saptanmasında, floresan işaretli problar kullanılmaktadır. Kullanılan bu prob sistemlerine örnek olarak ise; TaqMan prob (Şekil1.6), Molecular beacon, Light-up prob, hibridizasyon prob ve Scorpion primer gibi floresan işaretli problar verilebilir (Günel, 2007).



Şekil 1. 6. TaqMan prob çalışma prensibi (URL-8, 2015).

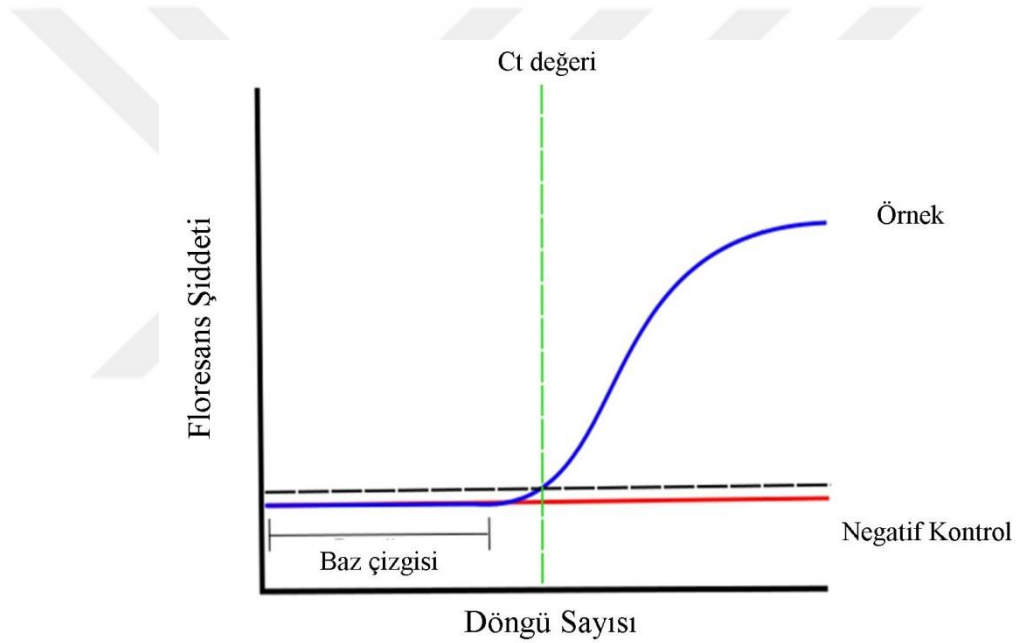
SYBR Green I, boya çeşitlerinden en fazla kullanılan olup, 497 nm dalga boyunda yükselttiği ve 520 nm dalga boyunda ise indirdiği bilinmektedir. Bu yöntemle spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltılması sağlanmış olur. Kullanılan

floresan boyanın sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığını ve çoğalan DNA miktarının artmasıyla Eş Zamanlı PZR cihazında okunan floresan miktarının da eş zamanlı olarak arttığı belirlenmiştir. DNA'nın çoğaltılması için reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green I boyası bulunmaktadır. Serbest DNA molekülü ise çok az bir floresan ışması yapmaktadır. Primerler bağlanıp uzamaya başladığında ise, boya molekülü çift zincirli DNA'ların arasına girerek floresan yayılımı başlar (Şekil 1.7). Başlangıçta sinyalin zayıf olduğu, ama döngü boyunca ürün miktarının arttığını ve bu artışa bağlı olarak floresan miktarının da hızla artmış olduğu görülmektedir ki bu artış 'Real time' cihazındaki monitörden izlenebilir (Kubista vd., 2006).



Bu yöntemin avantajı optimize edilmiş PZR şartlarında tasarlanmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasıdır. Ayrıca floresan işaretli problara ihtiyaç duymadığı için de daha ucuzdur. Ancak bu yöntemin dezavantajı, istenmeyen PZR ürünlerin çoğalması sonucunda da bazen floresan ışmanın açığa çıkması ve yanlış pozitif sonuçların da alınabilmesidir. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbirlerine bağlanmaları sonucunda primer dimerleri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışması da görülmektedir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için de DNA'ların erime eğrisi analizleri (melting curve, dissociation) yapılması gerekmektedir. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesinin olması, her ürünün kendine özgü uzunluğu olduğunu ve her türe ait gen dizisinin farklı olduğunu göstermektedir. Bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi güvenilir şekilde karşılaştırılabilir (Van der Velden vd., 2003).

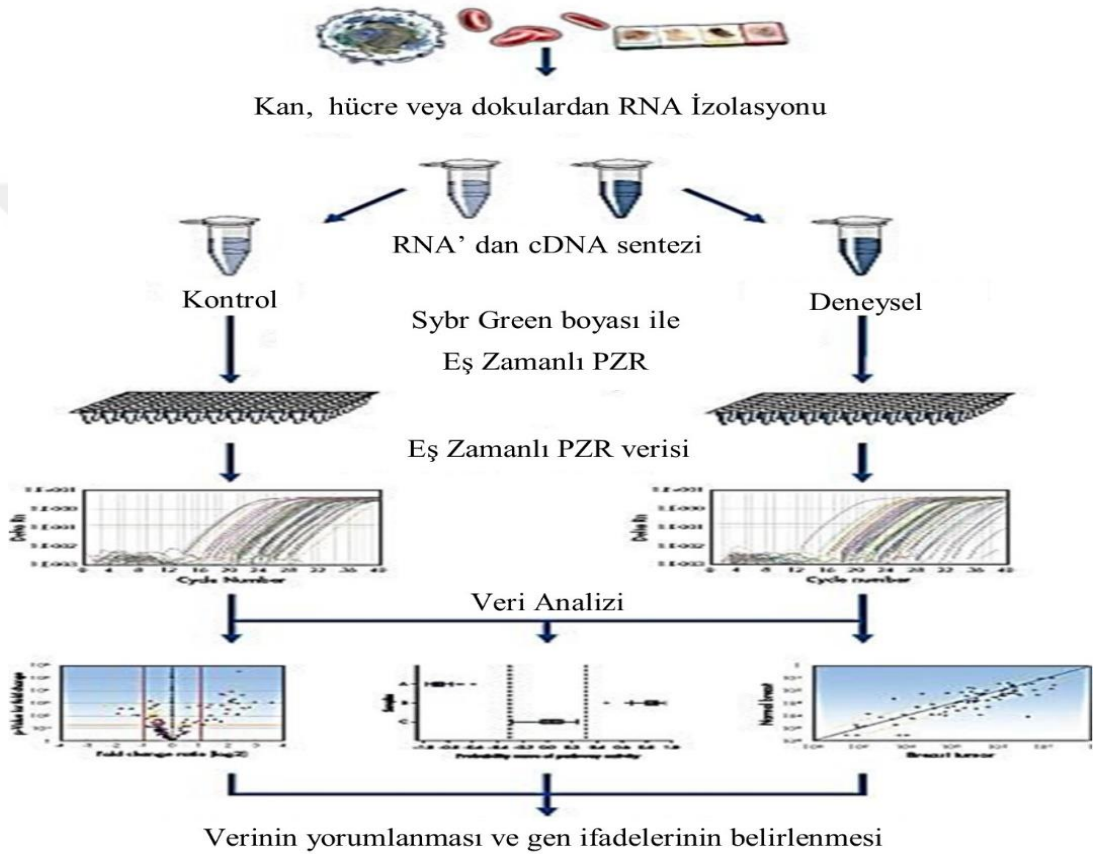
Eş Zamanlı PZR’de önemli bir parametre olan Ct değeri (Eşik döngüsü değeri = Threshold cycle), amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışımının eşik değerini aştığı döngü sayısını ifade etmektedir (Şekil 1.8). Yani ilk anlamlı artışın olduğu noktaya denilmektedir (Wong and Medrano, 2005). Florimetrik PZR yöntemi ile yapılan kantitasyon çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile araştırılan örneğin Ct değerleri karşılaştırılarak kantitasyonları yapılmaktadır. İyi ekspresyon sağlayan bir örneğin seri dilüsyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı verilmektedir (Pfaffl, 2001).



Şekil 1. 8. Ct değerlerine bağlı miktar tayini (URL-10)

Kantitatif RT-PZR uygulamalarında normalizasyon yapılabilmesi için çeşitli koşullarda ekspresyonunun değişmediği bilinen bir referans gene ihtiyaç vardır (Bustin, 2002). Farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, araştırılan genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ekspresyonu değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA’ sını ile normalizasyonu yapılmalıdır. Araştırılan genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak belirlenmiş housekeeping genin ekspresyon düzeyine oranlanarak, deneysel hatalar normalize edilmektedir. Bunun için farklı doku ve hücre tiplerinde, hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi

amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak housekeeping genin seçilmesi önemli ve gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik gösterirse yani sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans sağlanmış olacaktır. ‘Real time’ cihazı ile yapılan bu çalışmaların kısaca özeti (Şekil1.9)’ da gösterilmiştir.



Şekil 1. 9. Eş zamanlı PZR çalışma ve analiz aşamaları (URL-11 2015).

1.3.3. Dizileme Yöntemleri

DNA dizi analizi, DNA parçasında bulunan nükleotid (A, C, G, T) sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanabilir. Yani DNA parçalarına ait bu nükleotid sıralarının belirlenmesi ile DNA bölgesinin hangi proteini kodlayabileceğine ilişkin bilgilerin elde edilmesi sağlanmış olur. Genomik DNA dizisi ile tamamlayıcı DNA'ya ait dizi bilgileri karşılaştırılması sırasında; ekson ve intron bölgerin ortaya çıkarılması, DNA dizi analizi ile gen aktivitesini kontrol eden bölgelerin tanımlanması, spesifik

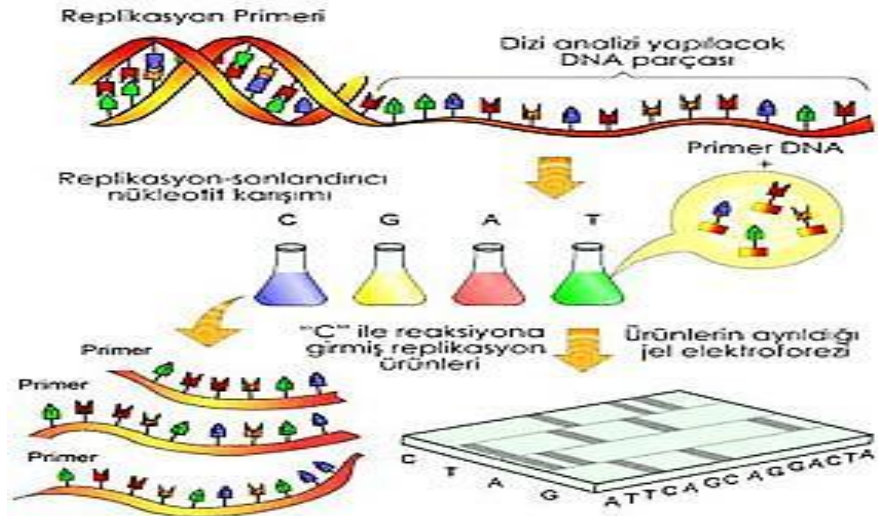
DNA dizilerinin belirlenmesi ve evrimsel akrabalık ilişkilerinin tanımlanması da yapılmış olur (Türktaş, 2011).

Dizileme yöntemleri; basit yöntemler, ileri yöntemler ve yeni nesil yöntemler olarak 3 genel başlık altında toplanabilir:

1.3.3.1.Basit dizileme yöntemleri

Sanger yöntemi (Zincir Sonlandırma Yöntemi)

Shotgun tekniği ile Sanger dideoksi metodu genom sekansının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntem olup, uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılmaktadır. Dizi analizi yapılamayacak kadar uzun olan DNA'ları önce küçük parçalara bölünmekte ve elde edilen her bir parça bir plazmite klonlanmaktadır. Klonlanan plazmitler tek tek dizilerek, bioinformatik analizler ile uzun DNA parçası dizisi elde edilir. DNA dizilerinin birçok kopyası, primer, normal deoksi nükleotidler (dNTP) ile dideoksi nükleotidler (ddNTP), DNA Polimeraz I enzimi ile kanşınırlır. DNA dört deoksiribonükleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) molekülünün birbirine bağlanmasıyla oluşan bir polimer olup, her eklenen yeni nükleotid bir önceki nükleotidin 3' OH⁻ ucuna eklenir. Dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) 3' OH⁻ ucu içermediğinden dolayı, enzim zincir uzamasını yapamaz ve zincirin son nükleotidini oluşturur. Sonra bu DNA dizilerinin, kapiller jel elektroforezi yardımıyla okumaları yapılır. Tüm bu aşamalar kısaca (Şekil1.10)'da özetlenmiştir (Sanger, Nicklen ve Coulson, 1977).



Şekil 1. 10. Sanger dizileme yöntemi (URL-12,2015).

Maxam– Gilbert Dizilemesi

Maxam-Gilbert yöntemi; DNA'nın kimyasal modifikasyonuna ve onun belli bazlardan kesilmesi yöntemine dayanan bir dizileme yöntemidir. Bu yöntem, Sanger dizileme yönteminden daha sonra bulunmasına rağmen, hem çok karmaşık, hem de fazlaca zararlı kimyasallar kullanılarak yapılması nedeniyle, çok tercih edilmemiştir (URL-13).

1.3.3.2. İleri Dizileme Yöntemleri

Tüm kromozom gibi uzun DNA parçalarının dizilenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Büyük DNA parçaları restriksiyon enzimleri veya mekanik güçler kullanarak küçük parçalara ayrılmakta ve parçalanmış DNA bir DNA vektörüne klonlanarak, *Escherichia coli* bakterisinde çoğaltılmaktadır. İleri dizileme yöntemlerinde 2 yöntem kullanılır: Bunlar av tüfeği dizilemesi ve PZR köprüsüdür (URL-13).

Av Tüfeği Dizilemesi

1000 bazdan daha uzun olan ve hatta tüm kromozomu içerebilen bir dizileme yöntemidir. Bu dizileme yönteminde, DNA'nın rastgele kırılmış olan bir parçası

olması gereklidir. Bu kopan ya da koparılan parçalar dizilenir ve sonra kendine eşleşen parçaya benzemektedir (URL-13).

PZR Köprüsü

Klonlama yapılarak gerçekleştirilen bir dizileme yöntemidir. Yönteme göre moleküler büyüme olmaksızın, lazer ışınları ile baz etkinliklerinin görüntülenmesi şeklinde yapılmaktadır (URL-13).

1.3.3.3.Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri

Günümüzde kullanılan en önemli teknolojilerden biri olup, yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak, dizileme yapabilmektedir. Dizileme kapasiteleri sayesinde transkriptom analizi, moleküler markör geliştirme ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışma alanlarında kullanılabilir. Yeni nesil dizileme tekniklerinin avantajı, DNA fragmentlerinin klonlanmasına ihtiyaç duyulmadan amplifiye olmuş tek zincir DNA'dan dizi verilerinin belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu tekniklerin kullanımını sınırlayan faktörler ise yüksek maliyetli olmaları ve elde edilen verilerin yorumlanması için gelişmiş biyoinformatik analizler için gerekli araçlara ihtiyaç duyulmasıdır (Ansoerge, 2009).

Yeni nesil dizileme teknikleri üç temel aşamadan meydana gelmektedir: İlk aşamada DNA'nın sonikasyon veya nebulizasyon aracılığıyla rastgele kesilmesi gerçekleşmektedir. İkinci aşamada, Universal adaptörleri kesilmiş DNA fragmentlerinin bağlanması olmaktadır. Son aşamada ise, Immobilizasyon ve amplikon kümelerinin oluşturulması için adaptöre bağlı fragmentlerin çoğaltılması gerçekleşmektedir (Shendure ve Ji, 2008).

Yeni nesil dizileme yöntemleri üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

Sentez Aracılığıyla Dizileme

Uygun büyüklükteki DNA fragmentlerine adaptör dizileri bağlanır ve sonra bu diziler, floresan veya kimyasal sinyali geliştirmek için amplifiye edilmektedirler. Daha sonra da örnekler ayrılır ve flowcell döngüsü için sabitlenirler. DNA dizilerinin

uzamasında kullanılan DNA polimeraz enzimi ile sentez yapılmaktadır. Dizilemede okuma uzunluğu, örneklerin amplifiye edilmesi ve sabitlenmesi açısından farklılık gösteren üç metot bulunmaktadır ki bunlar 454 GS20 pirodizileme, Illuminia ve Ion Torrent metotlarıdır. (Egan, Schlueter ve Spooner, 2012).

Ligasyon aracılığı ile dizileme

Ligasyon aracılığıyla dizilemede floresan etiketle işaretlenmiş farklı uzunluklardaki oligonükleotid probolar kullanılır. DNA fragmentleri proboların hibridizasyonuna izin veren kısa bir dizi ile astarlanır. DNA ligaz, flowcell'e eklenir. Floresan görüntüleme sayesinde hangi probun bağlandığı belirlenmiş olur. Bu işlem farklı prob setleri kullanılarak tekrarlanır. ABI/Solid ve Polonator olmak üzere iki metodu bulunur (Egan, vd., 2012).

Tek Molekül Dizileme

Tek nükleik asit molekülünden DNA dizileme sırasında kimyasal luminisans yoluyla nükleotid birleşmesinin sinyalinin belirlenmesine dayanır. Başlangıç materyali düşük konsantrasyonda kullanıldığı için basitleştirilmiş örnek hazırlama yönünden avantajlıdır. Bu metotlar ulaşılabilir ve bitki genomunda uygulanabilirliği açısından daha kolaydır. Bu dizileme yöntemine göre uygulanan metodlar Helicos Sistemi, Pasific Biosciences, Life Technologies-VisiGen/Starlight, Nanopor Dizilemedir (Egan vd., 2012).

Yeni nesil DNA dizileme metotları arasında maliyet, okuma uzunluğu (bç) ve çalışma süresi açısından birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Helicos sisteminin diğer sistemler ile karşılaştırıldığında daha az kullanıldığı, Pasific bioscience sisteminin de yeni nesil DNA dizileme metotları arasında en yüksek hata oranına sahip olduğu, Ion torrent sisteminin çalışma süresinin oldukça hızlı ancak bitkilerde kullanımının az olduğu görülmüştür. 454 ve Illumina tekniklerinin ise gerek verim, gerekse güvenilirlik açısından bitkilerde en yaygın kullanılan metotlar olduğu belirlenmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojileri maliyeti azaltmak ve verimi arttırmak amacıyla sürekli yeni yöntemler geliştirmektedir. Bunlar arasında optik dizileme ve SMRT teknikleri de bulunur (Dönmez, Şimşek ve Aka Kaçar, 2015).

Yeni nesil dizileme teknolojisinin son dönemde birçok alanda kullanıldığı görülmektedir. Bunların başında çevresel örnekte var olan tüm mikrobiyolojik genomların rastgele dizilenmesi sonucunda ortamın mikrobiyolojik çeşitliliğini ortaya çıkartan ve ayrıca daha önce bilinmeyen ya da çok az bilinen, sadece kendi doğal ortamında büyüyen ama kültür ortamında büyüemeyen bakteriler hakkında bilgi veren metagenomik gelmektedir. Metagenomik yaklaşım, daha çok hastane enfeksiyonları, ağız ve diş sağlığı gibi alanlarda kullanılmaktadır (Üstek, Abacı, Sırma ve Çakiris, 2011).

Atasal hedef diziler ile fosilden, saç, kemik gibi donmuş veya korunmuş örneklerden elde edilen DNA'lar ayırt edilebilmekte ve geniş kapsamlı dizi analizleri yapılabilmektedir (Üstek vd., 2011).

Transkripsiyon dizileme ile, mRNA transkripsiyon-ekspresyon analizi, yeni genlerin keşfi, henüz genomu tamamıyla tanımlanmamış organizmalarda gen bölgelerinin tanımlanması, tüm gen dizisinin oluşturulması, tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP) belirlenmesi, insersiyon-delesyonlar ve splicing varyantların tespiti, allel spesifik ekspresyonların analizi ve kromozomal yeniden düzenlenmelerin belirlenmesi sağlanılmaktadır (Üstek vd., 2011).

Küçük RNA'lar yani mikro RNA'lar ile bakteri içerisine klonlama yapmadan yüzlerce tanımlama yapılması sağlanılır ki böylece miktarları da belirlenmiş olur. Yapılmış çalışmalarda önceden tanımlanmamış olan küçük RNA'ların tespit edildiği ve farklı ekspresyon profilinin çıkartıldığı ya da küçük RNA'ların transkriptomlar ile karşılaştırılarak tespit edildiği görülmektedir (Üstek vd., 2011).

Metilasyon analiziyle, hedef genomik dizilerde bulunan metilasyonlar belirlenmektedir. DNA metilasyonunda olan değişikliklerin kanser, nörolojik hastalıklar (Şizofreni, Alzheimer) ve kardiyovasküler hastalıklarla (Ateroskleroz, Homosisteinemi) ilişkili olduğu görülmektedir. Genom boyu metilasyon kaybının ya da bazı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonunun, bu hastalıkların gelişiminde son derece önemli olduğu görülmektedir (Üstek vd., 2011).

Kromatin İmmunopresipitasyon Dizileme (ChIP-Seq) yöntemiyle ise, DNA'ya bağlanan proteinlerin, transkripsiyon faktörlerinin, histon proteinlerinin vb. genom üzerindeki tüm bağlanma bölgelerinin dizilenmesi mümkündür. Genom boyunca bağlanma bölgelerinin analizi ile gen ekspresyonunun düzenleyici mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. ChIP-PET (pair-end ditags) yöntemi son dönemde geliştirilen bir dizileme yöntemi olup, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri genom boyunca analiz edilmiş olunur. ChIP-PET yöntemi yüksek maliyetli ve pratik olmayan bir yöntem olup bazı klonlama basamaklarını içermektedir. Klonlama sonucu elde edilen DNA'lar da, Sanger yöntemine dayalı dizileme sistemleri ile analiz edildiğinden daha çok sayıda dizi analizi gerektirecektir. (Üstek vd., 2011).

Bitki ve tarımsal biyoteknolojide de daha çok yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılmaktadır. Çünkü bitki genomunun karmaşık ve büyük yapısının olması, Sanger Dizileme yönteminin maliyetinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılır. Bitkilerin tüm genomunun yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizileme yapılması ile ilgili çalışmalar, son 10-15 yıldır artarak devam etmektedir. Farklı dizileme yollarının, çeşitli örnek hazırlama stratejilerinin, immobilizasyon ve nükleik asit kimyasına sahip bu dizileme yöntemlerinin de halen geliştirildiği bilinmektedir. Bitkilerde yeni nesil DNA dizileme metotlarından en çok 454 ve Illumina dizileme stratejilerinin kullanıldığı bilinmektedir (Dönmez vd., 2015). Yeni nesil dizileme yöntemiyle yapılan çalışmalarda, doğruluk oranlarının yüksek olduğu okumaların yapıldığı görülmektedir. Yani yüksek kalitede, hızlı ve düşük maliyetlerde okumaların olduğu belirlenmiştir. Örneğin soya fasulyesinde büyük zarara yol açan kist nematodu olan *Heterodera glycines*' in 400 milyon bazlık genomu, Sanger dizileme yöntemi ve mikro-bead yöntemi kullanılarak karşılaştırılmaları yapılmıştır. Sonuç olarak Nematodun genomunda bulunduğu SNP' lerin mikro-bead yöntemi ile daha çabuk ve daha doğru tespit edildiği görülmüştür. Buda yeni nesil dizilemenin tarımsal mücadele açısından önemli olduğunu göstermektedir (Üstek vd., 2011).

1.4. Bitkilerde Stres Koşullarında Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Kserofitler yani kurakçıl olanlar, halofitler yani tuzcul olanlar veya cipsli yani alçıtışlı topraklarda yetişenler gibi özelleşmiş bitkilerin bazı stres koşullarına uyum sağladığını ve yaşamlarını sürdürebildikleri görülmüştür. Strese dayanıklı türler ile stres toleransları düşük olan *Arabidopsis thaliana* model organizması gibi bitkilerin strese verdikleri fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevapları arasındaki farklılıklar karşılaştırılmış ve araştırılmıştır (Boscaiu vd., 2008). Buna göre strese karşı gelişen makromoleküllerin moleküler cevaplarını 3 grupta toplayabiliriz ki bunlar; makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve detoksifikasyonu ile koruyucu moleküllerin sentezidir (Büyük, Soydam-Aydın ve Aras, 2012).

1.4.1. Makromoleküllerin ve İyonların Homeostazisi

Tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık gibi bir takım abiyotik çevresel faktörler, ozmotik bileşenler içerdiklerinden dolayı hücrelerin dehidrasyona uğramasına ve homeostazilerinin yani iç dengelerinin bozulmasına neden olmaktadır. Bitkiler tuz stresine maruz kaldıklarında sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) iyon dengesini iyi ayarlamak ve bu iyon taşınmasını iyi düzenlemek gereklidir. Tuzluluk nedeniyle bitkilerde Na^+ stresi, kök hücreleri tarafından K^+ alımını engellemektedir. Bu sırada hücreye Na^+ iyonu fazla miktarda giriş yaparak birikmekte ve toksik etkiye neden olduğu görülmektedir. Bu nedenle hücre ölümleri ve büyümelerindeki azalmayı engellemek için Na^+ iyonunun uzaklaştırılması ya da vakuolde bölümlere ayrılması sağlanmaktadır (Hasegawa, Bressan, Zhu, Bohnert, 2000; Munns, 2002).

Bitkiler dehidrasyona karşı cevap olarak su iletimi ve iyon dengesinin kontrolünü sağlayarak aquaporinlerini yani hidrofilik transmembran kanallarının ve iyon taşıma sistemlerinin aktivasyonunu ya da inaktivasyonunu sağlarlar (Zhu, 2000; Munns, 2002).

1.4.2. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Detoksifikasyonu

Bitkilerde endojen olarak kloroplastların fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşan en yoğun serbest radikal ROS'lardır (Van Camp, Van Montagu, Inze, 1998; Van Breusegem, Dat, 2006). ROS olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya atom ya da moleküle bir elektron eklenmesiyle oluşurlar. Elektron verebildiklerinden ya da elektron alabildiklerinden dolayı organizmada indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (Halliwell ve Gutteridge, 1998; Flora, 2007). Normalde bitkinin gelişimi sırasında sentezlenirler ancak detoksifikasyon mekanizması ile denge sağlanarak zararlı etki oluşturmazlar (Levitt, 1972). Singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot) hücrelerde bilinen ROS'lardan olup sürekli denge halinde bulunur (Halliwell, Jones, Menze ve Witt, 2007).

1.4.3. Koruyucu Moleküllerin Sentezi

Strese karşı bitkilerin verdikleri diğer cevaplar arasında LEA proteinleri yani geç embriyogenez bağımlı proteinler, ısı şoku proteinleri yani Heatshock gibi farklı özel proteinlerle, düşük molekül ağırlıklı çözünen maddeler ya da ozmolitler yani şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler yer almaktadırlar.

Tuzluluk stresinde birçok bitkide toksik etkisi olmayan ancak koruyucu ozmotin olarak adlandırılan katyonik proteinlerin biriktiği görülür. Ozmotin sentezinin absisik asit tarafından kontrol edildiği ve osmotolerans sağladığı görülmektedir (Singh, Handa, Hasegawa, Bressan, 1985; Husaini, Abdin, 2008). Ozmolitler stres tarafından oluşturulan ROS'un temizlenmesini sağlayan ozmotik ayarlayıcı ya da ozmoprotektan olarak bilinirler. Sitoplazmadaki suyu korumakta ve sodyumun vakuollerde tutulmasını kolaylaştırarak hücrel yapıların korunmasını sağlarlar (Smirnoff ve Cumbes, 1989).

Isı şoku proteinlerinin ise farklı stres koşullarında sentezlendiği bilinmektedir (Henle, Jethmalani, Nagle, 1999). Bu proteinler hasarlanmış ya da yanlış katlanmış polipeptidleri bağladıkları için polipeptid yıkımını önlerler ve böylece hücreyi strese karşı korumuş olurlar (Chiba, vd., 2006).

LEA proteinleri ilk olarak tohum embriyosunda tanımlanmış ve stres savunması sırasında bitkiyi koruduğu ileri sürülmüştür (Holmberg ve Bülow, 1998). LEA proteinlerinin suyu bağlayan yani hidrofilik protein yapısında olması sebebiyle su eksikliğinin etkisini azaltarak hücrenin yapısını koruduğu görülmüştür (Sairam ve Tyagi, 2004).

1.5. LEA Proteinleri

'Late embriyogenesis abundant' olarak isimlendirilen LEA proteinleri geç embriyogenez safhasında çok görülen ve kuraklık stresine bağlı olarak değişim gösterdiği düşünülen proteinlerdendir. İlk olarak buğday (*Triticum aestivum*) ile pamuk (*Gossypium hirsutum L.*) embriyolarında tanımlanmaları yapılmıştır. (Dure vd. 1981; Galau, Hughes, Dure, 1986).

LEA genleri ile ilk olarak gelişen tohumlarda birçok LEA benzeri genlerin sadece ABA veya diğer çevresel streslere bağlı olduğu görülmektedir (Bray, 1993; Cuming, 1999; Ingram ve Bartels, 1996; Wang vd., 2007). Ayrıca mantarlarda, protozoalarda, nematotlarda, böceklerde ve kabuklularda tanımlanmaları yapılmış ve farklı LEA genlerinin olduğu tespit edilmiştir. Hayvansal LEA benzeri genlerin dehidre veya anhidrobiyoz sporlarında, embriyo, fetüs, larva veya somatik dokularında bulunduğu sadece stres koşulları altında ifade edilebildiği ve bu nedenlerle de kuraklık toleransı ile ilgili oldukları söylenmiştir. Transgenik ve transformasyon çalışmalarından elde edilen bulgularda LEA proteinlerinin kurumayı önleyici içeriklerinin olduğu tespit edilmiştir (Kazuoka ve Oeda, 1994; Imai, Chang, Ohta, Bray ve Takagi, 1996 ; Xu vd., 1996 ; Nylander, Svensson, Palva ve Welin, 2001) .

