



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YABANI ARPA'DA (*Hordeum spontaneum*) DEHİDRİN3  
GENİNİN ALLELİK VARYASYONUNUN İNCELENMESİ**

**Süleyman ÇAPUTLU**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**Danışman**

**Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL**

**Haziran, 2014**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 06/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

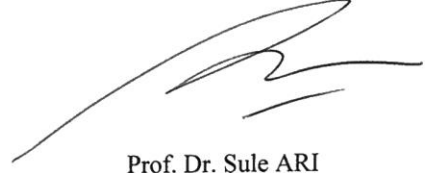
**Tez Jürisi:**



Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



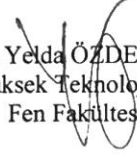
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bedia PALABIYIK  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ  
Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü  
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 30853 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, beni her zaman destekleyip yardımcı olan değerli hocam **Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL**'e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım için her türlü imkanı sağlayan, yardım ve destekleri ile katkıda bulunan değerli bölüm başkanımız **Prof. Dr. Nazlı ARDA**'ya, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, çalışmalarım sırasında yardımlarını hep hissettiğim laboratuvarımızda çalışan tüm araştırmacı arkadaşlarıma, ayrıca bana her zaman destek olan **Burcu ÖZ** ve çalışma arkadaşım **Nazaret POYRAZ**'a,

Tez çalışmam boyunca deneysel olarak tecrübelerini benimle paylaşan, önerilerde bulunan değerli hocam **Araş. Gör. Cüneyt UÇARLI**'ya,

Tez çalışmamda materyal olarak kullandığım bitki tohumlarını sağlayan Dicle Üniversitesi'nden **Doç. Dr. Aydın ALP**'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemi sağlayan ve hayatımın her aşamasında bana destek olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili **AİLEM**'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Haziran, 2014

Süleyman ÇAPUTLU

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY .....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Hordeum spontaneum</i> .....	3
2.2. GEÇ EMBRİYOGENEZ PROTEİNLERİ (LEA; “LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT”) .....	6
2.2.1. LEA Proteinlerinin Görevleri.....	7
2.2.2. LEA Proteinlerinin Sınıflandırılması .....	7
2.2.2.1. <i>LEA Proteinlerinin Korunmuş Motiflerine Göre Sınıflandırması</i> .....	8
2.2.2.2. <i>LEA Proteinlerinin POPP Programına Göre Sınıflandırılması</i> .....	13
2.2.3 Dehidrinler .....	14
2.2.3.1. <i>Arpada Dhn3 Varyasyonu</i> .....	16
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>18</b>
3.1. BİTKİ MATERYALİ .....	18
3.1.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi .....	20
3.2. GENOMİK DNA İZOLASYONU .....	20
3.3. <i>DEHİDRİN3 (DHN3) GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE         ÇOĞALTILMASI</i> .....	21
3.3.1. Primer Tasarımı .....	21
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	22
3.4. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ .....	23
3.5. <i>DHN3 GENİNİN KLONLANMASI</i> .....	24
3.5.1. PZR Ürünlerinin Klonlanması .....	24

3.5.2. Transformasyon .....	25
3.5.3. Transformant Hücrelerin Analizi .....	25
3.5.4. Plazmit İzolasyonu .....	27
3.6. DİZİLEME .....	27
3.6.1. Dizi Polimorfizminin Belirlenmesi .....	28
3.6.2. Filogenetik Dendrogram Oluşturulması .....	28
3.6.3. Protein Dizilerinin Analizi .....	29
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>30</b>
4.1. DNA SAFLIĞI VE MİKTARI .....	30
4.2. <i>DHN3</i> GENİNİN PZR SONUÇLARI .....	31
4.3. <i>DHN3</i> GENİNİN KLONLANMASI .....	31
4.4. <i>DHN3</i> GENİNDE ALLELİK VARYASYONUN BELİRLENMESİ .....	32
4.4.1. <i>Dhn3</i> PZR Sonuçlarının PAGE Analizi .....	32
4.5. <i>DHN3</i> DİZİLERİNDE POLİMORFİZMİN ARAŞTIRILMASI .....	33
4.5.1. <i>Dhn3</i> Dizilerinin Kontrolü ve Eldesi .....	33
4.5.2. <i>Dhn3</i> Dizilerinin DNA Düzeyinde Analizi .....	35
4.5.2.1. <i>Dhn3</i> Genindeki Nükleotit Çeşitliliği .....	35
4.5.2.2. <i>Dhn3</i> Segmentlerinin İncelenmesi .....	36
4.5.2.3. Tek Nükleotit Değişimlerinin (SNP) Belirlenmesi .....	36
4.5.2.4. <i>Hordeum</i> Türlerinin <i>Dhn3</i> Geni Açısından Dizi Benzerliğinin Filogenetik Analizi .....	41
4.5.3. Protein Seviyesindeki Analizler .....	44
4.5.3.1. <i>Dhn3</i> Segmentlerinin İncelenmesi .....	47
4.5.3.2. <i>Dhn3</i> Geni Mutasyonlarının Biyokimyasal Etkileri .....	48
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>50</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>7. EKLER .....</b>	<b>65</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>73</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1: Yabani arpa ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i> ) taksonomisi.....	3
Şekil 2.2: Bereketli Hilal; arpanın ( <i>H. vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i> ) kültüre alındığı bölge (Salamini ve diğ., 2002).....	4
Şekil 2.3: <i>H. spontaneum</i> ve <i>H. vulgare</i> tohumlarının morfolojik olarak karşılaştırılması (Badr ve diğ., 2000).....	5
Şekil 2.4: Arpanın 7 çift kromozomunun yapısı ve adlandırılması.....	6
Şekil 2.5: <i>Dehidrin</i> ( <i>Dhn1</i> , <i>Dhn2</i> , <i>Dhn3</i> , <i>Dhn4</i> , <i>Dhn5</i> ve <i>Dhn6</i> ) genlerinin arpa kromozomları üzerindeki konumları (Close, 1996).....	15
Şekil 2.6: Grup 2, protein dizilerindeki motiflerin çeşitleri ve yerleşimleri (n, y; tekrarlanma sayısı).....	16
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan <i>H. spontaneum</i> aksesyonların orijin aldıkları il ve ilçelerdeki toplanma yerleri.....	19
Şekil 3.2: <i>H. spontaneum</i> tohumlarının yetiştirilmesi.....	20
Şekil 3.3: AF043089.1 aksesyonundaki ekzon 1, intron ve ekzon 2'nin (oklar) gösterimi ve primerlerin konumları.....	22
Şekil 4.1: <i>Hordeum spontaneum</i> aksesyonlarından yapılan PZR görüntüsü.....	31
Şekil 4.2: <i>Hordeum spontaneum</i> ve <i>Hordeum vulgare</i> (Tokak 157/37) aksesyonlarından yapılan PZR görüntüsü.....	31
Şekil 4.3: A) PZR ile çoğaltılan <i>Dhn3</i> genini taşıyan vektörlerin <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu. <i>LacZ</i> mavi/beyaz seleksiyonuna göre; beyaz koloniler ligasyonun varlığına, mavi koloniler ise ligasyon olmadığına işaret etmektedir. B) LH1 ve K394 örnekleri ile yapılan koloni PZR sonucu. (1, 2, 3 LH1 örnekleri; 4, 5, 6 K394 örnekleri).....	32
Şekil 4.4: <i>H. spontaneum</i> aksesyonlarında <i>Dhn3</i> PZR ürünlerinin %8'lik PAGE'de 5 saat yürütülme sonucu.....	32
Şekil 4.5: <i>H. spontaneum</i> aksesyonlarında <i>Dhn3</i> PZR ürünlerinin %8'lik PAGE'de 5 saat yürütülme sonucu.....	33
Şekil 4.6: LH2 örneği, dizileme sonucunun Chromas Lite programı ile gösterimi.....	34

<b>Şekil 4.7:</b> 117-118 bazları arasındaki insersiyon/delesyon (Dicktoo, 47002, 4982, 49085 örnekleri 674 bç, diğer tüm yabancı hatlar ve varyeteler 692 bç). .....	38
<b>Şekil 4.8:</b> <i>Dhn3</i> gen dizilerindeki varyasyona dayalı olarak UPGMA metodu ile oluşturulan filogenik ağaç (Nei ve Kumar, 2000). .....	43
<b>Şekil 4.9:</b> <i>Dhn3</i> geninin kodladığı polipeptit dizisinin, Tokak ve Dicktoo varyetesinde karşılaştırılması (Tokak: 161; Dicktoo: 155). .....	44
<b>Şekil 4.10:</b> <i>Dhn3</i> geninde 27 ile 28'inci amino asit arasındaki 6 amino asitlik insersiyon/delesyon'unun pozisyonu. ....	45
<b>Şekil 4.11:</b> <i>Dhn3</i> amino asit dizisine özgü segmentlerin gösterimi (Y, S, K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> Fi segmentleri). .....	47
<b>Şekil 4.12:</b> Kyle-Doolittle'a göre yapılan analize göre <i>Dhn3</i> geninin farklı amino asit pozisyonlarındaki hidrofobisite değerleri. ....	49



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 2.1:</b> LEA proteinlerinin korunmuş amino asit dizileri. ....	11
<b>Tablo 3.1:</b> Çalışmada kullanılan aksesyonlar ve bilgileri. ....	18
<b>Tablo 3.2:</b> Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler. ....	21
<b>Tablo 3.3:</b> <i>Dhn3</i> geninin PZR ile çoğaltımında kullanılan primer çifti. ....	22
<b>Tablo 3.4:</b> PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları. ....	22
<b>Tablo 3.5:</b> Klasik PZR döngüleri. ....	23
<b>Tablo 3.6:</b> Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar. ....	23
<b>Tablo 3.7:</b> Poliakrilamid jel hazırlanması için kullanılan bileşenler ve miktarları. ....	24
<b>Tablo 3.8:</b> Koloni PZR’da kullanılan primerler. ....	26
<b>Tablo 3.9:</b> Koloni PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları. ....	26
<b>Tablo 3.10:</b> Koloni PZR döngüleri. ....	26
<b>Tablo 4.1:</b> DNA miktarları ve saflık değerleri. ....	30
<b>Tablo 4.2:</b> <i>Dhn3</i> geninin farklı bölgelerine ait nükleotit çeşitliliği. ....	35
<b>Tablo 4.3:</b> <i>Dhn3</i> geninin Y, S ve K segmentlerindeki polimorfizmin incelenmesi. ....	36
<b>Tablo 4.4:</b> Tüm örneklerde meydana gelmiş toplam SNP, sinonim ve sinonim olmayan değişimler. ....	37
<b>Tablo 4.5:</b> <i>Dhn3</i> genindeki SNP’lerin, <i>H. spontaneum</i> ve <i>H. vulgare</i> ’deki pozisyonları. ....	39
<b>Tablo 4.5’in Devamı:</b> <i>Dhn3</i> genindeki SNP’lerin, <i>H. spontaneum</i> ve <i>H. vulgare</i> ’deki pozisyonları. ....	40
<b>Tablo 4.6:</b> Yirmi dört genotipin <i>Dhn3</i> dizileri arasındaki nükleotit farklılıklarının sayısı temel alınarak filogenetik uzaklıklarının tahmini (Tamura ve diğ., 2013). ....	42
<b>Tablo 4.7:</b> <i>Dhn3</i> amino asit dizilerindeki sinonim olmayan değişimler. ....	46
<b>Tablo 4.8:</b> <i>H. spontaneum</i> <i>Dhn3</i> genindeki Y, S, K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> ve Fi segmentlerinin Dicktoo’ya göre sinonim olmayan amino asit değişimleri. ....	48

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleozid trifosfat
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>U</b>	: Ünite
<b>V</b>	: Volt
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>TAE</b>	: Tris-Asetat-EDTA
<b>Ppm</b>	: Milyonda bir birim
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit
<b>TEMED</b>	: Tetrametiletildiamin
<b>TBE</b>	: Tris-Borik Asit-EDTA
<b>UPGMA</b>	: Aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (Unweighted pair-group method with arithmetic averages)
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>Dhn</b>	: Dehidrin
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ABA</b>	: Absisik Asit
<b>CFU</b>	: Koloni Oluşturma Frekansı
<b>CTAB</b>	: Setiltrimetilamonyum Bromür

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### YABANI ARPA'DA (*Hordeum spontaneum*) *DEHİDRİN3* GENİNİN ALLELİK VARYASYONUNUN İNCELENMESİ

Süleyman ÇAPUTLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL

Dehidrinler, grup 2 LEA (“Late Embryogenesis Abundant”) proteinleri sınıfındadır ve bitkilerde stres toleransında önemli bir rol oynamaktadırlar. *Dehidrin3* (*Dhn3*) geni, arpa (*Hordeum vulgare* L.)’da iyi tanımlanmış dehidrin gen ailesinin bir üyesidir ve dehidrasyon stresi ve absisik asit (ABA) uygulamasında anlatımı artmaktadır. Bu gendeki varyasyonların özellikle kuraklığa dayanıklılık mekanizmalarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. *Dhn3* geninin ülkemiz coğrafyasında yaygın bulunan ve yabancı arpa olarak bilinen *Hordeum spontaneum* (C.Koch) Thell’deki varyasyonu ise bilinmemektedir. Bu çalışmada, Türkiye’nin 3 coğrafik bölgesinden toplanmış 21 *Hordeum spontaneum* aksesyonunda *Dhn3* geninin dizi polimorfizmi biyoinformatik araçlar kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak gendeki toplam nükleotit polimorfizmi ( $\pi$ ) 0.006365’tir. Gen içi bölgelerde en yüksek polimorfizmin intron bölgesinde ( $\pi$ : 0.012474), gen motifleri incelendiğinde ise  $K_1$  ( $\pi$ : 0.013545) segmentindedir. *H. spontaneum*’da dizilenen *Dhn3* geni yapı olarak  $YSK_2$  tipindedir ve *H. vulgare* ile benzerdir. Diğer yandan, bazı aksesyonlarda literatürde belirtilen korunmuş Y, S, K dizilimlerinden farklı olarak sinonim olmayan (“non-synonymous”) değişimler saptanmıştır.

Çalışmada *H. spontaneum Dhn3* genindeki polimorfizm Amerikan Dicktoo ve yerli Tokak arpa varyeteleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre 674 bç'lik gen bölgesinde 31 (Tokak'da 32) tek nükleotit değişimi (SNP) ve bir insersiyon/delesyon (indel) olmak üzere toplam 32 mutasyon vardır. Genin 117. pozisyonunda yer alan 18 baz çiftlik indel 18 yabancı arpa hattında bulunurken, 3 hatta bulunmamaktadır. Dicktoo varyetesine göre belirlenen SNP'lerin 21 tanesi ekzon bölgesinde olup, 6'sı sinonim ("synonymous"), 15'i ise sinonim olmayan tipte amino asit değişimlerine yol açmıştır. Çalışmada ayrıca bazı amino asit değişimlerinin polipeptidin hidrofobisitesinde değişimlere yol açtığı belirlenmiştir. SNP temelli filogenetik ilişki analizinde, batı bölgesinden toplanan iki aksesyon küme oluştururken, doğu orijinli aksesyonlar heterojen bir kümelenme göstermiştir.

Haziran 2014, 84 Sayfa.

**Anahtar kelimeler:** *Dehidrin3*, *Hordeum spontaneum*, Allelik Varyasyon

## **SUMMARY**

### **M.Sc.THESIS**

#### **DETERMINATION OF ALLELIC VARIATIONS OF *DEHYDRIN3* GENE IN WILD BARLEY (*Hordeum spontaneum*)**

**Süleyman ÇAPUTLU**

**İstanbul University**

**Graduate School of Science and Engineering**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL**

Dehydrins are classified in group 2 LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and play an important role in plant stress tolerance. *Dehydrin3* (*Dhn3*) gene is one of the members of well described dehydrin gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression is increased by dehydration stress and abscisic acid (ABA) applications. It has been reported that variations observed in this gene are related particularly with the drought stress tolerance mechanisms. However, *Dhn3* gene variation in *Hordeum spontaneum* (C.Koch) Thell which is widely distributed in Turkey and commonly known as wild barley is unknown. In this study, *Dhn3* gene sequence polymorphism was investigated by using bioinformatic tools in 21 *Hordeum spontaneum* accession collected from 3 different geographic regions of Turkey. As a result, the total nucleotide polymorphism ( $\pi$ ) in *Dhn3* gene is 0.006365. When intragenic regions were analyzed, introns have been detected to have the highest polymorphism rate ( $\pi$ : 0.012474), while in the gene motifs, K<sub>1</sub> ( $\pi$ : 0.013545) segment has the highest polymorphism. The sequenced *Dhn3* gene in *H. spontaneum* is YSK<sub>2</sub> type and similar to *H. vulgare*. On the other hand, in some accessions non-synonymous changes were detected that were different from the conserved Y, S, K segments reported in the literature.

Polymorphisms in *H. spontaneum Dhn3* gene were compared to American Dicktoo and native Tokak varieties in the study. As a result, a total of 32 polymorphisms were arised from 31 single nucleotide polymorphisms (SNP) (32 in Tokak) and one insertion/deletion (indel) mutation in the 674 bp long gene region. An 18 base pair indel at the 117th position of the gene was found in 18 wild barley accessions but was absent in 3 accessions. Compared to Dicktoo, 21 of identified SNPs exist in the exon, in which these 6 of caused synonymous changes while 15 of them have led to non-synonymous changes in amino acid sequences. In the study, it was also determined that some amino acid variations led to changes in polypeptide hydrophobicity. According to the SNP-based analysis on phylogenetic relationships, two accessions collected from the western region formed a cluster while eastern originated accessions showed an heterogeneous cluster.

June 2014, 84 Pages.

**Keywords:** *Dehydrin3*, *Hordeum spontaneum*, Allelic Variations

## 1. GİRİŞ

Günümüzde nüfus artışı ve iklim değişikliği nedeniyle yaşanan küresel ısınma ve kuraklık, tarım ve gıda güvenliğinin en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. İklim değişikliği ve özellikle fosil yakıtlar ile ormanların yanması sonucu oluşan karbondioksit, dünyada birçok alanda kuraklık ve çölleşmeye neden olmaktadır (Petit ve diğ., 1999; Lu ve diğ., 2007). Hükümetler Arası İklim Değişikliği Paneli (“The Intergovernmental Panel on Climate Change”; IPCC) tarafından yapılan proje sonucunda geçtiğimiz 150 yıl içerisinde atmosferik karbondioksit konsantrasyonunun ~260 ppm’den ~380 ppm’e yükseldiği belirlenmiştir (Griggs ve Noguera, 2002). Buna paralel olarak geçtiğimiz 100 yılda dünya sıcaklığı ortalama 0.8°C yükselmiştir ve bu yükselişin 3’te 2’si sadece geçtiğimiz 30 yıl içerisinde gerçekleşmiştir (Carnesale ve diğ., 2011). Birçok çalışma, dünya üzerindeki ortalama yüzey sıcaklığının artmasıyla ürün verimliliğinin azaldığını göstermiştir. Örneğin her 1°C’lik sıcaklık artışı arpa varyetelerindeki ürün verimliliğini %10 azaltmaktadır (Adams ve diğ., 1998).

Biyotik ve abiyotik strese karşı olan dayanıklılığı artırmak için ıslahı gerçekleştirilmiş mahsullerde ve doğal popülasyonlarda genetik çeşitliliğin korunması gerekmektedir. Islahı gerçekleştirilen popülasyonlardaki çeşitlilik aynı zamanda genetik gelişimin de sürdürülebilirliğini sağlamak açısından önemlidir (Martin ve diğ., 1991). Yabancı türler ticari ıslah faaliyetleri için potansiyel gen kaynağıdır (Vanhala, 2004).

Geç embriyogenez proteinleri (LEA), tohumların olgunlaşma aşamasında, vejetatif organlarda özellikle soğuk, kuruma, yüksek tuzluluk ve su eksikliği gibi stres koşulları altında biriken, hücrelerin fizyolojisini korumak için gen anlatımını düzenleyen, embriyo gelişimi ve absisik asit (ABA) gibi faktörler ile indüklenen bir protein grubudur (Close, 1996; Zhu ve diğ., 1997). Arpa üzerinde yapılan birçok çalışma sonucunda, bu protein grubunda yer alan *Dehidrin3* (*Dhn3*) ve *Dehidrin4* (*Dhn4*)’ün kuraklık stresi altında erken anlatım yapan genler olduğu belirlenmiştir (Park, 2006; Guo, 2009). Diğer yandan, bu genlerin genetik varyasyonlarına ait literatürde fazla bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada kültür arpasının atası olan yabani arpa *Hordeum spontaneum*'da ve bazı arpa varyetelerinde *Dhn3* geninin nükleotit dizisi biyoinformatik araçlarla analiz edilmiştir. Bu amaçla ülkemiz kökenli, 21 *Hordeum spontaneum* aksasyonu ile Tokak 157/37 ve Erginel90 varyetelerine ait tohumlar, laboratuvar koşullarında yetiştirilmiş, yapraklarından genomik DNA'lar izole edimiş ve gene özgü primerlerle *Dhn3* geni çoğaltılıp dizilenmiştir. Daha sonra bu genlerin 5' UTR, ekzon, intron ve 3' UTR bölgelerine ait diziler çeşitli programlar aracılığıyla incelenerek allelik varyasyonları araştırılmıştır.



## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. *Hordeum spontaneum*

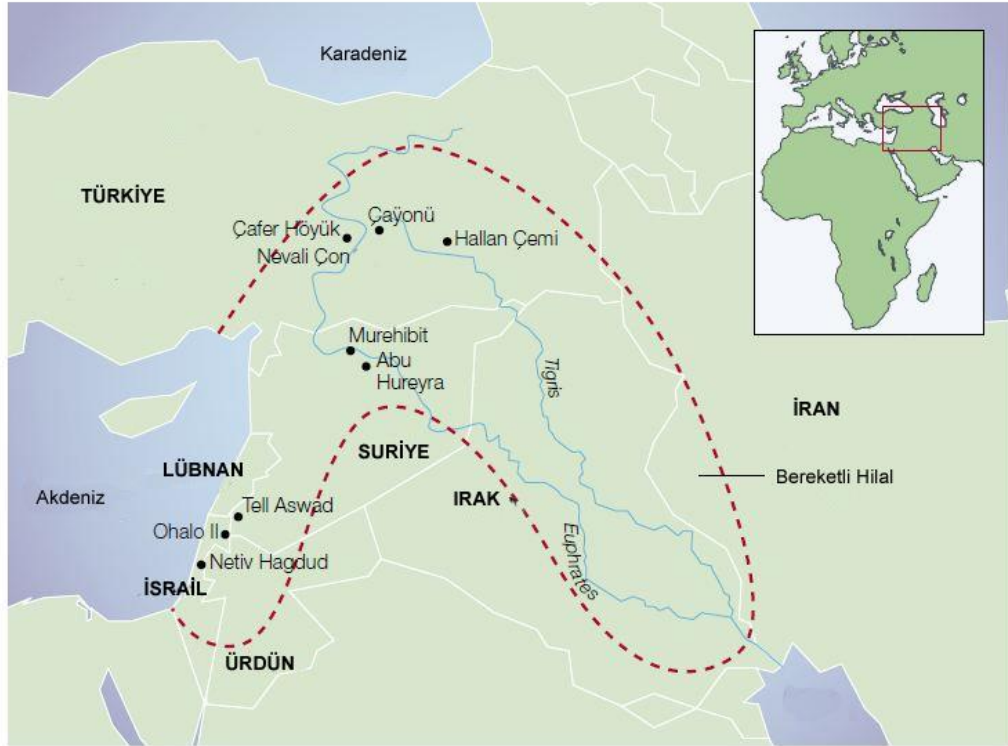
Arpa, *Poaceae* ailesinden *Liliopsida* sınıfının bir üyesidir ve *Poaceae* ailesine ait olan tüm bitkiler tek bir atadan gelişmiştir (Bothmer ve diğ., 1985; Devos, 2005; Schulte ve diğ., 2009). *Hordeum* cinsi, 32 türden ve 45 taksondan oluşur. Tüm arpa taksonları temelde diploid ( $2n=14$ ) olmakla beraber tetraploid ( $2n=4x=28$ ) veya heksaploid ( $2n=6x=42$ ) türleri de bulunmaktadır (Bothmer ve diğ., 1995). Yaklaşık 10.000 yıl önce kültürlenmiş ve ekimi yapılan arpa, bugün yabani arpa (*Hordeum vulgare* L. subsp. *spontaneum*) olarak bilinmektedir. Yabani arpa, ilk olarak Alman botanikçi Carl Koch tarafından Türkiye’de keşfedilmiştir ve ayrı bir tür olarak tanımlamıştır (*Hordeum spontaneum*). Ancak, biyolojik tür kavramına göre (Bothmer ve diğ., 1985), arpanın atasal formu günümüzde *Hordeum vulgare* L. türünün alt türü olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.1). Bu nedenle *H. spontaneum*’a sinonim olarak *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (C.Koch) Thell de denilmektedir (Bothmer ve diğ., 2003).

Alem: <b>Plantae</b>
Altalem: <b>Tracheobionta</b>
Üstşube: <b>Spermatophyta</b>
Şube: <b>Magnoliophyta</b>
Sınıf: <b>Liliopsida</b>
Altsınıf: <b>Commelinidae</b>
Takım: <b>Cyperales</b>
Aile: <b>Poaceae</b>
Altaile: <b>Pooideae</b>
Oymak: <b>Triticeae</b>
Cins: <b><i>Hordeum</i></b>
Tür: <b><i>Hordeum vulgare</i></b>
Alt Tür: <b><i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>spontaneum</i> (C. Koch)</b>

Şekil 2.1: Yabani arpa (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) taksonomisi.

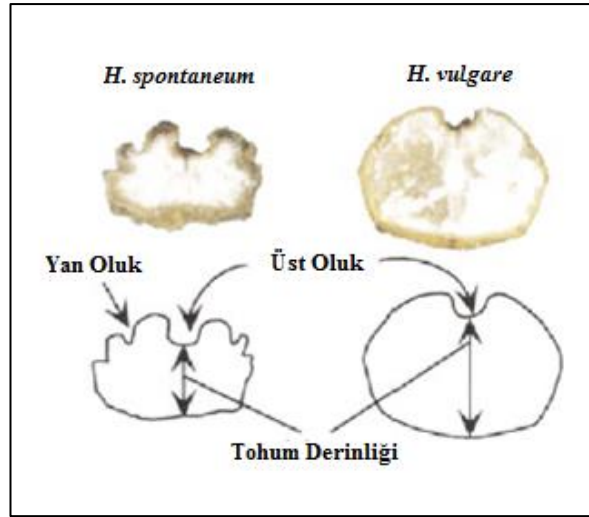
Yabani arpa, tek yıllık bir bitki olup iki sıralı ve diploiddir.  $2n=2x=14$  kromozoma sahip olan yabani arpanın diploid genom büyüklüğü yaklaşık 9.037 pg'dır (Kalender ve diğ., 2000).

Yabani arpa Yakın Doğu Asya ülkeleri boyunca geniş bir yayılım göstermektedir (Harlan ve Zohary, 1966). Ancak birincil gen havuzu, "Bereketli Hilal" olarak adlandırılan ve İsrail, Türkiye (Güneydoğu Anadolu Bölgesi), Lübnan, Ürdün, Suriye, Irak ve İran'ı içine alan bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Türkiye'de yayılım açısından bakıldığında *Hordeum spontaneum* Çanakkale ilinden başlayarak sahil boyunca bulunmakta ve Güneydoğu Anadolu'da yaygınlaşmaktadır (Davis ve diğ., 1985). Türkiye, coğrafik ve iklimsel çeşitliliğe sahip olması sebebiyle çok farklı bitki türünün yetiştiği bir coğrafyadır (Karagöz ve diğ., 2010).



**Şekil 2.2:** Bereketli Hilal; arpanın (*H. vulgare* subsp. *spontaneum*) kültüre alındığı bölge (Salamini ve diğ., 2002).

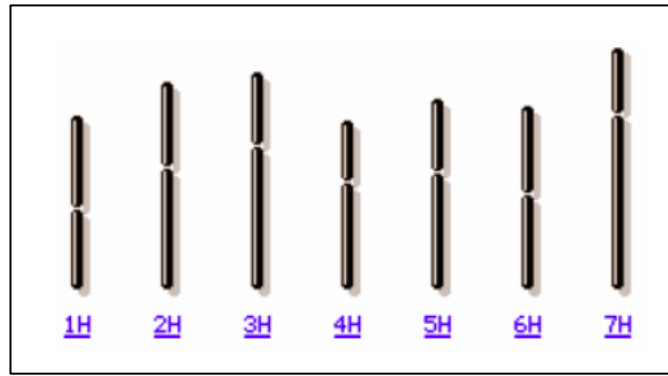
*Hordeum spontaneum*, yüksek yağış alan ortamlardan kurak alanlara, soğuk iklimlerden sıcak iklimlere ve deniz seviyesinin altındaki ortamlardan dağ tepelerine kadar çok çeşitli habitatlarda bulunabilmektedir. *H. spontaneum* gen havuzu, arpa genetiği ve ıslahı için zengin bir kaynak sağlamasının yanı sıra bitki evrimi, adaptasyonu ve popülasyon genetiği üzerindeki çalışmalar için de kullanılmaktadır (Nevo, 1992; Brown, 1992; Ceccarelli ve diğ., 2004). *H. spontaneum* ve *H. vulgare* morfolojik açıdan birbirlerine benzerdir. Bu iki tür karşılaştırıldığında *H. vulgare*, daha geniş yapraklara, daha kısa bir gövdeye ve dikenlere, sert bir başak eksenine, daha kısa ve daha kalın bir başağa sahiptir (Zohary, 1969). Ayrıca *H. vulgare*'nin, *H. spontaneum*'dan daha geniş bir tohumu vardır (Badr ve diğ., 2000; Şekil 2.3).



**Şekil 2.3:** *H. spontaneum* ve *H. vulgare* tohumlarının morfolojik olarak karşılaştırılması (Badr ve diğ., 2000).

*H. vulgare* ve *H. spontaneum* arasındaki genetik varyasyon incelendiğinde, bu türlerin birbirine benzer yapıda olduğu gösterilmiştir (Ellis ve diğ., 1999). Diğer yandan, iki türdeki allel frekanslarının incelenmesi sonucunda, bitki ıslahı çalışmaları sırasında kültür arpasındaki genetik çeşitliliğin azaldığı ve ender görülen allellerin kaybolduğu tespit edilmiştir. SSR temelli yapılan moleküler markır analizleri sonucunda allellerin %54'ü sadece yabani arpaya özgün iken bu allellerin hiçbirisi kültüre alınan arpa genotiplerinde bulunmamıştır. Yabani arpa gen havuzunda bulunan allellerin sadece %39'unun kültüre alınan arpanın gen havuzlarına aktarıldığı belirlenmiştir (Ellis ve diğ., 1999).

Bu çalışmada, dizi polimorfizmlerinin karşılaştırılmasında Türkiye’de yaygın ekimi yapılan iki arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidi kullanılmıştır. Diploid  $2n=2x=14$  (Şekil 2.4) olan arpanın genom büyüklüğü  $5.6 \times 10^9$  bç olup, genomunun yaklaşık %80’i tekrarlı DNA dizilerinden oluşur (Schulman ve diğ., 2004). Ayrıca arpa, kısa yaşam döngüsü, tek yıllık bir bitki olması, genomunun diğer küçük taneli tahıllara benzerliğinden dolayı genetik bir model organizma olarak tanımlanmıştır (Shewry, 1992).



**Şekil 2.4:** Arpanın 7 çift kromozomunun yapısı ve adlandırılması.  
([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?chr=barley.inf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?chr=barley.inf)).

## 2.2. GEÇ EMBRİYOGENEZ PROTEİNLERİ (LEA; “LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT”)

Geç embriyogenez proteinleri (LEA) 33 yıl önce pamuk (*Gossypium hirsutum*) tohumlarında tanımlanmıştır (Dure ve Chlan, 1981; Dure ve Galau, 1981; Dure ve diğ., 1981). Bu proteinler, tohumların olgunlaşma aşamasında ve vejetatif organlarda özellikle düşük sıcaklık, kuruma, yüksek tuzluluk, su eksikliği gibi stres koşullarında biriken, embriyo gelişimi ve hücrelerin fizyolojisini korumak için gen anlatımını düzenleyen, ayrıca absisik asit (ABA) gibi faktörler ile indüklenen protein grubudur (Close, 1996; Zhu ve diğ., 1997). Embriyonun geç dönemlerinde bol buldukları için LEA (“Late Embryogenesis Abundant”) olarak isimlendirilmişlerdir (Dure ve diğ., 1989).

LEA proteinleri ilk olarak pamuk (*Gossypium hirsutum*) tohumlarında tanımlanmasına karşın, ilk yayınlanan dehidrin dizisi pirinç RAB21 dehidrinine aittir (Mundy ve Chua, 1988). LEA proteininin yapısal karakterizasyonu ise ilk olarak 1985 yılında McCubbin

tarafından çeşitli biyokimyasal teknikler kullanılarak buğdayda (*Triticum aestivum*) çalışılmıştır ve bu çalışmada McCubbin grup 1 proteinini (Em) incelemiştir (McCubbin ve diğ., 1985).

LEA proteinleri özellikle bitkilerin tohum ve diğer dokularında bulunmasına rağmen (Baker ve diğ., 1988; Hughes ve diğ., 1989) sadece bitkilere özgün proteinler değildirler. Bakterilerden *Deinococcus radiodurans* (Battista ve diğ., 2001) ve *Bacillus subtilis* (Stacy ve Aalen, 1998), kironomid *Polypedilum vanderplanki* (Kikawada ve diğ., 2006), artemia (Hand ve diğ., 2007), farklı nematod çeşitleri (Browne ve diğ., 2002; Gal ve diğ., 2004), rotiferler (Tunnacliffe ve diğ., 2005; Pouchkina-Stantcheva ve diğ., 2007) ve siyanobakterilerde (Close ve Lammers, 1993) tanımlanmıştır. Hücre içinde ise sitozol (Robert ve diğ., 1993), nükleus (Houde ve diğ., 1995), kloroplast (Artus ve diğ., 1996.), vakuol (Heyen ve diğ., 2002) ve plazma zarının çevresi gibi çeşitli yerlerde de bulunduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Asghar ve diğ., 1994; Egerton-Warburton ve diğ., 1997; Puhakainen ve diğ., 2004).

### **2.2.1. LEA Proteinlerinin Görevleri**

LEA proteinleri, fosfolipitlerin negatif yüklü fosfat grupları ile etkileşime girerek plazma ve organel zarının stabilizasyonunda (Tollete ve diğ., 2010), kalsiyum gibi iyonların ayrılmasında moleküler şaperonlar gibi davranarak iyonların suya bağlanmasında ya da yer değiştirmesinde (Heyen ve diğ., 2002), bitki hücrelerinin dehidrasyonun zararlı etkilerine karşı korunmasında (Bray, 1993), kurumaya karşı dirençte, su kaybından kaynaklanan hücresel yapının korunmasında, katlanmamış proteinlerin renatürasyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Cuming, 1999).

LEA proteinleri, toplam amino asit miktarlarının %20-30'u oranında hidrofilik amino asitlerden oluşmaktadır. Örneğin; D-19 pamuk proteini %13 glisin ve %11 glutamik asit içermektedir. LEA proteinleri ile yapılan çalışmalarda, amino asit kompozisyonlarından enzim fonksiyonuna sahip olmadıkları ve yüksek oranda hidrofilik oldukları belirlenmiştir (Baker ve diğ., 1988).

### **2.2.2. LEA Proteinlerinin Sınıflandırılması**

Erken aşamadaki analizler sonucunda LEA genleri transkript yoğunluğuna ve embriyogenezdeki anlatım seviyelerine göre LEA ve LEA-A altgrupları olmak üzere 2

sınıfa ayrılmaktadır. LEA-A genleri tohum gelişimi sırasında, LEA genlerine göre daha erken anlatım yapmaya başlamaktadır (Galau ve diğ., 1986; Hughes ve Galau, 1989; 1991). Daha genel bir sınıflandırma ise proteinin yapısal domenlerine ve kimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır. Günümüzde sınıflandırmada 2 farklı yaklaşım bulunmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri Dure ve diğ. (1989) tarafından yapılan sınıflandırmadır. Dure ve diğ., amino asit dizilerindeki korunmuş motifleri dikkate alarak bir sınıflandırma yapmışlar ve LEA proteinlerini 5-9 alt gruba ayırmışlardır (Dure ve diğ., 1989; Bray, 1994; Cuming, 1999; Bies-Etheve ve diğ., 2008). İkinci yaklaşım ise bilgisayar analiz yöntemi ile yapılan sınıflandırmadır. Protein veya oligonükleotitlerin tahmin profili ("Protein or Oligonucleotide Probability Profile", POPP) olarak adlandırılan program ile özel amino asitlerin bulunma durumuna göre sınıflandırma yapılır (Wise, 2002; 2003). POPP analizine göre, LEA proteinleri 4 alt gruba ayrılmaktadır (Wise, 2003; Wise ve Tunnacliffe, 2004).

#### ***2.2.2.1. LEA Proteinlerinin Korunmuş Motiflerine Göre Sınıflandırması***

LEA1 Proteinleri (D-19): Bu grup içerisinde yer alan LEA proteinleri, ilk olarak gelişmekte olan pamuk tohumlarındaki D-19 ve D-132 proteinleri ile ortaya çıkarılarak kendilerine özgü 20 bakiyelik diziler ile tanımlanmıştır (Galau ve diğ., 1992; Baker ve diğ., 1995). Tüm gruplarla karşılaştırıldığında, grup 1 proteinleri ile diğer gruplar arasında büyük oranda bir homoloji gözlenmiş olup özellikle hidrofilik 20 amino asitlik bir motife (TRKEQ[L/M]G[T/E]EGY[Q/K]EMGRKGG[L/E]) rastlanmıştır. Bu yapı çoklu kopyalar halinde bulunabilmektedir (bitki türlerinde birden dörde kadar ve diğer organizmalarda ise sekize kadar). Bitkilere ait proteinlerde iki ayrı korunmuş motife daha rastlanmıştır. Bunlardan birincisi 20 amino asitlik dizinin öncesinde yer alan amino ucundaki motiftir (TVVPGGTGGKSLEAQE[H/N]LAE), diğeri ise karboksil ucundaki motiftir (D[K/E]SGGERA[A/E][E/R]EGI[E/D]IDESK[F/Y]).

*Arabidopsis* ile yapılan çalışmada, grup 1'in iki üyesinden bir tanesinin olmamasının bitkide erken tohum dehidrasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Böylelikle bu grubun tohum gelişimi ile ilişkili olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır (Manfre ve diğ., 2006). Normal şartlar altında yetiştirilen bitkilerdeki bazı grup 1 LEA proteinlerinin vejetatif dokulardaki ekspresyonu, bu grubun normal tohum/fide gelişiminde de rol oynadıklarını göstermektedir.

LEA2 Proteinleri (D-11): Dehidrinler olarak bilinen LEA proteinlerinin bu grubu ilk olarak gelişmekte olan pamuk embriyolarında “D-11” ailesi olarak tanımlanmıştır. Tipik olarak, son derece hidrofilik özellikte olup, yüksek düzeyde yüklü ve polar amino asitlerin yanı sıra triptofan (Trp) ve çoğunlukla sistein (Cys) bakiyelerinden yoksun, düşük oranda polar olmayan hidrofobik bakiyeler içerirler. Bu nedenle bu grup hidrofilinler olarak da kabul edilir (Garay-Arroyo ve diğ., 2000). Grup 2 LEA proteinlerinin ayırt edici özelliği korunmuş, lizince zengin, 15 bakiyeli motiftir (EKKGIMDKIKEKLPG). Bu motif “K segmenti” olarak adlandırılır ve tek bir polipeptit içerisinde 1 ile 11 kopya arasında bulunabilir (Close ve diğ., 1989; 1993). Ayrıca bu grupta “Y segmenti” olarak adlandırılan ve [V/T]D[E/Q]YGNP korunmuş dizisiyle genellikle proteinin amino ucunda 1 ile 35 arasında değişen tekrarlı kopyalar halinde bulunan ayrı bir segment daha vardır (Close ve diğ., 1993; Close, 1996; Campbell ve Close, 1997; Şekil 2.6; Tablo 2.1). LEA 2 proteinlerinin çoğu “S segmenti” olarak bilinen serin (Ser) bakiyelerine sahiptir ki bu segment bazı proteinlerde fosforilasyona da uğrayabilir (Tablo 2.1; Vilardell ve diğ., 1990; Plana ve diğ., 1991; Goday ve diğ., 1994; Jiang ve Wang, 2004). Daha az korunmuş motifler (Fi;  $\Phi$  segmentleri), genellikle polar amino asitlerce zengindir ve K segmentlerinin arasında serpiştirilmiş şekilde yer alır (Campbell ve Close, 1997). Tek bir polipeptit içerisinde bulunan farklı motiflerin burada bulunan düzenleri, grup 2 LEA proteinlerinin 5 alt gruba ayrılmasını sağlar (Campbell ve Close, 1997). Sadece K segmentine sahip olan proteinler K-alt grubu, hem S hem de K segmentlerine sahip olanlar ise SK-alt grubu olarak tanımlanmışlardır. Buna ek olarak, YSK, YK ve KS alt grupları da mevcuttur (Şekil 2.6; Campbell ve Close, 1997).

Grup 2 LEA proteinlerinde bulunan K segment motiflerinin alfa-heliks yapısı oluşturduğu ve böylelikle hücre zarını koruyabildiği düşünülmektedir (Dure, 1993b; Close, 1996). Ayrıca grup 1 LEA proteinlerinde olduğu gibi, grup 2 LEA proteinlerinin de düşük sıcaklık veya tuzluluktan kaynaklanan su eksikliğine yanıt olarak tohum kuruması sırasında biriktiği doğrulanmıştır (Ismail ve diğ., 1999a; Nylander ve diğ., 2001).

LEA3 Proteinleri (D-7/D-29): Bu grupta yer alan LEA proteinleri 11 amino asitlik tekrarlı motifleri aracılığı ile belirlenirler (Dure, 1993a). Dure'nin (2001) tanımlamış olduğu 11 amino asitlik motifinde yer alan çeşitlilik düzeyi, grup 3 LEA proteinlerinin 2

alt gruba ayrılmasını sağlamıştır. Bunlardan ilki olan alt grup 3A, pamukta yer alan D-7 LEA proteinleriyle temsil edilirken, diğer bir grup olan 3B ise D-29 LEA proteinleriyle tanımlanmışlardır. İlk alt grup olan 3A yüksek düzeyde korunmuştur. Bu alt grupta yer alan proteinlerle özdeşleştirilen iki motif (motif 3 ve 5), 9 ve 10. pozisyonlarda yer alan bazı değişimler haricinde (TAQ[A/S]AK[D/E]KT[S/Q]E; Tablo 2.1) 11 bazlık diziyle benzerlik göstermektedir. 3A proteinlerinin amino ucundaki bir bölgede motif 4'e (SYKAGETKGRKT) ve karboksil ucundaki bir bölgede ise motif 1 ve 2'ye rastlanmıştır (GGVLQQTGEQV ve AADAVKHTLGM; Tablo 2.1). Diğer alt grup olan 3B ise heterojen yapıdadır. 11 bazlık bölgesi ile ilişkili 4 varyasyona rastlanmıştır (motifler 1-4); fakat bu çeşitlilik sadece konsensus dizi ile sınırlı kalmıştır. Sadece bu alt grup ile ilişkilendirilen motif 5 yüksek derecede korunmuştur (Tablo 2.1).

Diğer gruplarda yer alan LEA proteinlerine benzer biçimde grup 3 LEA proteinleri de spesifik gelişme evrelerinde ve/veya strese maruz bırakılmalarının ardından ABA tarafından düzenlenirler (Piatkowski ve diğ., 1990; Curry ve diğ., 1991; Curry ve Walker-Simmons, 1993; Dehaye ve diğ., 1997; Dong ve Dunstan, 1997) Ayrıca bu grup içerisinde yer alan proteinlerin görevlerini belirlemeye yönelik çalışmalar sonucunda, suyun az olduğu ortamlarda bulunan bitkilerde gerçekleşen yaralanmaya karşı bu proteinlerin oluştukları görülmüştür (Wolkers ve diğ., 2001).

LEA4 Proteinleri (D-113): Dure sınıflamasına göre bu aile içinde bulunan proteinlerin amino ucundaki bölgeleri yaklaşık 70 ile 80 bakiyeye sahip olup alfa-heliks yapısı oluşturmuş ve yüksek derecede korunmuşlardır. Bununla beraber karboksil ucundaki bölgesi ise daha az korunmuştur ve boyut olarak da değişkenlik göstermektedir (Dure, 1993b). Bu grup içerisindeki proteinler amino ucundaki bölgede konumlanmış motif 1 adı verilen AQEKAEMTA[R/H]DPXKEMAHK[E/K][A/E][K/R] konsensus dizisiyle tanımlanırlar (Tablo 2.1). LEA4 proteinleri için gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda proteinlerdeki ilk 70-80 bakiyenin alfa-heliks yapısı oluşturabildiği, geri kalan proteinin ise rastgele sarmal bir konformasyonda bulunduğu tahmin edilmektedir (Kyte ve Doolittle, 1982).