1.5.1. LEA proteinlerinin yapısı

LEA proteinleri ortalama 10–30 kDa aralığında olan küçük molekül ağırlığındaki proteinlerdir. LEA proteinlerinin ortak özellikleri yüksek hidrofiliteye (Wise ve Tunnacliffe, 2004) ve çözeltideki ısı stabilitesine sahip aminoasit kompozisyonuna sahip olmalarıdır. LEA proteinleri, hidrofilinler olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak bununla beraber hidrofobik özellik gösteren proteinleri de içermektedirler. Bu gruplandırmanın fonksiyonel önemi henüz anlaşılamamıştır. Bu proteinler yaklaşık olarak otuz yıldır bilinmesine rağmen fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. LEA proteinlerinin büyük bir kısmı hidrofiliktir ve glisin aminoasidi bakımından zengindir. Ayrıca alanin, glutamik asit ve treonin aminoasitlerini de içerdiği bilinmektedir. Ancak triptofan ve sistein aminoasitlerinden yoksun oldukları görülmektedir (Dure, 1997).

LEA proteinlerinin kuraklık toleransı ve koruyucu rolleri hakkında fizyolojik karakterlerine bakılmıştır. Bu proteinlerin hidrofilik yapıda, su veya tuz bağlama kapasitesine sahip, subselular matriks ile ilişkili oldukları görülmüştür (Dure vd., 1989; Dure, 1993; Close, 1996).

LEA proteinlerinin yapısını saptamaya yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Circular dichroism (CD), nuclear magnetic resonance (NMR), veya Fourier transform IR (FTIR) spektroskopisi kullanılarak bazı LEA proteinlerinin ikincil yapıları da karakterize edilmiştir. LEA proteinlerini kodlayan genlerin aşırı ifade olduğu durumlarda transgenik bitkilerin stres toleranslarını geliştirebilecekleri düşünülmüş ve bununla ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; *HVA1* geninin arpa ve buğdaydaki ifadesinin, bitkilerin kuraklık toleransını ve buğday *PMA80* ve *PMA1959* genlerinin ifadesinin transgenik çeltikte dehidrasyon toleransını arttırdığı tespit edilmiştir (Cheng, Targolli, Huang ve Wu 1999; Xu vd., 1996; Sivamani vd., 2000). Transgenik tütünde yapılan araştırmalarda ise, soğuk toleransının LEA proteini kodlayan bir limon geninin (*CuCOR19*) ifadesiyle arttığı belirlenmiştir (Hara, Terashima, Fukaya ve Kubo, 2003). Buğday *WCS19* ve *Arabidopsis thaliana* *COR15A* genlerinin ifadesiyle *Arabidopsis thaliana*'da donma toleransının arttığı gözlemlenmiştir (Ndong vd., 2002; Artus vd., 1996; Puhakainen vd., 2004). Çilek

yapraklarındaki donma toleransının, buğday dehidrin geninin (*WCOR410*) ifadesinin artmasıyla birlikte geliştiği de bulunmuştur (Houde, Dallaire, N'Dong ve Sarhan, 2004). Ayrıca ıspanakta da, soğukla indüklenen 2 LEA proteinin transgenik bitkilerde soğuk veya kuraklık toleransı ile ilgili herhangi bir değişiklik göstermediği de belirlenmiştir. Bu bulgular, bütün LEA proteinlerinin, bitkilerde stress toleransına katkıda bulunamayabileceğini göstermiştir (Iturriaga, Schneider, Salamini ve Bartels, 1992; Puhakainen vd., 2004).

1.5.2. LEA proteinlerinin sınıflandırılması

LEA proteininin yapısal domainleri veya kimyasal karakteristikleri dikkate alınarak klasik değerlendirme ve POPP sınıflandırması olmak üzere iki değerlendirme yapılmıştır. Klasik değerlendirmede aminoasit dizisi ile korunmuş motiflere bakılmış ve LEA proteinleri 6 alt sınıfa ayrılmıştır (Dure vd., 1989; Bray, 1993; Cuming, 1999; Bies-Etheve vd., 2008). İkinci değerlendirmede ise bilgisayar analizine dayanan “Protein or Oligonucleotide Probability Profile, POPP” yani peptit kompozisyonlarına bağlı olarak yapılan sınıflandırma kullanılmıştır (Wise 2002, 2003).

1.5.2.1. LEA proteinlerinin klasik sınıflandırılması

LEA proteinleri klasik sınıflandırma yapıldığında; LEA-I proteinleri, LEA-II proteinleri, LEA-III proteinleri, LEA-IV proteinleri, LEA-V proteinleri ve A tipik LEA proteinleri olarak sınıflandırılmıştır.

LEA-I proteinlerinin; buğday EM proteini ve onun homoloğu olan pamuk D-19 proteinlerini içerdiği görülmüştür (Litts, Colwell, Chakerian ve Quatrano 1987; Baker, Steele ve Dure, 1988). Bahsedilen bu iki proteinin de yüksek dizi homolojisi gösterdiği ve benzer protein karakteristiklerine sahip olduğu görülmüştür (Baker vd., 1988; Dure vd., 1989). LEA-I proteinlerinin ortalama molekül ağırlığının 11.5 kDa olduğu, 6.8 'den 20.3 kDa' a kadar değişim gösterdiği görülmektedir. Çözeltideki bir aminoasit molekülü üzerinde net yükün sıfır olduğu pH değeri, izoelektrik nokta (pI) olarak adlandırılır. Net elektrik yükü bakımından bu proteinlerin; %58' inin pI<6,

%26' sının pI 6-9 arası ve %16' sının pI >9 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu gruptaki proteinlerin çoğunun küçük ve asidikten nötre doğru olduklarını belirlenmiştir (Volker vd. ,1994; Stacy ve Aalen, 1998).

LEA-II proteinlerinin; ilk olarak gelişen pamuk embriyolarında tanımlamaları yapılmıştır (Baker vd.,1988; Mundy ve Chua, 1988; Close, 1996). LEA-II proteinlerinin ise, soğukla ilişkili olan COLD proteinlerine benzer olduğu görülmüştür (Gilmour, Artus ve Thomashow, 1992). Günümüze dek çok çeşitli taksonlara ait birçok bitkide 100'den fazla sayıda LEA-II proteini tanımlamaları yapılmıştır (Rorat, 2006; Saavedra vd., 2006). LEA-II proteinleri sadece bu protein sınıfında bulunan 3 spesifik karakteristik diziyeye sahiptir ki bunlar; Y, S ve K domainleridir ve 5 alt grupta sınıflandırılmaktadır. Bu alt gruplar sırasıyla YnSK2, Kn, KnS, SKn ve YnKn proteinlerini içermektedir. Burada n tekrar sayısını göstermektedir. LEA-II proteinleri ortalama moleküler ağırlığı, 18.3 kDa olup, 5.3'ten 66.3 kDa' a kadar değişebilir. Net elektrik yükü bakımından ise; bu proteinlerin %7'sinde pI<6, %58'inde pI 6 ile 9 arasında ve %35'inde pI>9' dur. Bu da LEA-II proteinlerinin, nötrden bazığe doğru olduklarını göstermektedir (Close, 1996).

LEA-III proteinleri; *D-7* proteinleri olarak da adlandırılmaktadır. Bitki, mantar, mikroorganizmalar ve hayvanlarda bulunmaktadır (Tunnacliffe ve Wise, 2007). Bilinen 100'den fazla LEA-III proteini vardır. LEA-III proteinlerinin moleküler ağırlıkları 25.5kDa ortalamasıyla 7.2 'den 67.2 kDa 'a kadar değişmektedir. Net elektrik yükü bakımından %20'sinde pI<6, %37' sinde pI 6 ile 9 arasında ve %43'nde ise pI>9' dur. Değerlendirmelerin sonucunda, LEA-III proteinlerinin, nötrden bazığe doğru oldukları görülmektedir. Ayrıca LEA-III benzeri proteinlerin birçok organizmada dehidrasyona karşı oluşturdukları cevapları henüz bilinmemektedir (Hand, Jones, Menze ve Witt, 2007; Wang vd., 2007).

LEA-IV proteinleri; *D-113* proteinleri olarak adlandırılmaktadır. Pamukta *D-113*, domates ve onun yabani akrabasında *Le25*, ayçiçeğinde *Ha ds11*, soya fasulyesinde *GmPM1* ve *GmPM16*, Arabidopsis'te *AtLEA4-1* ve *AtLEA4-5* ve fasulyede *PvLEA18* olmak üzere çok farklı çeşitlerden LEA-IV izole edilmiştir. Günümüzde

birçok bitkide 100'den fazla LEA-IV proteini tanımlanmıştır. LEA-IV proteinlerinin ortalama moleküler ağırlığının 12.6 kDa olup 8.4 kDa ile 18.8 kDa arasında değişmekte olduğu bilinmektedir. LEA-IV proteinlerinde LEA-I, LEA-II ve LEA-III proteinlerinde olduğu gibi konsensus motif ve diziler yoktur. Net elektrik yükü bakımından ise bu proteinlerin %22'sinde $pI < 6$, %22'sinde pI 6 ile 9 arasında ve %56'sında ise $pI > 9$ olmasından dolayı LEA-IV proteinleri baziktir ve ısıyla çözünürler (Baker vd., 1988; Cohen, Tyrrell ve Smith, 1991; Almoguera ve Jordano, 1992; Kahn, Fender, Bray ve O'Connell, 1993; Parcy vd., 1994; Shih vd., 2004).

LEA-V proteinleri; *Arabidopsis thaliana* (AtECP31 ve AtRAB28), mısır (RAB28), pamuk (D-95, D-73), havuç (ECP31), gibi bitki türlerinde homologları belirlenmiştir. Bu proteinlerin ortalama moleküler ağırlıkları 18.1 kDa olup 5.3 ile 38.5 kDa arasında değişmektedir. Bu proteinlerin net elektrik yüküne bakıldığında %87'sinde $pI < 6$, %6'sinde pI 6 ile 9 arasında ve %7'sinde ise $pI > 9$ olduğu görülmektedir ki bu da LEA-V proteinlerinin çoğunun asidik olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu protein grubu hidrofobik oluşuylarıyla, diğer 4 hidrofilik LEA protein grubundan ayrılmaktadırlar (Baker vd., 1988; Galau ve Close, 1992).

Atipik LEA proteinlerinin; diğer LEA proteinleri gibi tohumda geç embriyogenez sırasında birikim gösterdiğini ve çimlenmeden hemen sonra da yok oldukları tespit edilmiştir. Aynı zamanda çeşitli stres koşulları sırasında bu protein grubunun, diğer organlarda da birikerek arttığı da düşünülmektedir (Shen, Uknes ve Ho, 1993; Gosti, Bertauche, Vartanian, Giraudatand, 1995; Breton, Danyluk, Charron ve Sarhan, 2003).

1.5.2.2. LEA Proteinlerinin POPP Sınıflandırması

Proteinlerin peptid kompozisyonlarına bakılarak yapılan bir sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmada, yazılıma yardımcı bilinmeyen bir proteinin, istatistik olarak değerlendirilmesini sağlayan bir program ile yapılmaktadır (Wise, 2002; Wise, 2003; Tunnacliffe ve Wise, 2007).

1.5.3. LEA proteinlerinin fonksiyonları

LEA proteinlerinin bitkilerde kuraklık, tuz ve soğuk gibi tüm stres direncinde etkili olduğu bilinmektedir. *Avicennia marina* ve *Podocarpus henkeli*'nin tohumlarının abiyotik stres dirençleri üzerine çalışmalar yapılmış ve çalışmaların sonucu olarak dehidrasyona duyarlı tohumlarında LEA proteinlerinin olmamasından kaynaklandığı belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise LEA proteinlerinin dokuya özgü olmadığı ve tüm gelişimsel aşamalarda ifade edildiği görülmüştür (Farrant, Spickett ve Matamoros, 1992).

Transgenik bitkilerde yapılan çalışmalarda LEA proteinlerini kodlayan genlerin aşırı ifadesinin stres toleransını arttırdığı belirlenmiştir. Buğday ve çeltikteki, arpa LEA4 grubu üyesi *HVA1* geninin ekspresyonunun bu bitkiler için kuraklık; Buğday *PMA80* ve *PMA1959* genlerinin transgenik çeltik bitkisinde ise dehidrasyon toleransını arttırdığı tespit edilmiştir (Xu vd., 1996). *Arabidopsis COR15A* genine, buğday *WCS19*' un uygulanmasıyla, *Arabidopsis*' in soğuk stresine karşı olan toleransının arttığı gözlemlenmiştir (Ndong vd., 2003). Buğdayda da desikasyon ya da dondurucu koşullar altında moleküler şaperon olarak görev yapan Em proteinlerinin, mayada desikasyon toleransını uyardığı tespit edilmiştir (Gilles vd., 2007). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda ise LEA proteinlerinin, stres koşulları altında kararsız enzimleri stabilize etme yeteneğine de sahip olduklarını görülmüştür (Bies vd., 2008).

2. KURAMSAL ÇERÇEVE

LEA proteinleri, ilk olarak pamuk tohumlarında embriyogenezisin son aşamalarında bulunmuştur (Dure vd., 1981). Genom seviyesinde *LEA* genlerinin belirlenmesi ilk olarak çeltik bitkisinde yapılmış olup, çeltik genomunda 34 adet *LEA* geni bulunmuştur (Wang vd., 2007). Bu genlerin ifade seviyeleri, hem mikroarray hem de PZR teknikleri kullanılarak tuz, kuraklık ve ABA uygulamalarından sonra incelenmiştir. Çeltikte belirlenen *LEA* genlerinin bir kısmı konsititüf yani sürekli olarak ifade edilirken bir kısmının ise sadece stres durumunda uyarıldığı gözlemlenmiştir.

Genom seviyesinde *LEA* genlerinin belirlenmesi Arabidopsis bitkisinde de yapılmış olup, Arabidopsis genomunda 51 adet *LEA* geni bulunmuştur (Hundertmark ve Hinch, 2008). Bulunan bu genlerin ifade seviyeleri, Arabidopsis bitkisinin farklı dokularında, sıcaklık, soğuk, ısı şoku, tuz, kuraklık, düşük ışık, küf ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanmasından sonra yaprak dokularında incelenmiştir. Bu çalışmada uygulanan biyotik ve abiyotik stresler sonucunda, Arabidopsis'te bulunan *LEA* genlerinin strese cevap olarak uyarıldığı saptanmıştır (Hundertmark vd., 2008).

Bu model organizmaların yanında, LEA proteinleri ayrıca baklagiller ailesine ait fasulye (*Phaseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*), yonca (*Medicago truncatula*), lotus bitkisi (*Lotus japonicus*), bezelye (*Cajanus cajan*) ve nohut (*Cicer arietinum*) bitkilerinde de olduğu belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, LEA protein dizileri incelenerek baklagiller için özel motifler bulunmuştur. *LEA* genlerinin farklı dokularda ve stres koşullarında ifade seviyeleri de transkriptom verileri aracılığıyla incelenmiştir (Battaglia ve Covarrubias, 2013).

LEA genleri sadece stres koşullarında değil, ayrıca bitkilerin normal büyüme ve gelişme sürecinde de aktif rol oynamaktadır. Buna, Çin eriğinde tanımlanan 30 adet *LEA* geninin ifade seviyelerinin incelenmesi örnek olarak verilebilir. Çin eriğinin

yaprak, kök, gövde, çiçek ve meyve dokularında *LEA* genlerinin ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir (Du vd., 2013).

Ağaçlar için model organizma olarak bilinen kavakda da, 53 adet *LEA* proteini genom seviyesinde tespit edilmiştir. Bu genler filogenetik olarak farklı *LEA* motiflerine göre 8 ana sınıfa ayrılmıştır. Bu çalışmada da kavak ağacı tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılarak farklı dokularda (kök, gövde, yaprak, floem ve tomurcuk) *LEA* genlerinin ifade seviyelerindeki farklılıklar eş zamanlı PZR ile incelenmiştir. Kavakta bulunan *LEA-7* grup proteinlerinin tuz ve kuraklık streslerinde önemli rol oynadıkları çalışma sonunda tespit edilmiştir (Lan, Gao ve Zeng, 2013).

Yalancıkılcan (*Brachypodium*) bitkisinin genomu incelenerek, 36 adet *LEA* geni tespit edilmiştir. *LEA* grup motiflerinin tamamı bulunan *LEA* proteinlerinde belirlenmesine rağmen, *LEA-2* grubunun bu bitki türü için hâkim form olduğu saptanmıştır (Filiz, Ozyigit, Tombuloglu ve Koc, 2013).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise domates genomunda 27 adet *LEA* geni belirlenerek, bu genlerin hem mikroarray hem de eş zamanlı PZR analizleri ile ifade seviyelerindeki değişiklikler gösterilmiştir. Ayrıca, abiyotik stres koşullarında önemli olduğu düşünülen *LEA* genlerinin promotör analizleri de yapılarak, promotör bölgelerinin streslerle ilgili ilişkileri araştırılmıştır. Domates bitkisine tuz, kuraklık ve soğuk stresi uygulamasından sonra, farklı *LEA* genlerinin cevap oluşturduğu gözlemlenmiştir (Cao ve Li, 2015).

Domates ile aynı aileden olan patatestede de *LEA* genleri genom seviyesinde belirlenmiş olup, domatestede bulunan *LEA* genlerine yakın miktarda yani 29 adet *LEA* geni patatestede tanımlanmıştır. Diğer organizma *LEA* genlerinde olduğu gibi, patates genomunda bulunan *LEA* genleri de filogenetik olarak *LEA* grup motiflerine göre ayrılmıştır. Araştırmacılar, patatestede tuz ve kuraklık stresine karşı erken cevap mekanizmasında *LEA* genlerinin rolünü görmek için, stres uygulamalarından sonra 3., 6., 9. ve 24. saatler sonunda gen ifadesindeki değişiklikleri izlemişlerdir. İncelenen genlerin tümü erken cevap olarak her iki stres uygulamasında da yüksek

ifade seviyesi göstermiştir (Charfeddine, Sai'di, Charfeddine ve Gargouri-Bouزيد, 2015).

LEA genlerinin genom seviyesinde araştırılması ile ilgili son çalışma ise mısır bitkisinde yapılmış olup, toplamda 32 adet *LEA* geni tespit edilmiştir. Domates genom çalışmasında olduğu gibi, mısır genomunda da *LEA* genlerine ait promotörlerin analizi yapılmıştır. Ayrıca bu genlerin hem mikroarray hem de eş zamanlı PZR ile gen ifade profilleri açığa çıkarılmıştır. Mısır bitkisine tuz, kuraklık ve soğuk uygulamasından sonra, *LEA* genlerinin strese karşı cevap oluşturdukları çalışmada gösterilmiştir (Li ve Cao, 2015).

Bu tez çalışmasında literatürde ilk defa salatalık bitkisinde genom seviyesinde *LEA* genlerinin belirlenmesi ve kromozomal dağılımları, gen yapısı ve ontolojileri, motif bölgeleri, farklı organizmalar ile ortolog ilişkileri, homolog ve homolog olmayan değişim oranları, LEA proteinlerinin homoloji modellemeleri, *LEA* genlerini hedef alan miRNA' ları tespit etmek amaçlandı. Ayrıca belirlenen *LEA* genleri, SRA (Sequence Read Archive) veri tabanında bulunan salatalığın farklı dokularında yapılmış olan RNA dizi analiz verilerinde incelenerek, salatalığın farklı dokularında *LEA* genlerinin ifade profilleri belirlendi. Son olarak, kuraklık stresi uygulanmış salatalık bitkisinin kök ve yaprak dokularında *LEA* genlerinin gen ifade seviyelerindeki farklılıkları tespit edildi. *LEA* genlerinin sadece abiyotik strese karşı bir cevap olarak ifade edilmediği, ayrıca salatalık bitkisinin normal büyüme ve gelişme evrelerinde de önemli rol oynayabileceği, salatalığın farklı dokularından alınan örneklerin, RNA dizi analizlerini inceleyerek gösterildi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal madde ve kitler

Agaroz low (Applichem, Almanya)

Asetik Asit (Glasiyal Asit, Merck, Türkiye)

DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, ABD)

EDTA (Applichem, Almanya)

Etanol (Kimetsan, Türkiye)

Hoagland (Phyto Techology Laboratories, ABD)

İzopropanol (Applichem, Almanya)

Kloroform (Applichem, Almanya)

Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Almanya)

Nucleic Acid Staining Solution-Jel Boyası (İntron Biotechnology)

PEG-6000 (Applichem, Almanya)

Revertaid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Litvanya)

RNAse zap (Ambion, ABD)

Sıvı azot

Trizol Reagent (Ambion, ABD)

Thin Wall PCR ve Reaksiyon tüpü (Greiner bio-one, ABD)

Tris (Applichem, Almanya)

3.1.2. Kullanılan cihaz ve aletler

Biosafety cabinet Class II (Tezsan, Türkiye)

Buz makinesi (Hoshizaki, Avrupa Ltd.)

Derin Dondurucu -82 °C (Glacier Nuair Nu-9668E, Meksika)

Derin Dondurucu -20 °C - Buzdolabı +4 (Arçelik 4252N, Türkiye)

Distile Su Cihazı (Protek Lab, Türkiye)

Elektroforez (Thermo Scientific EC1000XL2 ve EC300XL2, ABD)

Hassas Terazı (Presica 350-8519, İsviçre)

Jel görüntüleme sistemi Quantum ST5 (Vilber Lourmat, Fransa)
Manyetik Karıştırıcı (Wisd Laboratory MSH-20A, Kore)
Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)
Mikropipet (Thermo, ABD)
Mikrosantrifüj (N2631-0007 Star Lab, Kore)
Multipurpose Vorteks (Wisd Laboratory Instruments, Kore)
PCR (Thermo, ABD)
pH Metre/ Mettler Toledo (Jenco Quality Instruments, Çin)
Realtime PCR (Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Qiagen, Almanya)
Spektrofotometre (Thermo Sci. Multiskan go, ABD)
Soğutmalı Santrifüj (Hetrich Micro 220/220R, Almanya)
Test kabini TK252 (Nüve, Türkiye)
Thermal Cycler Isı bloğu (Thermo, ABD)
Thermo-Shaker (Biosan Ts-100, Letonya)
Otoklav (Nüve, Türkiye)
UV Table Manuel (Prizma, Fransa)
UV Fırın (LG Solar Dom, Kore)

3.1.3. Bitki materyali

Cucumis sativus L.' a ait Altay çeşidi salatalık tohumları, çalışmamızda gen ifade analizi için ana materyal olarak kullanılmış olup, Monsanto Gıda ve Tarım Tic. Ltd. Şti. (Antalya)' den temin edilmiştir.

Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan bitki büyütme kabinde salatalık tohumlarının çimlendirilmesi ile bu çimlenen tohumlardan bitki eldesi yapılmış ve elde edilen bu bitkilere belirlenen zamanlarda kuraklık stresi uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Salatalık Genomunda *LEA* Genlerinin Belirlenmesi

LEA genlerinin belirlenmesi için salatalık bitkisinde ilk olarak *LEA* proteinlerini içeren “LEAP, Late Embryogenesis Abundant Proteins Data Base” (Hunault ve Jaspard, 2010) veri tabanı kullanılarak, tanımlanmış *LEA* genleri tespit edilmiştir. *LEA* genlerinin taraması, farklı bitki türlerinde (*Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum* ve *Vitis vinifera*) yapılmıştır. Bu tarama sonucunda veri tabanından *LEA* genleri ile ilgili sekanslar belirlenip, tespit edilmiştir. Tespit edilen bu sekanslar, Goodstein vd., (2012) tarafından yapılan çalışmalarda da olduğu gibi, ilk önce PHYTOZOME v9.1 veri tabanında BLASTP (Protein Blast-Sekans Karşılaştırması) yapılmış ve sonra istatistik model olan The Hidden Markov Model (HMM) aracılığıyla da tarama yapılmıştır. NCBI BLASTP veri tabanı kullanılarak, salatalıkta belirlenmiş olan *LEA* proteinleri ile salatalıkta tanımlanmış ya da varsayılan proteinler eşleştirilmiş, tekrar eden sekanslar EXPASY veri tabanından tespit edilerek elenmiştir. Ayrıca SMART (Letunic, Doerks ve Bork, 2012) ve Pfam veri tabanları kullanılarak geriye kalan sekanslar ile *LEA* gen ailesi arasındaki eşleşmeler netleştirilmiştir. Moleküler ağırlıkları, değişkenlik durumları ve (pI) izoelektronik etki değerleri hesaplamaları da Prot Param Tool veri tabanı kullanılarak ayrıntılı olarak belirlenmiştir.

3.2.2. *LEA* Genleri Kromozomal Yerleşimlerinin Belirlenmesi ve Gen Yapısının Tahmini

Salatalıkta *LEA* proteinini kodlayan genlerin kromozomal yerleşim yerlerinin tespit edilebilmesi için Phytozome veri tabanından *C. sativus* dizilerinin BLASTP taraması yapılmıştır. Tarama sonucunda tespit edilen tüm *LEA* genleri MapChart programı ile kromozomların üzerinde gösterilmiştir. Plant Genome Duplication Database-PGDD (Tang vd., 2008) yöntemiyle de tandem ve segmental duplikasyonlar belirlenmiştir. ‘Gene Structure Display Server (Guo, Xiang, Yang ve Yang, 2007) ile de tam

komplementer DNA ların (cDNA) ya da tahmin edilen kodlayan dizilerin, genomik dizilerle karşılaştırılmasıyla genlerin ekzon-intron bölgeleri tespit edilmiştir.

3.2.3. Dizi Hizalanması

Dizi hizalaması için MEGA6 programı (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski ve Kumar, 2013) kullanılmış ve bu programa belirlenmiş olan aminoasit dizileri yüklenilmiştir. ClustalW programı sayesinde de çoklu dizi hizalamaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Filogenetik Analizler

Filogenetik ağaç oluştururken, ClustalW programında bulunan komşu birleştirme yani Neighbor Joining yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 1000 tekrarlı önyükleme sekmesi olan Bootstrap: 1000 değeri seçilmiş ve istenilen analizlerle filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Saitou ve Nei, 1987).

3.2.5. Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi

Korunmuş motiflerin belirlenmesi için DNA motif tarama aracı olarak kullanılan (MEME) (Bailey ve Elkan, 1994) veri tabanı ile taramalar yapılmıştır. Analiz edilirken motif sayılarının en fazla 20 sayıda olmasına ve ayrıca motif genişliklerinin de optimum ≥ 2 ve ≤ 300 olmasına dikkat edilmiştir. Motif taraması sonucunda belirlenmiş olan MEME motifleri, ayrıca InterPro veri tabanı ile ve InterProScan ile de taramalar yapılmıştır (Quevillon vd., 2005). Böylece korunmuş motifler belirlenmiştir.

3.2.6. Gen Ontoloji Analizleri

Blast2GO programı kullanılarak, LEA protein dizileri ile ilgili fonksiyonel analizler yapılmıştır (Conesa ve Götze, 2008). Bu fonksiyonel analizler üç basamakta gerçekleştirilmiştir: Buna göre ilk basamakta programda yüklü olan sekanslar ile eşleştirme yapılmış (BLASTp), ikinci basamakta ise BLAST sonuçları ile bağlantılı haritalamalar düzenlenmiş (MAPPING) ve en sonuncu basamakta ise sekanslarla

ilgili bilgi dosyası dökümü yapılmıştır (ANNOTATION). Bu program ile GO sınıflandırması biyolojik işlevler, hücresel içerik ve moleküler fonksiyonların belirlenmesi şeklinde üç kategori oluşturulmuştur.

3.2.7. LEA Proteinlerinin Farklı Türler ile Karşılaştırılması

Salatalıkta bulunan LEA proteinlerine karşılık gelen amino asit dizileri ile diğer türlerin (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays*) peptid dizileri arasındaki ilişkileri belirlemek için BlastP programı ile tarama yapıp, Phytozome veri tabanından elde edilen verilerin e-değerlerine bakılarak anlamlı diziler tespit edilmiştir. Buna göre e-değeri $\leq 1e-5$ ve en az % 50 özdeş olanlar anlamlı diziler olarak kabul edilmiştir. Salatalık kromozomunda bulunan LEA genleri ile *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays*' ta bulunan LEA genler arasındaki ortolog ilişkiler, MapChart programı ile belirlenerek görüntülenmesi sağlanmış ve böylece karşılaştırılmalı fiziksel harita oluşturulmuştur.

3.2.8. Homolog ve Homolog Olmayan Değişim Oranlarının Hesaplanması

Homolog (Ks) ve homolog olmayan (Ka) değişim oranlarını hesaplamak için önce CLUSTALW tabanlı çoklu dizi hizalama programı uygulanmıştır. Bu programla salatalıkta duplikasyona uğramış LEA genleri ile *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays* arasındaki ortolog gen çiftlerinin hizalaması yapılmıştır. Sonra CODEML programında (Suyama, Torrents ve Bork, 2006) DNA dizilerinin hizalanması yöntemi ile de LEA proteinlerinin aminoasit dizileri ve onların orjinal komplementleri ile homolog (Ks) ve homolog olmayan (Ka) değişim oranları hesaplanmıştır. Böylece LEA geninin duplikasyon ve ayrılma zamanı (milyonlarca yıl önce, Mya) λ değişimlerinin hesaplanması için her homolog bölge ve her yıla karşılık homolog mutasyon oranları kullanılmıştır ($T = Ks/2\lambda$ ($\lambda = 6.5 \times 10^{-9}$) (Lynch ve Conery, 2000; Yang vd., 2008).

3.2.9. LEA Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Homoloji modellemesi için salatalıkta bulunan LEA proteinlerine önce BLASTP taraması yapılmıştır. Daha sonra benzer dizi ve bilinen üç boyutlu yapıya sahip en iyi örneğin belirlenmesi için de Protein Data Bank (PDB) (Berman vd., 2000) ile taramalar yapılmıştır. Taramalarla elde edilen verilere Phyre2 programı kullanılarak LEA proteinlerinin homoloji modellemesi yapılmış ve sonuç olarak proteinlerin tahmini yapısı elde edilmiştir (Kelley ve Sternberg, 2009).

3.2.10. LEA Genlerini Hedef Alan miRNA' ların Tanımlanması

Salatalıkta bulunan *LEA* genlerinde miRNA kontrollü gen hedeflerinin tanımlanması ile miRNA fonksiyonlarının anlaşılmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir. Bunun için miRBase v20.0 programı kullanılmış ve önceden bilinen bitki miRNA öncülleri tespit edilmiştir. Salatalıkta bulunan *LEA* genlerini hedef alan miRNA' ların tanımlanması için de, bitki miRNA veri tabanı kullanılmıştır. Ayrıca psRNA Target Server veri tabanı kullanılarak bütün bilinen bitki miRNA' ları ile salatalık *LEA* gen transkriptleri hizalanıp varsayılan bütün bitki ve salatalık miRNA' ları tanımlanmıştır. Bilinen tüm bitki miRNA' ları ve onların hedef ya da hedefleri, Zhang (2005) tarafından tarif edilen parametrelerle belirlenmiştir. Ayrıca bilgisayar taraması yapılarak tespit edilen miRNA hedefleri doğrulanmıştır. Bununla birlikte gen homologlarının analizi için de BLASTX taraması kullanılmıştır.