**Tablo 2.1:** LEA proteinlerinin korunmuş amino asit dizileri.

Grup	Motif	Korunmuş Amino Asit Dizisi
LEA 1 (D-19)	1	T V V P G G T G G K S L E A Q E (H/N) L E A
	2	T R K E Q (L/M) G (T/E) E G Y (Q/K) E M G R K K G G (L/E)
	3	D (K/E) S G G E R A (A/E) (E/R) E G I (E/D) I D E S K (F/Y)
LEA 2 (D-11)	K	(E/K/R) K K G (I/L/M/F) (M/L/K) (D/E) K I K (E/D) K (L/I) P G
	S	(L/H) H R S G (S/H) (W/S) S S S S S (D/E) (D/E) (D/E)
	Y	(R/Q) (T/V) D E Y G N P (V/I) (H/Q)
LEA 3 (D-7)	1	G (G/S) (V/F) L (Q/S) Q (T/A) G E (Q/K) V
	2	A (A/K/T) (D/E) A V K (H/N) T (L/F) G M
	3 <sup>a</sup>	T A Q (A/S) A K (D/E) K T (S/Q) (E/Q)
	5 <sup>a</sup>	(A/T) (T/A) (E/Q) A (A/T) K (Q/E) K A (S/A) E
	4	S Y (K/R) A G E T K (G/A) (R/K/Q) K (T/A)
LEA 3 (D-29)	1 <sup>a</sup>	T (A/A) E K A G E Y K D Y
	4 <sup>a</sup>	T (V/A/M) (E/Q) K (A/T) (K/R) E (A/T) K D (T/A)
	2 <sup>a</sup>	A Y (E/D) K A G S A K D (M/A)
	3	A A Q K (A/S/T) K (D/E) Y A G (D/D/S)
	5	E S W (T/A) (E/G) W A K (E/D) K I
LEA 4 (D-113)	1	(A/V) (Q/E) E K (A/V) E (K/R) (A/M) T (A/T) (R/H) (D/T) (P/K) X (E/Q) K E (M/I/L) A (H/T) (E/Q) (K/R) K (E/K) (A/E) (K/R)
	2	M (Q/E) (S/A/T) A K E (K/T) (A/V) (S/A/K) (N/D) (M/V) (A/G) (A/S) (S/A) A K (A/E/S) (G/K) (M/V) (E/D) (K/I) T K A (K/T)
	3	(E/Q) A (E/K) M (D/E) (K/L) (H/Q) (Q/A/E) (A/E) (K/R) (A/E) H (H/N) (A/R) (A/E) E (K/A/R) (Q/E)
	4	(P/G/H) (T/M) G (T/A) H Q (M/T) S A (L/M) P G H G T G Q P (T/A) G H V (V/T) (E/D) G
LEA 6 (LEA-18)	1	L E D Y K (M/R) (Q/K/R) (G/A) Y G (T/A) (Q/E) G H (Q/L) (Q/E/P) (P/V) (K/S) (P/D) (G/V) (R/P) (G/H)
	2	(G/S) (S/G/A) T (D/E) A P T (L/I) (S/P) G (G/A/T) A (V/L)
	3	T D (A/T) I N R H (G/Q) V P
	4	(G/Q) L P (T/V) (E/D/S) (T/D) (S/P) P Y (V/T)
LEA 7 (ASR)	1	A A G A (Y/F) A L H E (K/E) H K A K K D P E H A H R H H K I
	2	E (I/V) A A (A/V) A A (V/A) G (A/S) G G (F/Y) (A/V) (F/Y) H E H H (E/Q) K K (E/D) (A/D) (K/H)
	3	(D/K) Y (K/R) K E E K H H K H (M/L) (E/Q) (H/Q) (L/I) G E (L/M) G (A/T) (V/M)
	4	(H/W) H H H H (L/F) (F/R) H H (H/K) (K/Q) (D/Q)
	5	(E/K) E (E/D) (E/Q) E (A/H) (H/E) G K K H H H (L/F) F

(A: Alanin; C: Sistein; D: Aspartik Asit; E: Glütamik Asit; F: Fenilalanin; G: Glisin; H: Histidin; K: Lizin; L: Lösin; M: Metiyonin; N: Asparajin; I: İzolösin; P: Prolin; Q: Glütamin; R: Arjinin; S: Serin; T: Treonin; V: Valin; W: Triptofan; Y: Tirozin)

LEA5 Proteinleri (Hidrofobik veya Atipik LEA Proteinleri): Bu grupta bulunan proteinler yüksek derecede hidrofobiktirler. Fizikokimyasal özelliklerine bakıldığında bu proteinler kaynatma derecesine kadar ısıtıldıklarında globüler bir yapı olarak çözünme özelliği göstermezler (Baker ve diğ., 1988; Galau ve diğ., 1993; Cuming, 1999). Bu grup ile ilişkili çok az bilgi olmasına rağmen, var olan bilgilere bakıldığında tohum gelişiminin geç evrelerinde kuraklık, UV ışığı, tuzluluk, düşük sıcaklık ve yaralanma gibi stres koşulları altında, transkriptlerin biriktiği görülmektedir (Kiyosue ve diğ., 1992; Maitra ve Cushman, 1994; Zegzouti ve diğ., 1997; Stacy ve diğ., 1999; Park ve diğ., 2003; Kim ve diğ., 2005).

LEA6 Proteinleri (PVLEA18): Bu proteinler yüksek derecede korunmuş yapılarıyla karakterize edilirler ve içerdikleri 4 çeşit motif ile diğerlerinden ayrılırlar. Bu gruba ait ilk keşfedilen protein, fasulyede (*Phaseolus vulgaris*) saptanmış olan PvLEA18 proteindir (Colmenero-Flores ve diğ., 1997). Motif 1 içerisinde prolin (Pro) ve treonin (Thr) bakiyeleri sırasıyla 6. ve 7. pozisyonlarda bulunmaktadır; ayrıca bu motif LDYK dizisini de içinde barındırmaktadır. Motif 2 ise %100 korunmuş bir yapıya sahiptir. Genel olarak bu proteinler son derece hidrofilitirler, sistein ve triptofan bakiyeleri barındırmazlar, ayrıca yüksek sıcaklığa maruz bırakıldıklarında koagüle olmazlar. Bu grup içerisinde yer alan proteinlerin fonksiyonlarını belirten herhangi bir bilgi olmamasına karşın *in vitro* dehidrasyon çalışmaları sonucunda PvLEA18, diğer gruplarda (2, 3 ve 4) yer alan LEA proteinlerinden farklı olarak haberci enzimlerin dehidrasyon inaktivasyonunu sağlamaktadır (Reyes ve diğ., 2005). Böylelikle bu grupta yer alan proteinlerin moleküler hedeflerinin diğer LEA proteinlerinden farklı olduğu ve proteinlerdeki hidrofilik özelliklerin su eksikliğinde ortaya çıkan tek koruyucu özellik olmadığı görülmüştür.

LEA7 Proteinleri (ASR1): Diğer LEA proteinleri ile aynı fizikokimyasal özellikleri taşımalarına rağmen su eksikliği halinde diğer tüm proteinlerde olduğu gibi geç embriyogenez döneminde tohum içerisinde birikirler (Maskin ve diğ., 2008). Ayrıca ASR genlerinin tuz, soğuk ve ışık şiddetinin çok az olduğu çeşitli stres koşullarına da yanıt verdiği görülmüştür (Silhavy ve diğ., 1995; Padmanabhan ve diğ., 1997; Doczi ve diğ., 2005). Çeşitli monokotil ve dikotil bitki türlerinin yanı sıra (Silhavy ve diğ., 1995; Rossi ve diğ., 1996; Wang ve diğ., 1998; Vaidyanathan ve diğ., 1999) *Pinus taeda* (Padmanabhan ve diğ., 1997) ve *Ginkgo biloba* (Shen ve diğ., 2005) gibi gimnosperm

çeşitlerinde de ASR genleri saptanmıştır. Bilinen tüm ASR proteinleri yüksek düzeyde korunmuş bölgelere sahiptir.

#### **2.2.2.2. LEA Proteinlerinin POPP Programına Göre Sınıflandırılması**

POPP, peptit yapılarına bağlı olarak bilinmeyen proteinlerin kompozisyonlarındaki farklılıkları belirlemek amacıyla kullanılan bir bilgisayar yazılım programıdır (Wise, 2002). POPP ile LEA proteinleri 4 ayrı gruba ayrılmıştır (Wise, 2003; Wise ve Tunnacliffe, 2004).

Grup 1: Bu grup LEA 1 proteinlerini ve 2 alt grubu içermektedir. Grup 1a proteinleri DNA'ya bağlanan nüklear proteinler olarak düşünülmektedir. Grup 1b'nin ise RNA ve ATP'ye bağlanabildiği, giraz ve şaperon aktivitesi gibi daha geniş fonksiyonlara sahip oldukları var sayılmaktadır (Shih ve diğ., 2008). Grup 1 polipeptitlerinin %70'ten fazlası rastgele heliks formundadır. Hidrofilik ve rastgele sarım yapısı, LEA proteinleri grup 1'in kurumakta olan hücrelerin su kaybını önleme fonksiyonunu belirlemektedir.

Grup 2: LEA 2 proteinlerini ve bazı LEA 4 proteinlerini içermektedir ve POPP'ta iki ayrı alt gruba ayrılmaktadır. Korunmuş 15 aminoasitlik lizin dizisi EKKGIMDKIKEKLPK olan K segmenti ile karakterize edilirler. K segmentinin olası amfipatik  $\alpha$  heliks yapısı makromoleküllerin yüzeyi ile hidrofobik etkileşim gösterirler (Campbell ve Close, 1997).

Grup2a: Soğuğa toleranslı olmayan, geç embriyogenezde biriken tüm Grup 2 proteinlerini içerir. 2 alt ailesi bulunmaktadır. Bunlardan SF1 proteinleri, onarımla ilgili olup DNA'nın nükleozom yapısının açılmasıyla ilgili proteinlerdir. SF10 proteinleri ise, DNA'ya bağlanan proteinler ve hücre iskeleti proteinlerini içerir. Y motiflerine benzer motif içerirler (Wise ve Tunnacliffe, 2004).

Grup2b: Soğuğa toleranslı ve geç embriyonezde sentezlenmeyen proteinleri içerir. SF3 proteinleri SF1'de olduğu gibi DNA'nın nükleozom yapısının açılmasıyla ilgili proteinler olmakla birlikte,  $Ca^{+2}$  bağlama ve şaperon proteinlerini içerirler (Shih ve diğ., 2008).

Grup 3: LEA 3 proteinlerini ve bazı LEA 4 proteinlerini içermektedir. Korunmuş amino asit dizisi olan TAQAAKEKAGE ile 11 bazlık amino asit tekrarlarını içerir. Bu motif,

uygun amfilik  $\alpha$ -heliks yapısı ile polipeptitlerin dimerizasyonuna izin verebilir. Motif içindeki yüklü amino asitlerin düzeninin fonksiyonu dehidrasyon koşullarında iyonların birikimine olanak sağlamaktadır (Dure, 1993). İki alt gruba ayrılır: Grup 3a; SF2 proteinleri şaperonlar, tropomiyozin, fosforilasyon ve stres aktin bağlayıcı proteinleri içerir, Grup 3b; SF5 proteinleri nüklear ve DNA'ya bağlanan proteinleri, histonları, özellikle H1 histonunu içerir (Shih ve diğ., 2008).

Grup 4: LEA 5 proteinlerini içerir. Şaperonları ve kromatinle bağlanmış nüklear proteinleri içerir (Shih ve diğ., 2008). Tekrar motifi içermezler fakat iyi korunmuş amino ucu domeni içerirler. Bu domenin iyon ve hücre zarı ile etkileşimde olan amfilik  $\alpha$  heliks yapıda olduğu tahmin edilmektedir (Bray, 1993; Imai ve diğ., 1995). Su bağlayan proteinin alternatif fonksiyonu grup 4 pamuk LEA proteini D-113'ün karboksil ucundaki rastgele sarmallanması temel alınarak saptanmıştır (Dure ve diğ., 1993).

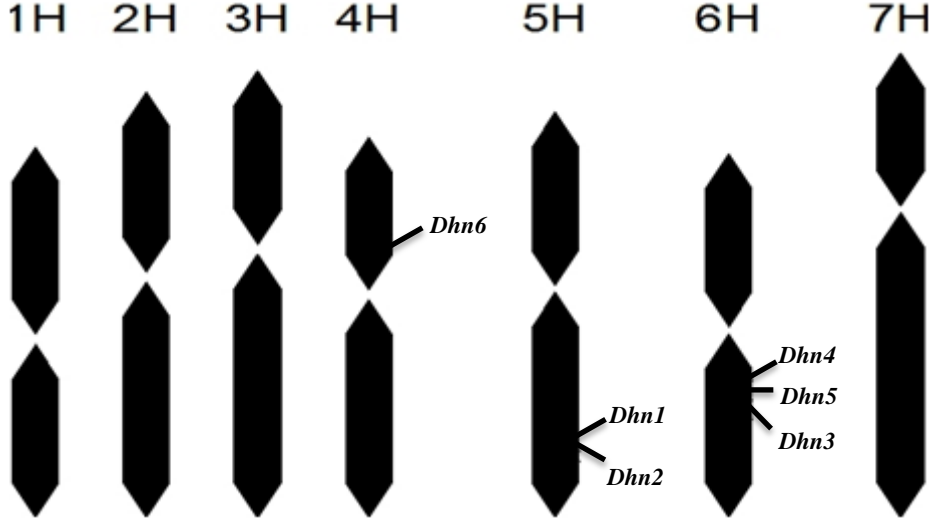
### 2.2.3 Dehidrinler

Dehidrinler, grup 2 LEA proteinlerinin bir alt sınıfıdır. Dehidrin terimi ilk olarak 1989 yılında kullanılmıştır. Hidrofilinler olarak bilinseler de yaygın isimleri *dehidrin* olup dehidrasyon koşullarında indüklenen proteinler anlamına gelmektedir (Close ve diğ., 1989).

Dehidrinler embriyonun geç dönemi ve tohumların olgunlaşma süresince ortamda oluşan tuzluluk, su eksikliği, kuraklık, düşük sıcaklık ve ABA uygulamaları ile aynı zamanda fotoperiyod değişimlerinde indüklenmektedir (Close, 1996; Svensson ve diğ., 2002). Bazı dehidrinlerin ise doğal büyüme periyotlarında da anlatımlarının yapıldığı belirlenmiştir (Nylander ve diğ., 2001; Rodriguez ve diğ., 2005; Rorat ve diğ., 2004; 2006). Dehidrinler, açık tohumlu bitkiler, kapalı tohumlu bitkiler, algler ve yosunlar gibi birçok fotosentetik canlıda tespit edilmiştir (Svensson ve diğ., 2002).

Günümüzde arpa kromozomlarında tanımlanmış 13 adet *Dhn* geni bulunmaktadır (Choi ve Close, 2000; Svensson ve diğ., 2002; Rodriguez ve diğ., 2005). *Dhn* geni, 7 arpa kromozomundan 4 tanesine dağılım göstermiştir. Genlerin kromozomlar üzerindeki dağılımı şu şekildedir; 3. kromozomda *Dhn10* ve *Dhn11*, 4. kromozomda *Dhn6*, 5.

kromozomda *Dhn13*, *Dhn1*, *Dhn2* ve *Dhn9* ve 6. kromozomda ise *Dhn3*, *Dhn4*, *Dhn5*, *Dhn7*, *Dhn8* ve *Dhn12* yer almaktadır (Şekil 2.5; Choi ve diğ., 2000).



**Şekil 2.5:** Dehidrin (*Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3*, *Dhn4*, *Dhn5* ve *Dhn6*) genlerinin arpa kromozomları üzerindeki konumları (Close, 1996).

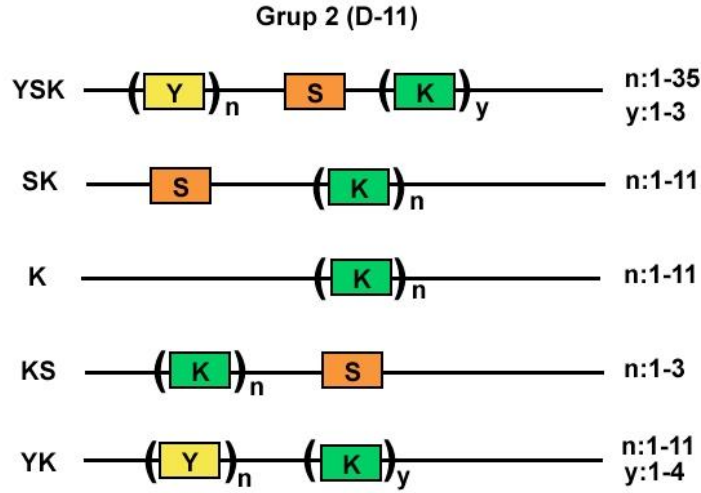
*Arabidopsis thaliana*'da ise 10 *Dhn* geninin 6 tanesi tanımlanabilmiş, bunların 8 tanesinin duplikasyon ile oluştuğu bildirilmiştir (Hundertmark ve Hincha, 2008). Arpada, *Dhn3* ve *Dhn4* genlerinin kuraklık stresi altında erken anlatımlarının yapıldığı belirlenmiştir (Park, 2006; Guo, 2009). Dehidrinlerin büyüklüğü 82-648 amino asit arasında değişmektedir (Close, 1996). Yapılan çalışmalarda protein büyüklüğü 5.3-66.3 kDa (ortalama 18.3 kDa) arasında değiştiği saptanmıştır. Moleküler ağırlığındaki bu farklılığın nedeninin tekrarlı K segmentlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Shih ve diğ., 2008).

Dehidrinler, K - S - Y -  $\Phi$  (Fi segmenti) segmentleri olarak isimlendirilen korunmuş 4 segment içerirler (Close, 1996). Dehidrinlerin yapısal özelliklerini belirlemede, lizince zengin korunmuş K segmenti (EKKGIMDKIKEKLP), serin bakiyelerince zengin S segmenti (SSSSSS) ve daha az oranda bulunan Y segmenti ([V/T]DEYGNP), ayrıca K segmentlerinin arasında bulunan polar amino asitlerce zengin olan Fi segmentleri yer almaktadır (Close, 1996; 1997; Hughes ve Galau, 1989).

Tüm dehidrinler, en az bir K segmentine (EKKGIMDKIKEKLP) sahiptir. Bu K segmenti genellikle proteinin karboksil ucunda bulunmaktadır ve amfipatik sarmal yapı

oluşturma özelliğine sahiptir. K segmentinin sahip olduğu sarmal yapı hücre zarı ve proteinler ile etkileşimde rol oynayabilmesini sağlamaktadır (Koag ve diğ., 2009; Hughes ve Graether, 2011). S segmenti, fosforilasyon aracılığıyla değişime uğrayabilir ve protein konformasyonunda, iyon bağlama aktivitesinde düzenleyici bir görev alabileceği düşünülmektedir (Jensen ve diğ., 1998; Alsheikh ve diğ., 2005). Y segmenti (DEYGNP) amino ucuna yakın bölgede yer almaktadır ve çeşitli organizmalarda şaperon proteinlerinin nükleotit bağlanma bölgelerindeki motiflerle kısmi amino asit benzerliği göstermektedir (Close, 1996).

K, S, Y ve Fi segmentlerinin kombinasyonlarına bağlı olarak dehidrinler 5 alt sınıfa ayrılmıştır. Bunlar:  $Y_nSK_y$ ,  $SK_n$ ,  $K_n$ ,  $Y_nK_y$ ,  $K_nS$  şeklindedir (Şekil 2.6; Campbell ve Close, 1997). Her motif farklı koşullar altında dehidrasyon stresine yanıt vermektedir;  $Y_nSK_y$  motifi ABA ve dehidrasyona yanıt gösterirken, düşük sıcaklıkta herhangi bir yanıt göstermemektedir.  $K_n$  ve  $Y_nK_y$  motifleri düşük sıcaklığa;  $SK_n$  tuzluluk, düşük sıcaklık, kuraklık veya yaralanma gibi etkilere;  $K_nS$  ise kuraklık ve düşük sıcaklığa yanıt vermektedir (Rorat, 2006).



**Şekil 2.6:** Grup 2, protein dizilerindeki motiflerin çeşitleri ve yerleşimleri (n, y; tekrarlanma sayısı).

### 2.2.3.1. Arpada Dhn3 Varyasyonu

*Dehidrin* genlerinin arpadaki allelik varyasyonları ilk kez Choi ve diğ. (1999) tarafından Dicktoo arpa varyetesinde incelenmiş olup, genlerin kromozomal lokasyonları, protein motifleri ve promotör bölgedeki cis-etkili (“cis-acting”) elementler tanımlanmıştır.

Arpada *Dhn3* ve *Dhn4* genlerinin bağlantılı olduğu, her iki genin 6. kromozom üzerinde buldukları bilinmektedir (Choi ve diğ., 1999).