3.2.11. Salatalık Bitkisinde Farklı Dokularda LEA Genleri İfade Profilinin

Çıkarılması

Salatalık bitkisinde *LEA* genlerinin ekspresyon profilinin çıkarılabilmesi için transkriptom verileri kullanılmıştır. RNA-Seq analizleri için gerekli okumaların tümü yani tüm Illumina HiSeq ve Roche454 okumaları, SRA, Sequence Read Archive denilen açık bir veri bankası arşivinden elde edilmiştir. Kullanılacak okumalar için (Tablo 3.1)' deki numaralarıyla giriş yapılmış ve tüm okumaların da “.sra” formatında ham sekans verisi indirilmiştir.

Bu veriler “fastq” formatına da dönüştürülmüştür. Yapılan okumalardan düşük kalitedeki okumalar (Phred quality (Q) score < 20) çıkarılmış ve sonra geriye kalan temiz tüm okumalara FastQC analizi ile tüm okumalara her baz için dizi kalitesini, her baz için kalite skorunu, her bazın nükleotid içeriğini ve dizi duplikasyon düzeyleri bakımından okuma kaliteleri kontrol edilmiştir. Yapılan tüm okumalar için normalizasyon (normalized) ile dönüşüm (transform) için CLC Genomic Workbench version 7.5 programı kullanılmıştır. Ayrıca hiyerarşik kümeleme haritası (heatmap) ile RPKM değerlerinin log²’ ye çevrilmesi ile gen ifade ölçümleri Permut Matrix programıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 1. *Transkriptom analizinde kullanılan dokular ve erişim numaraları*

SRR351476	cucumber ovary tissue, unexpanded (Salatalık ovaryum dokusu, genişlememiş)
SRR351489	cucumber expanded ovary tissue, fertilized (Salatalık genişlemiş ovaryum dokusu, döllenmiş)
SRR351495	cucumber expanded ovary tissue, unfertilized (Salatalık genişlemiş ovaryum dokusu, döllenmemiş)
SRR351499	cucumber root tissue (Salatalık kök dokusu)
SRR351905	cucumber stem tissue (Salatalık sürgün dokusu)
SRR351906	cucumber leaf tissue (Salatalık yaprak dokusu)
SRR351908	cucumber male flower tissue (Salatalık erkek çiçek dokusu)
SRR351910	cucumber tendril tissue (Salatalık asma filizi dokusu)
SRR351911	cucumber tendril tissue basal (Salatalık asma filizi taban dokusu)
SRR351912	cucumber female flower tissue (Salatalık dişi çiçek dokusu)

3.2.12. Salatalık Bitki Örneklerinin Yetiştirilmesi ve Stres Uygulanması

Monsanto Gıda ve Tarım Tic. Ltd. Şti (Antalya)' den temin edilen salatalık tohumlarının önce kabukları çıkarılmıştır. Kabukları çıkarılan tohumlar distile suda üçer defa yıkanmış ve yaklaşık yarım saat distile su içerisinde bekletilmiştir. Distile suda bekletilmiş olan tohumlar, içleri steril tarım perlitli ile dolu olan plastik kaplara 10' ar adet aralıklı olacak şekilde yerleştirilip dikilmiştir. Bitkiler Hoagland solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) içeren kültür ortamında bitki büyütme kabini içerisinde 24 ± 2 °C ve 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 14 gün boyunca yetiştirilmiştir. Bitki yetiştirme sırasında kullanılan Hoagland solüsyonu için önce, 1,63 gr Hoagland kimyasal karışımı 2 lt distile suda çözülmüş ve pH' ı 5.6–6.0 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Hoagland kimyasal karışımının içeriği Ek 1' de gösterilmiştir.

Kuraklık stresi için, yetiştirilen bitkilere Hoagland solüsyonuna, %10 polietilen glikol 6000 (PEG-6000) ilave edilip uygulama yapılmıştır. Kuraklık stresi için kullanılan PEG 6000, laboratuvar koşullarında kuraklığa dayanıklı genotiplerin test edilmesinde kullanılan güvenilir bir madde olup, ozmatik bir ajan gibi davrandığı için çözünen potansiyeli (Ψ_s) arttırmakta ve dolayısıyla suyun bitki kök sistemi tarafından emilimini bloke etmektedir. Hoagland solüsyonu içeren kültür ortamında bitki büyütme kabini içerisinde 2 hafta boyunca büyütülmüş bitki örneklerine, stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Morfolojik özellikleri de göz önünde bulundurularak, Baloglu vd. (2014)' nün salatalık bitkisinde kullanmış oldukları parametreler de dikkate alınarak 0., 3., 12. ve 24. saatler de bitkilerden kök ve yaprak örnekleri alınmıştır. 0. saat kontrol olarak kullanılmış olup, stres uygulanmış bitkiler ile kontrol bitkileri aynı bitki büyütme kabininde aynı büyüme koşullarında yetiştirilmiştir.

Hem kontrol hem de kuraklık stresine maruz bırakılmış bitkilerin yapraklarından ve köklerinden ayrı ayrı örnekler alınmış, doku spesifik ifade analizinde kullanılmak üzere toplanılmıştır. Doku örneklerinden üçer biyolojik örnekleme olacak şekilde

deney düzeneği oluşturulmuştur. Alınan tüm örnekler sıvı nitrojen ile dondurulmuş ve RNA izolasyonunda kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

3.3. Moleküler Genetik Metotlar

3.3.1. RNA İzolasyonu

Yapılan çalışmamızda uygulanan her bir stres koşulu için 3 biyolojik tekrar uygulanmıştır. RNA izolasyonu (Ünver ve Budak, 2009) olduğu gibi yapılmış ve izolasyonda Trizol reaktifi kullanılmıştır.

Homojenizasyon

- Stres uygulanıp $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de bekletilmiş bitki örnekleri sıvı azot yardımıyla, steril edilmiş porselen havanlarda dikkatlice ezilerek, toz haline getirilmiştir.
- Toz haline getirilen bitki örneklerinden 100' er mg alınıp, 2 ml' lik steril tüplere aktarılmıştır.
- 2 ml tüplerin içerisine 1' er ml Trizol ilave edilmesiyle iyice parçalanmış örnekler homojen hale getirilmiştir.

Faz ayrımı

- Bu homojen edilmiş örneklerin nükleoprotein komplekslerinden tamamen ayrıştırılması için de 5 dk. oda sıcaklığında ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) bekletilmiştir.
- Eklenen her 1ml Trizol reaktifi için, 0,2 ml kloroform ilave edilmiştir.
- Tüplerin kapakları sıkıca kapatılarak 15 sn elle kuvvetlice çalkalanarak iyice karıştırılmıştır.
- Sonra bu tüpler 2-3 dk. oda sıcaklığında ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) inkübe edilmiştir.
- Faz ayrımını sağlayabilmek için 15.000 rpm de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 20 dk. santrifüj edilmiştir.

RNA'nın çöktürülmesi

- RNA'nın çöktürülmesi için santrifüj sonrasında üstte kalan sıvı fazı önce yeni bir steril tüpe aktarılmıştır.

- Sonra bu sıvı faza homojenizasyonda kullanılan her 1ml Trizol' ün yarısı kadar izopropil alkol ilave edilmiş ve karıştırılmıştır.
- Sonra bu örnekler oda ısısında (25°C) 10 dk bekletilmiş ve daha sonra 15.000 rpm de 4°C de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
- Santifirüj sonrası süpernant kısmı atılmış ve geriye beyaz renkte jel benzeri görünümünde RNA pelleti elde edilmiştir.

RNA'nın yıkanması

- RNA çökeltisi %75'lik etanol ile bir kez yıkanmıştır. Kullanılan etanol miktarı için her 1 ml Trizol reaktifine 1 ml etanol ilave edilmiştir.
- Etanol ilave edilen örnekler vorteksenerek iyice karıştırılmış ve sonra 10.000 rpm' de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakılmıştır.
- Kurutulmuş RNA çökeltisi 30 µl steril su ile çözülmüştür.
- 60°C de 10 dk bekletilip, kullanılmak üzere -80 °C' lik derin dondurucuya saklanılmak üzere kaldırılmıştır.

RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

RNA izolasyonu yapılan örnekler, -80°C' lik derin dondurucuya kaldırmadan önce saflıklarının ve miktarlarının belirlenebilmesi için Spektrofotometre (MultiScanGo / Thermo) cihazı ile ölçümler yapılmıştır. Tüm RNA örneklerinin 260/280 nm' lik dalga boyunda absorbans değerleri alınmıştır. A260/A280 oranlarının 1.8–2.1 arasında olmasına yani yüksek saflıklarda olmalarına dikkat edilmiştir.

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforez yöntemiyle, izole edilen RNA' ların kaliteleri ile sağlamlıklarının tespit edilmesi için ve ayrıca oluşturulan iki zincirli cDNA' ların kalite ve miktarlarına bakılmıştır. Agaroz jel elektroforezinin yapılabilmesi için, jel matrisine, markörüne, tampon çözeltilere ve yükleme tamponlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Agaroz ile tampon çözeltisi hazırlanması sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta hazırlanılması gereken konsantrasyonlarıdır.

Agaroz Jel hazırlanışı

- %1' lik Agaroz jel hazırlanırken önce 0,5 gr Agaroz hassas terazide ölçülerek tartılmıştır.
- İçerisine 50 ml 1X TAE tampon ilave edilerek karıştırılmıştır. TAE tamponunun içeriği Ek 2' de gösterilmiştir.
- Hazırlanan bu jel karışım önce Mikrodalga UV Fırında (LG Solar Dom, Kore) kaynatılmış ve sonra 60°C ye kadar soğutulup içerisine 2,5 ml RedSafe (Nucleic Acid Staining Solution) jel boyası eklenerek karıştırılıp jel tankına dökülmüştür.
- Jel döküldükten sonra donmadan önce jele taraklar yerleştirilmiş ve donması için de 30 dk bekletilmiştir.
- 1 µl 6X DNA Loading Dye ile 4 µl RNA' ya da DNA karıştırılarak jele toplam 5 µl yükleme yapılmıştır (DNA Marker içeriği Ek 3' te gösterilmiştir).
- Yüklenen örnekler 110 voltta 30 dk yürütülmüştür. UV Table Manuel (France) ile bakılmış sonra Jel görüntüleme sistemi ile (Fotoğraf 3.1)' de görüntülenmiştir.

% 0,1'lik DEPC su hazırlama

- 1 ml DEPC 1000 ml distile suda çözüldükten sonra oda sıcaklığında 12 saat inkübe edilmiş ve sonra 121 °C 'de 20 dk otoklavlanarak hazırlanmıştır.



Fotoğraf 3.1. Jel Görüntüleme Sistemi Quantum (URL-14,2015).

3.3.2. DNaz Muamelesi

RNA izolasyonu yapılan örneklerin Spektrofotometre (Thermo Sci. Multiskan go, ABD) ile agaroz jel elektroforezinde bakılmış, konsantrasyonları ve kaliteleri belirlenmiştir. *DnazI* enzimi kullanılarak, tek ve çift zincirli DNA parçaları bulunan RNA örneklerinden, DNA parçalarının uzaklaştırılması örnekleri “Thermo DNase I, RNase-free” (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak sağlanılmıştır. *DnazI* enzimi ile muamele edilme işlemi (Tablo 3.2)’de özetlenmiştir. *DnazI* ile muamele edildikten sonra elimizde kalan örneklerdeki total RNA miktarları ve kalitelerini belirlemek için tekrar Spektrofotometre (Thermo Sci. Multiskan Go, ABD) ile ölçüm yapılmıştır.

Tablo 3. 2. *DNazI* enzimi ile RNA örneklerinin muamelesi

Bileşenler	Miktar (Her örnek için)
RNA örnekleri	1 µg
10X Reaksiyon Tampon	1 µl
MgCl ₂	1 µl
<i>DNazI</i> enzimi	1 µl (1U)
DEPC ile muamele edilmiş su	10 µl
37 °C’de 30 dk. inkübasyon	
50 Mm EDTA	1 µl
65 °C’de 10dk. inkübasyon	

3.3.3. cDNA sentezi (Komplementer DNA sentezi)

Total RNA örnekleri nükleaz içermeyen steril tüplerde “Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti” (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın öngördüğü şekilde de sırasıyla uygulanmıştır (Tablo 3.3). Karışımın toplam hacmi 12 µl oluncaya kadar steril distile su ilave edilmiş ve 5 dakika 65 °C de bu karışım bekletilerek hemen buza alınmıştır. Tüpün içeriğinin dipte toparlanabilmesi için de çok kısa bir süre santrifüj yapılmıştır.

Total RNA-primer karışımına 4 µl 5x Reaksiyon Tamponu, 1 µl RNaz inhibitörü, 2 µl 10 mM dNTP mix ve 1 µl ReverAid M-MuLV RT (200U/µl) enzimi ilave edilmiştir. Tüpün içeriği hafifçe karıştırılarak Thermalcycler (Thermo) cihazında önce 42 °C’de 60 dk. bekletilmiş ve daha sonra da 70 °C de 5 dk. inkübasyon yapılarak reaksiyon sonlandırılmıştır (Unver ve ark., 2008). Elde edilen cDNA’ lar PZR ve Eş Zamanlı PZR reaksiyonları gerçekleştirilene kadar -20 °C’ de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Tablo 3. 3. *cDNA sentezi*

Bileşenler	Miktar (Her örnek için)
Total RNA	1 -5 µg
Oligo dT (18) primeri (50 pmol/µl)	1 µl 50 pmol
DNA-RNA içermeyen steril su	10 µl
Toplam hacim	12 µl
65 °C’de 5 dk. inkübasyon	
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
RiboLock Rnase Inhibitör (20U/ µl)	1 µl
10 mM dNTP karışım	2 µl
ReverAid M-MuLV RT (200U/ µl)	1 µl
42 °C’ de 60 dk. inkübasyon	
70 °C’ de 5 dk. inkübasyon	

3.3.4. Primer tasarlama

PZR’ de ve RT-PZR analizinde kullandığımız primerler, biyoinformatik analizlerle gen bankasında (NCBI) belirlemiş olduğumuz *LEA* genlerine, Primer 5 software programı kullanılarak tasarlanmıştır. *18SrRNA* geni internal kontrol geni olarak kullanılmıştır (GenBank ID:X51542.1). *18SrRNA* geninin primer dizileri (Baloglu vd., 2014) ile *Cucumis sativus* için tasarlanan primer dizileri (Tablo 3.4)’ de gösterilmiştir.

Tablo 3. 4. Eş Zamanlı PZR çalışmasında kullanılan primer dizileri

Genler	Primer Dizileri (5'→3')	Bağlanma Sıcaklığı (T _m °C)	Ürün Uzunluğu (bp)
<i>CsLEA-09</i>	İleri-GGCCGATGTCAGTGGGATTC Geri-GAATCAGCCCAGCGATCAGT	62 °C	161 bp
<i>CsLEA-32</i>	İleri-CGTCCTGTGTAGTTGCCACA Geri-ATTGATAGTGCCGTTGGCGA	62 °C	149 bp
<i>CsLEA-37</i>	İleri-CGACATCGCAATCACGAACC Geri- TCCGTAAAACCGTCGTCGT	60 °C	198 bp
<i>CsLEA-49</i>	İleri- CCAAGCTCAGCCTCTCACTC Geri- CTGACACATCGGCAGTCAGT	60 °C	293 bp
<i>CsLEA-54</i>	İleri- GTCGAGGAGGGTGTTCAAGA Geri- GGATCGGGTGAGTTTCTCCA	60 °C	231 bp
<i>CsLEA-57</i>	İleri- CCATCATTTCGCAAAGCCC Geri- GACGGTGAGGATAAGCTCGG	62 °C	110 bp
<i>CsLEA-71</i>	İleri- GATTCATTGAGAAAATCGGGCAGAGA Geri- TGAGCGTCGTGGTGCTCT	60 °C	70 bp
<i>CsLEA-73</i>	İleri- TCTCAAGGAGTTGCGTCCAC Geri- AGAATCGATCGGAGTTCGGC	60 °C	107 bp
<i>CsLEA-76</i>	İleri- AAACATACGAGACAGGGCGG Geri- CGTTTCTTTTCCCGCTTGGG	60 °C	122 bp
<i>CsLEA-77</i>	İleri- AAGGTCACCAAAGCGTCCAA Geri- GCGACTCAATTGGGCTGTTG	60 °C	119 bp
<i>18SrRNA</i>	İleri- GTGACGGGTGACGGAGAATT Geri- GACACTAATGCGCCCGGTAT	60-62 °C	150 bp

3.3.5. PZR Analizleri

Total RNA'lardan elde edilen cDNA'ların birinci zincir sentez karışımına PZR primeri ilave edilerek, uygun sıcaklıklarda PZR cihazı (Thermo, ABD, Fotoğraf 3.2)

ile çoğaltılarak, ikinci zincir elde edilmiştir. PZR ile genlerin bağlanma sıcaklıklarını bulmak için yaptığımız optimizasyon sıcaklık koşulları (Tablo 3.5)' te gösterilmiştir.



Fotoğraf 3. 2. Bağlanma sıcaklık optimizasyonlarında kullanılan PZR cihazı (URL-15).

Tablo 3. 5. Genlerin bağlanma sıcaklıklarını bulmak için kullanılan PZR koşulları

Isıtılmış Kapak	İlk Denatürasyon	Denatürasyon	Primer Bağlanma	DNA sentezi	Final Uzama
105 °C	95 °C 5dk	95 °C 1dk	60-62 °C 1dk	72 °C 1dk	72 °C 7dk
35 döngü					

3.3.6. Eş Zamanlı PZR Analizleri

cDNA sentezi işlemlerinin sonrasında doku örneklerine ait cDNA'ların eş zamanlı (qRT-PZR) ile çoğaltılması sağlanmıştır. qRT-PZR analizlerimiz, Qiagen Rotor Gene 6000 'Real-Time' PZR cihazı (Fotoğraf 3.3) ile yapılmış olup, bağlanma sıcaklıkları optimize olan primerlerle birlikte 2X'lik Fast SYBR Green Master Mix kullanılarak yapılmıştır. Qiagen Rotor Gene 6000 'Real-Time' PCR cihazı floresans uyarısını ve emilimi belirleyen optik kısım ile bilgiyi alıp analiz eden yazılım sisteminden ve ısı bloğundan oluşmaktadır.



Fotoğraf 3. 3. Eş zamanlı PZR çalışmalarında kullanılan cihaz (URL-16).

qRT-PZR için uygun miktarda ve kalitede cDNA sentezi ile tarama yapılarak belirlenmiş olan 10 adet *LEA* geni (*CsLEA-09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-76*, *CsLEA-77*) ile *18S*rRNA internal kontrol genin optimizasyonları ile birlikte ön denemeler yapılmıştır. Yani izole edilen RNA'lerden daha sonra cDNA sentezi yapılmış ve gen spesifik primerler ile iki-basamaklı eş zamanlı PZR (two-step RT-PCR) çalışması yapılmıştır. Çalışmamızda her aşama için örnekleme üç kere tekrar edilmiş ve her tekrar için üçlü kantitatif eş zamanlı PZR sistemi kullanılmıştır. Eş zamanlı PZR bileşenlerinin her biri ayrı tüpte (Tablo 3.6)'da belirtildiği şekilde hazırlanılmıştır. Örnekler qRT-PZR cihazına yerleştirildikten sonra termal sıcaklık ayarları ve döngü sayısı ayarlanmıştır. qRT-PZR için kullanılan sıcaklık ve döngü şartları da (Tablo 3.7)'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Tablo 3. 6. Gen ifade analizi çalışmaları için hazırlanan PZR karışımı

Bileşenler	Miktar (Her örnek için)
2X' lik Fast SYBR Green Master Mix	12,5 µl
İleri primer	1,25 µl
Geri primer	1,25µl
cDNA	(200 ng/1000 µl olması şeklinde ayarlanır)
PZR için dH ₂ O	Toplam reaksiyon hacmi 25 µl oluncaya kadar ilave edilir
Toplam hacim	25 µl

Tablo 3. 7. Genlerin ifade analiz çalışmaları için kullanılan PZR koşulları

PZR Basamakları		Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon		95 °C	5 dk	1
Amplifikasyon	Denatürasyon	95 °C	5 sn	1
	Bağlanma ve uzama	60 °C	40 sn	45
Erime Eğrisi (Melting Curve) Analizi		50-95 °C	5 sn	1

Çoğaltılan ürünlerin 530 nm'de verdiği ışımaya değerlerinin ölçülmesi ile reaksiyonların analizleri yapılmıştır. Ayrıca amplifikasyonun reaksiyona sokulan primerlere özgü erime eğrisi analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi için örnekler, 95 °C'de denatüre edilip 65 °C'de bekletilmiştir. Floresan sinyalleri, 530 nm'de 65°C'den 95 °C' ye kadar her bir 0,5 °C derecede her saniyede alınarak toplanmıştır.

Hedef olan genler (*CsLEA-09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-76*, *CsLEA-77*) ile referans gen (*18SrRNA*) için

amplifikasyon değerleri bağıl kantitasyon metodu ile karşılaştırılmıştır. Erime eğrisine bakılarak karşılaştırma yapılmış ve doğru bölgenin çoğaltılıp oğaltılmadığına, dimerleşmelerin olup olmadığına bakılarak teyit edilmiştir. Ayrıca RT-PZR işlemi sonlandıktan sonra kontaminasyon varlığını kontrol etmek ve primerlerin özgünlüğünü netleştirmek için de her bir genin ayrı ayrı erime eğrilerine bakılmıştır. Belirli bir genin çoğaltılması durumunda her döngü sonrasında oluşan erime eğrilerinin tek bir pik oluşturup oluşturmamasına bakılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analizler

Salatalık bitkisinde stres verilmiş örnekler ile kontrol örnekleri arasındaki farklılıklar Student t testi kullanılarak istatistiksel olarak analizi yapılmıştır. Çalışmamızda rneklemeler üç kere yapılmış ve her tekrar için l kantitatif eş zamanlı PZR sistemi kullanılmıştır. *18SrRNA* gen ekspresyonu referans olarak alınmış, bağıl gen ekspresyonları hesaplanmış ve ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ değerleri, $\Delta CT = CT_{\text{rnek}} - CT_{\text{referans}}$ ve $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{stres verilmiş rnek}} - \Delta CT_{\text{kontrol (0 saatte)}}$ olarak hesaplanmış ve ekspresyon seviyesindeki farklılık $2\Delta\Delta Ct$ olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ise Livak ve Schmittgen (2001)'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre ve One Way ANOVA (Dunnett) ile yapılmıştır.

C_t değerleri belirlenen gen ekspresyon sonuçları housekeeping olarak kullandığımız *18SrRNA* ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Analiz verilerinin ortalamaları, standart sapmaları, standart hataları ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri "Minitab 17" istatistik programı kullanılarak ortalamalar arasındaki farklılıklar ayrı ayrı hesaplanmıştır. Buna göre ilgili *LEA* genindeki ekspresyon sonuçlarındaki farklılık, P değeri $< 0,01$ olması durumunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

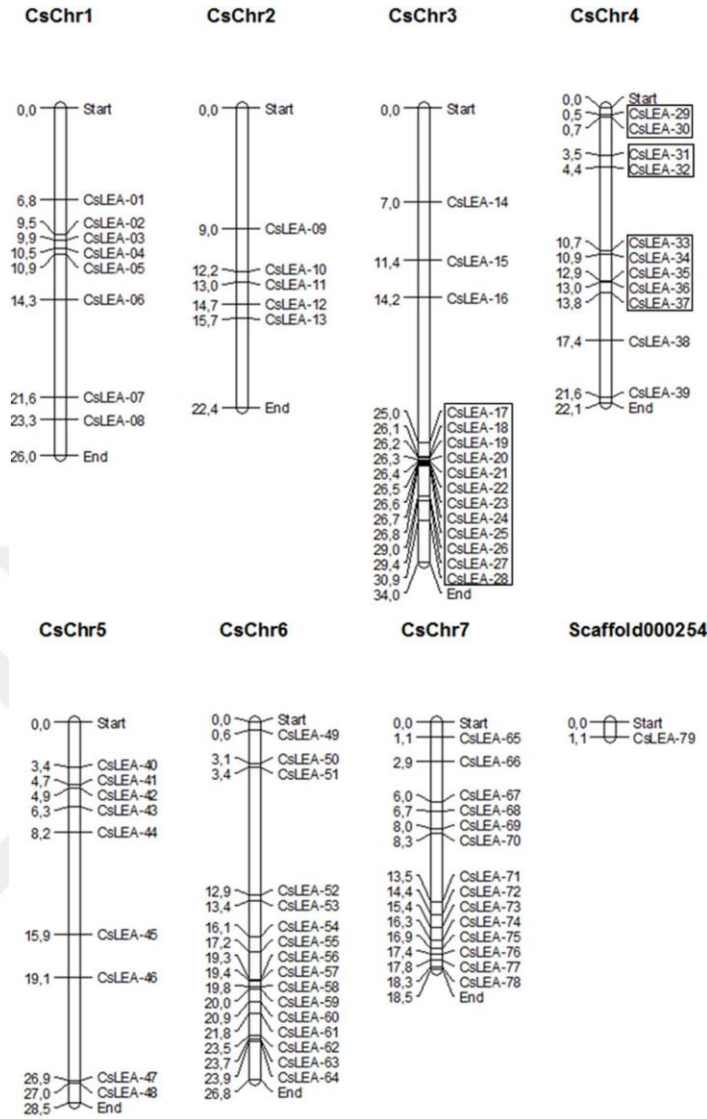
3.5. *CsLEA* Genlerinin Biyoinformatik Analizleri

3.5.1. Salatalıkta LEA Protein Dizilerinin Belirlenmesi ve İsimlendirilmesi

Farklı bitki türlerindeki tanımlanmış (*Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Pisum sativum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum* ve *Vitis vinifera*) LEA protein dizileri kullanılarak salatalık genomunda yapılan analizler sonucunda 79 adet *LEA* geni belirlenmiştir. Salatalık genomunda belirlenen bu *LEA* genleri, salatalık Latince isminin baş harfleri kullanılarak *CsLEA* olarak adlandırılmıştır. Genler 7 adet salatalık kromozomuna, 1. kromozomdan başlanarak yerleştirilmiştir. Genlerin kromozomlardaki yerleşimlerine dayanılarak *CsLEA-01*'den *CsLEA-79*'a kadar isimlendirilme yapılmıştır. Salatalıkta belirlenen LEA proteinleri 65 ile 600 aminoasit uzunluğunda olup, bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 6.8 ile 65.4 kDa arasında değişmektedir. Ayrıca 21 adet *CsLEA* geninin asidik ve 58 adet *CsLEA* geninin ise bazik karakterde olduğu tespit edilmiştir. *CsLEA* proteinlerine ait diğer bilgiler ise Ek 4'de gösterilmiştir.

3.5.2. *LEA* Genlerinin Kromozomal Dağılımı

CsLEA-79 geni haricindeki tüm *CsLEA* genleri salatalığa ait 7 kromozoma değişik oranlarda dağılmıştır. *CsLEA-79* ise Scaffold seviyesinde belirlenmiştir. *CsLEA* genlerinin kromozomlar üzerindeki dağılımı (Şekil 4.1)'de gösterilmiştir. Buna göre en fazla *CsLEA* geni 16 adet ile 6. kromozomda olup, bunları sırası ile 15 ve 14 adet *LEA* geni içeren 3. ve 7. kromozomlar takip etmektedir. Ayrıca, 3. 6. ve 7. kromozomlarda bulunan genler fiziksel olarak, kromozomların alt kısımlarında toplanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. *LEA* genlerinin salatalık kromozomlarına dağılımı

3.5.3. *LEA* Genlerinin Yapısı ve Tandem ve Segmental Duplikasyonlar

Salatalık genomunda bulunan *CsLEA* genlerinin ekzon ve intron bölgeleri yani gen yapıları belirlenmiştir. Buna göre, salatalıkta bulunan *LEA* gen ailesi üyelerinden 44 tanesinin (%55) intron içermediği saptanmıştır. İtron içermeyen *CsLEA* genleri fiogenetik analiz yapıldığında elde edilen filogenetik ağaçta çoğunlukla IV sınıf ile VII sınıfta yer almıştır. Son olarak, *CsLEA* genlerinin geri kalanı bir ya da 2 adet intron içermektedir (Ek 5).

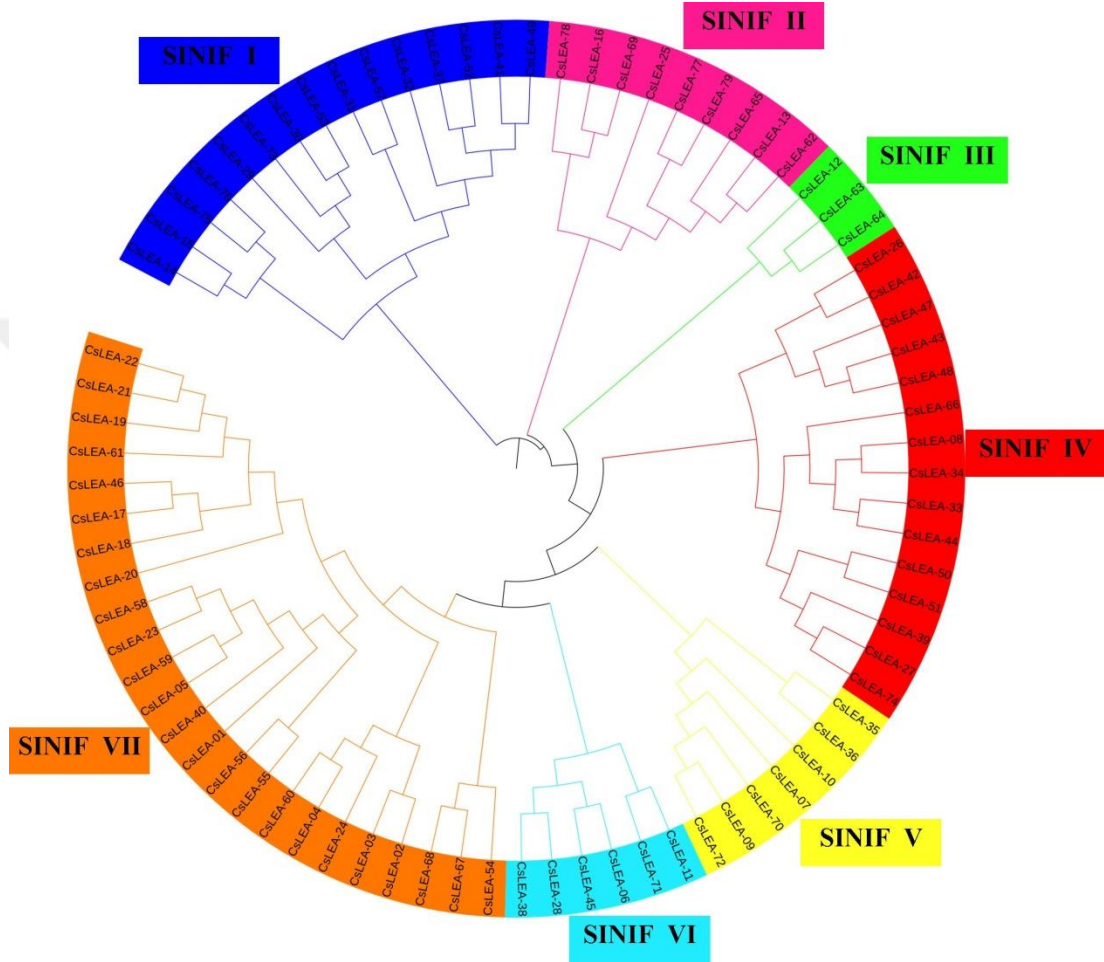
Gen duplikasyon olayları, gen ailelerinin genişleme ve büyümesinde önemli etkenlerden biridir (Mehan, Freimer, ve Ophoff, 2004). Bu bakımdan salatalık genomunda *CsLEA* genlerine ait tandem ve segmental duplikasyonlar belirlenmiştir. Salatalıkta *CsLEA* genlerinin yaklaşık %70'ine karşılık gelen 56 genin tandem duplikasyon gösterdiği belirlenmiştir. *CsLEA* genlerine ait en fazla tandem duplikasyona rastlanan kromozom 3 numaralı kromozom olup, bunu sırası ile 4. kromozom (*CsLEA-29*, *CsLEA-30*, *CsLEA-33*, *CsLEA-34*, *CsLEA-35* ve *CsLEA-36*), 6. kromozom (*CsLEA-55*, *CsLEA-56*, *CsLEA-58*, *CsLEA-59*, *CsLEA-60* ve *CsLEA-61*) ve 7. kromozom (*CsLEA-65*, *CsLEA-67*, *CsLEA-69*, *CsLEA-70*, *CsLEA-72* ve *CsLEA-74*) takip etmiştir. Tandem duplikasyonlar Şekil 4.1' de kutucuklar şeklinde gösterilmiştir. Buna karşın, *CsLEA* genleri arasında herhangi bir segmental duplikasyon olayına rastlanmamıştır.

3.6. Salatalıkta Filogenetik Analizler

3.6.1. *CsLEA* Genlerinin Filogenetik Ağaç Analizleri

CsLEA genleri arasında bulunan evrimsel ilişkileri belirlemek için, MEGA v.6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılarak filogenetik ağaç analizi yapılmıştır. Analizleri yapmak için, bu programda 1000 tekrarlı olacak şekilde komşu birleştirme (Neighbour-Joining, NJ) yöntemi kullanılmıştır. Filogenetik ağaç analizine göre *CsLEA* proteinleri 7 ana sınıfta (Cluster I-VII) kategorize edilmiştir (Şekil 4.2). Pfam erişim numarasına göre, *CsLEA* proteinleri arasında LEA2 grup proteinlerinin baskın olduğu gözlemlenmiştir. LEA2 grubuna dâhil olan *CsLEA* proteinleri özellikle II, IV ve VII. sınıflarda kümelenmiştir. Filogenetik ağaçta I. sınıfta bulunan 4 adet *CsLEA* proteini (*CsLEA 30*, *CsLEA-73*, *CsLEA-29* ve *CsLEA-75*) ise LEA2 grubunun üyesidir. Bununla birlikte III. sınıfta bulunan 2 adet *CsLEA* proteini (*CsLEA-63*, *CsLEA-64*) LEA6 grubuna dâhildir. Tüm LEA5 grup üyeleri (*CsLEA-35*, *CsLEA-36*) ve tohum olgunlaşma protein (SMP- Seed maturation protein) üyeleri (*CsLEA-7*, *CsLEA-70*, *CsLEA-72*) filogenetik ağacın V. sınıfında yer almaktadır. LEA3 grubuna ait *CsLEA-29*, *CsLEA 30*, *CsLEA-73* ve *CsLEA-75* proteinleri filogenetik ağaçta I. sınıfta yer alırken, LEA1 ve LEA4 grubuna ait üyeler ise filogenetik ağaca dağılmış şekilde

bulunmaktadır. Son olarak, dehidrin grubuna ait olan salatalık genomunda bulunan LEA proteinlerinden CsLEA-10, CsLEA-11, CsLEA-31, CsLEA-54 ise filogenetik ağaç üzerinde tüm sınıflarda dağılık olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 2. CsLEA proteinlerinin filogenetik sınıflandırılması

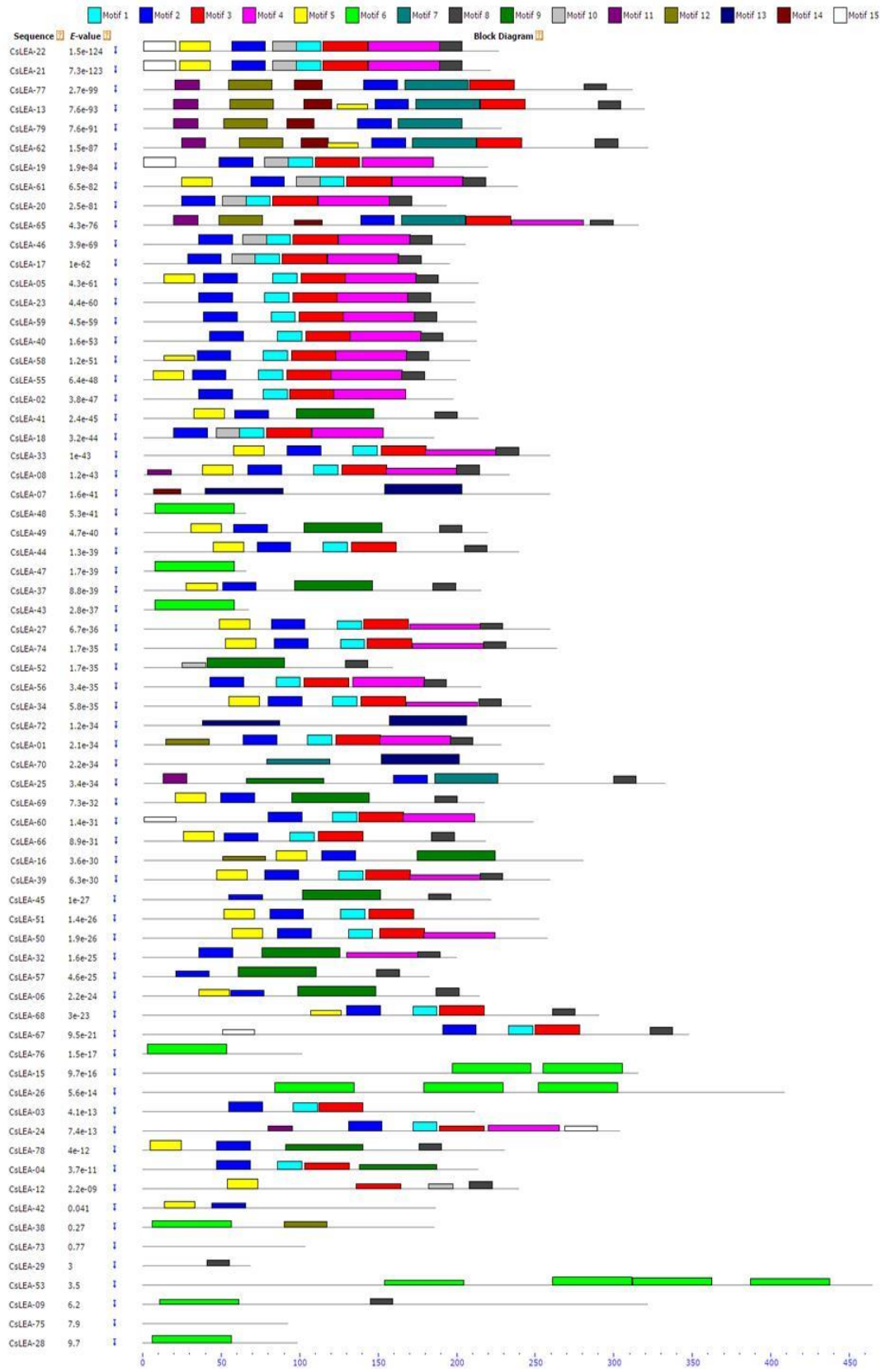
Yüksek tekrarlı (1000) bootstrap analizinden dolayı, dallar arasında yüksek bootstrap değerleri elde edilmiştir. Böylece, yüksek 'bootstrap' değeri ile gruplandırmalar için homojen ve güvenilir bir sonuç elde edilmiştir.

Filogenetik ağaç analizlerinde ayrıca, tandem duplikasyon gösteren genlerin de aynı sınıflarda toplandığı gözlemlenmiştir. Örneğin, en fazla tandem duplikasyon gösteren 3 numaralı kromozomda bulunan *CsLEA-17-18-19-20-21-22-23-24* LEA genleri VII. sınıfta toplanmışlardır. Ayrıca, 6 numaralı kromozoma ait tandem duplikasyon

genleri (*CsLEA-55 ile CsLEA-56; CsLEA-58 ile CsLEA-59; CsLEA-60 ile CsLEA-61*) de yine VII. sınıfta gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, CsLEA proteinlerinin sınıflandırılmasında filogenetik ağaç ile güvenilir veriler oluşturulmuştur.

3.6.2. CsLEA Genlerinin Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi

Filogenetik ağacın güvenilirliğini test etmek için, CsLEA proteinlerinin motif kompozisyonları incelenmiştir. MEME veri tabanına 79 adet CsLEA proteinine ait tüm aminoasit sekansları yüklenmiştir. Salatalıkta bulunan CsLEA proteinleri için toplamda 15 farklı korunmuş motif tanımlanmıştır (Şekil 4.3). Amino asitlerin korunmuş motifleri, dizileri ve motif uzunlukları Ek 6' da gösterilmiştir. Benzer motif kompozisyonları, CsLEA proteinleri arasında yapısal bir benzerliğin belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Bu analize göre, LEA5, LEA6 ve dehidrin grup proteinlerinde korunmuş motif bulunmamaktadır. Buna karşın, 1, 2, 3, 4 ve 8 numaralı motifler, baskın olarak LEA2 grubunda bulunmaktadır. Ayrıca, 5 ve 10 numaralı motifler de filogenetik ağaçta farklı gruplarda yer alan LEA2 grubunda da bulunmaktadır. LEA4 grup proteinlerinden olan, CsLEA-15, CsLEA-26, CsLEA-53 ve CsLEA-76 proteinleri ise sadece 6 numaralı motifi içermektedir. 6 numaralı motif sadece LEA4 grubunda değil, bununla birlikte LEA1 grubunun bazı üyelerinde (CsLEA-28 ve CsLEA-38) de tespit edilmiştir. Dolayısıyla, LEA4 ve LEA1 grup üyeleri aynı motif varlığından dolayı birbirlerine benzerlik göstermektedir. LEA3 grup proteinlerinin bazı üyelerinde motif bulunmamakla birlikte bazen de sadece bir motif tek bir CsLEA proteininde bulunmuştur. Örneğin, CsLEA 29 proteini sadece 8 numaralı motifi içermektedir. Ayrıca, bazı durumlarda sadece bir motif bir gruba özel olabilir. Buna örnek olarak 13 numaralı motif verilebilir. Bu motif ise tüm tohum olgunlaşma protein (SMP) üyelerinde (CsLEA-7, CsLEA-70, CsLEA-72) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, aynı LEA grubunda bulunan CsLEA proteinlerinin aynı motifleri içerdiği belirlenmiştir.



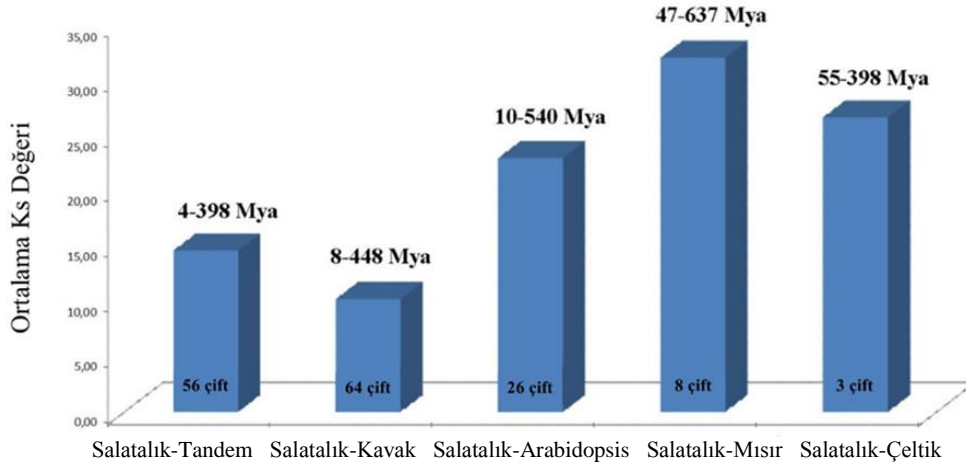
Şekil 4. 3. CsLEA proteinlerinin motif içerikleri ve E-değerleri

3.6.3. Salatalık ve Farklı Türlerdeki *LEA* Genlerinin Ortologları

Ortolog genler, farklı organizmalarda yapı bakımından farklı ancak işlev ve fonksiyon bakımından benzer özellikler gösteren genler olarak adlandırılır. Salatalık genomunda bulunan *CsLEA* genlerinin ortolog ilişkilerini tespit etmek için kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır genomlarında bulunan *LEA* gen ailesine ait üyelerin kromozomal düzeyde karşılaştırmalı haritaları yapılmıştır (Ek 7). Salatalık genomunda belirlenen 79 adet *CsLEA* geninin yaklaşık olarak ortalama % 32' sinde bu türler arasında ortolog ilişki gözlenmiştir. *CsLEA* genlerinin maksimum ortolog ilişkisi %81 ile kavak genomunda bulunan *LEA* genleri ile gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, Arabidopsis ile %33, mısır ile %10 ve çeltik ile %4 oranında *CsLEA* genlerinin ortolog ilişkisinin olduğu tespit edilmiştir. *CsLEA* genlerinin, salatalık ile kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır genomlarındaki dağılımları, kromozomların yeniden düzenlenmesi sonucunda gerçekleştiği düşüncesi, bu bulgular ile desteklenmiştir. Salatalık ve çalışılan diğer bitki türleri arasında yapılan karşılaştırmalı haritalar ile *CsLEA* genlerinin evrimsel süreci ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar, fonksiyonel yapının tespiti için gerekli çalışmalara temel oluşturulabilecek niteliktedir.

3.6.4. *CsLEA* Genlerinin Birbirlerinden Ayrılma Oranları

Gen duplikasyon olayları, proteinlerde yeni fonksiyonların evrimini sağlaması açısından önemli bir rol oynamaktadır (Kondrashov, Rogozin, Wolf ve Koonin, 2002). *CsLEA* gen ailesi içerisindeki evrimsel yayılmayı değerlendirmek amacıyla, 56 adet tandem duplikasyon gösteren *CsLEA* geni için homolog olmayanın (K_a), homolog olana (K_s) değişim oranı (K_a/K_s) hesaplanmıştır (Ek 8). Ayrıca bu değişim oranı kavak (64 çift), Arabidopsis (26 çift), mısır (8 çift) ve çeltik (3 çift) *LEA* genlerinin ortologları için de hesaplanmıştır (Ek 9). Tandem duplikasyon gösteren *CsLEA* genleri için K_a/K_s 0.008 ile 0.436 arasında değişmekte olup, ortalama 0.14 olarak bulunmuştur. Bu oran kullanılarak yapılan hesaplamalar, bu duplikasyon olaylarının tahmini olarak 4 ile 398 milyon yıl önce olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. *CsLEA* genlerinin ortologları ve birbirinden ayrılma oranları

Bununla birlikte salatalık genomunda bulunan *CsLEA* genlerinin sırasıyla ortologları bulunan genomlardan, kavakta 0.08, Arabidopsis' te 0.06, mısırdaki 0.03 ve çeltikte 0.01 Ka/Ks oranları belirlenmiştir (Ek 9). *CsLEA* genlerinin diğer bitkilerdeki ortolog genlerle arasındaki ayrılma zamanı incelendiğinde ise en erken ayrılmanın mısır bitkisi ile yaklaşık olarak 245 milyon yıl önce (Mya) meydana geldiği düşünülmektedir. Bu oranlar sırasıyla 204 Mya ile çeltik, 176 Mya ile Arabidopsis ve 78 Mya ile kavakla ayrılma gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Bu çalışmalar, salatalık ve kavak genomunda bulunan *LEA* genlerinin daha kuvvetli bir evrimsel seleksiyona uğradığını göstermektedir.

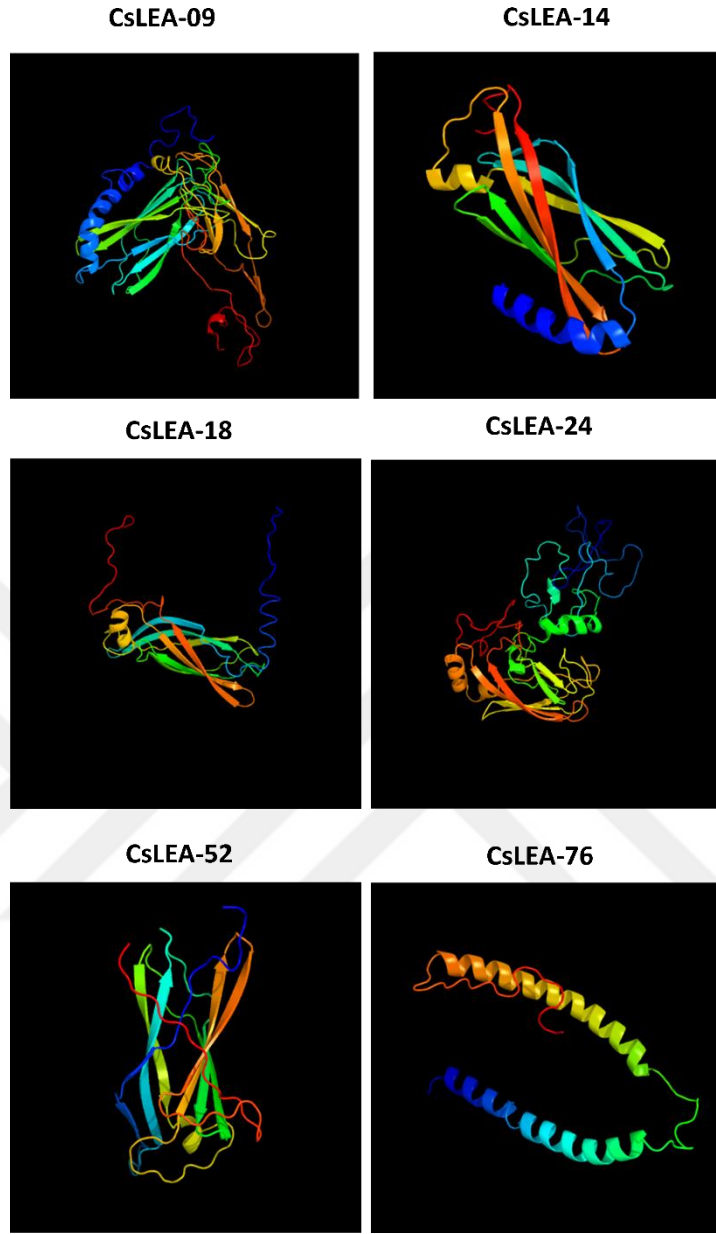
3.7. Hedef miRNA Tanımlaması

miRNA' lar bitkilerde biyotik ve abiyotik stres koşulları altında hedef gen ifadesini engellemek için kullanılan yollardan bir tanesi olup, hedef genlerin transkriptlerini parçalayarak bu işi yaparlar (Bartel, 2004; Jones-Rhoades, Bartel ve Bartel, 2006; Ambros ve Chen, 2007). psRNA Target veri bankası, *CsLEA* hedef transkriptlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Varsayılan parametreler kullanılarak hedef genler ve bunların küçük RNA molekülleri belirlenmiştir (Zhang, 2005). Hedef genlerin tanımlanabilmesi için iki önemli parametre kullanılmaktadır. Maksimum beklenti eşik değeri 3.0 olarak ayarlanmıştır. İkinci parametre ise UPE maksimum enerji değeridir. Bu değer hedef mRNA' nın hedef bölgesinin ikincil yapısını açmak için

gerekli olan enerjiyi temsil etmektedir. Düşük enerji, hedef mRNA' nın küçük RNA ile yüksek oranda bağlanma olasılığını göstermektedir. Bitki küçük RNA hedef genlerinin hesaplandığı veri tabanından (psRNA Target: A Plant Small RNA Target Analysis Server) 50 adet bitki miRNA' sı için hedef genler tespit edilmiştir. Toplamda 37 adet *CsLEA* geni (*CsLEA01-03-04-06-09-12-14-15-16-18-21-22-23-25-26-27-32-33-34-37-44-49-50-51-52-53-54-55-57-58-62-65-67-71-72-77-79*) bu miRNA' lar tarafından hedeflenmiştir (Ek 10). miRNA' lar tarafından en fazla hedeflenen salatalık *LEA* genleri ise *CsLEA06* ve *CsLEA37* genleridir. Ayrıca mir854 ve mir414 ise en fazla bulunan miRNA' lardır.

3.8. LEA Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

Homoloji modellemesi için Protein Data Bank (PDB) içerisinde BLASTP taraması yapılmıştır. Phyre2 veri tabanında homoloji modelleme oranını belirlemek için Hidden Markov Model (HMM) araması seçilmiştir. Bu veri tabanı proteinlerin yapısı, fonksiyonu ve mutasyonların analizinin tahmininde kullanılmaktadır (Söding, 2005). Toplam 6 Adet *CsLEA* proteini (*CsLEA9-14-18-24-52-76*) yüksek benzerlik ve homoloji göstermiştir. Bu benzerlik oranları Phyre2 veri tabanında yoğun mod seçilerek yapılmış olup %90 güvenilirlikte yaklaşık olarak %75 ile %90 arasında benzerlik bulunmuştur (Şekil4.5). Bu 6 *LEA* proteininin ikincil yapıları incelendiğinde *CsLEA76* haricinde diğerlerinde, β pilili tabaka yapısı hâkimdir. *CsLEA76* proteininde ise yalnızca α helix yapısı mevcuttur. Tahmin edilen bu protein modelleri, *LEA* proteinlerinin fonksiyonlarını anlamak için yararlı olabilir.

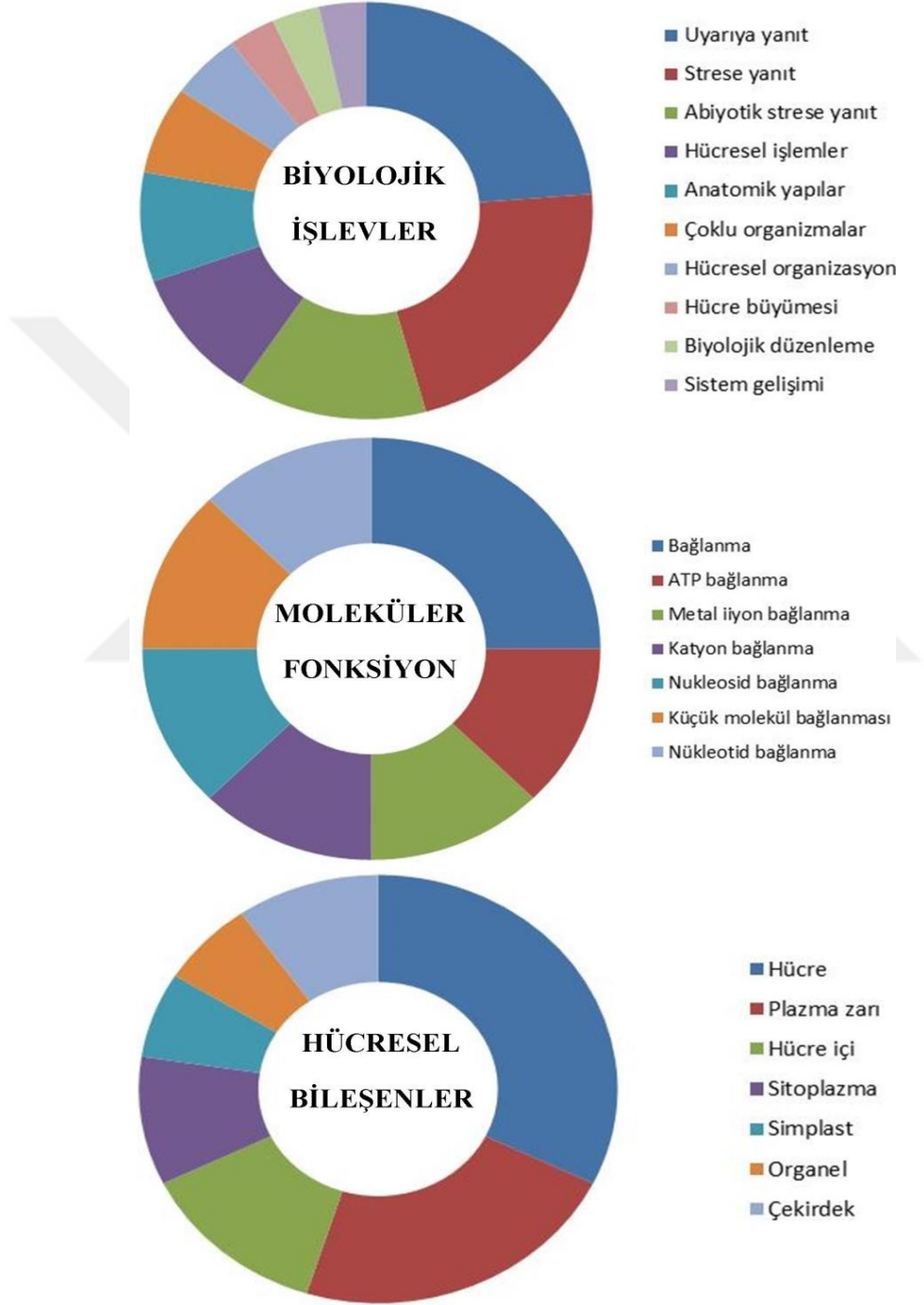


Şekil 4. 5. CsLEA proteinlerinin üç boyutlu tahmini yapısı

3.9. *CsLEA* Genlerinin Ontoloji Analizi

Belirlenen *CsLEA* genlerinin fonksiyonel bilgilerini belirlemek için Blast2Go gen ontoloji programı kullanılmıştır (Conesa ve Göt, 2008). Blast2Go programı ile *CsLEA* protein dizilerinin hücresel lokalizasyonu, biyolojik işlevleri ve moleküler fonksiyonları belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda uyarıcıya ve abiyotik strese cevap ile ilişkili fonksiyonel tanımlamalar biyolojik işlev olarak en fazla bulunan

fonksiyonlar olarak belirlenmiş ve hücre içerisinde LEA proteinlerinin rolü ile uygunluk göstermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. *CsLEA* genlerinin fonksiyonel analizleri

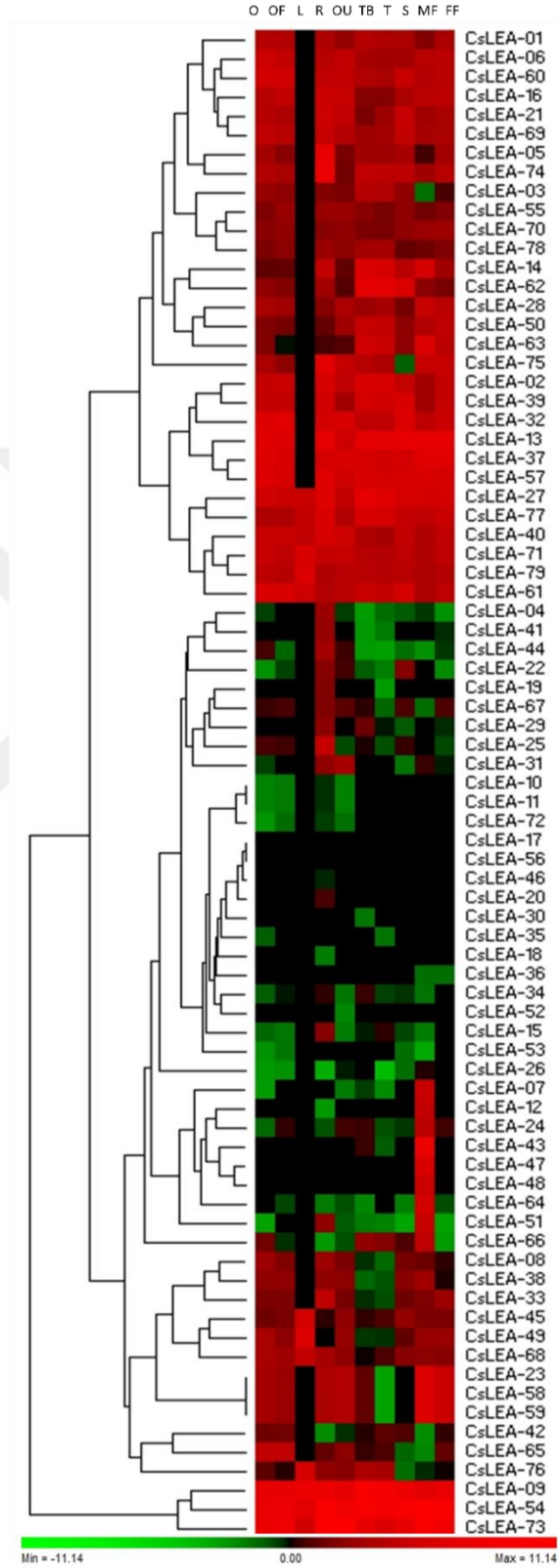
Buna ilaveten, *CsLEA* genlerinin moleküler fonksiyonu da bu program aracılığıyla belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre, bağlanma aktivitesi moleküler fonksiyon olarak *CsLEA* proteinleri için tespit edilmiş olup, ATP, metal iyonlar ile katyonlara bağlanma *CsLEA* proteinleri için belirlenen en fazla bağlanma olarak gözlemlenmiştir. Son olarak, *CsLEA* proteinlerinin hücre içerisindeki lokasyonları tespit edilmiş olup, bu proteinler en çok hücre, plazma zarında ve sitoplazmada bulunmaktadır. Buna ilaveten, bazı salatalık *LEA* proteinlerinin ayrıca, farklı organellerde ve çekirdekte de bulunduğu gözlemlenmiştir.