Arpada *Dhn1*, *Dhn2*, *Dhn3* ve *Dhn4* genlerine özgü problar oluşturularak hibridizasyon çalışmalarında kullanılmış ve *Dhn3* lokusunun polimorfik olmadığı, tek kopya içerdiği saptanmıştır (Lang ve diğ., 1998). Ek olarak, *Dhn* lokusunun yakınında BARE retrotranspozonlarına rastlanmış ve dehidrin gen ailesinin şekillenmesinde duplikasyon ve transpozisyon mekanizmalarının rol oynamış olabileceği önerilmiştir (Mamminen ve Schulman, 1993; White ve diğ., 1994). Arpanın on dört varyetesinde dehidrin genlerindeki dizi varyasyonları incelenmiş ve sadece *Dhn3*'te uzunluk polimorfizmi saptanmıştır (Lababidi ve diğ., 2004). Diğer yandan, *Hordeum spontaneum*'daki *Dhn3* genlerinin allelik varyasyonlarına ilişkin literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle tez çalışmasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden orijinlenen yabani arpalarda (*H. spontaneum*) *Dhn3* geni dizilerek allelik varyasyonu incelendi. Çalışmada üç bölgeden (Marmara, Ege, Güneydoğu Anadolu) orijinlenen 21 *H. spontaneum* aksesyonunun *Dhn3* dizileri PCR ile izole edildi. Allelik varyasyon elektroforetik olarak incelendikten sonra *Dhn3* geni bir vektöre klonlanarak dizilendi. Diziler gerek DNA, gerekse protein düzeyinde analiz edilerek sınırlı bir *H. spontaneum* germplazmında polimorfizmin derecesi araştırıldı.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

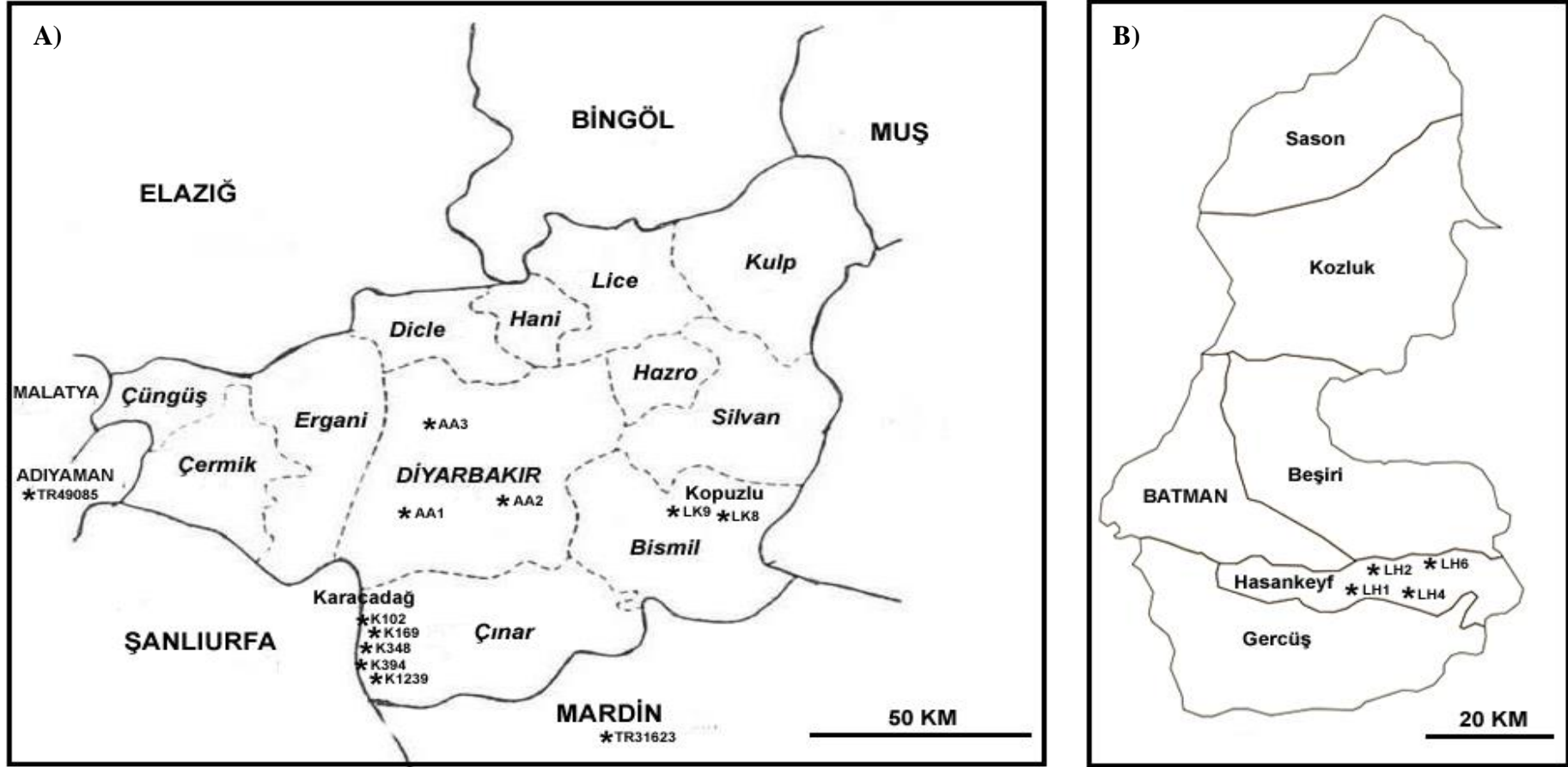
#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ

Çalışmada kullanılan *H. spontaneum* aksesyonları, orijin aldıkları bölgeler ve temin edildikleri yıllar Tablo 3.1’de verilmiştir. Çalışmaya daha önce yürütülmüş olan BAP 4712 numaralı projede dizilenmiş aksesyonlar da dahil edildi. Aksesyonlardan TR kodlu olanlar İzmir Menemen Zirai Araştırma Enstitüsü Gen Bankası’ndan, Hs01 no’lu hat Prof. Dr. Hikmet Budak’tan ve bu hatların dışında kalan örnekler Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bilimleri Bölümü’nden temin edildi. *H. spontaneum* aksesyonlarından ikisi (İzmir, Çanakkale) haricindeki tüm hatlar Güneydoğu Anadolu Bölgesi orijinelidir. Bunlardan 12’si Diyarbakır’dan (Karacadağ, Bismil), diğerleri ise Adıyaman, Gaziantep, Mardin, Batman (Hasankeyf) illerinden toplanmıştır (Şekil 3.1).

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan aksesyonlar ve bilgileri.

	Aksesyonlar	Lokasyon	İlçe	Toplanma Yılı	Dizileme Durumu
<i>Hordeum spontaneum</i>	AA1	Diyarbakır	Merkez	2012	Bu çalışma
	AA2	Diyarbakır	Merkez	2012	Bu çalışma
	AA3	Diyarbakır	Merkez	2012	Bu çalışma
	K102	Diyarbakır	Karacadağ	2012	Bu çalışma
	K169	Diyarbakır	Karacadağ	2012	Bu çalışma
	K348	Diyarbakır	Karacadağ	2012	Bu çalışma
	K394	Diyarbakır	Karacadağ	2012	Bu çalışma
	LH1	Batman	Hasankeyf	2012	Bu çalışma
	LH2	Batman	Hasankeyf	2012	Bu çalışma
	LH4	Batman	Hasankeyf	2012	Bu çalışma
	LH6	Batman	Hasankeyf	2012	Bu çalışma
	LK8	Diyarbakır	Kopuzlu	2012	Bu çalışma
	LK9	Diyarbakır	Kopuzlu	2012	Bu çalışma
	TR50358	Diyarbakır	-	2011	Bu çalışma
	K1239	Diyarbakır	Karacadağ	2012	BAP 4712 Nolu proje
	TR31623	Mardin	-	2010	BAP 4712 Nolu proje
	TR40812	Gaziantep	-	2010	BAP 4712 Nolu proje
	TR47002	İzmir	-	2010	BAP 4712 Nolu proje
	TR4982	Çanakkale	-	2010	BAP 4712 Nolu proje
	TR49085	Adıyaman	-	2011	BAP 4712 Nolu proje
Hs01	Diyarbakır	-	-	BAP 4712 Nolu proje	
<i>Hordeum vulgare</i>	Tokak 157/37	-	-	-	BAP 4712 Nolu proje
	Erginel90	-	-	-	BAP 4712 Nolu proje





Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan *H. spontaneum* aksesyonlarının orijin aldıkları il ve ilçelerdeki toplanma yerleri.

A) Diyarbakir ilçelerindeki toplama bölgeleri, B) Batman ilçesindeki toplama bölgesi (\*Örnek toplama lokasyonları).

### 3.1.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

Arpa tohumları torf tipte toprak içeren saksılarda, 1 cm derinliğe ekilerek bitki kabininde (Angelantoni, Ekochl 700) 16 saat ışık - 8 saat karanlık fotoperiyodunda, %50-60 nem ve  $600 \mu\text{Mol/m}^{-2}\text{s}^{-1}$  floresan ışık şartlarında yetiştirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: *H. spontaneum* tohumlarının yetiştirilmesi.

### 3.2. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA, standart koşullarda yetiştirilmiş arpa fidelerinin 3 yapraklı aşamasında, bitkinin yapraklarından CTAB (“Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”) yöntemi ile izole edildi (Weining ve diğ., 1991). En az 100 mg arpa yaprağı soğutulmuş havana alınarak, sıvı azot ile toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler 1.5 ml’lik mikrotüplere alındıktan sonra üzerine 2X CTAB (Tablo 3.2) tamponu ( $65^{\circ}\text{C}$ ’de ısıtılmış) eklendi. Karışım vortekslendi ve  $350 \mu\text{l}$  8 M LiCl eklendi. Tüplere  $10 \mu\text{l}$ , 10 mg/ml RNaz ilave edildi ve homojen şekilde karışması sağlandı.  $65^{\circ}\text{C}$ ’lik su banyosunda 30 dk tutulan tüplerde karışımın 2 faz haline gelmesi sağlandı. Tüpler sık aralıklarla (5 dakikada bir) ters yüz edilerek karıştırıldı. Tüplere  $700 \mu\text{l}$  kloroform:izoamilalkol (24:1, v:v) eklendi ve hafifçe karıştırıldı. 14.000 rpm’de (Beckman, Microfuge 18 centrifuge, Rotor; F2402 5P) 30 sn santrifüj edildi ve üst sıvı yeni bir tüpe alındı. Yeni tüpe alınan üst sıvının hacmi kadar kloroform:izoamilalkol (24:1, v:v) tüpe eklenerek 14.000 rpm’de 30 sn süre ile santrifüj edildi ve üst sıvı yeni bir tüpe alındı. Toplanan üst sıvıya 1/10 hacim olacak şekilde 3 M sodyum asetat ve 2 hacim soğuk saf etanol eklenerek nazikçe

karıştırıldı. Tüpler  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat tutuldu ve oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Üst sıvı atıldı. Dibe çöken DNA iki kere %70'lik etil alkol ile yıkandı. Tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdının üzerine konuldu ve alkolün uçması sağlandı.  $65^{\circ}\text{C}$ 'de ısıtılan 50  $\mu\text{l}$  TE (Tris-EDTA) tamponu ile çökelti süspansiyonu edildi.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) kullanılarak  $\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times \text{katsayı (50)}$  formülüne göre hesaplandı.

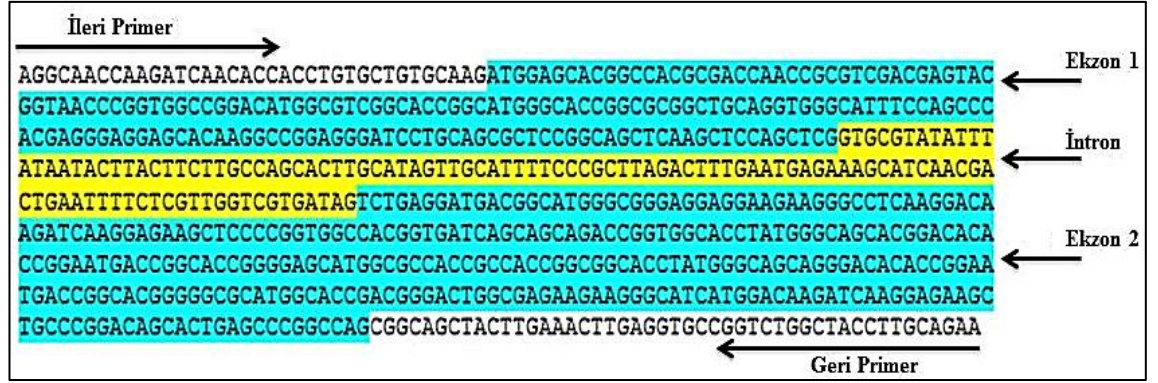
**Tablo 3.2:** Genomik DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler.

Tampon	Bileşen	Konsantrasyon
2X CTAB Tamponu	CTAB	%2
	Tris	100 mM
	EDTA (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	1.4 M
Tris-EDTA (TE) Tamponu	Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
	EDTA (pH 8.0)	1 mM

### 3.3. *DEHİDRİN3 (DHN3) GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE ÇOĞALTILMASI*

#### 3.3.1. Primer Tasarımı

*H. spontaneum* bitkilerinden *DHN3* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltımı amacıyla AF043089.1 aksesyonundaki diziye uygun olarak Şekil 3.3'te gösterilen şekilde primerler tasarlandı. Primer tasarımında bu dizinin, ekzon 1, intron ve ekzon 2 bölgelerini içerecek şekilde olmasına dikkat edildi. Primer tasarımında Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) programı kullanıldı.



Şekil 3.3: AF043089.1 aksesyonundaki ekzon 1, intron ve ekzon 2'nin (oklar) gösterimi ve primerlerin konumları.

### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışmada kullanılan örneklerden izole edilen DNA'lar ile klasik polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. Tablo 3.3'te gösterilen primerler ile *Dhn3* bölgesi çoğaltıldı.

Tablo 3.3: *Dhn3* geninin PZR ile çoğaltımında kullanılan primer çifti.

Primer Adı	Primer dizisi	Ürün Boyutu (bp)	Tm
Dhn3F	5' AGG CAA CCA AGA TCA ACA CC 3'	674	65 °C
Dhn3R	5' TTC TGC AAG GTA GCC AGA CC 3'		

Toplam hacmi 25 µl olan PZR karışımı, Tablo 3.4'te gösterildiği gibi hazırlandıktan sonra PZR cihazına (G-Storm, GT-10772) konuldu ve Tablo 3.5'te belirtildiği gibi döngüler programlandı.

Tablo 3.4: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Stok	Hacim	Final
dH <sub>2</sub> O		12.4 µl	
Taq DNA polimeraz tamponu	10 x	2.5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1 µl	0.4 mM
İleri Primer	10 µM	1 µl	0.4 µM
Geri Primer	10 µM	1 µl	0.4 µM
DNA	10 ng/µl	5 µl	2 ng/µl
Taq DNA polimeraz	5 U/µl	0.1 µl	0.02 U / µl
Toplam hacim		25 µl	

**Tablo 3.5:** Klasik PZR döngüleri.

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk	1
Denatürasyon	95 °C	1 dk	35
Bağlanma	61 °C	40 sn	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	15 dk	1
Bekleme	10 °C	∞	

PZR ürünleri %1 lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. PZR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu kullanıldı. %1'lik jel için 0.4 gram agaroz (Sigma, A5093) tartılıp üzerine stok 50X TAE tamponunun (Tablo 3.6) sulandırılmasıyla hazırlanan, 40 ml 1X TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında 2-3 dakika süre ile çözüldürüldü. Oda sıcaklığında yaklaşık 50-60°C'ye kadar soğutulan jel solüsyonuna 2 µl etidyum bromür (10 mg/ml) eklenip, karıştırıldı. Jel solüsyonu, tarağın yerleştirilmiş olduğu yatay elektroforez kasedine dökülerek, 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaştıran agaroz jel, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 5 µl örnek, 1 µl yükleme tamponu (Fermentas, #R0611) ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara yüklenerek 70 V sabit akımda, markır (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder) ile birlikte 45 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör (Avegene, X-lite 200) ile görüntülendi.

**Tablo 3.6:** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

Adı	Bileşenler	Final Konsantrasyon
Tris-Asetat (TAE) Tamponu	Tris Bazı	2 M
	Glasiyel Asetik Asit	% 0.0571
	EDTA (pH 8.0)	50 mM
6X Elektroforez Yükleme Tamponu	Yükleme Boyası (Fermentas, R0611)	1X

### 3.4. POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

*Dhn3* geninin heterozigositesi poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile analiz edildi. PAGE analizinde kullanılan 5X TBE (Tris/Borat/EDTA) solüsyonu hazırlamak için 54 gr tris ile 27.5 gr borik asit 800 ml distile su (dH<sub>2</sub>O) içerisinde çözüldürüldü. Ardından

üzerine 20 ml 0.5 M EDTA eklendi ve tekrar dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlandı. Analiz %8'lik poliakrilamid jel kullanılarak gerçekleştirildi. %8'lik PAGE için Tablo 3.7'de gösterilen bileşenler karıştırıldı ve ultrasonik su banyosunda 30 saniye bekletildi. Ardından sıvı haldeki jel solüsyonu dikey elektroforez kasetine döküldü ve tarak yerleştirildi. Jelin polimerize olması için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi.

**Tablo 3.7:** Poliakrilamid jel hazırlanması için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Miktarı
(%40) Akrlamid-Bisakrlamid 37.5:1	2 ml
5X Tris Borikasit EDTA (TBE)	2 ml
Amonyum persülfat (%10)	100 µl
TEMED	10 µl
dH <sub>2</sub> O	7 ml

Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarıldı ve kuyucuklar 5X TBE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 1X TBE tamponu ile yıkandı. Jel kaseti dikey elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1X TBE tamponu ile dolduruldu. 5 µl PZR ürünü, 1 µl yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra taraklarla oluşturulan kuyucuklara yüklendi. Jel 40 voltta 5 saat yürütüldükten sonra jel kasetten çıkartıldı. Ardından 5 µl EtBr (10 mg/ml) içeren 100 ml 1X TBE'de 15 dakika boyunca yavaşça çalkalandı. Süre sonunda jel, UV transillüminatörü ile görüntülendi.

### 3.5. *DHN3* GENİNİN KLONLANMASI

#### 3.5.1. PZR Ürünlerinin Klonlanması

PZR sonucunda elde edilen *Dhn3* ampliconları ticari kit (InsTAclone PCR Cloning Kit Thermo Scientific, K1213) kullanılarak, pTZ57R/T vektörüne aktarıldı. Her arpa örneğine ait *Dhn3* ampliconu için pTZ57R/T vektörüne ayrı ayrı ligasyon işlemi gerçekleştirildi.

Ligasyon işlemi için 3 µl PZR ürünü, 6 µl ligasyon tamponu, 17 µl steril su, 3 µl pTZ57R/T vektörü ve 1 µl enzim (T4 DNA Ligaz) olacak şekilde toplamda 30 µl'lik bir karışım hazırlandı. Karışım oda sıcaklığında 2-3 saat bekletildi ve *Escherichia coli* JM107 bakteri ırkına transformasyon işlemi için hazır hale getirildi.

### 3.5.2. Transformasyon

Transformasyon işlemi için *E. coli* JM107 hücrelerini kompetan (yeterli) hale getirebilmek ve klonlama işlemini gerçekleştirebilmek için firmanın önerdiği protokol değiştirilerek aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Klonlama kitinin bileşenlerini olan C solüsyonundan 750 µl alınarak mikrosantrifüj tüpü içine konuldu ve üzerine *E. coli* JM107 hücrelerinden 150 µl eklendi. 37°C'de 40 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.
2. İnkübe edilen hücreler 2 dakika 6000 rpm'de santrifüj edildi ve santrifüj sonunda üstte kalan sıvı döküldü.
3. Tüpe 75 µl T.A ve 75 µl T.B solüsyonlarından eklendi ve 5 dakika buz içerisinde bekletildi.
4. 5000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
5. Daha sonra tüpün içerisine 50 µl T.A ve 50 µl T.B solüsyonlarından eklenip 5 dakika daha buz içerisinde bekletildi. Bu işlemin sonunda JM107 hücreleri kompetan hale gelmiş oldu.
6. Ardından tüpün içerisine 5 µl klonlama karışımından eklendi ve 10 dakika buzda bekletildi.
7. Son olarak karışımından 55-60 µl alınarak, ampicilin (50 µg/ml), X-Gal (20 mg/ml) ve IPTG (100 mM) içeren LB besiyerinin bulunduğu petrilere steril L baget ile yayıldı.
8. Petriler 37°C'de 16 saat inkübe edildi.

### 3.5.3. Transformant Hücrelerin Analizi

Transformasyonun ardından petrilere gözlenen koloniler LacZ (mavi/beyaz) seleksiyonuna göre seçildi. Üreyen beyaz kolonilerin rekombinant olup olmadıkları koloni PZR yaparak belirlendi.

Steril pipet ucu ile her petriden 3 beyaz koloni alındı ve bu koloniler 10 µl steril dH<sub>2</sub>O içeren steril santrifüj tüplerinde nazıkçe süspansiyon edildi. Karışımın 2 µl'si koloni PZR'de kalıp DNA olarak kullanıldı. Rekombinant DNA'nın varlığının belirlenmesi için Tablo 3.8'de gösterilen primerler ile Tablo 3.9'da gösterilen bileşenler kullanılarak koloni PZR gerçekleştirildi. PZR döngüleri Tablo 3.10'da belirtildiği şekilde programlandı. Reaksiyon sonunda koloni PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde 45 dakika

yürütülerek kontrol edildi. Beklenen büyüklükte bant veren koloniler 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve kültür 37°C'de 180 rpm'de 16-18 saat inkübe edilerek üretildi. Süre sonunda kültür çöktürülerek plazmit izolasyonu yapıldı.

**Tablo 3.8:** Koloni PZR'da kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer dizisi	Ürün Boyutu	Tm
M13PucF	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'	174	53°C
M13PucR	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'		

**Tablo 3.9:** Koloni PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Reaksiyon Bileşenleri	Stok Konsantrasyon	Hacim	Final
ddH <sub>2</sub> O		12.4 µl	
Taq DNA Polimeraz Tamponu	10 x	2.5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 µl	2 mM
dNTP	10 mM	1 µl	0.4 mM
İleri Primer	10 µM	1 µl	0.4 µM
Geri Primer	10 µM	1 µl	0.4 µM
DNA	10 ng/µl	5 µl	2 ng/µl
Taq DNA Polimeraz	5 U/µl	0.1 µl	0.02 U / µl
Toplam Hacim		25 µl	

**Tablo 3.10:** Koloni PZR döngüleri.

Döngüler	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94 °C	2 dk	1
Denatürasyon	94 °C	20 sn	30
Bağlanma	48 °C	20 sn	
Uzama	72 °C	30 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	1
Bekleme	10 °C	∞	



### 3.5.4. Plazmit İzolasyonu

Bakteri kültürlerinden plazmit izolasyonu PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, K2100-10) kullanılarak firmanın önerdiği protokol değiştirilerek aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Bakteri kültüründen 2 ml alınarak mikrosantrifüj tüpü içerisine konuldu ve 14000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılarak çöktürüldü.
2. Üst sıvı atılarak 300 µl süspansiyon tamponu eklendi ve pellet homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.
3. Üzerine 250 µl lizis tamponu eklendi ve nazikçe homojen hale gelinceye kadar ters düz edildi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
4. Ardından 350 µl çöktürme tamponu eklendi ve homojen hale gelinceye kadar mikrosantrifüj tüpü ters düz edilerek karıştırıldı. 14000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonunda süpernatant filtre kolonuna aktarıldı. Filtre kolonu da yıkama tüpünün içerisine konularak 1 dk 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. Yıkama tüpünün içerisindeki sıvı döküldü ve filtre kolonu tekrar yıkama tüpünün üzerine konuldu.
6. Filtre kolonuna 700 µl yıkama tamponu eklendi ve 1 dk 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. Yıkama tüpünün içerisindeki sıvı döküldü ve filtre kolonu tekrar yıkama tüpünün üzerine konularak 1 dk daha 14000 rpm'de santrifüj yapıldı.
7. Filtre kolonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisine konuldu ve üzerine 65°C'de ısıtılmış 40 µl TE tamponu eklendi. 1 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
8. Son olarak 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi ve 1.5 ml tüp +4°C'de kısa süreli saklandı.

İzolasyon sonrasında plazmitlerin konsantrasyonları spektrofotometrede ölçüldü ve dizileme şirketine gönderilene kadar -20°C'de saklandı.

### 3.6. DİZİLEME

Dizileme M13Puc primerleriyle İontek A.Ş firması tarafından, "ABI Prism 310 Genetic Analyzer" cihazı ile çift yönlü olarak yapıldı. Dizileme sonucunda firma tarafından gönderilen sonuçlar Chromas Lite (versiyon 2.1.1) programında kontrol edilerek FASTA formatına çevrildi ve vektöre ait kısımlar görsel olarak belirlenerek çıkarıldı.

Ardından elde edilen ileri ve geri yöndeki diziler NCBI veritabanında “blastn” seçeneği ile karşılaştırıldı. Üst üste çakıştırılan DNA dizilerden karşılıklı olarak eşleşmeyen nükleotitler tek tek kromatogram üzerinde kontrol edildi. Dizileme sırasında oluşabilecek hatayı engellemek için eşleşmeyen nükleotitlerin seçiminde kromatogramda o noktada en yüksek pik seviyesi göstermiş olan nükleotitler seçildi. Her örnek için aynı işlem ayrı ayrı gerçekleştirildi ve çalışmada kullanılan tüm örneklerin *Dhn3* gen dizileri elde edildi.