3.10. Salatalıkta *LEA* Genlerinin Transkriptom Analizi

SRA (Sequence Read Archive) veri tabanı yardımıyla elde edilen RNA dizi bilgileri, salatalıkta *LEA* genlerinin dokuya özgü ifade profillerinin incelenmesi için kullanılmıştır. Sıcaklık haritası *CsLEA* genlerinin ifadelerini belirlemek için genişlememiş (SRR351476), döllenenmiş (SRR351489) ve döllenenmemiş (SRR351495) ovaryumlarda, yaprakta (SRR351906), kökte (SRR351499), asma filizi uzantısında (SRR351910), asma filizi taban dokusunda (SRR351911) sürgünde (SRR351905), erkek (SRR351908) ve dişi (SRR351912) çiçek dokularında incelenmiş ve (Şekil 4.7)' de gösterilmiştir.

Bu analize göre *CsLEA-09*, *CsLEA-27*, *CsLEA-40*, *CsLEA-54*, *CsLEA-61*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-77* ve *CsLEA-79* genleri tüm dokularda yüksek ifade seviyesi göstermiştir. Neredeyse tüm *CsLEA* genleri kök dokusunda ifade edilmesine rağmen, çoğu *LEA* geni yaprak dokusunda ifade edilmemiştir. Sadece, *CsLEA-45*, *CsLEA-49*, *CsLEA-68* ve *CsLEA-76* genlerinin yaprak dokusunda yüksek ifade edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, *CsLEA17* ve *CsLEA-56* genlerinin ifadeleri hiç bir dokuda gözlemlenmemiştir. Buna ilaveten, *CsLEA-18*, *CsLEA-20*, *CsLEA-30*, *CsLEA-35*, *CsLEA-36*, *CsLEA-46*, *CsLEA-47*, *CsLEA-48* ve *CsLEA-52* genlerinin bir ya da iki tane dokuda ifade seviyesinin arttığı ya da azaldığı belirlenmiştir. Bazı genlerin, örneğin *CsLEA-04*, *CsLEA-15*, *CsLEA-19*, *CsLEA-20*, *CsLEA-22*, *CsLEA-29*, *CsLEA-34*, *CsLEA-41*, *CsLEA-44* genlerinin sadece kök dokusunda yüksek ifade seviyesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Son olarak, salatalık genomunda bulunan

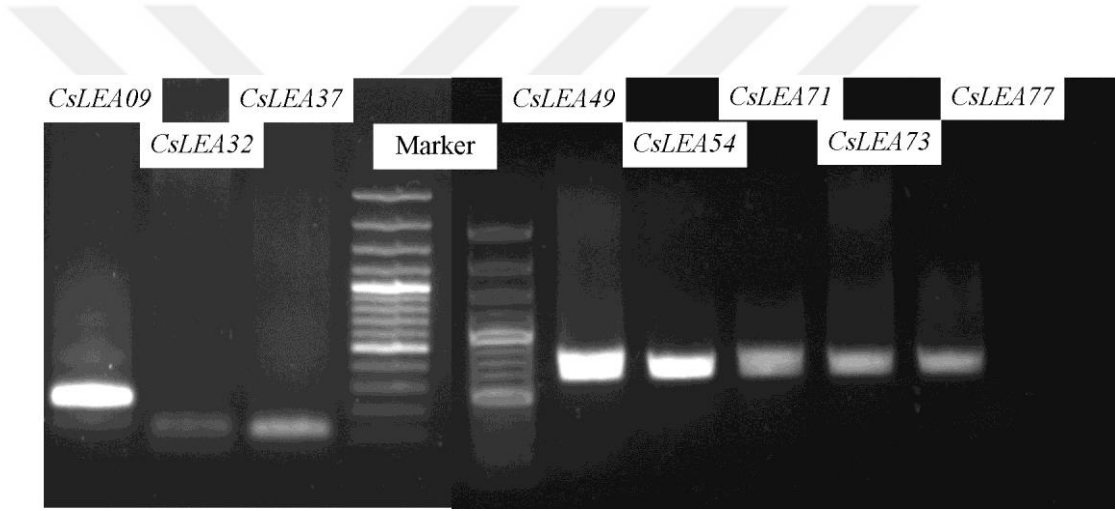
CsLEA-07, *CsLEA-12*, *CsLEA-43*, *CsLEA-47*, *CsLEA-48*, *CsLEA-64* LEA genlerinin sadece erkek organda ifadesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 7. *CsLEA* genlerinin farklı dokulardaki transkriptom analizi

3.11. *LEA* Genlerinin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Salatalık kök ve yaprak örneklerinden elde edilen RNA miktarının (ng/μl) yeterli ve A260/A280 değerlerinin istenilen aralıklarda olduğu saptanmıştır. Her iki doku örneği için 200 ng RNA örneği kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. İlk olarak, bu cDNA örnekleri normal PZR cihazında, primerlerin bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için optimizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları neticesinde, 10 adet *CsLEA* geni (*CsLEA-09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-76* ve *CsLEA-77*) için 60 °C veya 62 °C bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. *CsLEA* genlerinin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi.

3.12. Salatalıkta *LEA* Genlerinin İfade Seviyelerinin Belirlenmesi

Salatalık bitkisinde kuraklığa karşı *LEA* genlerinin cevaplarını incelemek için, kök ve yaprak dokularında transkriptom verisine dayanarak seçilen genlerin qRT-PZR ile gen ifade seviyeleri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda seçilen 10 adet *CsLEA* geninin (*CsLEA-09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-76* ve *CsLEA-77*) ifade profilleri incelenmiş ve transkriptom verisi ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, bu genler için erime eğri grafikleri çizilmiş ve her PZR ürününün kendine özgü uzunluğu olduğu gösterilmiştir (Ek 11). Bunlardan *CsLEA-09*, *CsLEA-54*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73* ve *CsLEA-77* genleri tüm dokularda yüksek gen ifadesine sahip ve *CsLEA-49* ile *CsLEA-76* genleri sadece

yaprak dokusunda yüksek gen ifadesine sahip genlerden seçilmiştir. *CsLEA-32*, *CsLEA-37* ve *CsLEA-57* genleri ise kök dokusunda herhangi bir ifade seviyesi göstermemiş olup, transkriptom verisini kontrol etmek amacıyla tercih edilmiştir (Şekil 4.9).

Bu genler arasında *CsLEA-54*, *CsLEA-76* ve *CsLEA-77* genlerinin ifade seviyesinin yaprak dokusunda tüm çalışılan saatlerde (3.s, 12.s ve 24.s) kuraklık stresinde arttığı gözlemlenmiştir. Bu genlerin, kuraklık stresi sonucunda yüksek ifade edildiği belirlenerek, su olmadığı durumlardaki rolünün belirlenmesi amacıyla daha geniş çalışmalar yapılabilir. Ayrıca *CsLEA-09*, *CsLEA-32* ve *CsLEA-57* genlerinin kuraklık stresine *CsLEA-54* geninin gösterdiği gibi 3. saatin sonunda benzer bir cevap oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu genlerin tümünün, salatalık bitkisinde su sıkıntısı olduğunda erken cevap oluşturduğu ön görülmektedir.

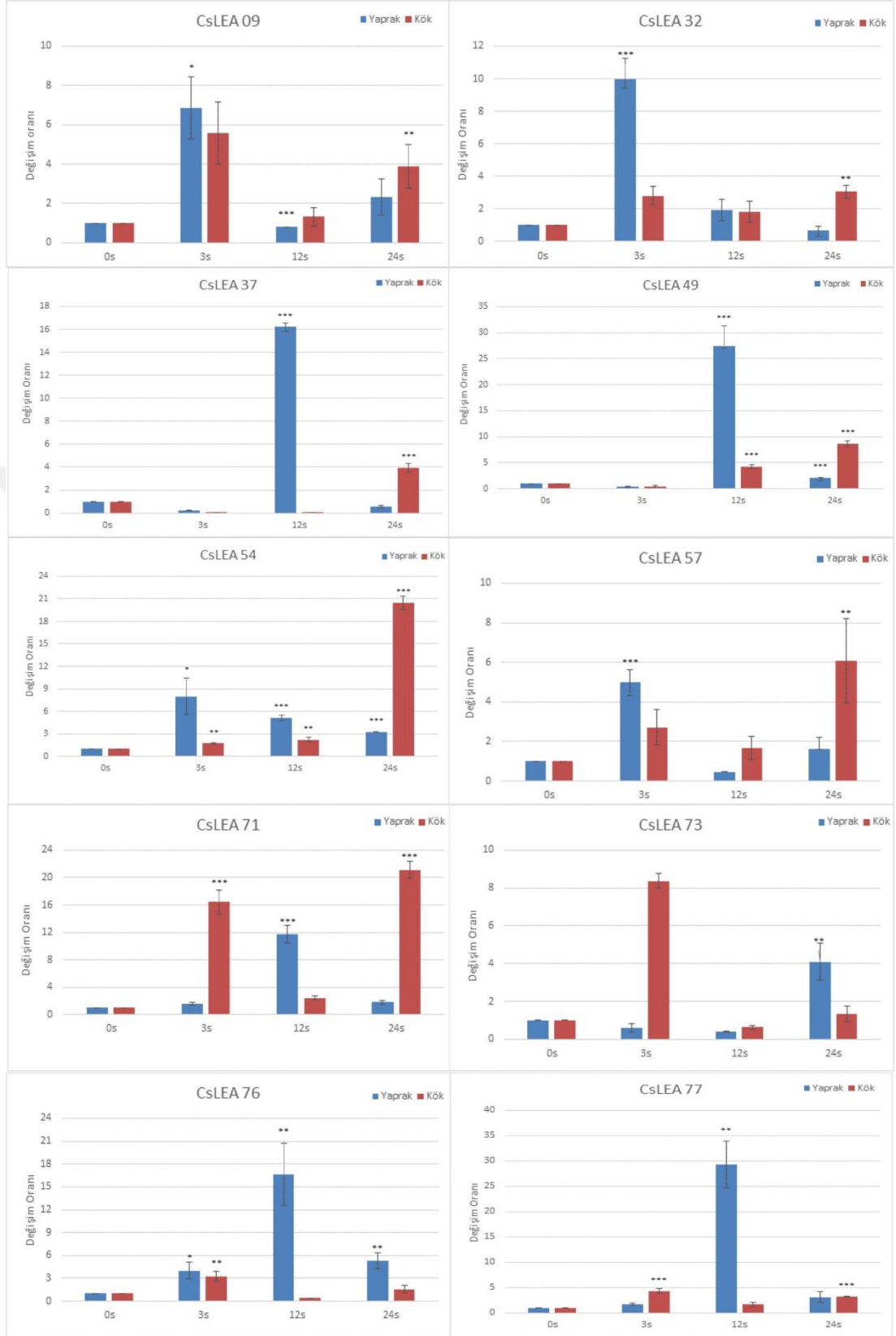
Yaprak dokusunda *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-71*, *CsLEA-76* ve *CsLEA-77* genleri ekspresyonu, 3. saatte artış göstermiş olmasına rağmen, bu genlerin ifade seviyeleri 12. saatin sonunda maksimuma ulaşmıştır. Bu genler, kuraklık stresine karşı cevap oluşturan genler içine dâhil edilmesi uygun görülmüştür.

CsLEA-09, *CsLEA-73*, *CsLEA-76*, *CsLEA-77* genleri ise, salatalık bitkisinde kuraklık stresine kök dokularında ilk cevap veren genlerdendir. Bununla birlikte *CsLEA-32*, *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57* ve *CsLEA-71* genlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresıyla birlikte 24. saatin sonunda kök dokusunda artmıştır. Seçilen bu genlerin ifade seviyelerinin kök veya yaprak dokularında 3. ya da 24. saatin sonunda artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu genlerin, ayrıca diğer transkripsiyon faktörleri ve stres genleri ile birlikte salatalık bitkisinde kuraklığa karşı cevap oluşturduğu düşünülebilir. Bu genler arasında *CsLEA-09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57* genleri kök ve yaprak dokularında benzer motifi göstermekte olup, köke göre yapraklarda daha fazla ifade edilmektedir. Ayrıca, kök ve yaprak dokularındaki bu genlerin ifade seviyeleri karşılaştırıldığında *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-76* ve *CsLEA-77* genleri, kuraklığa karşı geç cevap oluşturan genler olarak düşünülebilir.

Transkriptom ve eş zamanlı PZR verileri, birbirine uygun sonuçlar oluşturmuştur. Ancak *CsLEA-32*, *CsLEA-37* ve *CsLEA-57* genleri transkriptom verisinde sadece

yaprak dokularında ifade edilirken, eş zamanlı PZR analizlerinde hem kök hem de yaprak dokularında ifade edilmiştir.





Şekil 4. 9. *CsLEA* genlerinin farklı dokulardaki transkriptom analizi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Yürütülen bu tez çalışmasında LEA veri tabanından 14 farklı bitki türünün LEA protein dizileri kullanılarak, salatalık genomunda 79 adet *LEA* geni belirlenmiştir. Belirlenen *CsLEA* genleri *CsLEA-01*' den *CsLEA-79*' a kadar isimlendirilmiştir. Bitkilerde genom seviyesinde *LEA* genlerinin tanımlanması ve analiz çalışmaları literatürde sınırlıdır. İlk olarak Arabidopsis bitkisinde 51 adet (Hundertmark ve Hinch, 2008) ve çeltikte ise 34 adet (Wang vd., 2007) *LEA* geni tanımlanmıştır. Bununla beraber, LEA protein ailesine ait genler farklı bitkilerde de tanımlanmıştır. Örneğin soya fasulyesinde 36 adet (Battaglia ve Covarrubias, 2013), Çin eriğinde 30 adet (Du vd., 2013), kavakta 53 adet (Lan, Gao ve Zeng, 2013), Yalancıkılcan bitkisinde 36 adet (Filiz vd., 2013), domateste 27 adet (Cao ve Li, 2015), patateste 29 adet (Charfeddine vd., 2015) ve mısırdaki 32 adet (Li ve Cao, 2015) *LEA* proteinini kodlayan gen belirlenmiştir. Çalışmalarımız gösteriyor ki, diğer çalışmalara oranla en fazla sayıda *LEA* geni salatalık genomunda tespit edilmiştir. Bunun olası sebeplerinin başında detaylı biyoinformatik analiz çalışmalarında fazla sayıda bitki çeşidinin kullanılması gelmektedir.

Bulunan *CsLEA* genleri 7 adet salatalık kromozomunun tümüne Phytozome veri tabanından elde edilen başlangıç bilgilerine göre dağılmıştır. En fazla *CsLEA* geni 16, 15 ve 14 adet ile sırasıyla 6, 3 ve 7. kromozomlarda bulunmaktadır. Birçok transkripsiyon faktör geni örneğin lösün fermuar transkripsiyon faktör geni ailesi olan bZIP ile büyüme düzenleyici faktör gen ailelerinin üyeleri de çoğunlukla salatalık genomunda 3. kromozomda yer almaktadır (Baloglu vd., 2014; Baloglu, 2014). Bununla beraber, en düşük gen sayısını içeren kromozom 2 üzerinde sadece 5 adet *CsLEA* geni tespit edilmiştir.

Tandem (aynı kromozom üzerinde) ve segmental (farklı kromozomlar üzerinde) olarak bilinen gen duplikasyon olayları bir gen ailesinin genom seviyesinde genişlemesinde ve sayısının artmasında önemli rol oynamaktadır. Salatalık genomunda tespit edilen *CsLEA* genlerinin yaklaşık %70'inin tandem duplikasyon olayı gösterdiği belirlenmiştir. Salatalık genomunda *LEA* gen duplikasyon

olaylarının, diğer çalışılan bitki *LEA* gen aileleri ile kıyaslandığında daha yoğun olduğu görülmüştür. Sırasıyla Arabidopsis bitkisinde %33, çeltikte %17, domateste %29, patateste %7 ve çin eriğinde %40 oranında tandem duplikasyona rastlanmıştır (Hundertmark ve Hinch, 2008; Wang vd., 2007; Cao vd., 2015 ; Charfeddine vd., 2015; Du vd., 2013). Salatalık genomunda belirlenen *LEA* genlerinin tandem duplikasyon oranının, literatürde çalışılan tüm bitkilerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bulunan bu sonuç, *LEA* gen aile üyelerinin salatalık genomunda daha fazla olması ile açıklanabilir. Diğer yandan salatalık genomunda segmental duplikasyon olayına rastlanmamıştır. Ancak segmental duplikasyon Arabidopsis bitkisinde, çeltikte, domateste, patateste ve çin eriğinde yaklaşık olarak %14 ile %54 arasında değişmektedir. (Hundertmark ve Hinch 2008; Wang vd., 2007; Du vd., 2013; Cao vd., 2015 ; Charfeddine vd., 2015).

CsLEA genleri arasındaki evrimsel ilişkileri değerlendirmek için, MEGA v.6 programı yardımıyla filogenetik ağaç analizi yapılmıştır (Tamura vd., 2013). Salatalıkta bulunan *CsLEA* genleri 7 farklı sınıf oluşturacak şekilde dallanma göstermiştir. Bu filogenetik analiz sonucunda *LEA* grupları, tohum olgunlaşma proteinleri (SMP) ve dehidrin grubuna ait genler genelde aynı sınıflarda bulunmuştur. Arabidopsis, patates ve çin eriğinde *LEA* genlerinin filogenetik analizi sonrasında, birbirinden farklı olan 9 farklı sınıfın olduğu gözlemlenmiştir (Hundertmark ve Hinch 2008; Du vd., 2013; Charfeddine vd., 2015). Bu bitkiler de *LEA* genlerinin filogenetik sınıflandırılmasında da salatalık *LEA* genlerinin ayrılmasına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Salatalıkta *LEA2* grubu hariç, tüm *LEA* grupları filogenetik ağaçta aynı sınıflarda yer almıştır. Sadece *LEA2* grubu filogenetik olarak farklı sınıflarda bulunmuştur. Ancak *LEA2* grubu dışında olan *LEA* grupları, salatalıkta olduğu gibi Arabidopsis, patateste ve çin eriği bitkilerinde de filogenetik ağaçta aynı sınıflarda yer almıştır. Dolayısıyla, *LEA* gen grupları arasında evrimsel bakımdan diğer bitki grupları ile güçlü bir korelasyon bulunmaktadır.

Buna ilaveten, filogenetik ağacın güvenilirliğini test etmek için MEME veri tabanı kullanılarak *CsLEA* proteinlerinin taşıdıkları motifler belirlenmiştir. MEME veri tabanı kullanılarak yapılan analizlerde 79 adet *CsLEA* proteininin 15 farklı motif

içerdiği belirlenmiştir. Diğer organizmalardaki LEA proteinlerinin farklı sayılarda motif içerdiği gözlenmiştir. Örneğin LEA proteinlerinin kavakta 23 (Lan vd. 2013), domateste 26 (Cao vd., 2015) ve mısır da ise 34 (Li vd., 2015) farklı motif içerdiği tespit edilmiştir. LEA protein ailesi içinde yer alan LEA-5, LEA-6 ve dehidrin grup proteinlerinde korunmuş motif bölgeleri tespit edilmiştir. Ayrıca patates dehidrin proteinlerinde K ve Y segmentleri olmak üzere 2 farklı dizi motifi belirlenmiştir (Charfeddine vd., 2015). Bununla birlikte Çin eriği dehidrinlerinde de lizince zengin K segmenti bulunmuştur (Du vd., 2013).

Aynı motifleri içeren genler, aynı LEA grubuna dâhil olup, filogenetik ağaçta aynı sınıfta bulunmaktadır. Salatalık LEA protein ailesinde de benzer bir sonuç elde edilmiştir. Örneğin, LEA-2 grubunda Motif 1, 2, 3, 4 ve 8 bulunurken, LEA-4 grup proteinleri sadece 6. motifi içermektedir. Ancak aynı motiflerin farklı LEA gruplarında bulunabileceği de çalışmamızda gösterilmiş olup, Motif 6' nın hem LEA-1 hem de LEA-4 grup proteinlerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, aynı motiflerin farklı LEA grup ve filogenetik sınıflarda bulunması evrim sürecinde bunların farklı atalardan köken aldığı şeklinde yorumlanabilir.

CsLEA genlerinin ekzon ve intron bölgeleri yürütülen çalışma kapsamında incelenmiş olup, bu genlerin çoğunun intron içermediği tespit edilmiştir. Salatalık genomunda belirlenen bu intronsuz *CsLEA* genleri filogenetik olarak sınıf 4' te bulunduğu, geri kalan genlerin ise bir ya da iki adet intron içerdiği belirlenmiştir. Çalışmada salatalık genomunda bulunan LEA genlerinin intron-ekzon yapısı, Yalancıkılcan genomunda (Filiz vd., 2013) ve domates genomunda (Cao vd., 2015) bulunan *LEA* genlerinin yapıları ile benzerlik göstermektedir. Her iki bitkide de *LEA* genlerinin büyük çoğunluğunun intron içermediği gösterilmiştir. Ayrıca, çeltikte (Wang vd., 2007) Çin eriğinde (Du vd., 2013), kavakta (Lan vd., 2013), patateste (Charfeddine vd., 2015) ve mısırdaki (Li vd., 2015) tespit edilen *LEA* genlerinin çoğunda sadece bir ya da iki intron bulunmaktadır. Tüm organizmalarda bulunan *LEA* genlerinde olduğu gibi salatalık *CsLEA* genleri de intron-ekzon sayısı ve durumlarına göre filogenetik ağaçta benzer sınıflarda yer almış olup, benzer LEA grubunda bulunmaktadır. Bu sonuç, tüm *LEA* genleri arasında evrimsel açıdan korunmuş bir ilişkinin varolabileceğini göstermektedir.

Farklı organizmalarda bulunan, işlev ve fonksiyon bakımından benzer ancak fiziksel yapısının farklı olduğu genlere ortolog genler adı verilmektedir. Çalışmamızda, salatalıkta belirlenen *CsLEA* genlerinin kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır genomlarında bulunan *LEA* genleri ile ortolog ilişkileri de araştırılmıştır. Kavak genomunda bulunan *LEA* genleri ile salatalıkta bulunan *CsLEA* genleri arasında maksimum ortolog ilişki saptanmıştır. Salatalık genomu sadece *LEA* genleri bakımından değil, aynı zamanda farklı bir gen ailesi olan *bZIP* transkripsiyon faktör genleri bakımından da kavak genomu ile ortolog ilişki gösterilmiştir. Baloglu vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, salatalık genomunda belirlenen *bZIP* genleri ile kavakta bulunan *bZIP* genlerinin %90' nın üzerinde ortolog ilişki gösterdiği tespit edilmiştir. Ortolog ilişkilerin belirlenmesi sonucu elde edilen bu bilginin, *LEA* genlerinin salatalık ve diğer bitki türleri arasındaki evrimsel ilişkinin açığa çıkarılmasında yararlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca farklı organizmalarda bulunan bu ortolog genlerin, bitki ıslahı ve genetiği alanlarında izolasyon ve klonlama çalışmalarında kullanılma potansiyelinin de yüksek olduğu düşünülmektedir.

Gen duplikasyonlarının önemli fonksiyonlarından biri de, proteinlerde yeni fonksiyonların evrimini sağlamasıdır (Kondrashov vd., 2002). Salatalık genomunda tespit edilen tandem duplikasyon gösteren *CsLEA* genlerinin homolog olmayanın (K_a), homolog olana (K_s) değişim oranı (K_a/K_s) hesaplanarak, *LEA* gen ailesi içerisindeki evrimsel yayılması değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca bu değişim oranı Arabidopsis, kavak, mısır ve çeltik *LEA* genlerinin ortologları için de hesaplanmıştır. *CsLEA* genlerinin diğer bitkilerdeki ortolog genlerle arasındaki ayrılma zamanı incelendiğinde, 78 ile 204 milyon yıl önce gen ayrılmalarının meydana geldiği saptanmıştır. *CsLEA* genlerinin salatalık genomunda aynı kromozom üzerindeki duplikasyonları bakımından incelendiğinde, 245 milyon yıl önce gen ayrılmalarının meydana geldiği hesaplanmıştır. Bu çalışmalar, *LEA* genleri bakımından salatalık genomunun daha kuvvetli bir seleksiyona uğradığı şeklinde yorumlanabilir. Segmental ve tandem duplikasyonlar, gen ailelerinin genişlemesine neden olan önemli genetik olaylardır (Cao, Shi, Liu, Huang ve Zhou, 2012; Chen ve Cao, 2014). *LEA* genlerinin genom seviyesindeki analizleri ile toplam olarak

domatesten 22 genin (Cao vd., 2015), patatesten 8 genin (Charfeddine vd., 2015), Yalancıkılcan bitkisinden 8 genin (Filiz vd., 2013), Çin eriğinden 17 genin (Du vd., 2012) ve Arabidopsis' ten 42 genin (Hundertmark ve Hinch, 2008) tandem ve segmental duplikasyon olaylarından birini ya da her ikisini de gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, farklı bitki türleri arasında *LEA* gen ailesinin bu şekilde büyük oranlarda genişlemesini açıklamaktadır.

Genomik ve transkriptomik çalışmaları ile birlikte bitki ve hayvanlarda mRNA' nın yıkılması ve translasyonel düzeyde baskılanması ile ilgili düzenleyici rolleri olan küçük RNA molekülleri ilk olarak 1990' lı yıllarda bildirilmesine rağmen (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993) 2001 yılına kadar tam olarak tanımlanamamıştır (Lee ve Ambros, 2001). Bu süreçten sonra miRNA' lar bilim dünyasında büyük ilgi çekmiştir. Bu moleküller miRNA, siRNA (short interfering RNA), snoRNAs (Small nucleolar RNAs) ve piRNA (Piwi-interacting RNA) gibi bazı gruplara ayrılmaktadır. Bu gruplar, hücredeki üretim yolları ve işlevleri sebebi ile birbirlerinden ayrılmaktadır (Bartel, 2004; Jones-Rhoades vd., 2006; Ambros ve Chen, 2007). Çalışmamızda, toplamda 50 adet bitki miRNA' sı için 37 adet *CsLEA* geni hedef gen olarak belirlenmiştir. miRNA' lar tarafından en fazla hedeflenen salatalık *LEA* genleri *CsLEA-06* ve *CsLEA-37* genleri olup, mir854 ve mir414 ise en fazla bulunan bitki miRNA' larıdır. Arabidopsis bitkisinde yapılan gene ontoloji analizine göre mir414' ün hedefleri arasında özellikle transkripsiyonel düzenleyiciler önemli bir yer tutmaktadır. Bunlar arasında, bitki büyüme, gelişme ve savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan bZIP, WRKY, MYB, B3, ısı şoku proteinleri ve TCP' ler sayılabilir (Eulgem, Rushton, Robatzek ve Somssich, 2000; Gurley 2000; Jakoby vd., 2002; Suo, Liang, Pu, Zhang ve Xue vd., 2003; Guo, Xiang, Yang ve Yang, 2007; Romanel, Schrago, Couñago, Russo ve Alves-Ferreira, 2009; Guleria ve Yadav, 2011). Ayrıca başka bir çalışmada ise, çeltikte kuraklık stresi sonucunda mir854' ün ifade seviyesinin arttığı ve ancak bunun rolünün tam olarak aydınlatılamadığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2010). mir854' ün çevrilmeyen bölgede hedef bölgesi bulunmaktadır. Bu bölge oligouridylate bağlanma protein1b (UBP1b) olan nükleer RNA bağlanma proteinini kodlamaktadır (Lambermon vd., 2000). Trankripsiyonel mekanizmanın düzenleyicisi olan mir854 ailesi hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunmaktadır (Arteaga -Vazquez, Caballero-Pe' rez ve Vielle-Calzada, 2006). Bu

miRNA' lar tarafından hedeflenen *CsLEA* genlerinin belirlenmesi, salatalıkta bunların rollerinin anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Diğer yandan salatalık genomunda bulunan *LEA* genlerini hedefleyen miRNA' ların belirlenmesi bu çalışmayla ilk defa yapılmıştır. Ayrıca bu miRNA' ların yapısının keşfedilmesi dokuya özgü miRNA' ların bulunmasını da kolaylaştırabileceği ön görülmektedir.

Phyre2 veri tabanı kullanılarak, Protein Data Bank (PDB) bulunan LEA proteinleri ile BLASTP taraması yapılmış ve *CsLEA* proteinlerinin üç boyutlu homoloji modellenmesi yapılmıştır. Bu veri tabanı proteinlerin yapısı, fonksiyonu ve mutasyonların analizinin tahmininde kullanılmaktadır (Söding, 2005). Toplam 6 adet *CsLEA* proteinin, %90 güvenilirlikte yaklaşık olarak %75 ile %90 arasında benzerlik oranında üç boyutlu yapısı belirlenmiştir. Benzer çalışma, yine salatalıkta genom seviyesinde belirlenen bZIP gen ailesi için de yapılmıştır (Baloglu vd., 2014). bZIP genlerinin ikincil yapılarının ağırlıklı olarak α helix yapısından oluşmasına rağmen, *CsLEA* proteinlerinde ise β pilili tabaka yapısı hâkimdir. Dolayısıyla, bu iki çalışmada salatalık genomu kullanılarak yapılmış olsa dahi, ikincil ve dolayısıyla üçüncül yapılarının farklı olmasının nedeni, incelenen genlerin aminoasit dizileri ile doğrudan ilişkili olduğundandır. Arabidopsis (Singh vd., 2005) ve mısırdaki (Li ve Cao 2016) yapılan çalışmalarda, LEA-2 grup proteinlerinin bir α -heliks ve iki antiparalel β -tabakasından oluştuğu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermekte olup, salatalık LEA proteinlerinde de hâkim formun β -tabakası olduğu gözlemlenmiştir. Üç boyutlu yapıları tahmin edilen bu protein modelleri, salatalık dâhil farklı bitki türlerinde LEA proteinlerinin fonksiyonlarını anlamada ileri çalışmalarda yararlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu protein yapısının bitki dokularındaki yaralanmalar ve stres etkilerini azaltmak için akışkan kaybında rol oynayabileceği düşünülmektedir (Singh vd., 2005; Li ve Cao 2016).

Blast2Go gen ontoloji programı kullanılarak (Conesa ve Götze, 2008), *CsLEA* genlerinin ontoloji analizleri yapılmış ve salatalık genomunda bulunan *LEA* genlerinin hücresel lokalizasyonu, biyolojik işlevleri ve moleküler fonksiyonları belirlenmiştir. *CsLEA* proteinleri abiyotik strese cevap ve farklı moleküllere bağlanma olarak fonksiyonel aktivite göstermekte olup, en fazla plazma zarında ve

sitoplazmada bulunduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten, CsLEA proteinlerinin moleküler fonksiyon tahminlenmesi ile bu proteinlerin çoğunlukla bağlanma kapasitesine sahip ve su kıtlığı durumunda enzim koruma aktivitesi gibi davranışlar gösterebildiği tespit edilmiştir (Goyal, Walton ve Tunnacliffe, 2005; Reyes vd., 2008). Ayrıca LEA proteinleri, kuraklık veya dondurucu sıcaklıklarda hücre zarını korumak için zar stabilizasyon aktivitesi de göstermektedir (Kosová, Vítámvás ve Prášil, 2007; Tolleter, Hinch ve Macherel, 2010). CsLEA proteinleri çoğunlukla hücre içerisinde ya da zar koruma rollerinden dolayı, plazma zarında lokalize olmaktadır (Wolkers, McCready, Brandt, Lindsey ve Hoekstra, 2001; Liu, Zheng, Zhang, Wang ve Li, 2010). Bununla birlikte, domateste bulunan LEA proteinleri genellikle sitoplazmik veya çekirdek bölgelerinde bulunurken (Cao and Li 2015), yalancıkılcan genomunda belirlenen LEA proteinlerinin ise genelde mitokondri ve kloroplastta buldukları tespit edilmiştir (Filiz, Ozyigit, Tombulođlu, Koç, 2013). Ayrıca yapılan bir çalışmada (Battaliga, Olvera-Crrillo, Garcıarrubio, Campos, Covarrubias, 2008) LEA2 grup proteinlerinin sitoplazma, çekirdek veya mitokondri gibi hücre organellerinde yoğunlukla bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda bulunan bu sonuçlar bizim çalışmamızla uyum göstermekte olup, LEA proteinlerinin farklı hücresel bölgelerde bulunabileceği tespit edilmiştir.

Salatalıkta *LEA* genlerinin; dölleniş ve döllenişmemiş ovaryumlarda, yaprakta, kökte, asma filizi uzantısında, asma filizi taban dokusunda, sürgünde, erkek ve dişi çiçek dokularında, dokuya özgü transkriptom analiz verisi kullanılarak ifade seviyesindeki farklılıkları belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda, *CsLEA-09*, *CsLEA-27*, *CsLEA-40*, *CsLEA-54*, *CsLEA-61*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-77* ve *CsLEA-79* genlerinin ifade seviyesinin tüm dokularda yüksek olduğu gözlenirken, *CsLEA-17* ve *CsLEA-56* genlerinin ifadelerinin hiç bir dokuda olmadığı saptanmıştır. Benzer çalışma aynı dokulara ait transkriptom verisi kullanılarak *bZIP* gen ailesi genleri için de yapılmıştır (Baloglu vd., 2014). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, bazı *bZIP* genlerinin yine hiçbir dokuda ifade edilmediği ortaya çıkarılmıştır. Salatalık dokularına özgü yapılan transkriptom analizi sonuçlarına göre, 10 adet *CsLEA* geni (*CsLEA-09*, *CsLEA-32*, *CsLEA-37*, *CsLEA-49*, *CsLEA-54*, *CsLEA-57*, *CsLEA-71*, *CsLEA-73*, *CsLEA-76* ve *CsLEA-77*) seçilerek bu genlerin qRT-PZR ile gen ifade seviyeleri incelenmiştir. RNA-seq ve gerçek zamanlı PZR verilerinden elde

edilen sonuçlar birbirine uygunluk göstermişlerdir. Sadece, *CsLEA-32*, *CsLEA-37* ve *CsLEA-57* genleri transkriptom verisinde yaprak dokularında ifade edilirken, eş zamanlı PZR analizlerinde hem kök hem de yaprak dokularında ifade edildiği gözlemlenmiştir. Arabidopsis genomu ile salatalık genomunun ortolog analizine göre, Arabidopsis’ te bulunan 4, 10 ve 14 numaralı *LEA* genleri ile salatalıkta bulunan *CsLEA-54* geni ortolog özellik göstermiştir. Çalışmamızda *CsLEA-54* geninin ifade seviyesinin kuraklık stresi uygulamasından sonra arttığı hem transkriptom hem de eş zamanlı PZR analizleri kullanılarak doğrulanmıştır. Benzer şekilde, Arabidopsis’ te bulunan 4 (AT1G20440.1) ve 10 (AT1G76180.1) numaralı genlerin de kuraklık ve özellikle soğuk stresi sonunda uyarıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *CsLEA-73* geninin Arabidopsis’ teki ortoloğu olan, 41 numaralı *LEA* geninin de su sıkıntısı durumunda ifade seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. *CsLEA-73* geninin Arabidopsis’ teki diğer bir ortoloğu olan *SAG* geninin de (senescence-associated gene, Arabidopsis’ teki 38 numaralı *LEA* geni) soğuk, tuz ve kuraklık koşullarında uyarıldığı gözlemlenmiştir (Hundertmark ve Hinch 2008; Weaver, Gan, Quirino ve Amasino, 1998). Arabidopsis ve salatalıkta bulunan ortolog *LEA* genlerinin kuraklık stresi başta olmak üzere farklı abiyotik streslerde önemli rol oynadıkları belirlenmiştir. Bulunan bu sonuçlar çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Buna ilaveten, domateste bulunan 5 adet *LEA* geninin de tuz, su stresi ve soğuk uygulamalarından sonra ifade seviyesinde artış olduğu saptanmıştır (Cao vd., 2015). Ayrıca, patates genomunda belirlenen *StDHN1*, *StDHN2a*, *TAS14*, *StDHN25*, *StLEA27* isimli *LEA* genlerinin ifade seviyeleri başka bir çalışmada incelenmiştir (Charfeddine vd., 2015). Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *StDHN2a*, *TAS14* ve *StLEA2* genleri sadece kuraklık ve/veya tuz stresi durumunda ifade oldukları belirlenirken, *StDHN1* ve *StDHN25* genleri tüm dokularda ifade edildiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, *LEA* genlerinin sadece abiyotik stres koşullarında değil, aynı zamanda normal bitki büyüme ve gelişim evresinde de önemli roller oynadığı söylenebilir. Salatalık *LEA* genlerinde de benzer sonuçlar bulunmuştur. Salatalık farklı dokularından elde edilen transkriptom verisi de *CsLEA* genleri için incelenmiş ve bazı *CsLEA* genlerinin tüm dokularda ifade edildiği saptanmıştır. Dolayısıyla önceki çalışmalarda da görüldüğü gibi, salatalık bitkisi için de *LEA* genleri sadece abiyotik strese karşı cevap oluşturmamakta aynı zamanda salatalık bitkisinin normal gelişim ve büyümesi içinde gerekli olduğu

saptanmıştır. LEA protein ailesi ayrıca kuraklık stresine karşı embriyonel yapının korunmasına da katkıda bulunabilir (Hanin vd., 2011; Du vd., 2013; Lan vd., 2013).

Salatalık genomunda bulunan *LEA* gen ailesinin üyeleri bu tez çalışmasıyla ilk defa belirlenmiş olup, 79 adet *CsLEA* geninin biyoinformatik yöntemler kullanarak karakterizasyonu ve ifade seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Çalışmada, *LEA* genlerinin kromozomal yerleşimleri, gen yapısı tahmini, filogenetik analizleri, motif bölgelerinin belirlenmesi, gen ontoloji analizleri, LEA proteinlerinin farklı türler ile karşılaştırılması, homolog ve homolog olmayan değişim oranlarının hesaplanması, LEA proteinlerinin homoloji modellemesi ve *LEA* genlerini hedef alan miRNA'ların tanımlanması gibi analizler ile *CsLEA* genlerinin özelliklerini belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmıştır. Ayrıca, veritabanlarında bulunan salatalığın farklı dokularına ait RNA-seq verisi kullanılarak, *CsLEA* genlerinin ifade seviyelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Son olarak, kuraklık stresi uygulanmış salatalık kök ve yaprak dokularında, belirlenen *CsLEA* genlerinin ifade profili eş zamanlı PZR ile incelenerek, kuraklık stresi ile ilişkileri analiz edilmiştir. *CsLEA* genlerinin salatalık bitkisinde kuraklık stresine cevap oluşturan mekanizmalardan biri olabileceği bulgularla desteklenmektedir. LEA proteinleri (late embryogenesis abundant) ilk olarak tohumlarda keşfedilmiş olsa da, farklı bitki türlerinin vejetatif dokularında değişik abiyotik stres koşullarında ifade seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, bu çalışma; *LEA* genlerinin moleküler ıslah çalışmalarında markör olarak kullanılma potansiyeli, kuraklık stresine cevap ilgili mekanizmalar hakkında ön bilgiler vermesi ve kuraklık stresine dirençli bitkilerin geliştirilmesi gibi çalışmalara veri sağlaması bakımından literatüre değerli bilgiler sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. and Murata, N. (2000). Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*. *Plant Physiol*, 22(4),1201-1208.
- Almoguera, C. and Jordano, J. (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 19, 781-792.
- Ambros, V. and Chen, X. (2007). The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 134(9), 1635-1641.
- Anami, S., Block, M.D., Machula, J. and Lijsebettens, M.V. (2009). Molecular improvement of tropical maize for drought stress tolerance in Sub-Saharan Africa, *Critical Reviews in Plant Science*, 28,16-35.
- Ansorge, W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques, *NewBiotechnology*, 25(4), 195-203.
- Arteaga-Vázquez, M., Caballero-Pérez, J., Vielle-Calzada, JP. (2006). A family of micro RNAs present in plants and animals. *The Plant Cell*, 18(12), 3355–69.
- Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C. and Thomashow, M.F.(1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15* a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13404-13409.
- Ashraf, M. (2004). Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199, 361-376.
- Bailey, T. L., Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* (pp. 28–36), Menlo Park, California.
- Baker, J., Steele, C. and Dure, L. (1988). Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11, 277–291.
- Baloglu, M.C., Eldem., V., Hajyzadeh, M., Unver, T. (2014). Genome-Wide Analysis of the bZIP Transcription Factors in Cucumber. *PLoS ONE* 9(4), e96014. doi:10.1371/journal.pone.0096014.

- Baloglu, M.C. (2014). Genome-wide in silico identification and comparison of Growth Regulating Factor (GRF) genes in Cucurbitaceae family. *Plant Omi. J*, 7, 260-270.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 116(2), 281-297.
- Battaliga, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A.A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 148, 6-24.
- Battaglia, M., Covarrubias, A.A. (2013). Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. *Front Plant Sci*, 4, 190.
- Bayraktar, K. (1970). *Sebze Yetistirme*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R. and Delseny, M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67, 107–124.
- Blum, A. (1986). Breeding crop varieties for stress environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199-237.
- Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., Vladimirova, S.V., Voinikov, V.K. (2002). Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.*, 2, 5. doi:10.1186/1471-2229-2-5.
- Boscaiu, M., Lull, C. , Lidon, A. , Bautista, I. , Donat, P. , Mayoral, O. , et al. (2008). Plant responses to abiotic stress in their natural habitats. *Bulletin UASVM, Horticulture*, 65 (1), 53-8.
- Boswell, L.C., Menze, M.A., Hand, S.C. (2009). Multiple isoforms of late embryogenesis abundant proteins in *Artemia franciscana* embryos. *Integr Comp Biol*, 49: E203.
- Bray, E. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103, 1035 - 1040.
- Bray, EA., (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sci.*, 2, 48-54.

- Breton, G., Danyluk, J., Charron, J.B. and Sarhan, F. (2003). Expression profiling and bioinformatics analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132, 64-74.
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29, 23–39.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hij Den Biyol Derg.*, 69(2), 97-110.
- Campbell, M.K. (1991). *Biochemistry*. Fort Worth, USA: Harcourt Brace Jovanovich College Publishers.
- Cao, J., Shi, F., Liu, X., Huang, G., Zhou M. (2012). Phylogenetic analysis and evolution of aromatic amino acid hydroxylase. *FEBS Lett*, 584, 4775–4782.
- Cao, J., Li, X. (2015). Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*), *Planta*, 241, 757–772.
- Charfeddine, S., Sarıdi, M.N., Charfeddine, M., Gargouri-Bouزيد, R. (2015). Genome-wide identification and expression profiling of the late embryogenesis abundant genes in potato with emphasis on dehydrins. *Mol Biol Rep*, 42(7), 1163-74.
- Chen, Y., Cao, J. (2014). Comparative genomic analysis of the Sm gene family in rice and maize. *Gene*, 539, 238–249.
- Cheng, Z., Targolli, J., Huang, X. and Wu, R. (1959). Wheat LEA genes, PMA80 and PMA enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 10, 71-82.
- Chiba, S., Yokota, S.I., Yonekuva, K., Tanaka, S., Furuyama, H., Kubota, H., et al. (2006). Auto antibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebro spinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 241(1-2), 39-43.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu, J.K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *J. Exp Bot*, 55(395), 225-36.
- Close, T.J. (1996). Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Plant Physiology*, 97, 795–803.
- Close, T.J. (1997). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 100, 291-296.

- Cao, J. and Li, X. (2015). Identification and phylogenetic analysis of late embryogenesis abundant proteins family in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 241(3), 757-72.
- Cohen, S., Tyrrell, D. A. J. and Smith, A. P. (1991). Psychological stress and susceptibility to the common cold. *New England Journal of Medicine*, 325, 606- 612.
- Conesa, A., Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics*, 2008, 619832. doi: 10.1155/2008/619832.
- Cuming, A. (1999). LEA proteins. R. Casey & P.R. Shewry (Eds.), *Seed Proteins*. (pp 753–780). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Çırak, C. ve Esendal, E.(2006). Soyada Kuraklık Stresi. *OMÜ Ziraat Fak. Dergisi*, 21(2), 231-237.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., Bansal, K.C. (2009). Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from Brassica napus plays a key role in salt and drought tolerance. *J Biotechnol* 139(2),137–145.
- Davis, P.H. (1972). *Flora Of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Denekamp, N.Y., Reinhardt, R., Kube, M., Lubzens, E. (2010). Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in nondesiccated, encysted, and diapausing embryos of rotifers. *Biol Reprod* 82(4), 714–724.
- Dönmez, D., Şimşek, Ö., Aka Kaçar, Y. (2015). Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 8 (1), 30-37.
- Du, D., Zhang, Q., Cheng, T., Pan, H., Yang, W., Sun, L. (2013). Genome-wide identification and analysis of late embryogenesis abundant (LEA) genes in *Prunus mume*. *Mol Biol Rep* 40(2), 1937–1946.
- Dure, L.III., Greenway, S.C. , Galau, G.A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20, 4162-4168.
- Dure, L.I., Galau, G.A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins. *Plant Physiol* 68(1), 187–194.

- Dure, L., Crouch, M., Harada, J.J., Ho, T., Mundy, J., Quatrano, R.S., Thomas, T.L. and Sung, Z.R. (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, *12*, 475–486.
- Dure, L. (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, *3*, 363–369.
- Dure, L. (1997). Ctopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* *12*, *91*(6), 753-63.
- Egan, A.N., Schlueter, J. and Spooner, D.M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology, *American Journal of Botany*, *99*(2),175–185.
- Engin, A. (1991). *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Yayınları.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, *5*(5),199-206.
- Farrant, J., Spickett, G.P. and Matamoros, N. (1992). Lymphocyte surface phenotype in common variable immunodeficiency, *Dis Markers*, *10*(2),67-80.
- Filiz, E., Ozyigit, İ.İ., Tombuloğlu, H., Koç., İ. (2013). In silico comparative analysis of LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins in *Brachypodium distachyon* L. *Plant Omics Journal* *6*(6),433-440.
- Flora, S.J. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell Mol Biol* *53*, 1-2.
- Forment, J., Naranjo, M.A., Roldan, M., Serrano, R. and Vicente, O. (2002). Expression of Arabidopsis SR like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants, *The Plant Journal*, *30*, 511–519.
- Galau, G.A., Hughes, D.W. and Dure, L. (1986). Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Leu) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, *7*, 155-170.
- Galau, G.A. and Close, T.J. (1992). Sequences of the cotton group 2 LEA/RAB/dehydrin proteins encoded by LEA-3 cDNAs. *Plant Physiology*, *98*, 1523–1525.
- George, S., Usha, B., Parida, A. (2009). Isolation and characterization of an atypical LEA protein coding cDNA and its promoter from drought-tolerant plant *Prosopis juliflora*. *Appl Biochem Biotechnol* *157*(2), 244–253.

- Gilles, A., Fouquet, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. and Gemmell, N.J. (2007). Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *Plos One*, 31, 2 (10), e1109.
- Gilmour, S.J., Artus, N.N. and Thomashow, M.F. (1992). cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 18, 13–21.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten U., Putnam, N., Rokshar, D.S. (2012). Phytozome: a 14 comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res*, 40, 1178–1186.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N., Giraudatand J. (1995). Abscisic acid-dependent and-independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 246(1), 10–18.
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J*, 388,151–7.
- Guleria, P., Yadav, S.K. (2011). Identification of miR414 and expression analysis of conserved miRNAs from *Stevia rebaudiana*. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 9(6), 211-7.
- Guo, Q., Xiang, A., Yang, Q., Yang, Z. (2007). Bioinformatic identification of microRNAs and their target genes from *Solanum tuberosum* expressed sequence tags. *Chinese Science Bulletin*, 52(17), 2380-89.
- Gurley, W.B. (2000). HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *The Plant Cell*, 12(4), 457-60.
- Günay, A. (1970). Marmara bölgesi önemli hıyar çeşitlerinin sitolojik, biyolojik ve morfolojik hususiyetleri üzerinde araştırmalar. *Ankara Ü. Ziraat F. Yay.*, 395.
- Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”.*Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27(5), 763-7.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1998). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T. and Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217, 290-298.
- Hand, S., Jones, D., Menze, M. and Witt, T. (2007). Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology*, 307, 62 -66.

- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., Masmoudi, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant signal behave*, 6, 1503–09
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51, 463-99.
- He, S., Tan, L., Hu, Z., Chen, G., Wang, G., Hu, T. (2011). Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Mol Genet Genomics*, 287(1), 39–54. doi:10.1007/s00438-011-0660-x.
- Henle, K.J., Jethmalani, S.M., Nagle, W.A. (1999). Stres proteins and glycoproteins. *Int Mol Med*, 1, 25-32.
- Hoagland, D. R., Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Stn Circ*, 347,1–32.
- Holmberg, N., Bülow, L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci*, 3(2), 61-6.
- Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D. and Sarhan, F. (2004). Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Journal of Plant Biotechnology*, 2, 381-387.
- Hu, L.F., Liu, S.Q. (2012). Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in cucumber. *Genome*, 55(3), 245–256. doi: 10.1139/g2012-009.
- Huang, S. , Li, R. , Zhang, Z. , Li, L. , Gu, X., et al. (2009). The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet*, 41, 1275–1281.
- Hunault, G., Jaspard, E. (2010). LEAPdb: a database for the late embryogenesis abundant proteins. *Bmc Genomics*, 11, 221. doi: 10.1186/1471-2164-11-221.
- Hundertmark, M., Hinch, D.K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118.
- Husaini, A.M., Abdin, M.Z. (2008). Overexpression of tobacco osmotin gene leads to salt stress tolerance in strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) plants. *Indian J Biotechnol*, 7, 465-71.
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A. and Takagi, M. (1996). A Lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170, 243–248.

- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377–403.
- Iturriaga, G., Schneider, K., Salamini, F. and Bartels, D. (1992). Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 20, 555-558.
- Jakoby., M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 7(3), 106-11.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007). Water deficit stress Mitigation by Calcium Chloride in *Catharanthus Roseus*. Effects on Oxidative Stress, Proline Metabolism and Indole Alkaloid Accumulation. *Biointerfaces*, 60, 110-116.
- Jimenez, J.A., Alonso-Ramirez, A., Nicolas, C. (2008). Two cDNA clones (FsDhn1 and FsClo1) up-regulated by ABA are involved in drought responses in *Fasus sylvatica* L. seeds. *J Plant Physiol*, 165(17),1798-807.
- Jones-Rhoades, MW., Bartel, D.P., Bartel, B. (2006). Micro RNAS and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology*, 57, 19–53.
- Kacar, B., Katkat, V. ve Öztürk, S. (2002). *Bitki fizyolojisi*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayını.
- Kadioğlu A. (2004). *Bitki fizyolojisi*. Trabzon: Lokman Yayın.
- Kahn, T.L., Fender, S.E., Bray, E.A. and O’Connell, M.A. (1993). Characterization of expression of drought- and abscisic acid-regulated tomato genes in the droughtresistant species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Physiology*, 103, 597-605.
- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y. (2006). Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri ve Dayanıklılık Mekanizmaları, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18(4), 723-740.
- Kapluhan, E. (2013).Türkiye’de Kuraklık Ve Kuraklığın Tarıma Etkisi. *Marmara Coğrafya Dergisi*, 27, 487-510.
- Karanlık, S. (2001). Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık Ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması. Doktora tezi (Basılmamış), *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.

- Kazuoka, T. and Oeda, K. (1994). Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant and Cell Physiology*, 35, 601–611.
- Kelley, L.A., Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4, 363-371.
- Kocaçalışkan, I. (2003). *Bitki Fizyolojisi*. DPÜ: Fen-Edebiyat Fakültesi Yayını.
- Kondrashov, F. A., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2002). Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biology*, 3(2), research0008.1–research0008.9.
- Kosová, K., Vitámvás, P., Prášil, I.T. (2007). The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*, 51(4), 601-17.
- Kömürcü-Bayrak, E., Erginel-Ünaltuna, N. (2011) Gen Anlatımı Analiz Yöntemlerine Genel Bakış. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (2), 28-35.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.
- Kubista. (2008). M. Emerging real-time PCR applications. *Drug Discovery Word summer*,57-66.
- Lambermon, M.H., Simpson, G.G., Wieczorek Kirk, D.A., Hemmings- Mieszczak, M., Klahre, U., Filipowicz, W. (2000). UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO Journal*, 19, 1638–49.
- Lan, T., Gao, J., Zeng, Q.Y. (2013). Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree Genet Genomes*, 9, 253–264
- Lee, R.C, Feinbaum, R.L, and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843–854.
- Lee, R.C and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862–864.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*, 40, 302-305.
- Levitt, J. (1972). *Responses of plants to environmental Stresses*. New York, London: Academic Press.

- Levitt, J., (1980). *Responses of Plants to environmental stresses*. U.S.A: Academic Press.
- Li Q, Zhang C, Li J, Wang L, Ren Z. (2012). Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in *Cucumis sativus*. *Plos one*, e47576.
- Li X. ve Cao J. (2015). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Gene Family in Maize: Identification, Evolution, and Expression Profiles. *Plant Mol Biol Reporter*, 1-14.
- Lichtenhaler, HK. (1996). Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol*, 148, 4-14.
- Ling, J., Jiang, W., Zhang, Y., Yu, H., Mao, Z., Gu, X., Huang, S., Xie, B. (2011). Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*. *BMC genomics*, 12(1),471.
- Litts, J.C., Colwell, G.W., Chakerian, R.L. and Quatrano, R.S. (1987). The nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the wheat Em protein. *Nucleic Acids Research*, 15, 3607–3618.
- Liu, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Wang, W., Li, R. (2010). Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses. *Curr Microbiol*, 60, 373–8.
- Li, X., Cao, J. (2016). Late Embryogenesis Abundant (LEA) Gene Family in Maize: Identification, Evolution, and Expression Profiles. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 15-28.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Lynch, M., Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290, 1151–1155.
- Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Janardhan Reddy, K. (2005). Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. *Netherlands, Springer*, 345.
- Mehan, M. R., Freimer, N. B., and Ophoff, R. A. (2004). A genome-wide survey of segmental duplications that mediate common human genetic variation of chromosomal architecture. *Hum. Genomics* 1, 335. doi: 10.1186/1479-7364-1-5-335
- Mitra, J., (2001), Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, 80(6), 758-763.

- Monteiro Costa, C.Dn., Santa Brigida, A. B., Bdn Borges, de Menezes Neto, M.A., Castelo Branco Carvalho, L.J., Batista de Souza, C.R. (2011). Levels of MeLEA3, a cDNA sequence coding for an atypical late embryogenesis abundant protein in Cassava, increase under in vitro salt stress treatment. *Plant Mol Biol Rep*, 29(4), 997–1005. doi:10.1007/s11105-011-0292-7.
- Mundy, J. and Chua, N.H. (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal*, 7, 2279-2286.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, 25: 239-50.
- Muthamilarasan, M. , Theriappan, P., Prasad, M. (2013). Recent advances in crop genomics for ensuring food security. *Curr Sci*, 105, 155–158.
- Ndong, C., Danyluk, J., Wilson, K.E., Pocock, T., Huner, N.P.A. and Sarhan, F. (2002). Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analysis. *Plant Physiology*, 129, 1368-1381.
- Ndong, K., Ka, R., Sow, A.I., Mongo, N.M., Ndour, C.T., Diop, D., Soumboumou, S., Cisse, M.F. and Samb, A., (2003). Antibiotic resistance of the most frequently isolated germs at the Fann University Teaching Hospital between January 1999 and December 2000. *Dekar Med*, 48(2), 87-91.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T. and Welin, B.V. (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 45, 263–279.
- Okutucu, B. and Pehlivan, S. (2003). Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Archives Medical Review Journal*, 12 (2), 138-148. Turkish.
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Luis Reyes, J., Garcarrubio, A., Covarrubias, A.A. (2010). Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 154(1), 373–390. doi:10.1104/pp.110.158964.
- Oztur, Z.N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R., Bohnert, H.J. (2002). Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and saltstressed barley. *Plant Mol Biol* 48(5–6), 551–573. doi:10.1023/a:1014875215580.
- Özcan S., Babaoğlu, M., Gürel, E. (2004). *Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Konya: S.Ü. Vakfı Yayınları.

- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J. (1994). Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: Roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell*, 6, 1567–1582.
- Park, S.-C., Kim, Y.-H., Jeong, J.C., Kim, C.Y., Lee, H.-S., Bang, J.-W., Kwak, S. S. (2011). Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic and salt stress-tolerance of transgenic calli. *Planta* 233(3), 621–634. doi:10.1007/s00425-010-1326-3.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Research*, 29 - E45.
- Pinto, A. P., Mota A. M., de Varennes A., Pinto, F. C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci. Tot. Environ*, 326, 23–247.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P. and Palva, E.T. (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 54, 743-753.
- Qi, J., Liu, X., Shen, D., Miao, H., Xie, B., et al. (2013). A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nat Genet*, 45, 1510–1515.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res*, 33: 116–120.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P. and Sumithra, K. (2004). Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 33–42.
- Reyes, J.L., Campos, F., Wei, H., Arora, R., Yang, Y., Karlson, D.T., Covarrubias, A.A. (2008). Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant Cell Environ*, 31, 1781–90.
- Romanel, E.A., Schrago, C.G., Couñago, R.M., Russo, C.A., Alves-Ferreira, M. (2009). Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification. *PloS one*, 4(6), e5791.
- Rorat, T. (2006). Plant dehydrins-tissue location, structure and function. 2006. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(4), 536-56.

- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B. and Vidal, S. (2006). A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*, 45, 237–249.
- Sairam, R.K., Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci*, 86, 407–21.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Chapter 14). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463-5467.
- Santagati, S., Garnier, M., Carlo, P., et al. (1997). Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Br Res Prot*, 217.
- Sevgican, A. (1982). *Serada Hıyar Yetistiriciligi*. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Yayınları.
- Shannon, M.C. and Grieve, C.M., (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity, *Scientia Horticulturae*, 78, 5-38.
- Shannon, M.C. and Grieve, C.M. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78, 5-38.
- Shen, Q., Uknes, S.J. and Ho, T.H. (1993). Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 23652–23660.
- Shendure, J. and Ji., H. (2008). Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology*, 26 ,1135–1145.
- Shih, M.D., Lin, S.C., Hsieh, J.S., Tsou, C.H., Chow, T.Y., Lin, T.P. and Hsing, Y.I. (2004). Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology*, 56, 689-703.
- Singh, N.K., Handa, A.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1985). Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol*, 79, 126-37.

- Singh, S., Cornilescu, C.C., Tyler, R.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M.S., Markley, J.L. (2005). Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress-related protein. *Protein Sci*, 14(10), 2601–2609.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niemi, T., Dyer, W.E., Ho, T.H.D. and Qu, R. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Science*, 155, 1-9
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057–60.
- Söding, J. (2005). Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21, 951–960.
- Stacy, R.A., Aalen, R.B. (1998). Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206 (3), 476–478. doi:10.1007/s004250050424.
- Stewart, F. C. (1996). *Plant Physiology*. New York: Academic Press Incorporation.
- Suo, J., Liang, X., Pu, L., Zhang, Y., Xue, Y. (2003). Identification of GhMYB109 encoding a R2R3 MYB transcription factor that expressed specifically in fiber initials and elongating fibers of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1630(1), 25-34.
- Suyama, M., Torrents, D., Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res*, 34, 609–612.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197.
- Tang, H., Bowers, J.E., Wang, X., Ming, R., Alam, M., Paterson, A.H. (2008). Synteny and collinearity in plant genomes. *Science*, 320, 486–488.
- Tolte, D., Hinch, D.K., Macherel, D. (2010). A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 1926–33.
- Tunnacliffe, A. ve Wise, M.J. (2007). The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94, 791–812.

Türkyılmaz, B., (2004). Sodyum klorürün bazı arpa (*Hordeum vulgare L.*) kültür çeşitlerinde mineral beslenme ve protein metabolizması üzerine etkileri. Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*. Bornova-İzmir.

Türktaş M. (2011). *DNA Dizi Analizi. Floresan Temelli Yeni nesil genetik analiz uygulamaları*: DNA dizi analizi, moleküler markörler uygulamaları ve çoklu gen anlatım analizleri uygulamalı eğitimi kitapçığı. TÜBİTAK.

URL-1 <http://www.nkfu.com/hiyar-hakkinda-bilgi> adresinden 02.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-2 http://caliban.mpipz.mpg.de/thome/band4/tafel_089_small.jpg adresinden 05.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-3 http://www.tarimkutuphanesi.com/HIYAR_YETISTIRICILIGI adresinden 08.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-4 <http://www.harmanime.com/haber/231/bir-sebze-hiyar.html> adresinden 10.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-5 <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> adresinden 12.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-6 <http://www.bioline.com/us/one-step-vs-two-step-real-time-pcr.html> adresinden 15.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-7 <http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/mugeaydinsayitoglu.pdf> adresinden 15.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-8 <http://www.slideshare.net/MetheeSri/principle-of-pcr> adresinden 20.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-9 <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-greenqpcr.html> adresinden 20.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-10 <http://bitesizebio.com/24581/what-is-a-ct-value/> adresinden 23.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-11 http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-059Y.html adresinden 25.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-12 <http://drt23.blogspot.com.tr/2012/08/nobel-odullu-surpriz-ziyaretci.html> adresinden 30.10.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-13 <http://www.evrimagaci.org/makale/22> adresinden 02.11.2015 tarihinde alınmıştır.