### 3.6.1. Dizi Polimorfizminin Belirlenmesi

Nükleotit çeşitliliği ( $\pi$ ) DNA dizi seviyesinde genetik varyasyonun ölçülmesini sağlayan bir parametredir. Dizi polimorfizmini incelemek amacıyla önce gen içi nükleotit çeşitliliği hesaplandı ve tek nükleotit değişimleri (SNP) analiz edildi. Çalışmada  $\pi$  aşağıdaki formül kullanılarak MEGA Ver. 6.06 programında hesaplandı;

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{i,j} \hat{p}_i \hat{p}_j \pi_{ij}$$

Formüle göre;  $\pi_{ij}$  bir popülasyon içerisinde rastgele olarak ele alınan herhangi iki DNA dizisi arasındaki her bölge için tespit edilen nükleotit farklılıklarının ortalama sayısıdır (Nei ve Li, 1979).  $P_i$ , i dizisinin bulunma frekansını,  $p_j$ , j dizisinin bulunma frekansını, n ise tüm dizilerin toplam sayısını ifade etmektedir.

Nükleotit çeşitliliğini araştırmak amacıyla *Dhn3* dizileri önce ClustalW2 programında karşılaştırıldı (“alignment”) ve meydana gelen varyasyonların analizi için “.clustalw” uzantısı formatında kaydedilerek MEGA Ver. 6.06 programına aktarıldı. Nükleotit çeşitliliği gen içi bölgeler (5’ UTR, ekzon 1, intron, ekzon 2, 3’ UTR) ve *Dhn3* genine özgü segmentlerin DNA dizileri (Y, S, K, Fi segmenti) baz alınarak ayrı ayrı hesaplandı. Ayrıca, dizilerdeki SNP’ler ve insersiyon/delesyonlar MEGA (versiyon 6.06) programında incelenerek DNA üzerindeki pozisyonları belirlendi.

### 3.6.2. Filogenetik Dendrogram Oluşturulması

Çalışmada kullanılan örnekleri ikili olarak karşılaştırmak ve birbirlerine olan uzaklıklarını hesaplamak için Nei ve Kumar (2000)’a göre MEGA programındaki “Pairwise Distance” analizi kullanıldı. Ardından bu analize paralel olarak aritmetik

ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemine göre (UPGMA:“unweighted pair-group method with arithmetical averages”) dendrogram elde edildi. Tüm çalışmalarda referans olarak Dicktoo varyetesinin dizisi kullanıldı.

### **3.6.3. Protein Dizilerinin Analizi**

Ekzon bölgelerinin DNA dizileri MEGA programı ile amino asit dizilerine dönüştürüldü. Tüm amino asit dizileri üst üste karşılaştırıldı ve referans amino asit dizisine göre sinonim ve sinonim olmayan değişimler belirlendi. Ardından *Dhn3* genine özgü motifler tespit edildi ve bu bölgelerdeki sinonim olmayan değişimler saptandı.

Amino asit dizilerinin hidrofobisite değerleri, Expasy biyoinformatik araştırma paneli (<http://web.expasy.org/protscale/>) kullanılarak Kyte ve Doolittle (1982)'ye göre elde edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DNA SAFLIĞI VE MİKTARI

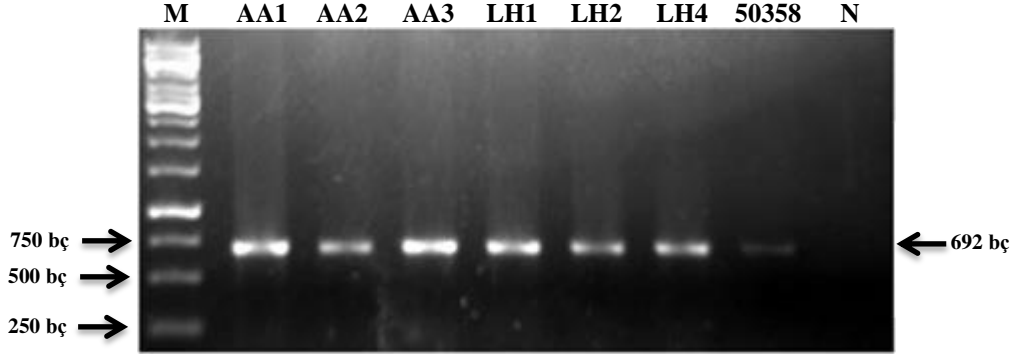
*H. spontaneum* bitkilerinden ve Tokak 157/37 varyetesinden CTAB yöntemi ile elde edilen genomik DNA'ların saflıkları ve miktarları Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1:** DNA miktarları ve saflık değerleri.

Aksesyonlar	DNA Konsantrasyonu (ng/ µl)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
AA1	373.8	1.81	1.99
AA2	330.4	1.91	2.04
AA3	352.0	1.94	2.10
K102	447.2	1.94	1.34
K169	355.7	1.92	1.36
K348	623.9	1.79	1.89
K394	281.0	1.80	1.33
LH1	289.1	1.83	1.71
LH2	254.3	1.98	2.01
LH4	380,3	1.87	2.16
LH6	275.6	1.79	1.93
LK8	370.5	1.81	1.60
LK9	253.2	1.99	2.20
50358	225.0	1.54	1.57
Tokak 157/37	380.8	1.81	1.61

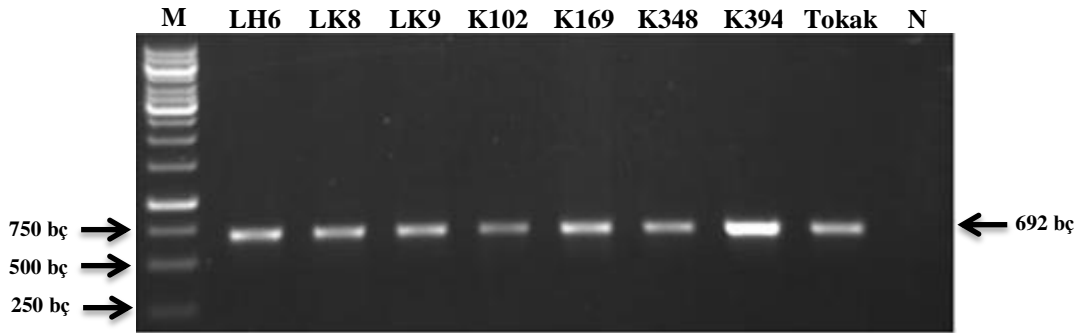
#### 4.2. *DHN3* GENİNİN PZR SONUÇLARI

*Dhn3* primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm örneklerde hedeflenen bölge çoğaltıldı ve %1'lik agaroz jelde görüntüledi (Şekil 4.1; Şekil 4.2).



Şekil 4.1: *Hordeum spontaneum* aksesyonlarından yapılan PZR görüntüsü.

M, 1kb'lik Markır; N, Kalıp DNA içermeyen kontrol.

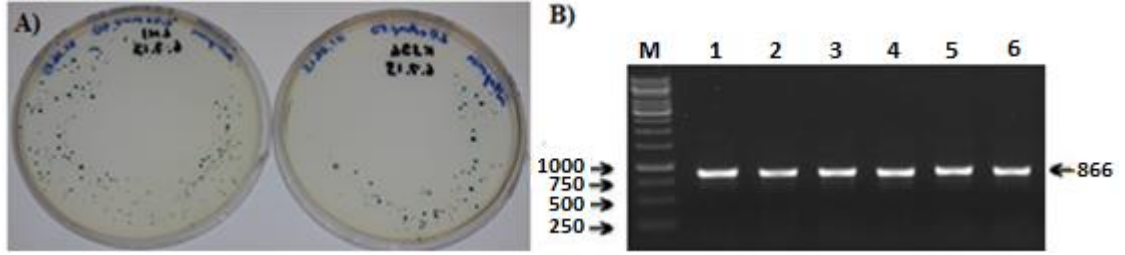


Şekil 4.2: *Hordeum spontaneum* ve *Hordeum vulgare* (Tokak 157/37) aksesyonlarından yapılan PZR görüntüsü.

M, 1kb'lik Markır; N, Kalıp DNA içermeyen kontrol.

#### 4.3. *DHN3* GENİNİN KLONLANMASI

*Dhn3* PZR ürünleri ligasyon işleminin ardından *E.coli* JM107 ırkına aktarıldığında *LacZ* üretimine bağlı olarak petrilerde mavi/beyaz koloniler gözlemlendi (Şekil 4.3A). Beyaz kolonilerden seçilen 3'er adet koloniden M13Puc primerleri ile koloni PZR yapıldı. PZR sonuçları %1'lik agaroz jelde görüntüledi (Şekil 4.3B). Ortalama koloni oluşturma frekansı da (CFU)  $51 \pm 9.6$  olarak hesaplandı.

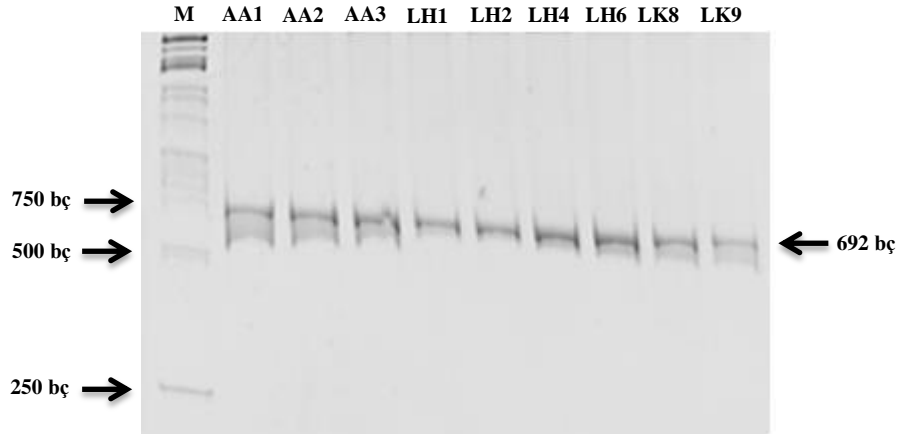


**Şekil 4.3:** A) PZR ile çoğaltılan *Dhn3* genini taşıyan vektörlerin *E. coli* hücrelerine transformasyonu. *LacZ* mavi/beyaz seleksiyonuna göre; beyaz koloniler ligasyonun varlığına, mavi koloniler ise ligasyon olmadığına işaret etmektedir. B) LH1 ve K394 örnekleri ile yapılan koloni PZR sonucu. (1, 2, 3 LH1 örnekleri; 4, 5, 6 K394 örnekleri)

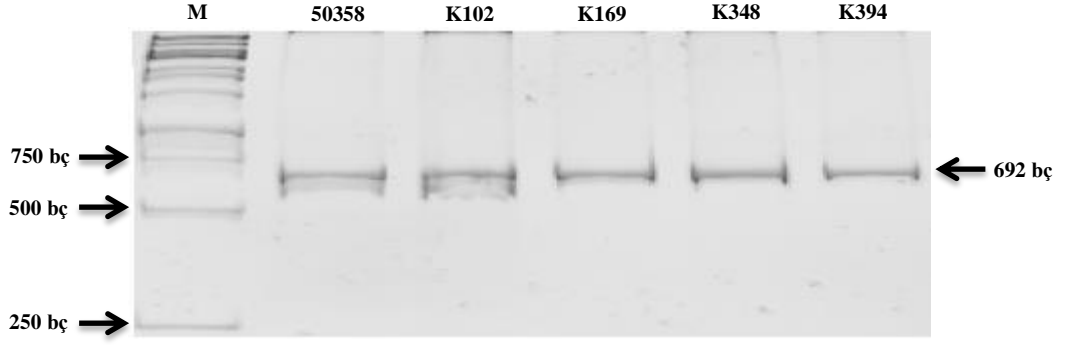
#### 4.4. *DHN3* GENİNDE ALLELİK VARYASYONUN BELİRLENMESİ

##### 4.4.1. *Dhn3* PZR Sonuçlarının PAGE Analizi

*Dhn3* genine ait PZR ürünlerinin ayrımı için öncelikle %10'luk poliakrilamid jel kullanıldı. Ancak PZR ürünlerinin ayrılmadığı gözlemlendi. Daha sonra %7 ve 8'lik poliakrilamid jel kullanılarak, PZR ürünleri 40 voltta 5 saat yürütüldü (Şekil 4.4; Şekil 4.5). Poliakrilamid konsantrasyonunda yapılan optimizasyona karşın, çalışmada allelik varyasyon gözlenmedi.



**Şekil 4.4:** *H. spontaneum* aksesyonlarında *Dhn3* PZR ürünlerinin %8'lik PAGE'de 5 saat yürütülme sonucu.

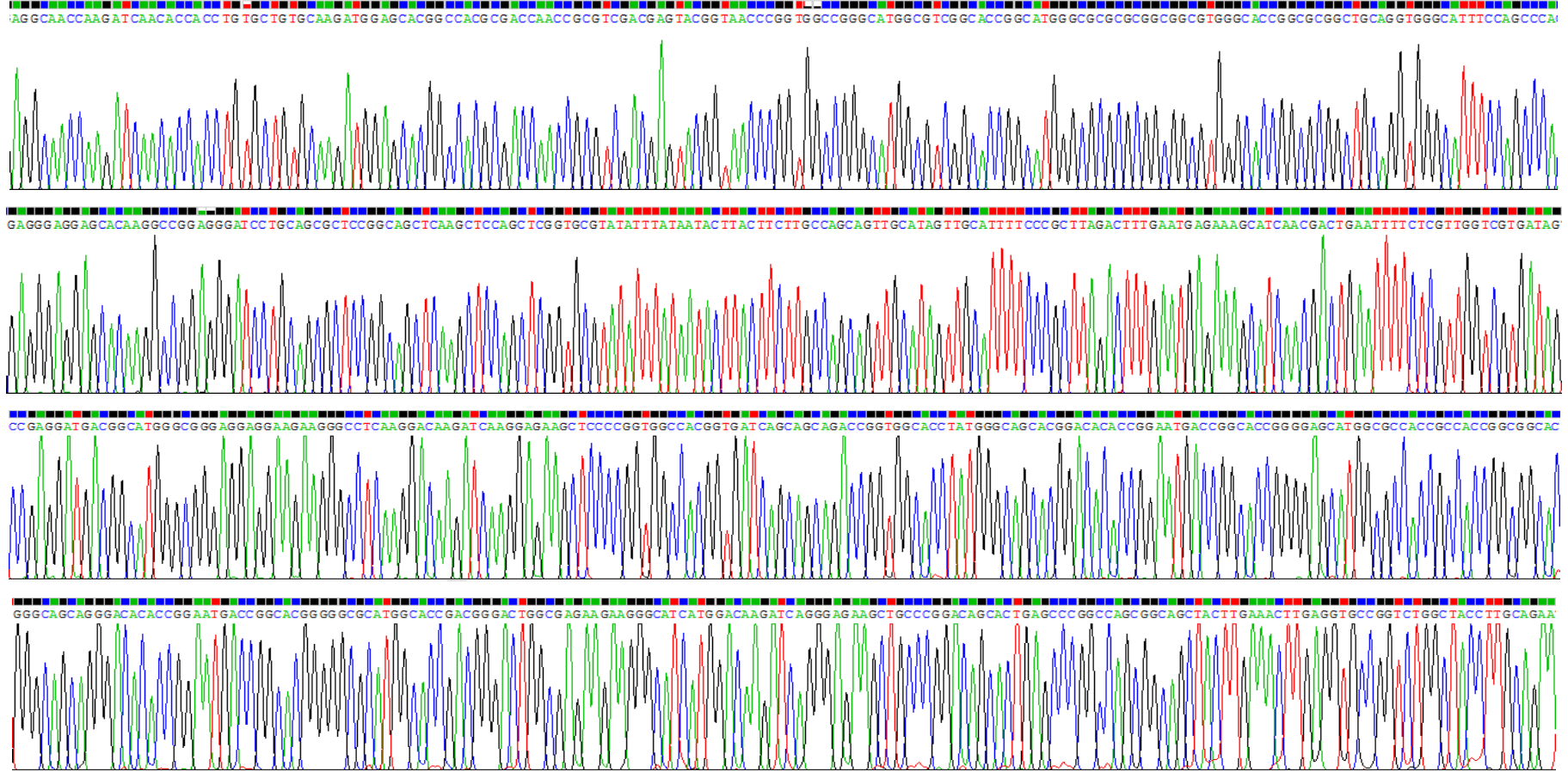


**Şekil 4.5:** *H. spontaneum* aksesyonlarında *Dhn3* PZR ürünlerinin %8'lik PAGE'de 5 saat yürütülme sonucu.

#### 4.5. *DHN3* DİZİLERİNDE POLİMORFİZMİN ARAŞTIRILMASI

##### 4.5.1. *Dhn3* Dizilerinin Kontrolü ve Eldesi

*H. spontaneum* aksesyonlarının dizileme sonuçları kromatogramlar halinde (Şekil 4.6) elde edildi. Kromatogramlar incelendiğinde dizilemenin genel olarak yüksek verimde gerçekleştiği belirlendi. Çalışmada kullanılan her örneğin FASTA formatına çevrilmiş dizisi (Ek 1)'de bulunmaktadır.



Şekil 4.6: LH2 örneği, dizileme sonucunun Chromas Lite programı ile gösterimi.



## 4.5.2. *Dhn3* Dizilerinin DNA Düzeyinde Analizi

### 4.5.2.1. *Dhn3* Genindeki Nükleotit Çeşitliliği

Çalışmada *Dhn3* geninin açık okuma çerçevesi insersiyon/delesyon durumuna göre 581-599 baz çifti uzunluğunda bulundu. Genin 5' UTR bölgesinin boyutu arpada 59 baz çifti, 3' UTR'nin boyutu ise 267 baz çifti olup (Close ve diğ., 1989), bu çalışmada 5' UTR ve 3' UTR bölgeleri kısmen dizilendiğinden *Dhn3* genomik dizisine ait toplamda 674-692 baz çiftlik bölge analiz edildi.

21 *H. spontaneum* hattının *Dhn3* genine ait ortalama nükleotit çeşitliliği ( $\pi$ ) 0.006365 olarak hesaplanırken; üç *H. vulgare* hattında 0.003854 olarak hesaplandı. Ayrıca *Dhn3* geninin bölgelerine ait nükleotit çeşitliliği hesaplandığında *H. spontaneum* hatlarında ekzon 1 bölgesinin nükleotit çeşitliliği 0.002808, ekzon 2'nin 0.007200, intronun 0.012474, 5' UTR'nin 0.002646 ve 3' UTR'nin 0.004925 olduğu; *H. vulgare* hatlarında ise ekzon 1'in 0.003419, ekzon 2'in 0.004582, intronun 0.005900 olduğu görüldü. Yabani arpa ve varyetelerde en yüksek nükleotit çeşitliliği intron bölgelerinde belirlendi (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2:** *Dhn3* geninin farklı bölgelerine ait nükleotit çeşitliliği.

Gen Bölgesi	L	<i>H. spontaneum</i> ( $\pi$ )	<i>H. vulgare</i> ( $\pi$ )
Ekzon 1	177-195	0.002808	0.003419
Ekzon 2	291	0.007200	0.004582
Kodlayan Bölge	468-486	0.005438	0.004115
İntron	113	0.012474	0.005900
5' UTR <sup>1</sup>	36	0.002646	0.000000
3' UTR <sup>2</sup>	57	0.004925	0.000000
Tümü	674-692	0.006365	0.003854

(L, Bölgenin Uzunluğu, insersiyon/delesyon mutasyonuna göre 177 veya 195 nükleotit içerebildiği gösterilmiştir;  $\pi$ , Nükleotit Çeşitliliği; 5' UTR<sup>1</sup> ve 3' UTR<sup>2</sup> bölgelerinin çalışmada incelenen nükleotit uzunluğu; Kodlayan bölge, Ekzon1 ve Ekzon2 bölgelerinin tamamı)

#### 4.5.2.2. *Dhn3* Segmentlerinin İncelenmesi

Dicktoo varyetesi referans alınarak (Choi ve diğ., 1999) yapılan çalışmada, *H. spontaneum* hatlarında ve *H. vulgare* varyetelerinde Y, S ve K segmentlerinin varlığı belirlendi. Çalışmanın sonucuna göre tüm örneklerin Dicktoo'ya benzer olarak YSK<sub>2</sub> motifine sahip olduğu saptandı. Tüm örneklerde YSK<sub>2</sub> motifine ait Y, S ve K segmentlerinin DNA dizileri incelendiğinde *H. spontaneum* hatlarında en yüksek nükleotit çeşitliliğin K<sub>1</sub> segmentinde olduğu, *H. vulgare* hatlarında ise en yüksek nükleotit çeşitliliğinin S segmentinde olduğu belirlendi (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3:** *Dhn3* geninin Y, S ve K segmentlerindeki polimorfizmin incelenmesi.

Gen Bölgesi	L	<i>H. spontaneum</i>			<i>H. vulgare</i>		
		SNP Sayısı	Sinonim olmayan	$\pi$	SNP Sayısı	Sinonim olmayan	$\pi$
Y	21	1	1	0.004535	0	0	0.000000
S	30	1	0	0.003175	1	1	0.022222
K <sub>1</sub>	45	4	3	0.013545	1	0	0.014815
K <sub>sp</sub>	234	7	5	0.006512	2	1	0.005698
K <sub>2</sub>	45	5	5	0.010582	0	0	0.000000
<b>Tümü</b>	<b>375</b>	<b>18</b>	<b>14</b>	<b>0.007467</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0.007111</b>

(K<sub>sp</sub> : K<sub>1</sub> ve K<sub>2</sub> segmentlerinin arasında kalan bölge)

#### 4.5.2.3. Tek Nükleotit Değişimlerinin (SNP) Belirlenmesi

*Dhn3* genindeki nükleotit değişimleri (SNP), sinonim ve sinonim olmayan gruplar açısından incelendi. 21 *H. spontaneum* hattında ve iki *H. vulgare* varyetesinde toplam 79 SNP belirlendi. En fazla SNP'nin AA1, K169, K348, LH2 ve 47002 örneklerinde (5 SNP), en az SNP'nin ise AA2 (1 SNP) hattında olduğu belirlendi (Tablo 4.4). Tek nükleotit değişimleri sonucunda *H. spontaneum* hatlarında toplamda 8 tane sinonim, 42 tane sinonim olmayan değişim, *H. vulgare* varyetelerinde ise 2 tane sinonim ve 4 tane sinonim olmayan değişim belirlendi.

**Tablo 4.4:** Tüm örneklerde meydana gelmiş toplam SNP, sinonim ve sinonim olmayan değişimler.

Arpa Türü	Arpa Hatları	Toplam SNP Sayısı	Sinonim	Sinonim olmayan
<i>H. spontaneum</i>	Hs01	2	-	1
	AA1	5	1	2
	AA2	1	-	1
	AA3	3	-	2
	K102	3	-	2
	K169	5	-	4
	K348	5	1	2
	K394	4	-	3
	K1239	3	-	2
	LH1	4	1	2
	LH2	5	2	3
	LH4	4	1	2
	LH6	3	-	1
	LK8	4	-	4
	LK9	2	-	1
	50358	2	-	1
	31623	2	-	1
	40812	2	-	1
	47002	5	2	2
	4982	4	-	4
49085	3	-	1	
<b>Toplam</b>		<b>71</b>	<b>8</b>	<b>42</b>
<i>H. vulgare</i>	Tokak 157/37	4	1	2
	Erginel90	4	1	2
<b>Toplam</b>		<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>

*Dhn3* dizilerindeki varyasyonu incelemek için yapılan ClustalW2 sonuçlarına göre 3 yabancı arpa türü (47002, 4982 ve 49085) dışında diğer tüm arpa çeşitlerinde referans olarak alınan Dicktoo'ya göre 117 ve 118'inci bazlar arasında 18 baz çiftlik bir insersiyon/delesyon mutasyonu belirlendi (Şekil 4.7).



**Tablo 4.5:** *Dhn3* genindeki SNP'lerin, *H. spontaneum* ve *H. vulgare*'deki pozisyonları.

Aksesyon	Nükleotit Pozisyonu																
	35	79	93	117-118	139	186	199	229	244	249	250	256	265	273	312	329	374
Dicktoo	A	A	A	-	C	G	T	A	C	C	T	A	T	T	C	T	C
Hs01	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
AA1	-	-	-	*	-	A	-	-	-	G	-	-	C	-	-	-	-
AA2	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA3	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
K102	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
K169	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
K348	-	-	-	*	-	A	-	-	-	G	-	-	C	-	-	-	-
K394	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
K1239	-	-	-	*	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
LH1	-	T	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-
LH2	-	-	G	**	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	C	-
LH4	G	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LH6	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	G	-	-
LK8	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
LK9	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
50358	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
31623	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
40812	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
47002	-	-	-	**	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4982	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49085	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	C	-	-	-	-	-	-
Tokak	-	-	-	*	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-
Erginel90	-	-	-	*	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-

(\* , GCGCACGGCGCGGTGGGC; \*\*, GCGCGCGGCGCGGTGGGC; (-) işareti referans alınan örnekle aynı nükleotit olduğunu göstermektedir)

**Tablo 4.5'in Devamı:** *Dhn3* genindeki SNP'lerin, *H. spontaneum* ve *H. vulgare*'deki pozisyonları.

Aksesyon	Nükleotit Pozisyonu																
	380	382	395	396	433	437	463	466	512	519	546	568	580	592	595	601	636
Dicktoo	C	A	C	G	A	G	G	C	G	A	A	A	T	A	A	T	A
Hs01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
AA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	-
AA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
AA3	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
K102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	G
K169	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	C	G
K348	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	-
K394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	G	-	G
K1239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
LH1	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	G	-	-	-	-	-	-
LH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	G	-	-	-
LH4	-	G	-	-	-	-	-	-	A	-	G	-	-	-	-	-	-
LH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
LK8	-	-	-	A	-	-	-	T	-	-	G	-	-	-	-	-	-
LK9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
50358	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
31623	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
40812	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
47002	-	-	G	-	-	A	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
4982	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	G	A	-	-	-	-
49085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
Tokak 157/37	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-
Erginel90	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-

("-" işareti referans alınan örnekle aynı nükleotit olduğunu göstermektedir)

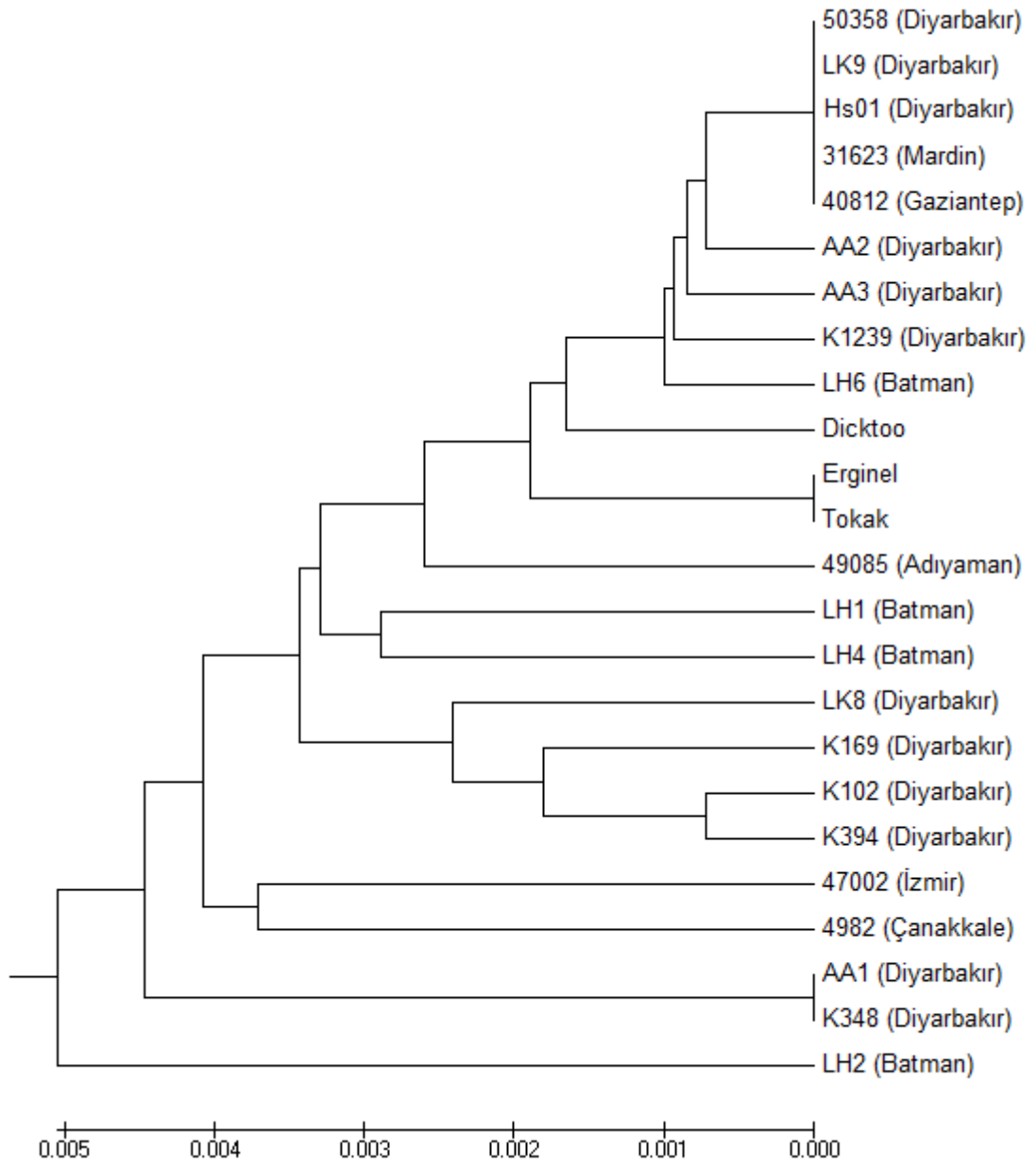
#### ***4.5.2.4. Hordeum Türlerinin Dhn3 Geni Açısından Dizi Benzerliğinin Filogenetik Analizi***

*Dhn3* dizi çeşitliliği *H. spontaneum* hatları ve *H. vulgare* varyetelerinde incelendi. Örnekler, aralarındaki nükleotit uzaklıklarına (pairwise distance) göre değerlendirildiğinde 50358, LK9, Hs01, 40812, 31623 (nükleotit uzaklığı: 0.000) hatlarının, Tokak 157/37, Erginel90 (nükleotit uzaklığı: 0.000) varyetelerinin ve K348, AA1 (nükleotit uzaklığı: 0.000) hatlarının birbirlerine en yakın olduğu belirlendi. Birbirlerine en uzak hatlar ise LH2, K169 (nükleotit uzaklığı: 0.013) olarak tespit edildi (Tablo 4.6). Bu verilere paralel olarak *Dhn3* dizisinin dendrogramı, UPGMA'ya göre oluşturuldu. Dendrogramda genel olarak yakın coğrafik bölgeden elde edilen örneklerin ortak küme oluşturdukları gözlemlendi. Marmara bölgesi ve Ege bölgesinden elde edilen yabani hatların Güneydoğu Anadolu bölgesindeki örneklere göre birbirlerine daha yakın olduğu ve ayrı bir küme oluşturdukları tespit edildi. Güneydoğu Anadolu bölgesinden elde edilen örneklerde ise kümelenmeler görülmekle birlikte bunun bölgesel olarak bağlantılı olmadığı belirlendi. Örneğin; Diyarbakır ve Batman illerinden elde edilen LH2, K169 hatlarının farklı kümeler içerisinde yer aldığı görüldü (Şekil 4.8).

**Tablo 4.6:** Yirmi dört genotipin *Dhn3* dizileri arasındaki nükleotit farklılıklarının sayısı temel alınarak filogenetik uzaklıklarının tahmini (Tamura ve diğ., 2013).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Dicktoo																								
2	Tokak	0.006																							
3	Erginel	0.006	0.000																						
4	Hs01	0.003	0.003	0.003																					
5	AA1	0.007	0.010	0.010	0.007																				
6	AA2	0.001	0.004	0.004	0.001	0.006																			
7	AA3	0.004	0.004	0.004	0.001	0.009	0.003																		
8	K102	0.004	0.007	0.007	0.004	0.009	0.003	0.006																	
9	K169	0.007	0.010	0.010	0.007	0.012	0.006	0.009	0.003																
10	K348	0.007	0.010	0.010	0.007	0.000	0.006	0.009	0.009	0.012															
11	K394	0.006	0.009	0.009	0.006	0.010	0.004	0.007	0.001	0.004	0.010														
12	K1239	0.004	0.004	0.004	0.001	0.009	0.003	0.003	0.006	0.009	0.009	0.007													
13	LH1	0.006	0.009	0.009	0.006	0.010	0.004	0.007	0.007	0.010	0.010	0.009	0.007												
14	LH2	0.007	0.012	0.012	0.009	0.010	0.007	0.010	0.010	0.013	0.010	0.012	0.010	0.012											
15	LH4	0.006	0.009	0.009	0.006	0.010	0.004	0.007	0.007	0.010	0.010	0.009	0.007	0.006	0.012										
16	LH6	0.004	0.004	0.004	0.001	0.009	0.003	0.003	0.006	0.009	0.009	0.007	0.003	0.007	0.010	0.007									
17	LK8	0.006	0.009	0.009	0.006	0.010	0.004	0.007	0.004	0.004	0.010	0.006	0.007	0.009	0.012	0.009	0.007								
18	LK9	0.003	0.003	0.003	0.000	0.007	0.001	0.001	0.004	0.007	0.007	0.006	0.001	0.006	0.009	0.006	0.001	0.006							
19	50358	0.003	0.003	0.003	0.000	0.007	0.001	0.001	0.004	0.007	0.007	0.006	0.001	0.006	0.009	0.006	0.001	0.006	0.000						
20	31623	0.003	0.003	0.003	0.000	0.007	0.001	0.001	0.004	0.007	0.007	0.006	0.001	0.006	0.009	0.006	0.001	0.006	0.000	0.000					
21	40812	0.003	0.003	0.003	0.000	0.007	0.001	0.001	0.004	0.007	0.007	0.006	0.001	0.006	0.009	0.006	0.001	0.006	0.000	0.000	0.000				
22	47002	0.007	0.010	0.010	0.007	0.012	0.006	0.009	0.009	0.012	0.012	0.010	0.009	0.010	0.012	0.010	0.009	0.010	0.007	0.007	0.007	0.007			
23	4982	0.006	0.009	0.009	0.006	0.010	0.004	0.007	0.007	0.010	0.010	0.009	0.007	0.009	0.010	0.009	0.007	0.009	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	
24	49085	0.004	0.007	0.007	0.004	0.009	0.003	0.006	0.006	0.009	0.009	0.007	0.006	0.007	0.009	0.007	0.006	0.007	0.004	0.004	0.004	0.004	0.009	0.007	





**Şekil 4.8:** *Dhn3* gen dizilerindeki varyasyona dayalı olarak UPGMA metodu ile oluşturulan filogenik ağaç (Nei ve Kumar, 2000).

### 4.5.3. Protein Seviyesindeki Analizler

*Dhn3* dizisinin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgeleri amino asit dizisine çevirildiğinde referans örneğin (Dicktoo, AF043089.1) 155 aminoasitlik bir peptidi kodladığı ancak çalışmamızda 3 *H. spontaneum* haricindeki tüm örneklerin insersiyon/delesyon oluşumuna bağlı olarak 161 amino asitlik bir peptidi kodladığı görüldü (Şekil 4.9).

Dicktoo	MEHGHATNRVDEYGNPVGHGVTGMG-----TGAAAGGHFQPTREEHKAGGILQRSGS	54
Tokak	MEHGHATNRVDEYGNPVGHGVTGMGAHGGVGTGAAAGGHFQPTREEHKAGGILQRSGS	60
	*****	*****
Dicktoo	SSSSSEDDGMGRRKKGLKDKIKEKLPGGHGDQQQTGGTYGQHGHGTGMTGTGEHGATAT	114
Tokak	TSSSSSEDDGMGRRKKGLKDKIKEKLPGGHGDQQQTGGTYGQHGHGTGMTGTGEHGATAT	120
	:*****	
Dicktoo	GGTYGQQGHGTMTGTGAHSTDGTGEKKGIMDKIKEKLPGQH	155
Tokak	GGTYGQQGHGTMTGTGAHSTDGTGEKKGIMDKIKEKLPGQH	161
	*****	*****

**Şekil 4.9:** *Dhn3* geninin kodladığı polipeptit dizisinin, Tokak ve Dicktoo varyetesinde karşılaştırılması (Tokak: 161; Dicktoo: 155).

Çalışmada analiz edilen 3 yabancı arpa dışındaki (47002, 4982, 49085) tüm örneklerin referans örneğe göre 27 ile 28'inci amino asit arasında 6 amino asitlik bir insersiyon/delesyon taşıdığı belirlendi (Şekil 4.10).

	27	6						28
Dicktoo	G	-	-	-	-	-	T	
47002	G	-	-	-	-	-	T	
4982	G	-	-	-	-	-	T	
49085	G	-	-	-	-	-	T	
Tokak	G	A	H	G	G	V	T	
Erginel	G	A	H	G	G	V	T	
Budak	G	A	H	G	G	V	T	
AA1	G	A	H	G	G	V	T	
AA2	G	A	H	G	G	V	T	
AA3	G	A	H	G	G	V	T	
K102	G	A	H	G	G	V	T	
K169	G	A	H	G	G	V	T	
K348	G	A	H	G	G	V	T	
K394	G	A	H	G	G	V	T	
K1239	G	A	H	G	G	V	T	
LH1	G	A	H	G	G	V	T	
LH2	G	A	R	G	G	V	T	
LH4	G	A	H	G	G	V	T	
LH6	G	A	H	G	G	V	T	
LK8	G	A	H	G	G	V	T	
LK9	G	A	H	G	G	V	T	
50358	G	A	H	G	G	V	T	
31623	G	A	H	G	G	V	T	
40812	G	A	H	G	G	V	T	

**Şekil 4.10:** *Dhn3* geninde 27 ile 28'inci amino asit arasındaki 6 amino asitlik insersiyon/delesyon'unun pozisyonu.

Tüm örneklerin ekzon 1 ve ekzon 2 bölgelerinde meydana gelmiş sinonim olmayan değişimler belirlendi. Toplamda 45 adet değişim tespit edildi. Ayrıca aynı pozisyonda sinonim olmayan değişim gözlenen tüm amino asitlerin, tüm hatlarda aynı değişime uğradığı saptandı. Örneğin referans dizide 133. pozisyonda bulunan serin (S) amino asitinin tüm örneklerde glisine (G) dönüştüğü gözlemlendi (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7:** *Dhn3* amino asit dizilerindeki sinonim olmayan değişimler.

Aksesyon	Amino Asit Pozisyonu																
	15	27-28	35	55	75	78	83	95	105	106	124	133	140	144	148	149	151
Dicktoo	N	-	H	S	D	K	G	Y	G	T	T	S	K	M	K	E	L
Hs01	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
AA1	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-
AA2	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
AA3	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	C	-	-	-	G	-	-	-	-	-
K102	-	AHGGVG	-	-	E	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
K169	-	AHGGVG	-	-	E	-	-	-	-	I	-	G	-	-	-	-	P
K348	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	A	G	-	-	-	-	-
K394	-	AHGGVG	-	-	E	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	G	-
K1239	-	AHGGVG	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
LH1	Y	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
LH2	-	<u>A</u> RGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	R	-	-
LH4	-	AHGGVG	-	-	-	R	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
LH6	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
LK8	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
LK9	-	AHGGVG	-	-	E	-	S	-	-	I	-	G	-	-	-	-	-
50358	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
31623	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
40812	-	AHGGVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
47002	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	-	-	-	-	-
4982	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	G	R	K	-	-	-
49085	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
Tokak 157/37	-	AHGGVG	-	T	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-
Ergine190	-	AHGGVG	-	T	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-

(A: Alanin; C: Sistein; D: Aspartik Asit; E: Glütamik Asit; G: Glisin; H: Histidin; K: Lizin; L: Lösin; M: Metiyonin; N: Asparajin; I: İzölösin; P: Prolin; R: Arjinin; S: Serin; T: Treonin; V: Valin; Y: Tirozin; Dicktoo referans amino asit dizisi; (-) işareti referans dizi ile aynı amino asit olduğunu göstermektedir)

#### 4.5.3.1. Dhn3 Segmentlerinin İncelenmesi

*Hordeum* türleri üzerinde *Dhn3* amino asit dizisine özgü segmentler (Y, S, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, Fi segmentleri) literatürde (Choi ve diğ., 1999) belirtilen şekilde bulundu (Şekil 4.11).

		Y Segment											
Dicktoo	MEHGHATNRV	DEYGNPV	AGHGVGTGMG	· · · · ·	TGAAAGGHF	QP	TREEHKAGGI						
Tokak	MEHGHATNRV	DEYGNPV	AGHGVGTGMGAHGGVGTGAAAGGHF	QP	TREEHKAGGI								
47002	MEHGHATNRV	DEYGNPV	AGHGVGTGMG	· · · · ·	TGAAAGGHF	QP	TREEHKAGGI						
AA1	MEHGHATNRV	DEYGNPV	AGHGVGTGMGAHGGVGTGAAAGGHF	QP	TREEHKAGGI								
		S Segment					K <sub>1</sub> Segment					Fi Segment(1)	
Dicktoo	LQ	RS	GSSSSSSS	EDDGMGGR	RKKGLKDKIKEKLP	G	GHGDQQQ	TGGTYGQ	H	G	H	TG	
Tokak	LQ	RS	GSSSSSSS	EDDGMGGR	RKKGLKDKIKEKLP	G	GHGDQQQ	TGGTYGQ	H	G	H	TG	
47002	LQ	RS	GSSSSSSS	EDDGMGGR	RKKGLKDKIKEKLP	G	GHGDQQQ	TGGTYGQ	H	G	H	TG	
AA1	LQ	RS	GSSSSSSS	EDDGMGGR	RKKGLKDKIKEKLP	G	GHGDQQQ	TGGTYGQ	H	G	H	TG	
		Fi Sement(2)			Fi Segment(1)		Fi Segment(2)			K <sub>2</sub> Segment			
Dicktoo	MTGTG	EHGATA	TGGTYGQ	Q	G	HTGMTGTG	AHSTDGTG	EKKGIMDKIKEKLP	Q	H			
Tokak	MTGTG	EHGATA	TGGTYGQ	Q	G	HTGMTGTG	AHSTDGTG	EKKGIMDKIKEKLP	Q	H			
47002	MTATG	EHGATA	TGGTYGQ	Q	G	HTGMTGTG	AHSTDGTG	EKKGIMDKIKEKLP	Q	H			
AA1	MTGTG	EHGATA	TGGTYGQ	Q	G	HAGMTGTG	AHSTDGTG	EKKGIMDKIKEKLP	Q	H			

Şekil 4.11: *Dhn3* amino asit dizisine özgü segmentlerin gösterimi (Y, S, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> Fi segmentleri).

Çalışmada kullanılan örneklerin amino asit dizileri üzerinde dehidrin genine özgü Y, S, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> ve Fi segmentleri ve bu segmentlerdeki sinonim olmayan değişimler belirlendi. 9 *H. spontaneum* hattında (Hs01, AA2, K1239, LH6, LK9, 50358, 31623, 40812, 49085) Y, S, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> ve Fi segmentlerinde sinonim olmayan değişime rastlanmadı. Diğer örneklerde ise (AA1, AA3, K102, K169, K348, K394, LH1, LH2, LH4, LK8, 47002, 4982, Tokak 157/37, Erginel90) toplamda 21 adet sinonim olmayan değişim tespit edildi. En fazla sinonim olmayan değişime uğramış bölgenin (6 adet) K<sub>1</sub> ve Fi2 segmentlerinde olduğu görüldü (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8:** *H. spontaneum Dhn3* genindeki Y, S, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> ve Fi segmentlerinin Dicktoo'ya göre sinonim olmayan amino asit değişimleri.

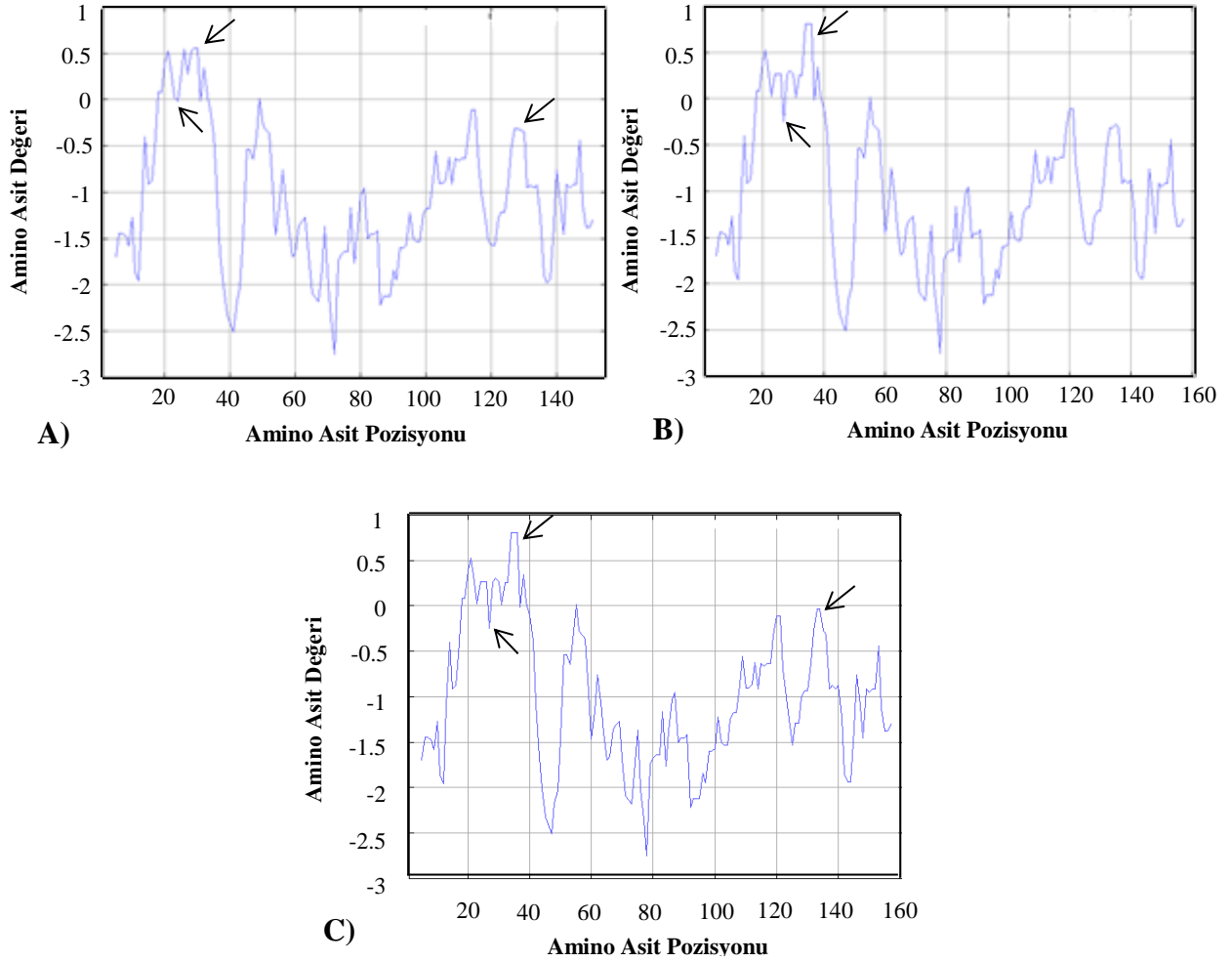
Arpa Türü	Y Segmenti	S Segmenti	K <sub>1</sub> Segmenti	Fi Segmenti(1)	Fi Segmenti(2)	K <sub>2</sub> Segmenti
Dicktoo	DEY GNPV	RSGSSSSS SS	RKKGLKDKI KEKLPG	TGGT YGQ	HTGMT GTG	EKKGIMDKI KEKLPG
AA1	-	-	-	-	HAGMT GTG	-
AA3	-	-	-	TGGT CGQ	-	-
K102	-	-	RKKGLKEKIK EKLPG	-	-	-
K169	-	-	RKKGLKEKIK EKLPG	-	HTGMT GIG	EKKGIMDKIK EKPPG
K348	-	-	-	-	HAGMT GTG	-
K394	-	-	RKKGLKEKIK EKLPG	-	-	EKKGIMDKIK GKLPG
LH1	DEYG YPV	-	-	-	-	-
LH2	-	-	-	-	-	EKKGIMDKIR EKLPG
LH4	-	-	RKKGLKDKIR EKLPG	-	-	-
LK8	-	-	RKKGLKEKIK EKLP <u>S</u>	-	HTGMT GIG	-
47002	-	-	-	-	HTGMT ATG	-
4982	-	-	-	-	HTGMT ATG	ERKGIKDKIK EKLPG
Tokak 157/37	-	RSGSTSSS SS	-	-	-	-
Erginel 90	-	RSGSTSSS SS	-	-	-	-

(Kalın ve altı çizili amino asitler sinonim olmayan değişimler; Dicktoo referans amino asit dizisi; (-) işareti referans dizi ile aynı amino asit olduğunu göstermektedir; A: Alanin; C: Sistein; D: Aspartik Asit; E: Glütamik Asit; G: Glisin; H: Histidin; K: Lizin; L: Lösin; M: Metiyonin; N: Asparajin; I: Izolösin; P: Prolin; Q: Glütamin; R: Arjinin; S: Serin; T: Treonin; V: Valin; Y: Tirozin)

#### 4.5.3.2. *Dhn3* Geni Mutasyonlarının Biyokimyasal Etkileri

*H. spontaneum* ve *H. vulgare* örneklerindeki polimorfizm sonucu meydana gelen amino asit değişimleri biyokimyasal açıdan düşük oranda farklılıklara yol açmıştır. Dicktoo varyetesine ait amino asitler %80 polar, %20 apolar özellik gösterirken, Tokak 157/37 ve Erginel90 varyeteleri %79.5 polar, %20.5 apolar amino asit özelliği göstermiştir. Dicktoo varyetesine göre en fazla biyokimyasal açıdan farklılık gösteren *H. spontaneum* hatları ise AA1, K169, K348 ve LK8 (%78.8 polar, %21.2 apolar) olarak belirlenmiştir.

Biyokimyasal yapılarında meydana gelen değişimlerin örneklerin hidrofobik profillerine de yansıdığı belirlendi. Dicktoo ve Tokak varyetesinin karşılaştırılmasında 20. ve 40. amino asitleri arasında; AA1 ve Dicktoo arasında ise 20. ve 40. aminoasitler ile, 120. ve 140. amino asitleri arasındaki hidrofobisitenin değiştığı belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Kyle-Doolittle'a göre yapılan analize göre *Dhn3* geninin farklı amino asit pozisyonlarındaki hidrofobisite değerleri.

Oklar, Dicktoo'ya göre oluşan farklılıkları göstermektedir; A: Dicktoo, B: Tokak, C: AA1

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemiz orijinli *H. spontaneum*'daki genetik polimorfizm daha önce izoenzim (Nevo ve diğ., 1986), RAPD (Dawson ve diğ., 1993; Reddy ve Soliman, 1997; Albayrak ve Gözükırmızı, 1999; Tanyolaç, 2003), ISSR (Tanyolaç, 2003), RFLP (Graner ve diğ., 1994) ve AFLP markırları (Pakniyat ve diğ., 1997; Turpeinen ve diğ., 2003; Özkan ve diğ., 2005) ile incelenmiştir. Güneydoğu orijinli 76 *H. spontaneum* genotipinde popülasyon içi ve arası varyasyon AFLP analizlerine göre sırasıyla %32 ve %68 bulunmuştur (Özkan ve diğ., 2005). Ancak, stres ilişkili genler düzeyinde bir polimorfizm araştırması bulunmamaktadır. Abiyotik strese yanıt mekanizmalarının önemli bir bileşeni olan dehidrin ailesindeki genetik varyasyon *H. vulgare*'de (Choi ve diğ., 1999; Lababidi ve diğ., 2004), *H. spontaneum*'da (Yang ve diğ., 2009), *Quercus petraea*'da (Vornam ve diğ., 2010), *Helianthus annuus*'ta (Natali ve diğ., 2002) incelenmiştir.

Bu çalışma sonucu, Türkiye orijinli *H. spontaneum* aksesyonlarında *Dhn3* geninin popülasyonlar arasında genetik varyasyon gösterdiği belirlenmiştir. *H. spontaneum* *Dhn3* genindeki toplam nükleotit polimorfizmi ( $\pi$ ) 0.0063 iken; bu oran arpa varyetelerinde 0.0038 olarak hesaplanmıştır. Gen içi bölgeler incelendiğinde en yüksek nükleotit çeşitliliği gerek yabancı arpada ve gerekse varyetelerde intron bölgesindedir ( $\pi$ : 0.012). *Helianthus annuus* bitkisinde *Dhn1* geni ile yapılan bir çalışmada da intron bölgesindeki varyasyon yüksek (0.053) bulunmuştur (Natali ve diğ., 2002). Bitkilerde SNP oluşma frekansının kodlamayan bölgelerde kodlayan bölgelere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ching ve Rafalski, 2002; Ablett ve diğ., 2003; Snowdon ve diğ., 2005). Mısırdaki kodlamayan bölgede 34 bazda bir SNP'ye rastlanırken; kodlayan bölgede 124 bazda bir SNP'ye rastlanmıştır (Ching ve Rafalski, 2002).

*Dhn3* ve *Dhn4* arpada 6. kromozom üzerinde yer almakta ve aralarında sadece 8 kb'lik bir uzaklık bulunmaktadır (Choi ve diğ., 1999). *H. spontaneum*'da *Dhn4*'ün intron yapısı uzunluk olarak (91 bç veya 92 bç) polimorfizm göstermiş ve *H. vulgare*'de sadece 92 bç'lik introna rastlanmıştır (Close ve diğ., 2000). Çalışmamızda analiz edilen



*Dhn3* geni intron bölgesinin uzunluğu *H. spontaneum* ve *H. vulgare* örneklerinin tümünde 113 bç olarak bulunmuştur. *Dhn3* geni, *Dhn4* geni ile bağlantılı olmasına karşın intronları homoloji göstermemekte ve *Dhn3*'ün intronu *Dhn7* ile %88 benzerlik göstermektedir. Bu durumun eşit-olmayan rekombinasyondan kaynaklanabileceği önerilmiştir (Choi ve diğ., 1999).

*H. spontaneum* *Dhn3* geninde en yüksek nükleotit çeşitliliğinin K<sub>1</sub> segmentinde ( $\pi$ : 0.013), *H. vulgare*'de ise S segmentinde ( $\pi$ : 0.022) olduğu tespit edilmiştir. *Dhn3* gen ailesinde Y, S ve K segmentlerinin nükleotit çeşitliliğine dair literatürde bilgi bulunmamasına karşın, aynı gen grubunda bulunan *Dhn1*'in yabani tip *Helianthus annuus* bitkisinde segmentler arasında en yüksek nükleotit çeşitliliği K<sub>sp</sub> bölgesinde ( $\pi$ : 0.102) ve K<sub>1</sub> segmentinde ( $\pi$ : 0.068) bulunmuştur (Natali ve diğ., 2002).

Çalışmada, *H. spontaneum* hatlarının *Dhn3*'ü kodlayan bölgedeki nükleotit polimorfizminin toplam olarak 0.0054 olduğu belirlenmiştir. Bu bölgedeki sinonim olmayan değişimlerin proteinin hidrofobisitesini etkilediği gözlenmiştir. *Quercus petraea*'nın farklı popülasyonlarında yapılan bir çalışmada *Dhn3*'ün kodlayan bölgesinin nükleotit polimorfizminin 0.011'e kadar çıktığı ve kodlayan bölgedeki varyasyonun protein düzeyinde önemli biyokimyasal değişimler yarattığı bildirilmiştir (Vornam ve diğ., 2010).

*Dhn3* genindeki bir diğer polimorfizm insersiyon/delesyon (indel) mutasyonudur. 18 yabani hat ve 2 varyetede 18 baz çiftlik bir indel bulunmuştur. Bu 6 amino asitlik dizi *Dhn3* genindeki Y segmentinin 30 baz çifti ilerisinde yer almaktadır. Ancak bu 18 bç'lik mutasyon 47002, 4982 ve 49085 yabani hatlarında bulunamamıştır. Lababidi ve diğ., (2004) arpa varyetelerinde yapmış oldukları çalışmada *Dhn3* geninde uzunluk polimorfizmini saptamış ve mutasyonun olduğu Zambaka varyetesi ile mutasyonun olmadığı Tadmor varyetelerinin kuraklığa karşı farklı yanıt verdiklerini belirtmişlerdir.

Tüm dehidrinlerde ortak olarak bulunan K segmenti, korunmuş 15 amino asitten (EKKGIMDKIKEKLPG) oluşmaktadır. Ancak bazı tek amino asitlerin değişimi ve yapısal modifikasyonlar, K segmenti içerisinde değişikliğe neden olabilmektedir. Örneğin; *Pseudotsuga menziesii* dehidrinlerinde K segmenti amino asit dizisinin (Q/E)K(P/A)G(M/L)LDKIK(A/Q)(K/M)(L/I)PG şeklinde olduğu belirlenmiştir (Jarvis

ve diğ., 1996). Bu çalışma sonucunda tüm örneklerde korunmuş K segmentine rastlanmakla birlikte, bazı aksesyonlarda literatürde (Tablo 2.1) olmayan yeni amino asit dizi varyasyonları bulunmuştur: K169 örneğinde 13. amino asitin lösinden proline, K394'te 11. amino asitin glutamik asitten glisine, LH2 ve LH4'te 10. amino asitin lizinden arjinine, 4982'de 2. amino asitin lizinden arjinine ve LK8 örneğinde 15. amino asitin glisinden serine dönüştüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak elde ettiğimiz tüm veriler doğrultusunda K segmentinin E(K/R)KGIMDKI(K/R)(E/G)K(L/P)P(G/S) şeklinde de olabileceği görülmüştür. S segmentinde ise Dicktoo varyetesinden farklı olarak iki arpa varyetesinde (Tokak 157/37, Erginel90) 5. amino asitin serinden treonine dönüştüğü saptanmıştır. Ayrıca Y segmentinde LH1 örneğinde 5. amino asitin asparajinden tirozine dönüştüğü gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerde, literatürden farklı olarak S segmenti için "RSGS(S/T)SSSSS" ve Y segmenti için "DEYG(N/Y)PV" kompozisyonunda amino asit dizilimleri olabileceği görülmüştür. Sonuç olarak, *Dhn3* geninin şifrelediği polipeptit yapısında meydana gelen bu değişimlerin promotör bölgeler de dahil edilerek kapsamlı analiz edilmesi ve gen anlatımı çalışmalarlarıyla desteklenmesi dehidrinlerin stres yanıtındaki rollerine ilişkin yeni bulguların elde edilmesine katkı sağlayabilir.

*Dhn3* geninde SNP'ler baz alınarak yapılan filogenetik ilişki analizinde, en uzak genotipler LH2 (Batman orijinli *H. spontaneum* aksesyonu) ve K169 (Diyarbakır orijinli *H. spontaneum* aksesyonu) olarak belirlenmiştir. İki arpa varyetesinin (Erginel90 ve Tokak) *Dhn3* dizileri arasında fark bulunmamıştır. Erginel90 Fransız kökenli (Pedigri: Escourgeon/Hop2171) altı sıralı bir varyete; Tokak ise yerli çeşitlerden geliştirilmiş iki sıralı bir varyetedir. *H. spontaneum* aksesyonları arasında ise; Diyarbakır (5), Gaziantep (1) ve Mardin (1) orijinli toplam yedi aksesyonda yüksek dizi benzerliği görülmüştür. Yapılan küme analizinde Batman (LH2) örneği ile diğer tüm örnekler iki büyük klada ayrılmıştır. Batı orijinli iki aksesyon (Çanakkale ve İzmir) tek kümede toplanırken; oluşan diğer kümelerin heterojen yapıda olduğu gözlenmiştir. Farklı coğrafik bölgelerden orijinlenen aksesyonların çalışmaya dahil edilmesiyle polimorfizm ve yayılım arasındaki ilişkinin artabileceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map\\_search.cgi?chr=barley.inf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?chr=barley.inf), [Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2014].
- <http://web.expasy.org/protscale/>, [Ziyaret tarihi: 3 Mayıs 2014].
- Ablett, G.A., Karakousis, A., Banbury, L., 2003, Application of SSR markers in the construction of australian barley genetic maps. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, 1187-1195.
- Adams, R.M., Hurd, B.H., Lenhart, S., Leary, N., 1998, Effects of global climate change on agriculture: an interpretative review, *Climate Research*, 11, 19-30.
- Albayrak, G., Gözükmızı, N., 1999, RAPD Analysis of genetic variation in barley, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 627-630.
- Alsheikh, M.K., Svensson, J., Randall, S.K., 2005, Phosphorylation regulated ionbinding is a property shared by the acidic subclass dehydrins, *Plant, Cell & Environment*, 28, 1114–1122.
- Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmore, S.J., Lin, C., Thomashow, M.F., 1996, Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13404–13409.
- Asghar, R., Fenton, R.D., DeMason, D.A., Close, T.J., 1994, Nuclear and cytoplasmic localization of maize embryo and aleurone dehydrin, *Protoplasma*, 177, 87-94.
- Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl R., Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F., 2000, On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*, 17(4):499-510
- Baik, B.K., Ulrich, S.E., 2008, Barley for Food: Characteristics, improvement, and renewed interest, *Journal of Cereal Science*, 48, 233-242.
- Baker, E.H., Bradford, K.J., Bryant, J.A., Rost, T.L., 1995, A comparison of desiccation-related proteins (dehydrin and QP47) in pea (*Pisum sativum*), *Seed Science Research*, 5, 185-193.
- Baker, J., Steele, C., Dure, L.I., 1988, Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton, *Plant Molecular Biology*, 11, 277-291.
- Battista, J.R., Park, M.J., McLemore, A.E., 2001, Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus Radiodurans* R1 to desiccation, *Cryobiology*, 43, 133-139.

- Beck, E.G., Fettig, S., Knake, C., Gartig, K., Bhattarai, T., 2007, Specific and unspecific responses of plant to cold and drought stress, *Journal of Biosciences*, 32, 501–510.
- Bray, E.A., 1993, Molecular response to water deficit, *Plant Physiology*, 103, 1035-1040.
- Bregitzer, P., Campbell, R.D., 2001, Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus, *Crop Science*, 41, 173-179.
- Brown, A.H.D., 1992, Genetic variation and resources in cultivated barley and wild *Hordeum*, *Proceedings of the Sixth International Barley Genetics Symposium*, 1991 Helsingborg, Sweden, 669-682.
- Browne, J., Tunnacliffe, A., Burnell, A., 2002, Plant desiccation gene found in a nematode, *Nature*, 416, 38.
- Campbell S.A., Close T.J., 1997, Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits, *New Phytologist*, 137, 61-74.
- Carnesale, A., Chameides, W., Boesch, D.F., Brown, M.A., Cannon, J., Dietz, T., Eads, G.C., Fri, R.W., Geringer, J.E., Hartmann, D.L., JR, C.O.H., Jacobs, K.L., Karl, T., LivermanI, D.M., Matson, P.A., Raven, P.H., Schmalensee, R., Sharp, P.R., Shepard, P.M., Socolow, R.H., Solomon, S., Stigson, B., Wilbanks, T.J., Zandan, P., 2011, *America's climate choices*, National Academies Press, Washington, USA, ISBN: 978-0-309-14585-5.
- Ceccarelli, S., Grando, S., Baum, M., Udupa, S., 2004, *Breeding for drought resistance in a changing climate*, Challenges and Strategies for Dryland Agriculture, In: Roberts, C.A., (ed), Rao, C., Ryan, J., Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, ISBN:978-0-89118-611-3, 167-190.
- Ching, A., Rafalski, A., 2002, Rapid genetic mapping of ESTs using SNP pyrosequencing and indel analysis, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7 (2B), 803-810.
- Choi, D.W., Close, T.J., 2000, A newly identified barley gene, *Dhn12*, encoding a YSK<sub>2</sub> DHN, is located on chromosome 6H and has embryo-specific expression, *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1274–1278.
- Choi, D.W., Koag, M.C., Close, T.J., 2000, Map locations of barley dhn genes determined by gene-specific PCR, *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 350–354.
- Close, T.J., 1996, Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins, *Physiologia Plantarum*, 97, 795-803.

- Close, T.J., Choi, D.W., Venegas, M., Salvi, S., Tuberosa, R., Ryabushkina, N., Turuspekov, Y., Nevo, E., 2000, Allelic Variation in Wild and Cultivated Barley at the Dhn4 Locus, which Encodes a Major Drought-Induced and Seed Protein, DHN4, *Plant and Animal Genome VIII*, 9-12 January 2000, San Diego, USA.
- Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., DeMason, D.A., Crione, D., Meyer, N.C., Moonan, F., 1993, Dehydrin: the protein, *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*, In: Close, T.J., Bray, E.A. (ed.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 104-118.
- Close, T.J., Kortt, A.A., Chandler, P.M., 1989, A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn, *Plant Molecular Biology*, 13, 95-108.
- Close, T.J., Lammers, P.J., 1993, An osmotic stress protein of cyanobacteria Is immunologically related to plant dehydrins, *Plant Physiology*, 101, 773-779.
- Colmenero-Flores, J.M., Moreno, L.P., Smith, C., Covarrubias, A.A., 1999, PvLEA-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings, *Plant Physiology*, 120, 93-103.
- Cuming, A.C., 1999, *Lea Proteins*, Seed Proteins., In: Shewry, P.R., Casey, R. (ed) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, ISBN: 978-94-010-5904-6, 753-780.
- Curry, J., Morris, C.F., Walker-Simmons, M.K., 1991, Sequence analysis of a cDNA encoding a group 3 LEA mRNA inducible by ABA or dehydration stress in wheat, *Plant Molecular Biology*, 16, 1073-1076.
- Curry, J., Walker-Simmons, M.K., 1993, Unusual sequence of group 3 LEA (II) mRNA inducible by dehydration stress in wheat, *Plant Molecular Biology*, 21, 907-912.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., 1985, *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 9th ed., Edinburgh University Press, UK, ISBN: 0-85224-559-9.
- Dawson, I.K., Chalmers, K.J., Waugh, R., Powell, W., 1993, Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers, *Mol Ecol*, 2, 151-159.
- Dehaye, L., Duval, M., Viguier, D., Yaxley, J., Job, D., 1997, Cloning and expression of the pea gene encoding SBP65, a seed-specific biotinylated protein, *Plant Molecular Biology*, 35, 605-621.
- Devos, K.M., 2005, Updating the Crop Circle, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 155-162.
- Doczi, R., Kondrak, M., Kovacs, G., Beczner, F., Banfalvi, Z., 2005, Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 269-276.

- Dong, J.Z., Dunstan, D.I., 1997, Characterization of cDNAs representing five abscisic acid-responsive genes associated with somatic embryogenesis in *Picea glauca*, and their responses to abscisic acid stereostructure, *Planta*, 203, 448-453.
- Dunwell, J.M., 1986, *Handbook of Plant Cell Culture* Vol. 4, MacMillan & Co, London, ISBN: 0-02-947940-1.
- Dure, L., 1993a, A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation, *Plant Journal*, 3, 363-369.
- Dure, L., 1993b, *Structural Motifs in Lea Proteins of Higher Plants*, Response of Plants to Cellular Dehydration During Environmental Stress, Close, T.J., Bray, E.A. (ed.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, TN, 91-103.
- Dure, L., Chlan, C., 1981, Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: XII. Purification and properties of principal storage proteins, *Plant Physiology*, 68, 180-186.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., Sung, Z., 1989, Common amino acid sequence domains among the Lea proteins of higher plants, *Plant Molecular Biology*, 12, 475-486.
- Dure, L., Galau, G.A., 1981, Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: XIII. Regulation of biosynthesis of principal storage proteins, *Plant Physiology*, 68, 187-194.
- Dure, L., 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.
- Egerton-Warburton L.M., Balsamo, R.A., Close, T.J., 1997, Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays* L., *Plant Physiology*, 101, 545-555.
- Ellis, R.P., Russell, J., Ramsay, L., Waugh, R., Powell, W., 1999, Barley domestication-*Hordeum spontaneum*, a source of new genes for crop improvement, In: Scottish Crop Research Institute Annual Report 1998/1999, Dundee, Schottish Crop Research Institute, 97-100.
- Forster, B.P., Ellis, R.P., Thomas, W.T.B., Newton, A.C., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R.A., Bahri, M.H., Ben Salem, M., 2000, The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley, *Journal of Experimental Botany*, 51 (342), 19-27.
- Gal, T.Z., Glazer, I., Koltai, H., 2004, An Lea group 3 family member is involved in survival of *C. Elegans* during exposure to stress, *FEBS Letters*, 577, 21-26.

- Galau, G.A., Wang, H.Y., Hughes, D.W., 1992, Cotton Lea4 (D19) and LeaA2 (D132) group 1 Lea genes encoding water stress-related proteins containing a 20-amino acid motif, *Plant Physiology*, 99, 783-788.
- Galau, G.A., Wang, H.Y., Hughes, D.W., 1993, Cotton Lea5 and Lea74 encode atypical Late Embryogenesis-Abundant proteins, *Plant Physiology*, 101, 695-696.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A., Covarrubias, A.A., 2000, Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 5668-5674.
- Goday, A., Jensen, A., Cullanez-Macia, F., Alba, M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pages, M., 1994, The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals, *Plant Cell*, 6, 351-360.
- Goldsten, C.S., Kronstad, W.E., 1986, Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*, *Theoretical and Applied Genetics*, 71 (4), 631-636.
- Graner, A., Ludwig, W.F., Melchinger, A.E., 1994, Relationship among European barley germplasm: II. Comparison of RFLP and pedigree data, *Crop Science*, 34, 1199-1205.
- Griggs, D.J., Noguer, M., 2002, Climate change 2001, The scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change, *Weather*, 57, 267-269.
- Guo, P., Baum, M., Grando, S., Ceccarelli, S., Bai, G., Li, R., Von Korff, M., Varshney, R.K., Graner, A., Valkoun, J., 2009, Differentially expressed genes between drought tolerant and drought sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage, *Journal of Experimental Botany*, 60 (12), 3531-3544.
- Hand, S.C., Jones, D., Menze, M.A., Witt, T.L., 2007, Life without Water: Expression of Plant Lea Genes by an Anhydrobiotic Arthropod, *Journal of Experimental Zoology*, 307 (1), 62-66.
- Harlan, J.R., Zohary, D., 1966, Distribution of Wild Wheats and Barley, *Science*, 153, 1074-1080.
- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, K.F., Seals, D.F., Randall, S.K., 2002, The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation, *Plant Physiology*, 130, 675-687.
- Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S., Sarhan, F., 1995, Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissue, *Plant Journal*, 8, 583-593.

- Hu, S.J., 1995, *An introduction to Tibet agriculture*, Sichuan Science and Technology Publishing House, Sichuan.
- Hughes, D.W., Galau, G.A., 1989, Temporally modular basis of dehydration tolerance in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377-403.
- Hughes, D.W., Galau, G.A., 1989, Temporally modular gene expression during cotyledon development, *Genes Development*, 3, 358-369.
- Hughes, S., Graether, S.P., 2011, Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein, *Protein Science*, 20, 42-50.
- Hundertmark, M., Hinch, D.K., 2008, LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*, *Biomedcentral Genomics*, 9, 118-140
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A., Takagi, M., 1995, A Tea-Class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces Cerevisiae*, *Gene*, 170, 243-248.
- Ismail, A.M., Hall, A.E., Close, T.J., 1999a, Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 13566-13570.
- Jensen, A., Goday, A., Figueras, M., Jessop, A., Pages, M., 1998, Phosphorylation mediates the nuclear targeting of the maize Rab17 protein, *Plant Journal*, 13, 691-697.
- Jiang, X., Wang, Y., 2004,  $\beta$ -Elimination coupled with tandem mass spectrometry for the identification of in vivo and in vitro phosphorylation sites in maize dehydrin DHN1 protein, *Biochemistry*, 43, 15567-15576.
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A., and Okuda, T., 2006, Dehydration-induced expression of Lea proteins in an anhydrobiotic chironomid, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348, 56-61.
- Kim, H.S., Lee, J.H., Kim, J.J., Kim, C.H., Jun, S.S., Hong, Y.N., 2005, Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*, *Gene*, 344, 115-123.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Higashi, K., Satoh, S., Kamada, H., Harada, H., 1992, Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot, *Plant Molecular Biology*, 19, 239-249.



- Koag, M.C., Wilkens, S, Fenton, R.D., Resnik, J., Vo, E., Close T.J., 2009, The K-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes, *Plant Physiology*, 150, 1503-1514.
- Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132.
- Lababidi, S., Choumane, W., Ceccarelli, S., Grando, S., Al-Saiid, W., Baum, M.. 2004, Allelic variation of dehydrin genes in barley, *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 40 (Special Issue), 170.
- Lang ,V., Robertson, M., Chandler, P.M., 1998, Allelic variation in the dehydrin gene family of 'Himalaya' barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theoretical Applied Genetics*, 96, 1193-1199.
- Lu, J., Vecchi, G.A., Reichler, T., 2007, Expansion of the Hadley cell under global warming, *Geophysical Research Letters*, 34, L06805.
- Maitra, N., Cushman, J.C., 1994, Isolation and characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a D95 family late-embryogenesis-abundant protein, *Plant Physiology*, 106, 805-806.
- Mamminen, I., Schulman, A.H., 1993, BARE-1, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Molecular Biology*, 22, 829-846.
- Manfre, A.J., Lanni, L.M., Marcotte, W.R., 2006, The Arabidopsis group 1 late embryogenesis abundant protein ATEM6 is required for normal seed development, *Plant Physiology*, 140, 140-149.
- Martin, J.M., Blake, T.K., Hochett, E.A., 1991, Diversity among North American spring barley cultivars based on coefficients of parentage, *Crop Science*, 31, 1131-1137.
- Maskin, L., Maldonado, S., Iusem, N.D., 2008, Tomato leaf spatial expression of stress-induced *Asr* genes, *Molecular Biology Reports*, 35 (4), 501-505.
- McCubbin, W.D., Kay, C.M., Lane, B.G., 1985, Hydrodynamic and optical properties of the wheat germ Em protein, *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 63, 803-811.
- Mundy, J., Chua, N.H., 1988, Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene, *EMBO Journal*, 7, 2279-2286.
- Natali, L., Giordani, T., Cavallini, A., 2002, Sequence variability of a dehydrin gene within *Helianthus annuus*, *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 811-818.
- Nei, M., and Kumar, S., 2000, Molecular evolution and phylogenetics, Oxford University Press, New York, ISBN: 0-19-513584-9.
- Nei, M., Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *PNAS*, 76 (10), 5269-5273.

- Nevo, E., 1992, *Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, Hordeum spontaneum, in the fertile crescent*, Barley, Genetics, Biochemistry Molecular Biology, In: Shewrey, P.R. (ed.), CAB International, Wallingford, UK, ISBN: 0-85198-725-7, 19-43.
- Nevo, E., Beiles, A., Zohary, D., 1986a, Genetic resources of wild barley in the Near East: structure, evolution and application in breeding, *Biological Journal of the Linnean Society*, 27, 355-380.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B.V., 2001, Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology*, 45, 263-279.
- Olave-Concha, N., Bravo, L.A., Ruiz-Lara, S., Corcuera, L.J., 2005, Differential accumulation of dehydrin-like proteins by abiotic stresses in *Deschampsia antarctica* Desv., *Polar Biology*, 28, 506-513.
- Ouilet, F., Houde, M., Sarhan, F., 1993, Purification, characterization and Cdna cloning of the 200 kda protein induced by cold acclimation in wheat, *Plant Cell Physiology*, 34, 59-65.
- Ozkan, H., Kafkas, S., Ozer, M.S., Brandolini, A., 2005, Genetic relationships among South-East Turkey wild barley populations and sampling strategies of *Hordeum spontaneum*, *Theoretical Applied Genetics*, 112, 12-20.
- Padmanabhan, V., Dias, D.M., Newton, R.J., 1997, Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress, *Plant Molecular Biology*, 35, 801-807.
- Pakniyat, H., Powell, W., Baird, E., Handley, L.L., Robinson, D., Scrimgeour, C.M., Nevo, E., Hackett, C.A., Caligari, P.D.S., Forster, B.P., 1997, AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography, *Genome*, 40, 332-341.
- Park, J.A., Cho, S.K., Kim, J.E., Chung, H.S., Hong, J.P., Hwang, B., Hong, C.B., Kim, W.T., 2003, Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the Ca-LEAL1 gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang), *Plant Science*, 165, 471-481.
- Park, S.Y., Noh, K.J., Yoo, J.H., Yu, J.W., Lee, B.W., Kim, J.G., Seo, H.S., Paek, N.C., 2006, Rapid upregulation of *Dehydrin3* and *Dehydrin4* in response to dehydration is a characteristic of drought tolerant genotypes in barley, *Journal of Plant Biology*, 49, 55-462.
- Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J.M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., 1999, Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctic, *Nature*, 399, 429-436.

- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F., Bartels, D., 1990, Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes, *Plant Physiology*, 94, 1682-1688.
- Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pages, M., Martinez, M.C., 1991 Phosphorylation of maize RAB-17 protein by casein kinase 2, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22510-22514.
- Pouchkina-Stantcheva, N.N., McGee, B.M., Boschetti, C., Tolleter, D., Chakrabortee, S., Popova, A.V., Meersman, F., Macherel, D., Hinch, D.K., Tunnacliffe, A., 2007, Functional divergence of former alleles in an ancient asexual invertebrate, *Science*, 318, 268-271.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Pirjo, Makela, P., Svensson, J., Heino, P., Palva, E.T., 2004, Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*, *Plant Molecular Biology*, 54, 743-753.
- Reddy, P.V., Soliman, K.M., 1997, Identification of wild and cultivated *Hordeum* species using two-primer RAPD fragments, *Biologia Plantarum*, 39 (4), 543-552.
- Reyes, J.L., Rodrigo, M.J., Colmenero-Flores, J.M., Gil, J.V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D., Covarrubias, A.A., 2005, Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro, *Plant, Cell and Environment*, 28, 709-718.
- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., Dure, L., 1993, Cellular concentrations and uniformity of cell type accumulation of Two Lea proteins in cotton embryos, *Plant Cell*, 5, 769-780.
- Robinson, D., Handley, L.L., Scrimgeour, C.M., Gordon, D.C., Forster, B.P., Ellis, R.P., 2000, Using stable isotope natural abundances to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C.Koch.) genotypes, *Journal of Experimental Botany*, 51, 41-50.
- Rodriguez, E.M., Svensson, J., Malatrasi, M., Choi, D.W., Close, T.J., 2005, Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression, *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 852-858.
- Rorat, T., 2006, Plant dehydrins; Tissue location, structure and function, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11, 536-556.
- Rorat, T., Grygorowicz, W.J., Irzykowski, W., Rey, P., 2004, Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth, *Planta*, 218, 878-885.
- Rossi, M., Lijavetzky, D., Bernacchi, D., Hopp, H.E., Iusem, N., 1996, *Asr* genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato, *Molecular and General Genetics*, 252, 489-492.

- Russel, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powel, W., Waugh, R., 1997, Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs, *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 714-722.
- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., Martin, W., 2002, Genetics and Geography of Wild Cereal Domestication in the Near East, *Nature Reviews Genetics*, 3, 429-441.
- Schulman, A.H., Gupta, P.K., Varshney, R.K., 2004, Organization of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes, *Cereal Genomics*, 83-118.
- Schulte, D., Close, T.J., Graner, A., Langridge, P., Matsumoto, T., Muehlbauer, G., Sato, S., Schulman, A.H., Waugh, R., Wise, R.P., Stein, N., 2009, The international barley sequencing consortium - at the threshold of efficient access to the barley genome, *Plant Physiology*, 149, 142-147.
- Segrest, J.P., De Loof H., Dohlman, J.G., Brouillette, C.G., Anantharamaiah, G.M., 1990, Amphipathic helix motif: classes and properties, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 8, 103-117.
- Shen, G., Pang, Y., Wu, W., Deng, Z., Liu, X., Lin, J., Zhao, L., Sun, X., Tang, K., 2005, Molecular cloning, characterization and expression of a novel *Asr* gene from *Ginkgo biloba*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 836-843.
- Shewry, P.R., 1992, *Biotechnology in agriculture*, Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology, The Alden Press, Oxford, UK, 549-571.
- Shih, M., Hoekstra, F.A., Hsing, Y.C., 2008, Late embryogenesis abundant proteins, *Advances in Botanical Research*, 48, 212-240.
- Silhavy, D., Hutvagner, G., Barta, E., Banfalvi, Z., 1995, Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*, *Plant Molecular Biology*, 27, 587-595.
- Snowdon, R., Link, K., Badani, A.G., Friedt W., 2005, *Plant Breeding: Recent Advances in Molecular Breeding of Oilseed Rape (Brassica napus L.)*, Progress in Botany, In: Esser, K., Lüttge, U., Beyschlag, W., Murata, J. (ed.), Volume 66, Springer Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-540-22474-7, 144-163.
- Stacy, R.A.P., Aalen, R.B., 1998, Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group I Late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein Gsib of *Bacillus subtilis*, *Planta Journal*, 206, 476-478.
- Stacy, R.A.P., Nordeng, T.W., Cullianez-Macia, F.A., Aalen, R.B., 1999, The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells, *Plant Journal*, 19, 1-8.

- Sun, X., Xi, D.H., Feng, H., Du, J.B., Lei, T., Liang, H.G., Lin, H.H., 2009, The dual effects of salicylic acid on dehydrin accumulation in waterstressed barley seedlings, *Russian Journal of Plant Physiology*, 56, 348-354.
- Svensson, J., Ismail, A., Palva, E.T., Close, T.J., 2002, *Cell and molecular responses to stress*, Dehydrins, In: Storey, K.B., Storey, J.B. (ed.), Elsevier Science, Netherlands, 155-171.
- Takahashi, R., Joshee, N., Kitagawa, Y., 1994, Induction of chilling resistance by water stress, and Cdna sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice, *Plant Molecular Biology*, 26, 339-352.
- Tanyolac, B., 2003, Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* ssp *spontaneum*) populations from west Turkey, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50 (6), 611-614.
- Tolleter, D., Hinch, D.K., Macherel, D., 2010, A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state, *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, 26-33.
- Tommasini, L., Svensson, J.T., Rodriguez, E.M., Wahlid, A., Malatrasi, M., Kato, K., Wanamaker, S., Resnik, J., Close, T.J., 2008, Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Functional Integrative Genomics*, 8, 387-405.
- Tunnacliffe, A., Lapinski, J., McGee, B., 2005, A putative Lea protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers, *Hydrobiologia*, 546, 315-321.
- Turpeinen, T., Tenhola, T., Manninen, O., Nevo, E., Nissila, E., 2001, Microsatellite diversity associated with ecological factors in *Hordeum spontaneum* populations in Israel, *Mol Ecol*, 10, 1577-1591.
- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., Thomas, G., 1999, Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice, *Plant Science*, 140, 21-30.
- Vanhala, T.K., 2004, *Exploring And Mapping Genetic Variation in Wild Barley, Hordeum spontaneum*, Thesis (PhD), Wageningen University.
- Vilardell, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martinez, M.C., Torne, J.M., Pages, M., 1990, Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize, *Plant Molecular Biology*, 14, 423-432.
- Von Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jorgensen, R.B., Linde-Laursen, I., 1995, *An ecogeographical study of the genus Hordeum*, 2<sup>nd</sup> ed., Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 7, International Plant Genetic Resources Institute, Roma, 929-0432-292.
- Von Bothmer, R., Sato, K., Komatsuda, T., Yasuda, S., Fischbeck, G., 2003, *The domestication of cultivated barley*, Diversity in barley (*Hordeum vulgare*), In:

- Von Bothmer, R., Hintum, T.V., Knüpfper, H., Sato, K. (ed), Elsevier, Amsterdam, 9-27.
- Vornam, B., Gailing, O., Derory, J., Plomion, C., Kremer A., Finkeldey, R., 2010, Characterisation and natural variation of a dehydrin gene in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., Plant Biology, In: Amtmann, A., (ed.), Chapter 12, German Botanical Society and The Royal Botanical Society of the Netherlands, 881-887
- Wang, C.S., Liao, Y.E., Huang, J.C., Wu, T.D., Su, C.C., Lin, C.H., 1998, Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress, *Plant and Cell Physiology*, 39, 1307-1314.
- Weining, S., Langridge, P., 1991, Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on polymerase chain reaction, *Theoretical and Applied Genetics*, 82(2), 209-216.
- White, S.E., Habera, L.F., Wessler, S.R., 1994, Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for copia-like elements in the evolution of structure and expression, *PNAS*, 91, 11792-11796.
- Wise, M.J., 2002, The POPPs: Clustering and searching using peptide probability profiles, *Bioinformatics*, 18 (Suppl 1), S38-S45.
- Wise, M.J., 2003, LEAping to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles, *Biomedcentral Bioinformatics*, 4, 52-70.
- Wise, M.J., Tunnacliffe, A., 2004, POPP the question: What do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 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, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544, 196-206.
- Zegzouti, H., Jones, B., Marty, C., Lelievre, J.M., Latche, A., Pech, J.C., Bouzayen, M., 1997, ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding, *Plant Molecular Biology*, 35, 847-854.
- Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R., 1997, "Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16, 253-277.
- Zohary, D., 1969, *The progenitors of wheat and barley in relation to domestication and agriculture dispersal in the old world*, The domestication and exploitation of plants and animals, In: Ucko, P.J., Dimbley, G.W., (ed), Duckworth, London, 47-66.
- Zohary, D., Hopf, M., 1993, *The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*, Domestication of plants in the old world, Clarendon Press, Oxford, England, ISBN: 978-0198503569.

## 7. EKLER

**Ek 1:** Klonlama sonucunda plazmidlerden yapılan dizileme sonuçları.

Örnekler	Dizi Sonuçları
AA1 (692bç)	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG  CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCCG  CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG  CATTTCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAACGCT  CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC  AGCAGTTGCATAGTTGCATTCTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA  CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG  AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC  CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG  GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG  GCAGCAGGGACACCGCGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG  GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG  ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT  GGCTACCTTGCAGAA</p>
AA2 (692bç)	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG  CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCCG  CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG  CATTTCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT  CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC  AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA  CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG  AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC  CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG  GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG  GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACCG  GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG  ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT  GGCTACCTTGCAGAA</p>

<p>AA3 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTGTGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>K102 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGAGAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTGCTTGAAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>K169 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGAGAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCATCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCCGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTGCTTGAAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>



<p>K348 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAACGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCAGTTGCATAGTTGCATTCTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACCGCGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>K394 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGAGAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGGGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTGCTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>LH1 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTTACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTCAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAAGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>

<p>LH2 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCGCGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCAGTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCCGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAGGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>LH4 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAGGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAGGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAAGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>LH6 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATGGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>

<p>LK8 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTCGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGAGAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCAGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCATCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>LK9 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>50358 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACCG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>

<p>K1239 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG TATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCCG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>Hs01 (692)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCC AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCCG ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT GGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>Erginel90 (692bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG CATTTCCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT CCGGCAGCACAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGC CAGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCA ACGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGG GAGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATTAAGGAGAAGCTCCCCGGTGG CCACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACC GGAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATG GGCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACG GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCCG GACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCT TGGCTACCTTGCAGAA</p>

Tokak (692bç)	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG  CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG  CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG  CATTTCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT  CCGGCAGCACAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGC  CAGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCA  ACGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGG  GAGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATTAAGGAGAAGCTCCCCGGTGG  CCACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACC  GGAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATG  GGCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACG  GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCCG  GACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAAACTTGAGGTGCCGGTC  TGGCTACCTTGCAGAA</p>
31623 (692bç)	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG  CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG  CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG  CATTTCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT  CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGC  AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA  CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG  AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC  CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG  GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG  GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG  GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCCG  ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAAACTTGAGGTGCCGGTCT  GGCTACCTTGCAGAA</p>
40812 (692bç)	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG  CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG  CACCGGCATGGGCGCGCACGGCGGCGTGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGG  CATTTCAGCCCACGAGGGAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCT  CCGGCAGCTCAAGCTCCAGCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGC  AGCACTTGCATAGTTGCATTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAA  CGACTGAATTTTCTGGTTGGTTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGG  AGGAGGAAGAAGGGCCTCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGC  CACGGTGATCAGCAGCAGACCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCG  GAATGACCGGCACCGGGGAGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGG  GCAGCAGGGACACACCGGAATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGG  GACTGGCGAGAAGAAGGGCATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCCG  ACAGCACTGAGCCCGGCCAGCGGCAGCTACTTGAAACTTGAGGTGCCGGTCT  GGCTACCTTGCAGAA</p>

<p>47002 (674bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGGCATTTCCAGCCCACGAGG GAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCA GCTCGGTGCGTATATTTATAGTACTTACTTCTTGCCAGCACTTGCATAGTTGCA TTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAACGACTGAATTTTCTCGTTG GTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGGAGGAGGAAGAAGGGCCTC AAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGCCACGGTGATCAGCAGCAG ACCGGTGGCACCTATGGACAGCACGGACACACCCGGAATGACCGCCACCGGGG AGCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGGGCAGCAGGGACACACCGG AATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGGGACTGGCGAGAAGAAGGG CATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGGACAGCACTGAGCCCCGCCA GCGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCTGGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>4982 (674bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGGCATTTCCAGCCCACGAGG GAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCA GCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCCAGCACTTGCATAGTTGCA TTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAACGACTGAATTTTCTCGTTG GTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGGAGGAGGAAGAAGGGCCTC AAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGCCACGGTGATCAGCAGCAGA CCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCCGGAATGACCGCCACCGGGGA GCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGGGCAGCAGGGACACACCGGA ATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGGGACTGGCGAGAGGAAGGGC ATCAAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGGACAGCACTGAGCCCCGCCAG CGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCTGGCTACCTTGCAGAA</p>
<p>49085 (674bç)</p>	<p>AGGCAACCAAGATCAACACCACCTGTGCTGTGCAAGATGGAGCACGGCCACG CGACCAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTGGCCGGACATGGCGTCGG CACCGGCATGGGCACCGGCGCGGCTGCAGGTGGGCATTTCCAGCCCACGAGG GAGGAGCACAAGGCCGGAGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCAAGCTCCA GCTCGGTGCGTATATTTATAATACTTACTTCTTGCTAGCACCTGCATAGTTGCA TTTTCCCGCTTAGACTTTGAATGAGAAAGCATCAACGACTGAATTTTCTCGTTG GTCGTGATAGTCTGAGGATGACGGCATGGGCGGGAGGAGGAAGAAGGGCCTC AAGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCCGGTGGCCACGGTGATCAGCAGCAGA CCGGTGGCACCTATGGGCAGCACGGACACACCCGGAATGACCGGCACCGGGGA GCATGGCGCCACCGCCACCGGCGGCACCTATGGGCAGCAGGGACACACCGGA ATGACCGGCACGGGGGCGCATGGCACCGACGGGACTGGCGAGAAGAAGGGC ATCATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCCGGACAGCACTGAGCCCCGCCAG CGGCAGCTACTTGAACTTGAGGTGCCGGTCTG GCTACCTTGCAGAA</p>

## 8. ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Süleyman Çaputlu
Uyruğu	T.C
Doğum tarihi, Yeri	01.01.1988, Ümraniye
Telefon	(505) 290 44 35
E-mail	<a href="mailto:slymncaputlu@gmail.com">slymncaputlu@gmail.com</a>
Web adres	

### Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Lisans	Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2005-2010
Lise	Ümraniye Lisesi	2001-2004