URL-14 http://www.fisherbiotec.com.au/shop/product/gel_documentation_system_quantum_st5/48 adresinden 11.11.2015 tarihinde alınmıştır.

- URL-15 <http://www.techne.com/product.asp?dsl=925> adresinden 15.11.2015 tarihinde alınmıştır.
- URL-16 <http://www.medica-line.com/ProductDetails.aspx?c=14&p=72> adresinden 20.11.2015 tarihinde alınmıştır.
- Uygan, D., Havgören, F. ve Büyüktaş, D. (2006). Eskişehir Sulama Şebekesinde Drenaj Sularının Kirlenme Durumu ve Sulamada Kullanma Olanaklarının Belirlenmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1), 47-58.
- Ünver, T., Budak, H. (2009). Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta (ISI)*, 230 (4), 659-69.
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S. ve Çakiris, A. (2011). Yeni Nesil DNA Dizileme (New Generation DNA Sequencing). *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1(1), 11-18.
- Van Breusegem, F., Dat, J.F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol*, 141, 384-90.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. (1998). H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci.*, 3, 330-4.
- Van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17,1013-34.
- Volker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Voelker, A., Schmid, R., Mach H. and Hecker, M. (1994). Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 140, 741-752.
- Wan, H.J., Yuan, W., Bo, K.L., Shen, J., Pang, X, Chen, J.F. (2013). Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in Cucurbitaceae crops. *BMC Genomics*, 14(109),1471–2164.
- Wang, X.S., Zhu, H.B., Jin, G.L., Liu, H.L., Wu, W.R., Zhu, J. (2007). Genome scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* 172,414–420.
- Wang, L., Li, X., Chen, S., Liu, G. (2009). Enhanced drought tolerance in transgenic *Leymus chinensis* plants with constitutively expressed wheat TaLEA (3). *Biotechnol Lett*, 31(2), 313–319. doi: 10.1007/s10529-008-9864-5.

- Wang, J., Pan, C., Wang, Y., Ye, L., Wu, J., Chen, L., Zou T., Lu, G. (2015). Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. *BMC Genomics*, 16(1), 386. doi: 10.1186/s12864-015-1621-2.
- Warner, A.H., Miroshnychenko, O., Kozarova, A., Vacratsis, P.O., MacRae, T.H., Kim, J., Clegg, J.S. (2010). Evidence for multiple group 1 late embryogenesis abundant proteins in encysted embryos of *Artemia* and their organelles. *J Biochem* 148(5), 581–592. doi: 10.1093/jb/mvq091.
- Weaver, L.M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R.M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol*, 37,455-69.
- Winicov, I., (1998). New Molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants, *Annals of Botany*, 82, 703-710.
- Winter, P.C., Hickey, G.I., Fletcher, H.L. (1998). Instant Notes in Genetics, Bios Scientific Publishers Limited England; 274.
- Wise, M.J. (2002). The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics (Suppl 1)*, 18, 38–45.
- Wise, M.J. (2003). LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics*,4, 52.
- Wise, M.J. and Tunnacliffe, A., (2004). POPP the question: what do LEA proteins do?, *Trends in Plant Sci.*, 9,13–17.
- Wolkers, W.F., McCready, S., Brandt, W.F., Lindsey, G.G., Hoekstra, F.A. (2001). Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1544, 196–206.
- Wong. M. L. and Medrano J. F. (2005). Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1),75-85.
- Wright J., (2000). *Color Atlas of Genetics*. Türkiye: Nobel Tıp Kitapevi.
- Wu, G., Zhang, H., Sun, J., Liu, F., Ge, X., Chen, W.-H., Yu, J., Wang, W. (2011). Diverse LEA (late embryogenesis abundant) and LEAlike genes and their responses to hypersaline stress in post-diapause embryonic development of *Artemia franciscana*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 160(1), 32–39.

- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho T, H, D. and Wu, R.(1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110, 249-257.
- Yang, Z., Gu, S., Wang, X., Li, W., Tang, Z., Xu, C. (2008). Molecular evolution of the cpp2 like gene family in plants: insights from comparative genomics of Arabidopsis and rice. *J Mol Evol* 67, 266–277.
- Yaşar, F. (2003). Tuz Stresi Altındaki Patlıcan Genotiplerinde Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin in vitro ve in vivo Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Van.
- Yu, Y.J., Liang, Y., Lv, M.L., Wu, J., Lu, G., Cao, J.S. (2014). Genome-wide identification and characterization of polygalacturonase genes in *Cucumis sativus* and *Citrullus lanatus*. *Plant Physiol Bioch*, 74, 263–275. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.11.022.
- Zhang, Y. (2005). miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res* 33, 701–704.
- Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany*, 61(15),4157-68.
- Zhu, J.K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiology*, 124, 941-948.
- Zhu, J.K., (2001). Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 247– 273.

EKLER

- EK 1 HOAGLAND ÇÖZELTİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ
- EK 2 10X TAE TAMPONUNUN İÇERİĞİ
- EK 3 DNA MARKER İÇERİĞİ
- EK 4 SALATALIKTA (*Cucumis sativus*) TANIMLANAN *LEA* GENLERİ
- EK 5 *CSLEA* GENLERİNİN EKZON-İNTRON ORGANİZASYONU
- EK 6 *CSLEA* PROTEİNLERİNİN MOTİF ANALİZİ
- EK 7 *CSLEA* GENLERİ İLE KAVAK, MISIR VE ARABİDOPSİS *LEA* GENLERİNİN ORTOLOG GÖSTERİMİ
- EK 8 *CSLEA* GENLERİNİN SEGMENTAL DUPLİKASYONLARI İLE HOMOLOG VE HOMOLOG OLMAYAN DEĞİŞİM SONUÇLARI
- EK 9 *CSLEA* GENLERİNİN KAVAK, ARABİDOPSİS, ÇELTİK VE MISIR *LEA* GENLERİ İLE ORTOLOG İLİŞKİLERİ VE BİRBİRLERİNDEN AYRILMA ORANLARI
- EK 10 *CSLEA* GENLERİNİN miRNA HEDEFLERİ
- EK 11 *CSLEA* GENLERİNİN KÖK VE YAPRAK DOKULARINDAKİ ERİME EĞRİ GRAFİKLERİ

EK 1 Hoagland çözeltisinin kimyasal içeriği

Kimyasal içerik	mg/L
Amonyum fosfat	115,03
Borik asit	2,86
Kalsiyum nitrat	656,4
Bakır Sülfat, Pentahidrat	0,08
EDTA, Disodyum Salt	3,35
Demir Sülfat, Heptahidrat	2,50
Magnezyum Sülfat, Anhydrous	240,76
Manganez klorür, Tetrahidrat	1,81
Molibden trioksit	0,016
Potasyum nitrat	606,6
Çinko Sülfat, Heptahidrat	0,22

EK 2 10x TAE tamponunun içeriği

Bileşenler	Miktar
Tris base	48,5 gr
800ml distile su ile iyice çözünerek karıştırılır.	
Glasiyal Asedik asit 17.4M	11,4 ml
0.5M EDTA(pH 8)	20 ml
Toplam 1000 ml oluncaya kadar distile su ilave edilmiştir.	

EK 3 DNA Marker içeriği

Bileşenler	Miktar
DNA ladder (0,5-1 µg)	1 µl
6X DNA Loading Dye	1 µl
Deiyonize su	4 µl
Toplam	6 µl



EK 4 Salatalıkta (*Cucumis sativus*) tanımlanan LEA genleri

Gen Adları	Phytozome adı	Salatalık genomundaki fiziksel pozisyonu			Protein uzunluğu (aa)	pI	Moleküler ağırlığı (Da)	Kararsızlık indeksi	Kararsızlık durumu
		Kromozom	Başlangıç pozisyonu (bp)	Bitiş pozisyonu (bp)					
CsLEA-01	Cucsa.086110	1	6842192	6843022	228	9,61	25821,7	51,56	Kararsız
CsLEA-02	Cucsa.200350	1	9464033	9465096	197	9,76	22405	46,93	Kararsız
CsLEA-03	Cucsa.200330	1	9507136	9465096	212	9,82	23993,1	36	Kararlı
CsLEA-04	Cucsa.319600	1	10,520,042	10,520,800	214	9,02	23869,6	102,94	Kararsız
CsLEA-05	Cucsa.319610	1	10870559	10871589	213	8,99	23987,8	39,69	Kararlı
CsLEA-06	Cucsa.235580	1	14290469	14293270	215	8,93	23842,5	34,97	Kararlı
CsLEA-07	Cucsa.288980	1	21571423	21573026	259	5,05	26932,0	29,69	Kararlı
CsLEA-08	Cucsa.42720	1	23349277	23350207	233	9,99	25897,4	43,36	Kararsız
CsLEA-09	Cucsa.94230	2	9044869	9047695	316	4,77	35183,0	21,27	Kararlı
CsLEA-10	Cucsa.09360	2	12,194,592	12,196,235	73	9,65	8045,9	36,03	Kararlı
CsLEA-11	Cucsa.09370	2	12194592	12196235	162	8,11	17498,2	37,03	Kararlı
CsLEA-12	Cucsa.54480	2	14,653,845	14,654,756	240	10,78	27152,0	99,88	Kararsız
CsLEA-13	Cucsa.396030	2	15742898	15744018	319	10,04	35190,4	59,67	Kararsız
CsLEA-14	Cucsa.258720	3	7040686	7041666	152	4,64	16394,8	16,61	Kararlı
CsLEA-15	Cucsa.252130	3	11417298	11418718	320	5,49	34904,8	37,72	Kararlı
CsLEA-16	Cucsa.244220	3	14192810	14195409	300	9,32	32494,1	60,34	Kararsız
CsLEA-17	Cucsa.241690	3	26104440	26107114	195	9,77	22149,8	28,69	Kararlı
CsLEA-18	Cucsa.241700	3	26106539	26107114	185	9,97	21418,5	24,66	Kararlı
CsLEA-19	Cucsa.241720	3	26113612	26114271	219	9,73	24859,8	35,08	Kararlı

EK 4'ün devamı, Salatalıkta (*Cucumis sativus*) tanımlanan LEA genleri

CsLEA-20	Cucsa.241710	3	26117915	26118580	193	9,18	21646,2	33,22	Kararlı
CsLEA-21	Cucsa.241730	3	26117915	26118580	221	9,71	25008	36,88	Kararlı
CsLEA-22	Cucsa.241740	3	26117915	26118580	226	9,62	25736,9	42,72	Kararsız
CsLEA-23	Cucsa.241750	3	26124328	26124963	211	9,79	23984,1	36,78	Kararlı
CsLEA-24	Cucsa.241760	3	26131424	26132302	304	8,71	33527,8	49,59	Kararsız
CsLEA-25	Cucsa95190	3	26458847	26462723	332	6,78	37190,7	46,59	Kararsız
CsLEA-26	Cucsa.378720	3	29033622	29035470	600	5,97	65404,2	22,9	Kararlı
CsLEA-27	Cucsa.341180	3	29411696	29412475	259	10,2	28055,7	43,63	Kararsız
CsLEA-28	Cucsa.242730	3	30929209	30929957	99	6,84	10757,8	36,77	Kararlı
CsLEA-29	Cucsa.097040	4	477337	477972	69	9,25	7496,6	31,13	Kararlı
CsLEA-30	Cucsa.097030	4	478990	479428	114	6,29	12330,0	49,09	Kararsız
CsLEA-31	Cucsa.06380	4	3543549	3544599	274	6,65	30331,7	34,76	Kararlı
CsLEA-32	Cucsa.14930	4	4403225	4404363	200	7,81	21362,5	36,54	Kararlı
CsLEA-33	Cucsa.52900	4	10669980	10670769	259	9,65	28881,8	39,22	Kararlı
CsLEA-34	Cucsa.52940	4	10696387	10697198	247	10,02	28385,5	35,26	Kararlı
CsLEA-35	Cucsa.067320	4	12895264	12896168	91	6,14	9760,6	48,91	Kararsız
CsLEA-36	Cucsa.067330	4	12899773	12900221	113	6,16	12278,4	49,02	Kararsız
CsLEA-37	Cucsa.30830	4	13785683	13786720	215	9,43	23196,0	29,45	Kararlı
CsLEA-38	Cucsa.353880	4	17412774	17413473	174	9,13	17637,3	17,06	Kararlı
CsLEA-39	Cucsa.299410	4	21634615	21635394	259	10,11	28264,5	34,05	Kararlı
CsLEA-40	Cucsa.202510	5	3366607	3368125	212	9,98	23751,7	46,85	Kararsız
CsLEA-41	Cucsa.303600	5	4722482	4723262	218	8,51	24014,7	33,63	Kararlı
CsLEA-42	Cucsa.303590	5	4724772	4725447	204	9,45	22642,5	22,37	Kararlı
CsLEA-43	Cucsa.29620	5	6319725	6320523	67	5,69	7019,7	43,46	Kararsız

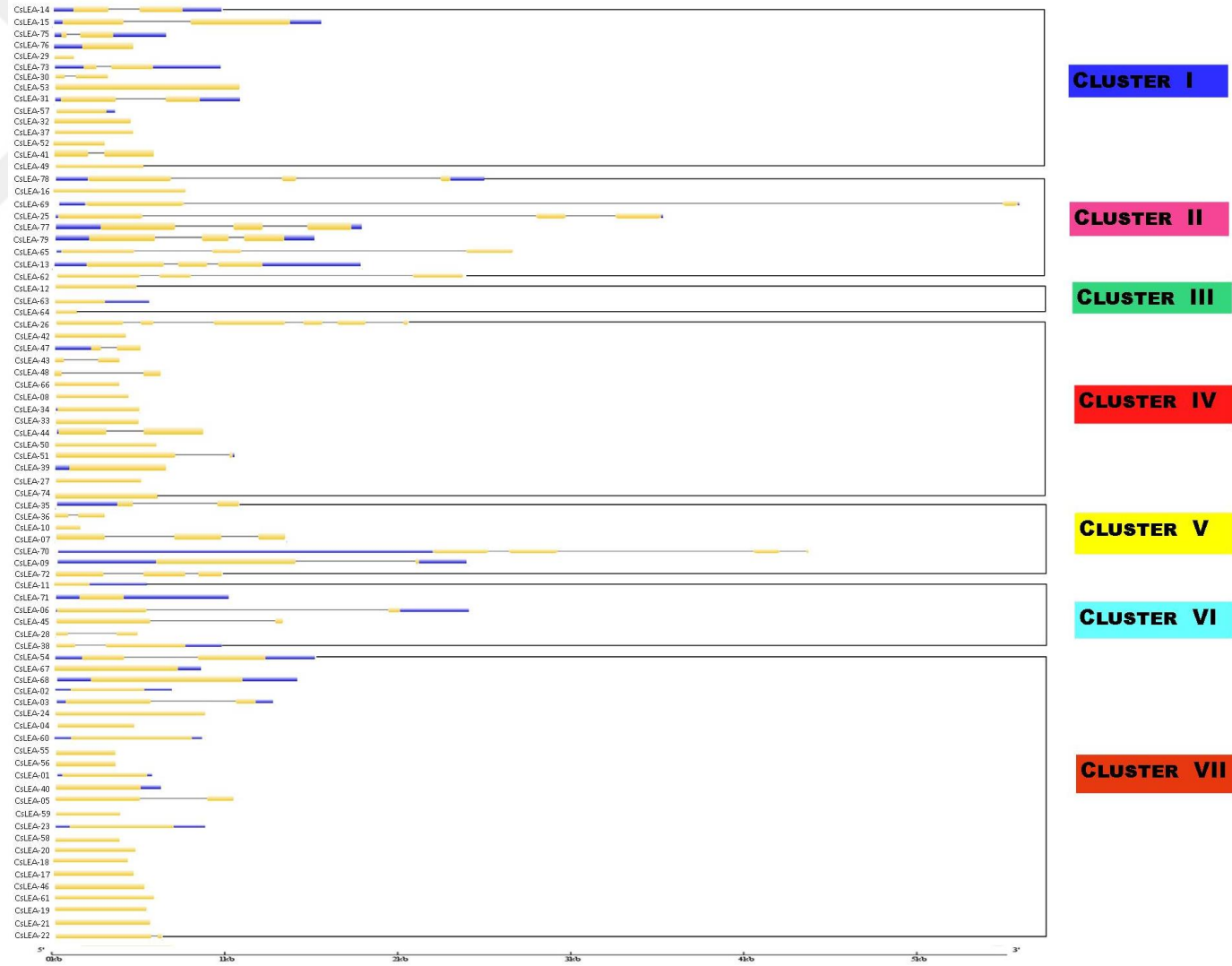
EK 4'ün devamı, Salatalıkta (*Cucumis sativus*) tanımlanan LEA genleri

CsLEA-44	Cucsa.65240	5	8175651	8176621	239	9,5	26644,7	53,48	Kararsız
CsLEA-45	Cucsa.303580	5	15883144	15883773	222	9,95	24524,7	45,12	Kararsız
CsLEA-46	Cucsa.241680	5	19089488	19090126	205	9,13	23558,3	28,57	Kararlı
CsLEA-47	Cucsa.238360	5	26880429	26881091	66	5,21	6848,5	37,65	Kararlı
CsLEA-48	Cucsa.238350	5	26882654	26883762	65	5,65	6895,6	52,82	Kararsız
CsLEA-49	Cucsa.35790	6	599129	599972	219	10,47	24701,4	23,67	Kararlı
CsLEA-50	Cucsa.258920	6	3149466	3150559	258	9,69	28642,5	64,09	Kararsız
CsLEA-51	Cucsa.364900	6	3367344	3368786	252	9,37	27872,7	53,71	Kararsız
CsLEA-52	Cucsa.007860	6	12927737	12928312	191	7,69	20617,3	24,66	Kararlı
CsLEA-53	Cucsa.230780	6	13391131	13392528	450	5,23	49377,1	38,24	Kararlı
CsLEA-54	Cucsa.077690	6	16107424	16109149	236	5,17	26625,3	60,93	Kararsız
CsLEA-55	Cucsa.260120	6	17234089	17234736	199	10,32	21915	49,58	Kararsız
CsLEA-56	Cucsa.85020	6	19366609	19367256	215	7,53	23837,6	51,26	Kararsız
CsLEA-57	Cucsa.85690	6	19900525	19901452	183	8,74	20103,1	29,5	Kararlı
CsLEA-58	Cucsa.083780	6	19994312	19995077	208	9,74	23269	34,78	Kararlı
CsLEA-59	Cucsa.85870	6	19994312	19995077	212	7,74	23609,4	33,06	Kararlı
CsLEA-60	Cucsa.85880	6	20000644	20001754	248	9,96	27687,5	50,86	Kararsız
CsLEA-61	Cucsa.083760	6	21807151	21808126	238	9,05	26376,5	44,72	Kararsız
CsLEA-62	Cucsa.02490	6	23484633	23487293	321	10,27	35228,4	55,37	Kararsız
CsLEA-63	Cucsa.02930	6	23,826,654	23,827,121	83	5,17	9192,8	38,92	Kararsız
CsLEA-64	Cucsa.272350	6	23,826,654	23,827,121	76	5,02	8266,3	81,97	Kararsız
CsLEA-65	Cucsa.099270	7	1102737	1105708	315	8,95	35493,7	64,67	Kararsız
CsLEA-66	Cucsa.47780	7	2895166	2896098	218	9,24	23983,8	32,77	Kararlı
CsLEA-67	Cucsa.286640	7	6650734	6651609	348	9,85	40054	61,59	Kararsız

EK 4'ün devamı, Salatalıkta (*Cucumis sativus*) tanımlanan LEA genleri

CsLEA-68	Cucsa.334220	7	6650734	6651609	291	10,24	32373.3	51.21	Kararsız
CsLEA-69	Cucsa.51390	7	7983689	7989331	217	9,48	23689.5	33,23	Kararlı
CsLEA-70	Cucsa.239450	7	8296448	8298912	264	4,53	27480.3	31,09	Kararlı
CsLEA-71	Cucsa.338040	7	13521314	13528014	101	6,43	11368.2	31,66	Kararlı
CsLEA-72	Cucsa.084360	7	14367607	14368756	259	4,67	26619.5	34,98	Kararlı
CsLEA-73	Cucsa.205500	7	15372005	15372905	114	9,79	12020.5	45,93	Kararsız
CsLEA-74	Cucsa.360550	7	16325939	16326730	263	9,76	28693.2	40,31	Kararsız
CsLEA-75	Cucsa.359830	7	16859125	16859364	93	9,43	10604,3	33,95	Kararlı
CsLEA-76	Cucsa.05230	7	17370258	17371142	126	7,96	13435.6	13,35	Kararlı
CsLEA-77	Cucsa.359180	7	17787523	17789510	311	9,76	34111.9	62,87	Kararsız
CsLEA-78	Cucsa.359890	7	18257282	18259905	231	9,02	26297.1	37,06	Kararlı
CsLEA-79	Cucsa.328650	Scaffold000254	1081	2436	228	9,63	25387,8	68,93	Kararsız

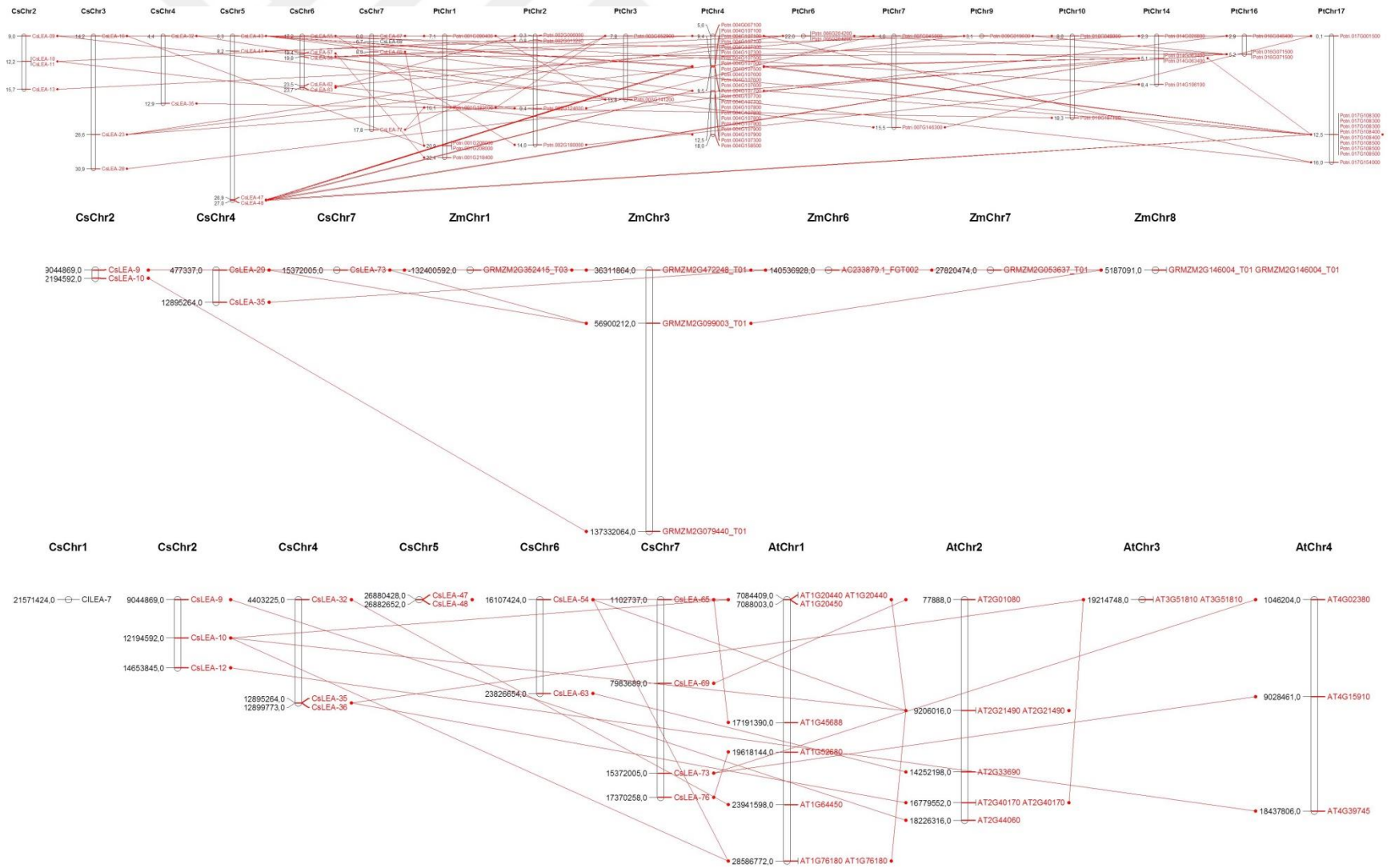
EK 5 CsLEA genlerinin ekzon-intron organizasyonu



EK 6 CsLEA proteinlerinin motif analizi

Motif No.	Bölge	E-değeri	Motiflerin amino asit kompozisyonu	Uzunluk (aa)
Motif 1	35	3.1e-141	RNPNKRIGIYYDSME	15
Motif 2	46	2.0e-185	LILWLVFRPHKPQFDVQDAQV	21
Motif 3	36	3.8e-145	VYYNQQLCTQWLPPFYQGHKNTTVWSP	28
Motif 4	16	1.9e-117	FDGQQAVPVAPDKAMEFNQEQNAGVFWIDVKFMGRWRWKVGTWRI	45
Motif 5	21	6.1e-053	HHRRRCCRCCCCFCLLWL	19
Motif 6	6	1.4e-044	MSYHAGEAKGQTQEKASNMDKASDAAQSAKEWAQEMGQQMMAKAQGAKD	50
Motif 7	6	2.5e-041	QEGSDFTGVATDLLTCNCTMRIIFHNPAFFGIHVSSTFI	40
Motif 8	42	1.3e-035	WHYWMHVNCDVVVD	14
Motif 9	7	7.3e-029	VRNPNMAIFNYSNSTMSIYYRGMVIGEAPTPAGRVPARGTQRMNVTLEI	49
Motif 10	8	2.1e-020	NDNQLHYNLALNMTI	15
Motif 11	6	3.0e-019	SPRRFVYYVQSPSRD	15
Motif 12	5	1.6e-015	PPHSHSHPSYGRHSRESSASRFSGSFK	27
Motif 13	3	8.0e-017	AAAIQAAEV RATGENNIIPGGIAATAQSAA TMNARVTQDEDKTKLGDIL	49
Motif 14	4	1.3e-012	KPWPECDVIEEEGLYDD	17
Motif 15	3	3.1e-014	MADKQPHLNGAFYGPAVPPP	20

EK 7 *CsLEA* genleri ile kavak, mısır ve Arabidopsis *LEA* genlerinin ortolog gösterimi



EK 8 CsLEA genlerinin segmental duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları

Genler	Genler	Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CsLEA-01	CsLEA-05	1	51,7843	0,8311	0,0160493	398,34077
CsLEA-03	CsLEA-02	1	13,6907	0,7665	0,0559869	105,31308
CsLEA-17	CsLEA-18	3	2,4458	0,5635	0,230395	18,813846
CsLEA-17	CsLEA-20	3	2,3045	0,4712	0,2044695	17,726923
CsLEA-17	CsLEA-19	3	2,0331	0,6294	0,3095765	15,639231
CsLEA-17	CsLEA-21	3	2,2236	0,4555	0,204848	17,104615
CsLEA-17	CsLEA-22	3	2,5762	0,4975	0,1931139	19,816923
CsLEA-18	CsLEA-20	3	2,8975	0,5969	0,2060052	22,288462
CsLEA-18	CsLEA-19	3	21,1697	0,6943	0,0327969	162,84385
CsLEA-18	CsLEA-21	3	3,9924	0,5707	0,1429466	30,710769
CsLEA-18	CsLEA-22	3	47,77	0,5624	0,0117731	367,46154
CsLEA-19	CsLEA-17	3	2,0331	0,6294	0,3095765	15,639231
CsLEA-19	CsLEA-18	3	21,1793	0,6943	0,032782	162,91769
CsLEA-19	CsLEA-20	3	2,7684	0,407	0,1470163	21,295385
CsLEA-19	CsLEA-21	3	1,5226	0,3604	0,2367004	11,712308
CsLEA-19	CsLEA-22	3	1,3947	0,3905	0,2799885	10,728462
CsLEA-20	CsLEA-17	3	2,3045	0,4712	0,2044695	17,726923
CsLEA-20	CsLEA-18	3	2,8975	0,5969	0,2060052	22,288462
CsLEA-20	CsLEA-19	3	2,7684	0,407	0,1470163	21,295385
CsLEA-20	CsLEA-21	3	1,1218	0,2068	0,1843466	8,6292308
CsLEA-21	CsLEA-17	3	2,2236	0,4555	0,204848	17,104615
CsLEA-21	CsLEA-18	3	3,9924	0,5707	0,1429466	30,710769
CsLEA-21	CsLEA-20	3	1,1218	0,2068	0,1843466	8,6292308
CsLEA-21	CsLEA-19	3	1,5226	0,3604	0,2367004	11,712308
CsLEA-21	CsLEA-22	3	0,5786	0,0935	0,161597	4,4507692
CsLEA-22	CsLEA-17	3	2,5762	0,4975	0,1931139	19,816923
CsLEA-22	CsLEA-18	3	47,7333	0,565	0,0118366	367,17923
CsLEA-22	CsLEA-20	3	1,3879	0,2442	0,1759493	10,676154
CsLEA-22	CsLEA-19	3	1,3947	0,3905	0,2799885	10,728462
CsLEA-22	CsLEA-21	3	0,5786	0,0935	0,161597	4,4507692
CsLEA-30	CsLEA-29	4	7,3431	0,3793	0,0516539	56,485385
CsLEA-34	CsLEA-33	4	4,3866	0,9042	0,2061278	33,743077
CsLEA-35	CsLEA-36	4	2,788	0,1287	0,0461621	21,446154

EK 8' in devamı, CsLEA genlerinin segmental duplikasyonları ile homolog ve homolog olmayan değişim sonuçları

CsLEA-39	CsLEA-33	4	50,2059	0,8526	0,0169821	386,19923
CsLEA-43	CsLEA-48	5	1,5479	0,1316	0,0850184	11,906923
	CsLEA-47	5	1,1162	0,1549	0,1387744	8,5861538
CsLEA-47	CsLEA-48	5	0,566	0,1062	0,1876325	4,3538462
CsLEA-48	CsLEA-43	5	1,5479	0,1316	0,0850184	11,906923
	CsLEA-47	5	0,566	0,1062	0,1876325	4,3538462
CsLEA-55	CsLEA-58	6	47,1659	0,849	0,0180003	362,81462
CsLEA-55	CsLEA-59	6	14,1611	0,7844	0,0553912	108,93154
CsLEA-55	CsLEA-56	6	1,2845	0,4788	0,372752	9,8807692
CsLEA-56	CsLEA-61	6	6,7233	1,0181	0,1514286	51,717692
CsLEA-56	CsLEA-59	6	48,2667	0,9931	0,0205753	371,28231
CsLEA-56	CsLEA-60	6	47,231	1,2192	0,0258136	363,31538
CsLEA-56	CsLEA-55	6	1,2845	0,4788	0,372752	9,8807692
CsLEA-58	CsLEA-59	6	38,1563	0,4351	0,0114031	293,51
CsLEA-59	CsLEA-58	6	38,1563	0,4351	0,0114031	293,51
CsLEA-65	CsLEA-77	7	51,3315	0,5501	0,0107166	394,85769
CsLEA-67	CsLEA-68	7	5,7118	0,6819	0,1193844	43,936923
CsLEA-69	CsLEA-78	7	2,6146	0,9907	0,3789107	20,112308
CsLEA-70	CsLEA-72	7	42,3578	0,3424	0,0080835	325,82923
CsLEA-72	CsLEA-70	7	42,3578	0,3424	0,0080835	325,82923
CsLEA-74	CsLEA-73	7	3,556	1,5519	0,4364173	27,353846
CsLEA-75	CsLEA-76	7	50,5004	1,7058	0,033778	388,46462
CsLEA-77	CsLEA-65	7	51,3315	0,5501	0,0107166	394,85769
Ortalama			14,57	0,54	0,14	112,13

EK 9 CsLEA genlerinin kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır LEA genleri ile ortolog ilişkileri ve birbirlerinden ayrılma oranları

Salatalık-Kavak							
Salatalık Genler	Salatalık Kromozom	Kavak Genler	Kavak Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CsLEA-09	2	Potri.007G146300.1	7	3,02	0,11	0,03	23,2
CsLEA-09	2	Potri.017G001500.1	17	35,2	0,41	0,12	271,1
CsLEA-10	2	Potri.002G013200.1	2	21,9	0,60	0,03	168,9
CsLEA-11	2	Potri.004G158500.1	4	47,9	0,62	0,01	368,6
CsLEA-13	2	Potri.014G026800.1	14	2,43	0,15	0,06	18,7
CsLEA-16	3	Potri.T165600.1	scaffold_862	8,34	0,24	0,03	64,2
CsLEA-16	3	Potri.001G208000.1	1	3,09	0,25	0,08	23,8
CsLEA-23	3	Potri.006G204200.1	6	56,5	0,31	0,01	435,2
CsLEA-23	3	Potri.016G071500.1	16	57,0	0,33	0,01	438,9
CsLEA-28	3	Potri.T111300.1	scaffold_170	6,26	0,31	0,05	48,1
CsLEA-28	3	Potri.016G046400.1	16	5,63	0,28	0,05	43,3
CsLEA-32	4	Potri.003G141200.1	3	22,8	0,12	0,01	175,8
CsLEA-32	4	Potri.001G090400.1	1	3,24	0,15	0,04	25,0
CsLEA-35	4	Potri.010G187100.1	10	2,78	0,12	0,04	21,3
CsLEA-43	5	Potri.004G107500.1	4	5,77	0,15	0,03	44,4
CsLEA-43	5	Potri.017G108300.1	17	1,76	0,15	0,08	13,5
CsLEA-43	5	Potri.004G107300.1	4	6,32	0,16	0,02	48,6
CsLEA-43	5	Potri.017G108400.1	17	1,90	0,16	0,08	14,6
CsLEA-43	5	Potri.004G107700.1	4	6,24	0,1	0,03	48,0
CsLEA-43	5	Potri.004G107100.1	4	6,24	0,16	0,03	48,0
CsLEA-43	5	Potri.004G107900.1	4	6,24	0,16	0,03	48,0
CsLEA-43	5	Potri.004G107800.1	4	6,24	0,16	0,03	48,0
CsLEA-43	5	Potri.004G107600.1	4	2,28	0,47	0,21	17,5
CsLEA-43	5	Potri.017G108500.1	17	1,23	0,21	0,17	9,5
CsLEA-43	5	Potri.014G063400.1	14	40,7	0,89	0,02	313,3
CsLEA-44	5	Potri.004G067100.1	4	1,26	0,28	0,22	9,7
CsLEA-44	5	Potri.017G154000.1	17	1,65	0,27	0,16	12,7
CsLEA-47	5	Potri.017G108300.1	17	2,46	0,17	0,07	18,9
CsLEA-47	5	Potri.004G107500.1	4	7,37	0,20	0,03	56,7
CsLEA-47	5	Potri.004G107700.1	4	6,47	0,20	0,03	49,8
CsLEA-47	5	Potri.004G107100.1	4	6,47	0,20	0,03	49,8
CsLEA-47	5	Potri.004G107900.1	4	6,47	0,2	0,03	49,8
CsLEA-47	5	Potri.004G107800.1	4	6,47	0,20	0,03	49,8
CsLEA-47	5	Potri.004G107300.1	4	8,12	0,20	0,02	62,5
CsLEA-47	5	Potri.017G108400.1	17	2,36	0,18	0,08	18,2

EK 9' un devamı, CsLEA genlerinin kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır LEA genleri ile ortolog ilişkileri ve birbirlerinden ayrılma oranları

CsLEA-47	5	Potri.004G107600.1	4	9,06	0,46	0,05	69,7
CsLEA-47	5	Potri.017G108500.1	17	2,28	0,21	0,09	17,5
CsLEA-48	5	Potri.004G107500.1	4	2,30	0,17	0,08	17,7
CsLEA-48	5	Potri.004G107600.1	4	1,78	0,45	0,25	13,7
CsLEA-48	5	Potri.004G107300.1	4	2,45	0,18	0,08	18,9
CsLEA-48	5	Potri.004G107700.1	4	1,90	0,18	0,10	14,6
CsLEA-48	5	Potri.004G107100.1	4	1,90	0,18	0,10	14,6
CsLEA-48	5	Potri.004G107900.1	4	1,90	0,18	0,10	14,6
CsLEA-48	5	Potri.004G107800.1	4	1,90	0,18	0,10	14,6
CsLEA-48	5	Potri.017G108400.1	17	1,24	0,18	0,15	9,6
CsLEA-48	5	Potri.017G108300.1	17	1,23	0,17	0,14	9,4
CsLEA-48	5	Potri.017G108500.1	17	1,05	0,23	0,22	8,1
CsLEA-48	5	Potri.014G063400.1	14	3,23	0,75	0,23	24,9
CsLEA-55	6	Potri.T181400.1	scaffold_2703	2,17	0,24	0,11	16,7
CsLEA-55	6	Potri.002G180000.1	2	1,97	0,26	0,13	15,1
CsLEA-55	6	Potri.014G106100.1	14	1,56	0,27	0,18	12,0
CsLEA-57	6	Potri.001G218400.1	1	15,8	0,18	0,01	122,2
CsLEA-58	6	Potri.006G204200.1	6	50,5	0,25	0,00	389,1
CsLEA-58	6	Potri.016G071500.1	16	58,2	0,23	0,00	448,2
CsLEA-58	6	Potri.009G019600.1	9	53,4	0,38	0,01	411,4
CsLEA-62	6	Potri.007G045000.1	7	3,44	0,18	0,05	26,4
CsLEA-62	6	Potri.002G124600.1	2	5,99	0,23	0,04	46,1
CsLEA-63	6	Potri.002G006000.1	2	5,56	0,37	0,07	42,8
CsLEA-67	7	Potri.010G049000.1	10	3,33	0,48	0,14	25,6
CsLEA-68	7	Potri.011G165500.1	11	1,50	0,28	0,18	11,6
CsLEA-69	7	Potri.001G208000.1	1	1,45	0,16	0,11	11,1
CsLEA-69	7	Potri.T165600.1	scaffold_862	1,79	0,14	0,08	13,8
CsLEA-77	7	Potri.001G183600.1	1	1,39	0,14	0,10	10,7
CsLEA-77	7	Potri.003G052900.1	3	1,31	0,15	0,12	10,1
Ortalama				10,2	0,26	0,08	78,4

EK 9' un devamı, CsLEA genlerinin kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır LEA genleri ile ortolog ilişkileri ve birbirlerinden ayrılma oranları

Salatalık-Arabidopsis							
SalatalıkGenler	Salatalık Kromozom	Arabidopsis Genler	Kavak Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CsLEA-07	1	AT5G27980.1	5	13,6754	0,3414	0,025	105,2
CsLEA-09	2	AT2G44060.1	2	7,1906	0,1386	0,0193	55,3
CsLEA-10	2	AT2G21490.1	2	65,3516	0,2312	0,0035	502,7
		AT1G20440.1	1	35,8204	0,5626	0,0157	275,5
		AT1G76180.1	1	35,2649	0,6589	0,0187	271,3
		AT5G66400.1	5	24,2137	0,4421	0,0183	186,3
		AT1G20450.1	1	70,3166	0,8275	0,0118	540,9
CsLEA-12	2	AT4G39745.1	4	2,7383	1,3029	0,4758	21,1
CsLEA-32	4	AT1G64450.1	1	11,075	0,1951	0,0176	85,2
CsLEA-35	4	AT3G51810.1	3	4,6461	0,1217	0,0262	35,7
		AT2G40170.1	2	5,4587	0,1396	0,0256	42,0
CsLEA-36	4	AT3G51810.1	3	25,7485	0,0706	0,0027	198,1
	4	AT2G40170.1	2	7,3039	0,1513	0,0207	56,2
CsLEA-47	5	AT5G53820.1	5	1,9423	0,265	0,1364	14,9
	5	AT5G38760.1	5	19,8902	0,188	0,0095	153,0
CsLEA-48	5	AT5G53820.1	5	1,4012	0,2715	0,1938	10,8
	5	AT5G38760.1	5	25,1245	0,1862	0,0074	193,3
CsLEA-54	6	AT2G21490.1	2	47,9046	1,2961	0,0271	368,5
	6	AT1G20440.1	1	3,2217	0,6086	0,1889	24,8
	6	AT1G76180.1	1	19,4038	0,378	0,0195	149,3
CsLEA-63	6	AT2G33690.1	2	54,0922	0,2268	0,0042	416,1
CsLEA-65	7	AT1G45688.1	1	52,5857	0,4779	0,0091	404,5
CsLEA-69	7	AT2G01080.1	2	4,3352	0,1506	0,0347	33,3
CsLEA-73	7	AT4G02380.1	4	1,6624	0,3247	0,1953	12,8
	7	AT4G15910.1	4	12,7526	0,7424	0,0582	98,1
CsLEA-76	7	AT1G52680.1	1	42,9291	1,3234	0,0308	330,2
Ortalama				22,92	0,46	0,06	176,3

EK 9' un devamı, *CsLEA* genlerinin kavak, Arabidopsis, çeltik ve mısır *LEA* genleri ile ortolog ilişkileri ve birbirlerinden ayrılma oranları

Salatalık-Çeltik							
Salatalık Genler	Salatalık Kromozom	Çeltik Genler	Çeltik Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CsLEA-09	2	LOC_Os03g62620.2	3	24,299	0,16	0,0068	186,9
CsLEA-36	4	LOC_Os05g28210.1	5	7,225	0,13	0,0184	55,57
CsLEA-72	7	LOC_Os03g53610.1	3	48,223	0,35	0,0074	370,9
Ortalama				26,58	0,21	0,01	204,5

Salatalık-Mısır							
Salatalık Genler	Salatalık Kromozom	Mısır Genler	Mısır Kromozom	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
CsLEA-09	2	GRMZM2G352415_T03	1	60,58	0,18	0,003	466,0
	2	GRMZM2G053637_T01	7	7,321	0,22	0,030	56,31
CsLEA-10	2	GRMZM2G079440_T01	6	82,81	0,37	0,004	637,0
CsLEA-29	4	GRMZM2G099003_T01	3	6,195	0,62	0,101	47,65
	4	GRMZM2G472248_T01	3	33,92	0,642	0,019	260,9
	4	GRMZM2G146004_T01	8	49,45	0,705	0,014	380,4
CsLEA-35	4	AC233879.1_FGT002	6	5,054	0,156	0,031	38,88
CsLEA-73	7	GRMZM2G146004_T01	8	10,43	0,716	0,068	80,23
Ortalama				31,97	0,46	0,03	245,9

EK 10 CsLEA genlerinin miRNA hedefleri

miRNA ismi	Hedef gen ismi	Beklenendeğer	UPE	miRNA parçası	Hedef gen parçası
<i>Arabidopsis lyrata</i>					
aly-miR834	CsLEA-34	3.0	13.467	ACCACAGCUUC-UGCUACGAAC	GAUCAUAGCAUGAAGCUGUGGU
aly-miR838	CsLEA-54	2,5	14.907	UUUUCUUCUUCUUCUUGCACA	UGAACAAAGAAGAAGAAGAGAA
<i>Aquilegia caerulea</i>					
aqc-miR477d	CsLEA-62	3.0	16.814	CUCUUCUCAAAGGCUUCUA	UCGACGCCAUUGAAGAAGAG
aqc-miR477f	CsLEA-53	3.0	11.651	CUCUCCUCAAAGGCUUCUA	AAGAAACUUUGAAGGAGGG
<i>Arabidopsis thaliana</i>					
ath-miR414	CsLEA-65	3.0	18.963	UCAUCUUCAUCAUCAUCGUC	GAUGGUGAUGAUGAGGAAGA
ath-miR5021	CsLEA-16	2.0	16.951	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	CUUUUUUCUUCUUCUUCUA
ath-miR5649a	CsLEA-49	3.0	15.069	AUUGAAUAUGUUGGUUACUA	UCGUGAUCAAUAUAUUCAGU
ath-miR5649b	CsLEA-49	3.0	15.069	AUUGAAUAUGUUGGUUACUA	UCGUGAUCAAUAUAUUCAGU
ath-miR5658	CsLEA-37	2.0	46023	AUGAUGAUGAUGAUGAUGAAA	UCUCAUCAUCAUAUCAUCAU
ath-miR5658	CsLEA-03	3.0	19.59	AUGAUGAUGAUGAUGAUGAA	ACCAUCAUCAUCAUCAUA
ath-miR5658	CsLEA-18	3.0	4.564	AUGAUGAUGAUGAUGAUGAA	UUCACCAUUGUCAUUAUCGU
ath-miR780.2	CsLEA-34	3.0	19511	UUCUUCGUGAAUAUCUGGCAU	AUGCAAGAUUUGGUGAAGAA
ath-miR854a	CsLEA-12	1,5	6.144	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCUCCUCCCUAUCUUCGUC
ath-miR854a	CsLEA-23	2.0	11.496	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC
ath-miR854a	CsLEA-37	3.0	5.503	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCCUUCUCAUCAUC
ath-miR854b	CsLEA-12	1,5	6.144	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCUCCUCCCUAUCUUCGUC
ath-miR854b	CsLEA-23	2.0	11.496	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC
ath-miR854b	CsLEA-37	3.0	5.503	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCCUUCUCAUCAUC
ath-miR854c	CsLEA-12	1,5	6.144	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCUCCUCCCUAUCUUCGUC
ath-miR854c	CsLEA-23	2.0	11.496	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC

EK 10' un devamı, CsLEA genlerinin miRNA hedefleri

ath-miR854c	CsLEA-37	3.0	5.503	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCCUUCUCAUCAUC
ath-miR854d	CsLEA-12	1,5	6.144	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCUUCCUCCCUAUCUUCGUC
ath-miR854d	CsLEA-23	2.0	11.496	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC
ath-miR854d	CsLEA-37	3.0	5.503	GAUGAGGAUAGGGAGGAGGA	UCCUCCUCCUUCUCAUCAUC
ath-miR869.2	CsLEA-52	3.0	19.636	UCUGGUGUUGAGAUAGUUGA	UCAACUAUGCCAAUACCGGA
ath-miRf10440-akr	CsLEA-77	2,5	15.721	CUUCUCCAACAUGGAGAUUC	CAAUUUUUAUGUUGGAGAAG
ath-miRf10797-akr	CsLEA-67	3.0	18.581	CUUUUAGGUCGAGCUUCAUU	GAUUAAGCUUGAGCUAAAAG
ath-miRf10807-akr	CsLEA-65	3.0	20.686	UGUCUUCAUCGUCAUCACAA	UGGUGAUGAUGAGGAAGACG
ath-miRf10807-akr	CsLEA-77	3.0	15.774	UGUCUUCAUCGUCAUCACAA	UUAUGAUGACCUUGAAGACA
<i>Brachypodium distachyon</i>					
bdi-miR5180a	CsLEA-22	3.0	16.105	UAAGUGUCUCAGUUUUGAACU	AGUUCAACGGUGAGACACUUG
bdi-miR5180b	CsLEA-22	3.0	16.105	UAAGUGUCUCAGUUUUGAACU	AGUUCAACGGUGAGACACUUG
bdi-miR396e-3p	CsLEA-32	3.0	15.847	GGUCAAGAAAGCUGUGGGAA	UUGCCACAGUCUUCUUGAUC
bdi-miR164c-3p	CsLEA-71	3.0	12.522	CAUGUGCGCUCCUUCUCCAG	AUGGAGAAGGGGCGCACAAG
bdi-miR7745-3p	CsLEA-72	3.0	21.763	UUGUUGUUAACUUAAGUCUUG	CAAGGCUUAACCAACAACAG
<i>Cucumis melo</i>					
cme-miR858	CsLEA-26	3.0	21.511	UCUCGUUGUCUGUUCGACCU	GGGUCGAAUUGACGACGAGG
cme-miR854	CsLEA-23	1.0	11.496	GAUGAGGAUAGUGAGGAGGA	UCCUCCUCACCAUCCUCAUC
cme-miR854	CsLEA-12	2,5	6.144	GAUGAGGAUAGUGAGGAGGA	UCUUCCUCCCUAUCUUCGUC
cme-miR854	CsLEA-58	3.0	11.899	GAUGAGGAUAGUGAGGAGGA	UCCUCCUCACAAUCCUCCU
<i>Gossypium hirsutum</i>					
ghr-miR414b	CsLEA-65	2.0	18.963	UUUUCUUCAUCAUCAUCGUC	GAUGGUGAUGAUGAGGAAGA
ghr-miR414b	CsLEA-44	3.0	19.493	UUUUCUUCAUCAUCAUCGUCAU	GUGGCGGUGAAGAUGGGGAAA
ghr-miR414b	CsLEA-09	3.0	14.797	UUUUCUUCAUCAUCAUCGUCAU	AAGACGAUGAUGACGAGGUAAA
ghr-miR7491	CsLEA-49	3.0	18.68	UGGGAUCUUCGAGAGGAUUG	GAAGCUUCUCGAGGAUCCCA

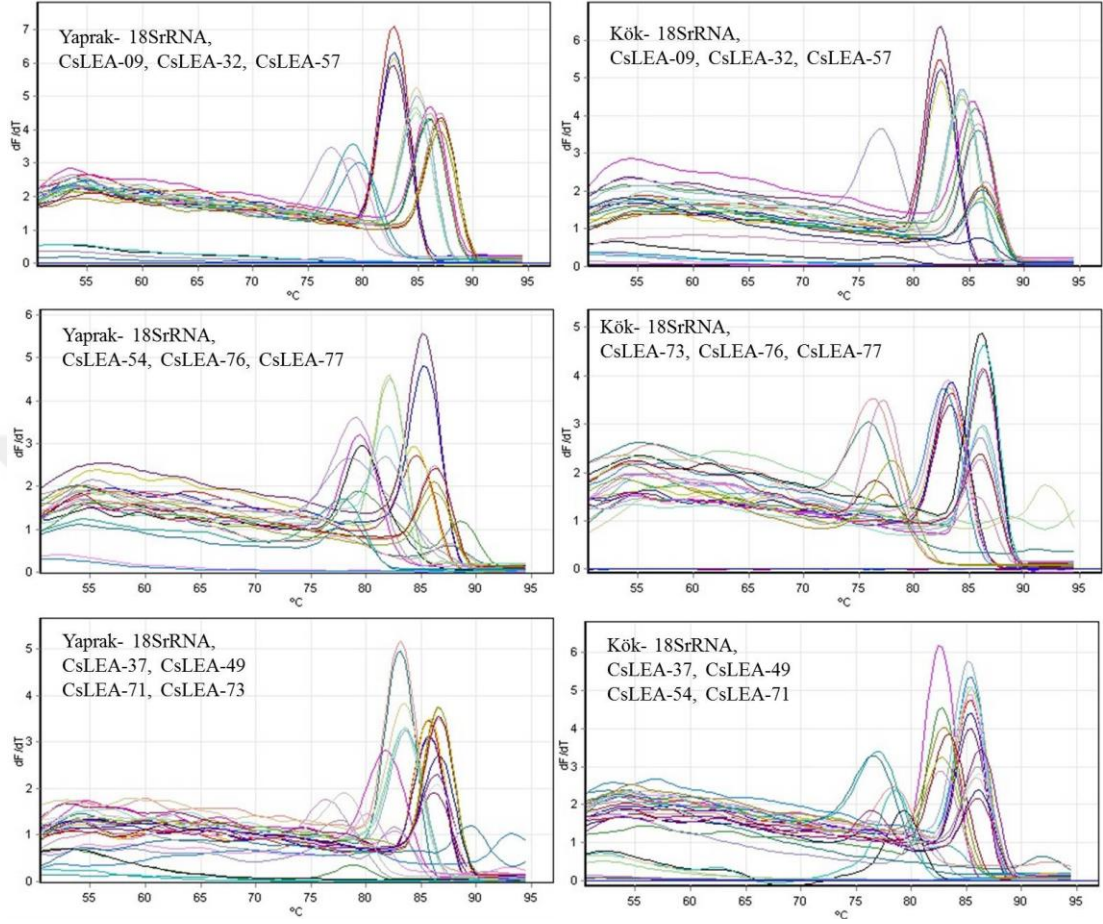
EK 10' un devamı, CsLEA genlerinin miRNA hedefleri

<i>Glycine max</i>					
gma-miR4993	CsLEA-04	3.0	17.023	GAGCGGCGGCGGUGGAGGAU	CUCUGCCGCCGCCGCCGCUC
<i>Heliconius melpomene</i>					
hme-miR-13a	CsLEA-18	3.0	18.407	UAUCACAGCCACUUUGAUGU	GCAUCGAAGUGGCUGUGUUG
hme-miR-71	CsLEA-22	3.0	15.53	UCUCACUACCUUGUCUUUCA	UGAAAGUCGGGGUGGUGAGG
<i>Lotus japonicus</i>					
lja-miR7531	CsLEA-33	3.0	42270	CGUGUUUUCUUUCAUUCCCC	UGGGAGUGACAGAAAACGCG
lja-miR7538	CsLEA-57	3.0	22.008	UCAACGGAGAGCUUGCUGUC	GACAGCCAUCUCACCGUUGA
<i>Medicago truncatula</i>					
mtr-miR2626	CsLEA-44	3.0	11.946	AACGUCGGGAUUUAGGGUGU	AAGCCCAAGAUCCCGACGUU
mtr-miR2629a	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2629b	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2629c	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2629d	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2629e	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2629f	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2629g	CsLEA-06	3.0	21.798	AGUUUCCUCGGUAGUUAAC	GUUGGCUACCGGGGAAGACG
mtr-miR2673a	CsLEA-25	2,5	14.191	CCUCUCCUCUCCUCUCCAC	GAGGAGGAAGAGGAGGAAGGGG
mtr-miR2673b	CsLEA-25	2,5	14.191	CCUCUCCUCUCCUCUCCAC	GAGGAGGAAGAGGAGGAAGGGG
mtr-miR5243	CsLEA-14	2,5	21.053	UGGGCAGAGAAAUCGUGAGG	CUUCACGAUCCUCUGUCUA
<i>Oryza sativa</i>					
osa-miR1858a	CsLEA-34	3.0	5.545	GAGAGGAGGACGGAGUGGGG	UCCUACUCC-UCCUCCUCUC
osa-miR1858b	CsLEA-34	3.0	5.545	GAGAGGAGGACGGAGUGGGG	UCCUACUCC-UCCUCCUCUC
osa-miR2928	CsLEA-06	3.0	9.946	AAGAAGACGACAUUUUGUUG	CAACAAAACGUCGUCGUUUU
osa-miR414	CsLEA-65	2,5	18.963	UCAUCCUCAUCAUCAUCGUC	GAUGGUGAUGAUGAGGAAGA

EK 10' un devamı, CsLEA genlerinin miRNA hedefleri

osa-miRf10063-akr	CsLEA-51	3.0	13.906	UUGCCGCUGCUACCGCCUUCG	UGAAGGCGGAGGCGGGCGGUGA
osa-miRf10063-akr	CsLEA-15	3.0	8.883	UUGCCGCUGCUACCGCCUUC	GGAGGUGGUGGGAGCGGCGA
osa-miRf10458-akr	CsLEA-09	3.0	14.814	UCGUCGUCAUCGCCAUUGCCG	UGGCGAAGACGAUGAUGACGA
osa-miRf10576-akr	CsLEA-53	3.0	17.763	CUUGUCCUGCGGGAGCUGCU	UGCAGUUCCGCAGGACAAA
osa-miR166j-5p	CsLEA-55	3.0	14.321	GAAUGACGUCCGGUCUGAAG	CUAAAGACUGGACGUUAUUC
<i>Populus trichocarpa</i>					
ptc-miR6422	CsLEA-03	3.0	11.533	UGUGAUAAUGAAGGCUAUGGU	ACCAUAGCUUUUACUGUUACA
ptc-miRf10822-akr	CsLEA-22	3.0	10.948	CGUCGGUGAUGUCGCCGGUG	CACCUUCGACGUCACUGACG
ptc-miRf11383-akr	CsLEA-22	3.0	19.978	AGAUGGGAAUUCAGGUUGAC	GUCGACCUGAGGUUUCGUCU
ptc-miRf11534-akr	CsLEA-79	2.0	22.144	GCACCAACAUUAUUGGAAUG	CAUUCCUAUGAUGUUGGUGU
ptc-miRf11872-akr	CsLEA-50	2.0	19.742	CACAUUCCGGAAUUCACUUU	GAAGUGAGUUGCGGAAGUGUG
ptc-miRf11948-akr	CsLEA-23	3.0	12.552	UGAUGUUGCAUUCUGAAUUGC	GUGGUUCAGAAAUGCGAUGUUA
ptc-miRf12315-akr	CsLEA-79	2.0	22.144	GCACCAACAUUAUUGGAAUG	CAUUCCUAUGAUGUUGGUGU
<i>Sorghum bicolor</i>					
sbi-miR5568f-3p	CsLEA-25	2,5	15.733	GUCUUAUAAUUUGGAAUGGAG	UUUCAUUCAAUUAUAGGGU
<i>Solanum tuberosum</i>					
stu-miR7984c-3p	CsLEA-44	3.0	21.288	CCUUCAUAAAGUUUGGUAUC	GAGAACAAGCUUUGUGAAGG
stu-miR8035	CsLEA-27	3.0	16.724	UCCAUCUCAAUAUCACUUUC	GAAGGUGAAACUGAAGAUGGG
stu-miR7122-3p	CsLEA-49	3.0	16.217	ACAGCGUUUCUCUGUAU AAC	UUUAUAGGGAGAAACGUUGU
<i>Vitis vinifera</i>					
vvi-miR3627	CsLEA-21	3.0	16.987	UUGUCGCAGGAGAGACGGCA	UGCCGUCCCUCCUCCGGCAA
<i>Zea mays</i>					
zma-miR414	CsLEA-65	3.0	18.963	UCAUCCUCAUCAUCGUCGUC	GAUGGUGAUGAUGAGGAAGA
zma-miR396f-3p	CsLEA-32	3.0	15.847	GGUCAAGAAAGCUGUGGGAA	UUGCCACAGUCUUCUUGAUC

EK 11 CsLEA genlerinin kök ve yaprak dokularındaki erime eğri grafikleri



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pınar BALOĞLU
Doğum Yeri ve Yılı: Ankara-1981
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : pbaloglu81@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Kaya Beyazıtöğlü Lisesi, Ankara
Lisans : Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Kastamonu Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik

Mesleki Deneyim

İş Yeri : İntergen Genetik Tanı Merkezi, Ankara, (2003-2004)
İş Yeri : Düzen Laboratuvarları, Ankara, (2004-2005)
İş Yeri : Hacettepe Üniversitesi, Biyokimya Laboratuvarları, Ankara, (2005-2013)
İş Yeri : Kastamonu Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, (2013-Halen)

Yayınları:

Baloglu, M.C., Baloglu, P., Yer, E.N., Celik Altunoglu, Y. (2015). Identification of LEA genes in cucumber. *Society for Experimental Biology (SEB)*, Prague, Czech Republic.

Celik Altunoglu, Y., Baloglu, P., Yer, E.N., Pekol, S., Baloglu, M.C. (2016). Identification and expression analysis of LEA gene family members in cucumber genome. *Plant Growth Regulation*. doi: 10.1007/s10725-016-0160-4.

Celik Altunoglu, Y., Guney, K., Baloglu, P., Baloglu, M.C. (2015). Genetic variation in natural populations of *Abies taxa* in Turkey, *Society for Experimental Biology (SEB)* Prague, Czech Republic.

Celik Altunoglu, Y., Kara, S., Yer, E.N., Baloglu, P., Baloglu, M.C. (2015). Kavunda (*Cucumis melo* L.) LEA Protein karakterizasyonu, 18. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye.

Güney, K., Celik Altunoglu, Y., Baloglu, P., Baloglu, M.C. (2015). Türkiye’de yayılış gösteren bazı karaçam varyetelerinin genetik çeşitliliği, 18. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye.

Pekol, S., Yer, E.N., Kara, S., Baloglu, P., Celik Altunoglu, Y., Baloglu, M.C. (2015). Identification and phylogeny analysis of LEA genes in watermelon, *Society for Experimental Biology (SEB)*, Prague, Czech Republic.

Ulu, F., Baloglu, P., Celik Altunoglu, Y., Baloglu, M.C. (2015). Modern ve Atasal Buğdaylarda Myb ve Mbf1 Tipi Transkripsiyon Faktör Genlerinde Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi, 18. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye.