

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**KURAKLIK STRESİ SIRASINDA UYARILAN NAC
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN RANGPUR LAYM'DAN
İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE TURUNÇ
ANACINA GENETİK TRANSFORMASYONU**

Emine Doğuş SİVRİ

**Danışman
Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK**

**DOKTORA TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA-2019**



© 2019 [Emine Doğuş SİVRİ]

TEZ ONAYI

Emine Doğuş SIVRİ tarafından hazırlanan ‘**Kuraklık Stresi Sırasında Uyarılan NAC Transkripsiyon Faktörünün Rangpur Laym’dan İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Turunç Anacına Genetik Transformasyonu**’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Jüri Üyesi **Prof. Dr. Ali Ramazan ALAN**
Pamukkale Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ**
Adnan Menderes Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Prof. Dr. Yusuf UÇAR**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Emine Doğuş SİVRİ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Turunçgiller.....	4
2.2. Çevresel Stres Faktörleri.....	6
2.3. Kuraklık Stresi.....	7
2.3.1. Kuraklık stresinden kaçınma	8
2.3.2. Kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmaları.....	9
2.3.2.1. Kuraklık stresi ve stomaların kapanması	9
2.3.2.2. Kuraklık stresinin ozmotik düzenleme üzerine etkisi.....	12
2.3.2.3. Kuraklık stresi, reaktif oksijen türleri (ROT) ve det oksifikasyonları	13
2.3.2.4. Bitkilerde abiyotik streslere dayanımın moleküler mekanizması	15
2.4. Transkripsiyon Faktörleri.....	17
2.4.1. NAC transkripsiyon faktörleri	18
2.4.1.1. NAC transkripsiyon faktörlerinin yapısı.....	19
2.4.1.2. NAC transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları	20
2.5. Gen Aktarım Yöntemleri	28
2.6. Turunçgillerde Gen Aktarım Yöntemlerinin Geliştirilmesi.....	28
2.7. Turunçgiller ve Kuraklık Stresi.....	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Kısmi Baz DNA Dizilimi Bilinen NAC Geninin RACE Yöntemiyle Tüm Gen Olarak Elde Edilmesi	42
3.1.1. Bitki materyali	42
3.1.2. 14 günlük kuraklık stresi uygulaması.....	43
3.1.3. mRNA izolasyonu.....	43
3.1.4. RACE yöntemi.....	44
3.1.4.1. 3' ve 5' RACE ready cDNA'larının hazırlanması	44
3.1.4.2. 3' ve 5' RACE PCR'larının yapılması	45
3.1.4.3. 3' ve 5' RACE-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerin DNA dizilerinin analizi.....	46
3.1.4.4. Tüm gen olarak elde edilen NAC geninin dizi analizi ve diğer bitkilerde bulunan diğer NAC genleri ile karşılaştırılması	47
3.2. NAC Geninin Kuraklık Stresi Sırasında Gen İfadesinin Rangpur laym ve Turunç Anaçlarında İncelenmesi	48
3.2.1. Bitki materyali	48
3.2.2. 14 günlük kuraklık stresi uygulaması.....	48
3.2.3. Toplam RNA izolasyonu	49
3.2.4. Real-time RT-PCR Analizi.....	50

3.3. Rangpur laym Anacından İzole Edilen <i>NAC</i> Geninin Turunç Anacına Transformasyonu.....	50
3.3.1. <i>NAC</i> geninin Çoğaltılması	50
3.3.2. pGEM-T Easy vektörüne klonlanması.....	52
3.3.3. pJIT30 plazmiti içerisine klonlanması	53
3.3.4. pCAMBIA 1304 ikili vektöre klonlanması	54
3.3.5. pCAMBIA 1304 ikili vektöre klonlanan <i>NAC</i> geninin <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e aktarılması	56
3.3.6. <i>NAC</i> geninin turunç anacına transformasyonu	57
3.3.6.1. Tohum çimlendirme.....	57
3.3.6.2. <i>NAC</i> geninin turunç epikotil parçaları kullanılarak turunç anacına transformasyonu	58
3.3.6.3. Transgenik turunç bitkilerinin analizi.....	59
3.3.6.3.1. β -glukuronidaz (GUS) testi	59
3.3.6.4. PCR analizi.....	60
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	61
4.1. <i>NAC</i> Geninin RACE Yöntemiyle Tüm Gen Olarak Elde Edilmesi	61
4.1.1. 3' RACE PCR.....	61
4.1.2. 5' RACE PCR.....	63
4.2. <i>CINAC</i> Geninin Dizi Analizi ve Karşılaştırılması	66
4.3. <i>CINAC</i> Geninin Ekspresyonunun Rangpur laym ve Turunç Anaçlarında İncelenmesi.....	74
4.4. <i>CINAC</i> Geninin Rangpur Laym'dan Tüm Gen Olarak Çoğaltılması ve cDNA Sentezi.....	75
4.5. Tüm Gen Olarak Çoğaltılan <i>CINAC</i> geninin pCAMBIA 1304 Vektörüne Klonlanması	77
4.5.1. <i>CINAC</i> genine promotör ve terminatör bölgelerin eklenmesi	77
4.5.2. <i>CINAC</i> geninin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması.....	81
4.5.3. pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörüne klonlanan <i>CINAC</i> gen kasetinin elektroporasyon yöntemi ile <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404'e aktarımı.....	84
4.5.4. pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörüne klonlanan ve <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404'e aktarımı yapılan <i>CINAC</i> geninin turunç anacına transformasyonu	86
4.5.4.1. Tohum sterilizasyonu ve ekimi	86
4.5.4.2. Turunç epikotil parçalarının transformasyonunda sürgün gelişim konsantrasyonunun belirlenmesi	86
4.5.4.3. Epikotil parçalarının transformasyonu.....	89
4.5.4.4. Turunç epikotil parçalarının rejenerasyonu ve seleksiyonu.....	89
4.6. Trasgenik Sürgünleri Köklendirme	91
4.7. Glukuronidaz (GUS) testi	94
4.8. PCR Testi.....	94
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	96
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	121

ÖZET

Doktora Tezi

KURAKLIK STRESİ SIRASINDA UYARILAN NAC TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN RANGPUR LAYM'DAN İZOLASYONU, KARAKTERİZASYONU VE TURUNÇ ANACINA GENETİK TRANSFORMASYONU

Emine Doğuş SİVRİ

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Çevresel stres faktörleri dünyadaki bütün bitkilerin büyümesini, üretimini ve dağılmasını sınırlayan en önemli faktörler olarak bilinmektedir. Abiyotik stres faktörlerinden biri olan kuraklık ise doğal dengeyi olumsuz olarak etkilemektedir. Dünya üzerinde giderek etkisini artıran kuraklık, ülkemizde ve dünyada diğer meyve türlerinde olduğu gibi turunçgil yetiştiriciliğini de olumsuz yönde etkilemektedir. Türkiye’de ve Akdeniz kuşağında turunçgil yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan turunç (*Citrus aurantium*) anacı kuraklığa orta şiddette tolerans göstermektedir. Bu nedenle kuraklığa dayanıklı anaç geliştirilmesi ülkemizde turunçgil ıslahının ana amaçlarından birini oluşturmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada Rangpur laym (*Citrus x limonia*) bitkilerine kuraklık stresi uygulandığında uyarılan genler arasında kuraklık dayanımında etkili olan bir NAC geni bulunmuştur. Bu çalışmada kısmi baz dizilimi bilinen bu NAC geninin RACE yöntemiyle 5’ ve 3’ uçları bulunarak bu NAC geninin tamamı elde edilmiştir. Tüm gen olarak izole edilen NAC geni *CINAC* olarak tanımlanmıştır ve farklı turunçgil anaçlarında kuraklık stresi sırasında ekspresyonu incelenmiştir. Yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda 14 günlük kuraklık stresi uygulaması sırasında *CINAC* geninin ekspresyonu Rangpur laym bitkilerinde artarken turunç anacında herhangi bir artış göstermemiştir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında turunç anacının kuraklık stresine karşı toleransını artırmak amacıyla *CINAC* geni *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı turunç anacına aktarılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla NAC geni RT-PCR yöntemi ile tüm gen olarak çoğaltılarak Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotör ve terminatör bölgeleri arasına klonlanmıştır. Elde edilen tüm gen daha sonra pCAMBIA-1304 binary plazmitinin T-DNA bölgesine klonlanarak *Agrobacterium tumefaciens*'e aktarılmıştır. Elde edilen tüm NAC geni daha önce geliştirilen ve turunçgilerde yaygın olarak kullanılan *Agrobacterium* aracılığı ile gen transformasyon yöntemi kullanılarak tohumlardan yetiştirilen turunç epikotil parçalarına aktarılmıştır. Transformasyon yapılan epikotil parçalarından doğrudan organogenez yoluyla rejenerasyonu yapılarak potansiyel transgenik sürgünler oluşturulmuştur. Elde edilen sürgünlerin transgenik olup olmadıklarını histokimyasal GUS boyaması ve PCR yöntemiyle test edilmiştir. Ancak yapılan GUS veya PCR testlemeleri sonucunda test edilen sürgünlerin tamamı negatif sonuç vermiş olup elde edilen sürgünlerden hiçbirinden transgenik bitki elde edilememiştir. Çalışma sonucunda transgenik bitki

elde edilmemiş olmasına rağmen kuraklık ile ilişkili bir NAC geninin izolasyonu, ekspresyon analizi ve gen aktarım vektörüne klonlaması yapılarak, turunç anacına genetik transformasyonun ve rejenerasyonunun optimizasyonu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik stres, kuraklık, RACE, transkripsiyon faktörü, NAC tf, *Agrobacterium* gen transformasyonu, stres, turunç

2019, 121 sayfa



ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ISOLATION, CHARACTERIZATION OF NAC TRANSCRIPTION FACTOR INDUCED, DURING DROUGHT STRESS FROM RANGPUR LIME AND GENETIC TRANSFORMATION TO *CITRUS AURANTIUM* ROOTSROCK

Emine Doğuş SİVRİ

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

Environmental stress factors are known to be the most important factors limiting the growth, production and distribution of all plants in the world. Drought, which is one of the abiotic stress factors, adversely affects the natural balance. The drought, which increases its effect on the world, negatively affects the citrus cultivation as it is in other fruit species in Turkey and in the world. Sour orange (*Citrus aurantium*) rootstock is widely used rootstock in the cultivation of citrus in Turkey and the Mediterranean Basin and is only moderately tolerant to drought. Therefore, the development of drought-resistant rootstock is one of the main aims of citrus breeding in Turkey. A partial sequence of a *NAC* gene induced by drought stress was previously identified from Rangpur lime (*Citrus x limonia*) rootstock. In this study, the 5' and 3' ends of this *NAC* gene were determined by RACE method and the full-length gene was isolated from the leaves of drought treated Rangpur lime rootstock. The full-length *NAC* gene was designated as *CINAC* and its expression in response to drought was analyzed in different citrus rootstocks. The expression analysis showed that while the expression of *CINAC* gene was increased in Rangpur lime, it was not induced at all in sour orange during 14-day drought treatment. Therefore, the *CINAC* gene was transferred to sour orange by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation method to improve drought tolerance of sour orange rootstock. For this, the full-length *CINAC* gene was amplified by RT-PCR and cloned between *Cauliflower mosaic virus* (*CaMV*) 35S promoter and terminator regions. The gene cassette was then cloned into the T-DNA region of pCAMBIA-1304 binary plasmid and transferred to *Agrobacterium tumefaciens*. The *CINAC* gene was transferred to the sour orange (*C. aurantium*) epicotyl segments grown from seeds using the *Agrobacterium*-mediated transformation method previously developed and commonly used in citrus transformation. Potential transgenic shoots were regenerated from transformed epicotyl segments by direct organogenesis. The transgenic nature of regenerated shoots were tested by histochemical GUS staining and PCR methods. However, all tested shoots were negative for GUS and PCR tests indicating that no transgenic shoots were obtained. Although no transgenic plants were obtained in this study, a drought induced *NAC* gene was isolated, its expression was analyzed, and the gene was cloned into gene transformation vector. In addition, genetic transformation and regeneration of transgenic sour orange was optimized in this study.

Keywords: Abiotic stress, drought, RACE, transcription factor, NAC tf, *Agrobacterium* gene transformation, stress, *Citrus aurantium*

2019, 121 pages



TEŞEKKÜR

Doktora tez alıőmam boyunca deneyimlerini ve bilgileri ile beni aydınlatan ve bu çalıőmayı yürütmemde sonsuz sabrı ile bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK'e ve engin tecrübelerini benimle paylaşan, bana maddi ve manevi destek olan Sayın Prof. Dr. Bayram ÇEVİK hocama teşekkür ederim.

Tez izleme komitesi üyelerim Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK-BAYDAR ve Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ hocalarıma da doktora ara rapor dönemlerinde tecrübeleri ile tez hakkında yaptıkları görüş ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim ve sonsuz őükranlarımı sunarım.

2150444 nolu TOVAG projesi ile teze maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, zor anlarımda bana destek ve moral veren ve bana hep güvenen annem Naime SİVRİ, babam Mehmet SİVRİ ve kardeőim Mustan Barıő SİVRİ'ye çok teşekkür ederim.

Emine Doğuş SİVRİ
Isparta, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Stres sırasında bitki hücrelerinde sinyal iletim yolu (Huang vd., 2012) ...	16
Şekil 2.2. NAC domainin yapısı (Puranik vd., 2012)	19
Şekil 3.1. NAC genine spesifik DNA'yı içeren pCAMBIA 1304 ikili vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hücrelerine aktarılmasında kullanılan elektroporator cihazı.....	57
Şekil 3.2. Turunç tohumlarının çimlendirilerek epikotil oluşturmasının aşamaları a) Turunç tohumlarının kabuklarının soyulması b) Yüzey sterilizasyonu c) Medya hazırlama d) Tohum çimlenmesi e) Epikotil gelişimi.....	58
Şekil 3.3. Turunç epikotil parçaları kullanılarak yapılan genetik transformasyonun aşamaları. A) Fidelerin epikotil kısımlarının kesilmesi B) <i>Agrobacterium</i> ile inokülasyon C) Transformasyon yapılan segmentlerin ko-külivasyon ortamına alınması	59
Şekil 4.1. RACE-PCR jel görüntüsü	62
Şekil 4.2. pGEMT-easy plazmitine klonlanan 3'RACE-PCR örneğinin M13F ve M13R primerleri ile yapılan koloni PCR görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-15: Koloni PCR ürünleri	63
Şekil 4.3. Nested RACE-PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü	64
Şekil 4.4. pGEMT-easy plazmitine klonlanan 5' Nested RACE-PCR örneğinin M13F ve M13R primerleri ile yapılan koloni PCR görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-15: Koloni PCR ürünleri	66
Şekil 4.5. RACE yöntemi ile <i>CINAC</i> geninin tüm gen dizisinin elde edilmesi	67
Şekil 4.6. <i>CINAC</i> geninin cDNA dizisi	68
Şekil 4.7. <i>CINAC</i> geninin tüm cDNA dizisi ile yapılan BLASTN analizlerinin sonuçları	70
Şekil 4.8. <i>CINAC</i> geninin kodladığı amino asit dizileri ile yapılan conserved domain (CD) araştırması ve BLASTP analizlerinin sonuçları.....	71
Şekil 4.9. <i>CINAC</i> geninin diğer gen bankasında yer alan diğer NAC genleriyle olan çoklu sekans karşılaştırması. ADL36797 <i>Malus domestica</i> , XP 008345087 <i>Malus domestica</i> , XP 008226676 <i>Prunus mume</i> , XP 020418173 <i>Prunus persica</i> , XP 004291667 <i>Fragaria vesca</i> , KDO74151 <i>Citrus sinensis</i> , XP 006464708 <i>Citrus sinensis</i> , XP 006451940 <i>Citrus clementina</i> , EOY12853 <i>Theobroma cacao</i> , XP 007021328 <i>Theobroma cacao</i> , XP 016732489 <i>Gossypium hirsutum</i> , XP 017605223 <i>Gossypium arboreum</i> , XP 012458602 <i>Gossypium raimondii</i> , XP 010089503 <i>Morus notabilis</i> , XP 015869180 <i>Ziziphus jujuba</i> , APA20125 <i>Populus tomentosa</i> , XP 011042499 <i>Populus euphratica</i> , XP 002316917 <i>Populus trichocarpa</i> , XP 011029436 <i>Populus euphratica</i> , XP 002533913 <i>Ricinus communis</i> , XP 002284668 <i>Vitis vinifera</i> , XP 018851445 <i>Juglans regia</i> , XP 009594219 <i>Nicotiana tomentosiformis</i> , XP 019451092 <i>Lupinus angustifolius</i>	72
Şekil 4.10. <i>CINAC</i> geninin diğer gen bankasında yer alan diğer NAC genleriyle filogenetik analizi. ADL36797 <i>Malus domestica</i> , XP 008345087 <i>Malus domestica</i> , XP 008226676 <i>Prunus mume</i> , XP 020418173 <i>Prunus persica</i> , XP 004291667 <i>Fragaria vesca</i> , KDO74151 <i>Citrus sinensis</i> , XP 006464708 <i>Citrus sinensis</i> , XP 006451940 <i>Citrus clementina</i> , EOY12853 <i>Theobroma cacao</i> , XP 007021328 <i>Theobroma cacao</i> , XP 016732489 <i>Gossypium hirsutum</i> , XP 017605223 <i>Gossypium arboreum</i> , XP 012458602	

	<i>Gossypium raimondii</i> , XP 010089503 <i>Morus notabilis</i> , XP 015869180 <i>Ziziphus jujuba</i> , APA20125 <i>Populus tomentosa</i> , XP 011042499 <i>Populus euphratica</i> , XP 002316917 <i>Populus trichocarpa</i> , XP 011029436 <i>Populus euphratica</i> , XP 002533913 <i>Ricinus communis</i> , XP 002284668 <i>Vitis vinifera</i> , XP 018851445 <i>Juglans regia</i> , XP 009594219 <i>Nicotiana tomentosiformis</i> , XP 019451092 <i>Lupinus angustifolius</i>	72
Şekil 4.11.	<i>CINAC</i> geninin ekspresyonunun Rangpur laym (<i>C. limonia</i>) 14 günlük kuraklık stresi sırasında incelenmesi. KNT: Kontrol bitkileri. STR: Kuraklık stresi uygulanmış bitkiler	75
Şekil 4.12.	<i>CINAC</i> geninin ekspresyonunun turunç 14 günlük kuraklık stresi sırasında incelenmesi. KNT: Kontrol bitkileri. STR: Kuraklık stresi uygulanmış bitkiler	75
Şekil 4.13.	14 gün kuraklık stresi uygulanmış Rangpur laym bitkilerinden izole edilen <i>CINAC</i> geninin MSC 229 ve MSC 230 primerleri ile yapılan RT-PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü	76
Şekil 4.14.	<i>CINAC</i> geninin pGEMT Easy plazmitine klonlanması sonucunda elde edilen kolonilerin M13F-R primerleri ile yapılan PCR görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-18: Koloni PCR ürünleri. NK: Negatif kontrol.....	78
Şekil 4.15.	pGEM-T Easy plazmitine aktarılan <i>CINAC</i> geninin <i>BamHI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon enzimleri ile kesiminin ardından elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü.....	78
Şekil 4.16.	pJIT 30 plazmitinin <i>BamHI</i> ve <i>HindIII</i> restriksiyon enzimleri ile jel kesim görüntüsü ve pJIT 30 plazmitinin şematik görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü.....	79
Şekil 4.17.	<i>CINAC</i> geninin ve pJIT 30 plazmitinin <i>BamHI</i> ve <i>HindIII</i> enzimleri ile kesim sonrasında sırasıyla jel ekstraksiyonu ve PCR saflaştırmasının jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü	79
Şekil 4.18.	<i>CINAC</i> geninin pJIT 30 plazmitine klonlanması sonucunda elde edilen tek koloninin BC 200-201 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü	80
Şekil 4.19.	pJIT 30 plazmitine aktarılan <i>CINAC</i> geninin BC 212 ve BC 213 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü M: DNA büyüklük markörü. ..	81
Şekil 4.20.	pCAMBIA 1304 plazmiti ve <i>CINAC</i> gen kaseti içeren saflaştırılmış DNA'nın PstI enzim ile kesim sonrasında yapılan PCR saflaştırma jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü	82
Şekil 4.21.	<i>CINAC</i> gen kasetinin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması sonucunda elde edilen kolonilerin MSC 229-230 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-38: Koloni PCR ürünleri.....	83
Şekil 4.22.	<i>CINAC</i> gen kasetinin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması sonucunda elde edilen pozitif kolonilerin MSC229-230 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve <i>PstI</i> ile kesim görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü.....	84
Şekil 4.23.	<i>CINAC</i> gen kasetinin klonlandığı pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e transformasyonu sonrasında oluşan koloniler	85
Şekil 4.24.	<i>CINAC</i> gen kasetinin klonlandığı pCAMBIA 1304 vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e transformasyonu sonrasında oluşan kolonilere gen spesifik MSC 229-230 primerlerle yapılan koloni PCR	

jel görüntüsü M: DNA büyüklük markörü. 1-8: PCR ürünleri. NK: Negatif kontrol.....	85
Şekil 4.25. 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg ^l ⁻¹ BAP konsantrasyonu içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunç segmentlerinin ikinci (üstte) ve dördüncü haftalardaki görüntüsü	87
Şekil 4.26. 0.5 ve 1,5 mg ^l ⁻¹ BAP konsantrasyonu içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunç segmentlerinin alıncı (solda) ve sekizinci haftalardaki görüntüsü	88
Şekil 4.27. 0,5 mg ^l ⁻¹ BAP konsantrasyonu içeren sürgün gelişim ortamında bulunan turunç segmentlerinin onuncu haftadaki görüntüsü.....	88
Şekil 4.28. 2,5 mg ^l ⁻¹ , 5 mg ^l ⁻¹ , 7,5 mg ^l ⁻¹ ve 10 mg ^l ⁻¹ higromisin konsantrasyonları içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunç segmentlerinin ikinci haftadaki görüntüsü	90
Şekil 4.29. 2,5 mg ^l ⁻¹ , 5 mg ^l ⁻¹ , 7,5 mg ^l ⁻¹ ve 10 mg ^l ⁻¹ higromisin konsantrasyonları içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunç segmentlerinin dördüncü haftadaki görüntüsü	90
Şekil 4.30. Turunç segmentlerinden gelişen sürgünlerin 6. haftadaki 0,5 mg ^l ⁻¹ NAA köklendirme ortamındaki görüntüsü	92
Şekil 4.31. Turunç segmentlerinden gelişen sürgünlerin 8. haftadaki 0,5 mg ^l ⁻¹ NAA köklendirme ortamındaki görüntüsü	93
Şekil 4.32. Turunç segmentlerinden gelişen sürgünlerin 10. haftadaki 0,5 mg ^l ⁻¹ NAA köklendirme ortamındaki görüntüsü	93
Şekil 4.33. Transgenik olup olmadığı test edilen turunç bitkilerinin GUS testi.....	94
Şekil 4.34. Transgenik olup olmadığı test edilen turunç bitkilerinin PCR analizi	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Kısmi baz dizilimi bilinen <i>NAC</i> geninin 3' ve 5' uç kısımlarını bulmak için tasarlanan 3' ve 5' RACE Primerleri ve dizileri	46



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik asit
ABRE	ABA-responsive element
APX	Askorbat peroksidaz
Arg	Arjinin
ATA	Arabidopsis transcription activation factor
CAT	Katalaz
CUC	Cup-shaped cotyledon
DRE	Dehydration-responsive element
DREB	Dehydration responsive element binding protein
Glu	Glutamin
GPX	Glutatyon peroksidaz
LRE	Low-temperature responsive element
M	Markör
MAPK	Mitojenle aktive olmuş protein kinaz
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
MYB	Myeloblastosis oncogene
MYC	Myelocytomatosis oncogene
NAC	NAM, ATAF1,2, CUC2, a multifunctional plant TF family
NAM	No apical meristem
POD	Peroksidaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
SA	Salisilik asit
SNAC	Stress responsive NAC
SOD	Süperoksit dismutaz
TRR	Transkripsiyon düzenleyici bölge

1. GİRİŞ

Canlıların buldukları yaşam alanlarında büyüme ve gelişmesini etkileyen sınırlayıcı koşullar stres olarak tanımlanmaktadır. Bitkiler sessiz yaşam şartlarından dolayı yaşamları boyunca birçok stres faktörüne maruz kalmaktadırlar. Çevresel stres koşulları dünyadaki bütün bitkilerin büyümesini, üretimini ve dağılmasını sınırlayan en önemli faktörler olarak bilinmektedir. Stres faktörleri dünya tarım alanlarının çoğunu tehdit etmektedir ve biyotik (patojen, mikroorganizmalar vb.) ve abiyotik (kuraklık, soğuk, tuzluluk, radyasyon) stres faktörleri olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Stres faktörleri verim kayıplarına neden olmaktadır. Örneğin; kuraklık stresi stomalarda kapanma ve gaz değişiminde kısıtlamaya neden olmaktadır. Stomaların kapanmasına bağlı olarak karbondioksit alımı ve fotosentez kısıtlanmaktadır. Kuraklık stresinin ilerleyen aşamalarında ise aşırı su kaybının metabolizma ve hücre yapısını tamamen bozduğunu ve enzimle katalizlenen reaksiyonları durdurduğunu göstermiştir (Smirnov, 1993; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Bitkiler stres faktörleri ile başa çıkabilmek için farklı yollarda görevli birçok genin aktivitesinin sonucunda bünyelerinde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde değişikliklere giderek farklı adaptasyon stratejileri geliştirmişlerdir. Streslerde etkili olan genlerin ifadelerinin düzenlenmesi transkripsiyon faktörleri (TF) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bitki TF'leri arasında yer alan NAC TF'lerinin streslere karşı tepkiler sırasında anahtar düzenleyicilerden biri olduğu ortaya çıkmıştır (Puranik vd., 2012; Nuruzzaman vd., 2013). NAC proteinleri bitkiye özgü TF'lerinin en büyük ailelerinden birini oluşturmaktadır ve bitki gelişimi ve bitkilerin streslere olan tepkileri sırasında önemli roller oynadığı bilinmektedir (Olsen vd., 2005; Puranik vd., 2012; Nuruzzaman vd., 2013). Model bitki *Arabidopsis*'de NAC TF'lerinin streslere karşı tepkilerinin düzenlenmesindeki rolleriyle ilgili bugüne kadar çok fazla ilerleme kaydedilmiştir. Örneğin; kuraklık, tuzluluk ve ABA tarafından uyarılan 3 NAC geninin *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072'nin* (RD26) aşırı ifadesi ile transgenik *Arabidopsis'te* kuraklık stresine karşı daha fazla tolerans kazandırılmıştır (Fujita vd., 2004; Tran vd., 2004). *ANAC96* geninin ise absisik asit (ABA)'ya bağlı streslere toleransta etkili genlerin promotör bölgelerinde yer alan absisik asit tepkili elementlerine (ABRE) bağlanarak kuraklık stresine karşı tepkinin düzenlenmesinde yer aldığı bildirilmiştir (Xu vd., 2013).

NAC TF'lerinin ayrıca çelikte (*Oryza sativa*) de abiyotik streslere karşı olan tepkilerinin düzenlenmesinde rol aldığı tespit edilmiştir. Örneğin; çelikte *OsNAC6 / SNAC2* geni aşırı düzeyde ifade edildiği transgenik çelik bitkilerinin kuraklığa, tuzluluğa, soğuk streslerine ve aynı zamanda hastalıklara karşı daha iyi tolerans sağladığı gözlemlenmiştir (Nakashima vd., 2007; Hu vd., 2008). Çelikten izole edilen bir diğer NAC geni olan *OsNAC10* geninin çelikte aşırı ifadesi gerçekleştirildiğinde ise tarla koşullarında yapılan kuraklık uygulamalarının ardından transgenik bitkilerin kontrol bitkilere göre kuraklık toleranslarının ve tane verimlerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir (Jeong vd., 2010). Ayrıca buğday, mısır, soya fasulyesi ve nohuttan izole edilen NAC TF'lerinin *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı ifade edilmesi elde edilen transgenik *Arabidopsis* bitkilerin kuraklık ve tuzluluk streslerine karşı toleranslarının arttığı bildirilmiştir. Örneğin; *TaNAC2*, *TaNAC67* ve *TaNAC29* geninin aşırı ifade edilmesi ile elde edilen transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin kuraklık ve tuzluluk streslerine karşı tolerans düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Xue vd., 2011; Mao vd., 2012; Mao vd., 2014). Yapılan bir başka çalışmada ise soya fasulyesinden izole edilen *GmNAC20* geninin aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin tuzluluk ve soğuğa karşı tolerans düzeyleri artarken, yine soya fasulyesinden izole edilen bir başka NAC geni olan, *GmNAC11* geninin aşırı ifadesi ile transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin yalnızca tuzluluğa karşı toleransının arttığı belirlenmiştir (Hao vd., 2011). Yapılan bu çalışmalar NAC TF'lerinin stres faktörlerine karşı dayanıklılıkta önemli rollerinin olduğunu göstermektedir.

Turunçgiller dünyada en fazla üretimi yapılan ve ekonomik açıdan önemli bir meyve grubunu oluşturmaktadır. İnsan beslenmesindeki önemi, kendine has renk ve kokusu, kozmetik sanayinin ham maddelerinden oluşu bunun nedenlerinden bazılarıdır. Ülkemizde ve dünyada hastalık ve zararlılar gibi biyotik streslerin yanı sıra kuraklık, soğuk, tuzluluk gibi abiyotik stres faktörleri de diğer bitki gruplarının üretiminde olduğu gibi turunçgil üretimini de olumsuz yönde etkileyerek turunçgil üretimini ve kalitesini sınırlandırmaktadır. Turunçgillerin de dahil olduğu ve tarımsal yönden önemli birçok ürünün yetiştiriciliğinde anaç kullanılmaktadır. Yetiştiricilikte kullanılan bu anaçların bitkilerin abiyotik ve biyotik stres koşullarına uyum sağlamaları yanında ağacın meyveye yatma süresine ve ömrüne, verim ve kalite üzerine de etkileri bulunmaktadır. Tohum ve diğer vejetatif yollarla da çoğalabilen

turunçgiller hastalıklar, iklim ve toprak şartları nedeniyle çoğunlukla aşu ile çoğalılmaktadırlar. 1920’li yıllardaki *Tristeza* (Göçüren) salgını ve Florida’da meydana gelen don olayları nedeniyle dünyada turunçgil anaçları üzerine ciddi çalışmalar yapılmaya başlanmış ve değişik iklim ve toprak koşullarına uyum gösteren anaçlar elde edilmiştir.

Ülkemizde ise turunçgil yetiştiriciliğinde çoğunlukla turunç anacı kullanılmaktadır. Turunç anacının ülkemizde kullanılmasının nedeni ağır ve kireçli topraklarda daha iyi gelişim göstermesinden kaynaklanmaktadır. Ancak turunç anacı orta derecede kuraklığa tolerans göstermektedir. Son yıllarda çevresel bir sorun olan küresel ısınmanın etkisiyle birlikte kuraklık, meyve yetiştiriciliğini olumsuz olarak etkilemektedir. Dünya üzerinde kuraklık etkisinin artarak devam etmesi nedeni ile ülkemizde diğer meyve türlerinde olduğu gibi turunçgil yetiştiriciliğinde de en çok kullanılan turunç anacının kuraklığa karşı olan tolerans düzeyinin artırılması gerekmektedir. Turunçgil yetiştiriciliğinde kuraklığa dayanıklılık özelliğinden dolayı kurak koşullarda ve özellikle Brezilya’da Rangpur laym (*Citrus limonia*) anacı kullanılmaktadır ve turunçgil yetiştiriciliğinde Rangpur laym kuraklığa dayanıklılıkta kullanılan en önemli anaç olarak bilinmektedir. Rangpur laym üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda kuraklık sırasında aktif olan genler arasında *NAC* geninin varlığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada da daha önce Rangpur laymda kuraklık sırasında ifade edilen ve kısmi baz dizilimi bilinen bir *NAC* geninin (Şahin Çevik vd., 2017) RACE yöntemi ile 5’ ve 3’ bölgeleri elde edilerek Rangpur laym bitkisinden izolasyonu yapılarak çoğalılmıştır. Elde edilen bu gen *CINAC* geni olarak izimlendirilmiştir. Sonra *CINAC* geni Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) 35S promotör ve terminatör bölgeleri arasına klonlanmıştır. Daha sonra *CINAC* geni pCAMBIA-1304 binary plazmitinin T-DNA bölgesine klonlanarak *Agrobacterium tumefaciens*’e LBA4404’e aktarılmıştır. Yapılan bu tez çalışmasının son aşamasında da *CINAC* geninin *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile turunç (*Citrus aurantium*) bitkisine aktarılması amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Turunçgiller

Turunçgiller, Geraniales takımının Rutaceae familyasında yer almaktadır (Gmitter ve Hu, 1990). Turunçgiller donma tehlikesinin olmadığı, meyve üretimini sağlamak için dünyada yeterli su ve uygun toprak koşullarının bulunduğu 40 ° kuzey ve 40 ° güney enlemleri arasında kalan tropikal ve subtropikal bölgelerde yetiştirilmektedir. Dünyada en önemli turunçgil üretim alanları Amerika, Akdeniz Havzası, Güney ve Güneydoğu Asya bölgelerinde bulunmaktadır (FAO, 2003). Turunçgillerin anavatanı tropik ve semitropik bölgeler olmasına rağmen yetiştiriciliği subtropik bölgelerde yoğunlaşmış ve en kaliteli meyveler özellikle sofralık taze tüketime uygun kaliteli turunçgil meyveleri bu bölgelerde yapılan yetiştiricilikten sağlanmaktadır. Tropik ve semitropik bölgelerden elde edilen turunçgillerde meyve iç ve dış renklenmesi ve aroma iyi olmamaktadır (Yeşiloğlu vd., 2011).

FAO verilerine göre, 2016 yılı itibarıyla dünyada toplam 66,9 milyon ton portakal (*Citrus sinensis*), 32,9 milyon ton mandarin (*Citrus reticulata*) ve satsuma mandarini (*Citrus unshiu*), 15,9 milyon ton limon (*Citrus limonia*), 8,3 milyon ton alıntop (*Citrus paradisi*) olmak üzere toplam 124,2 milyon tonun üzerinde turunçgil üretimi gerçekleşmiştir. Portakal (*Citrus sinensis*), mandarin (*Citrus reticulata*), limon (*Citrus limonia*), laym (*Citrus aurantifolia*) ve alıntop (*Citrus paradisi*) gibi ekonomik değere sahip ticari turunçgil türlerinin üretiminin yanı sıra şadok (*Citrus maxima*), ağaç kavunu (*Citrus medica*) ve bergamot (*Citrus bergamia*) gibi diğer turunçgil türlerinin de üretimi gerçekleştirilmektedir. Turunçgil üretiminde en büyük üretici ülke 32,9 milyon ton ile Çin olup onu sırasıyla Brezilya, Hindistan, USA, İspanya ve Meksika izlemektedir.

Turunçgil yetiştiriciliğinde ülkemiz önemli bir konuma sahiptir. Akdeniz havzasında yer alması nedeniyle ülkemiz, kaliteli sofralık üretim açısından oldukça uygun ekolojik koşullara sahiptir (Tuzcu, 1998). Bu havza içerisinde yer alan ülkeler arasında başta İspanya olmak üzere, Türkiye, İtalya, Yunanistan, Mısır, Fas ve Tunus'ta dünya pazarlarında aranan kaliteli turunçgil meyvelerinin üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye'de toplam turunçgil üretim alanı 2007 yılında 111 bin

hektar iken, %23 artışla 2016 yılında 135 bin hektar alana çıkmıştır (TÜİK, 2017). Türkiye toplam 3.652.1 ton turunçgil üretimi ile dünyada dokuzuncu sırada yer almaktadır ve Türkiye'nin dünya toplam turunçgil üretimindeki payı ise yaklaşık olarak %2,94'dür (FAO, 2016). Ülkemizde turunçgil üretimi Akdeniz ve Ege kıyı şeridinde yoğun olarak, Doğu Karadeniz'de ise nispeten yapılmaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en fazla portakal üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye turunçgil üretiminin ise %46,5'ini portakal oluşturmaktadır. Ticari turunçgil türleri arasında üretimi en az yapılan turunçgil türü ise greylifttir (FAO, 2016).

Tarımsal üretimde meyve verim ve kalitesi üzerinde genetik faktörlerin yanında çevresel faktörlerinde etkisi bulunmaktadır. Bitkiler yetiştirildikleri ortamda sıklıkla çevresel streslere maruz kalmaktadırlar (Türkan vd., 2005). Araştırmacılar, küresel ısınma sebebiyle, Akdeniz havzasının bazı bölgelerinde gelecek yıllarda kışın daha belirgin olmak üzere, yağış miktarlarının %10-15 oranlarında azalacağını, daha sıcak ve kurak iklim koşullarının yaşanacağını ön görmektedirler (Türkeş, 2007). Küresel ısınma, atmosfere verilen gazların sera etkisi nedeniyle, dünya atmosferi ve okyanuslarının ortalama sıcaklıklarında meydana gelen artışa verilen isimdir. Tüm dünyada olduğu gibi, Türkiye'de de küresel ısınmanın özellikle su kaynaklarının zayıflaması, kuraklık ve çölleşme ile buna bağlı olarak gelişen ekolojik bozulmalarla karşı karşıya olup, küresel ısınmanın potansiyel etkileri açısından risk grubu ülkeler arasında yer almaktadır (Kuşvuran, 2010). Örneğin; Güneydoğu, İç Anadolu, Akdeniz ve Ege bölgeleri gibi yarı kurak bölgeler küresel ısınmanın etkisiyle çölleşmeye doğru bir yol izlemektedir. Bu nedenle olumsuz çevre koşullarına neden olan stres faktörlerine karşı dayanıklı bitki tür ve çeşitlerinin geliştirilmesi özellikle son yıllarda bir zorunluluk haline gelmektedir.

Turunçgil yetiştiriciliğinde değişik iklim ve toprak koşullarına uygun olarak farklı anaçlar kullanılmaktadır. Yetiştiricilikte anaç kullanımının temelde iki nedeni bulunmaktadır. Birincisi, toprak kökenli hastalıklar, böcek taşıyan hastalık veya zararlılar, ekstrem soğuk veya sıcaklıklar, düşük kaliteli topraklar, düşük kaliteli veya yetersiz su koşullarına dayanıklılık sağlamak amacıyla anaç kullanılmaktadır. İkinci amacı ise daha yüksek verim ve kaliteli ürün elde etmektir (Ferguson vd., 1990). Turunçgiller genellikle tohum, çelik ve öteki vegetatif yöntemlerle kolaylıkla çoğaltılabilirse de, özellikle hastalıklardan korunma, iklim ve toprak koşullarına

uyum sağlayabilme, verim ve kaliteyi artırma ve bitki büyümesini kontrol edebilme gibi nedenlerden dolayı aşı ile çoğalım tercih edilmektedir (Biçen, 2008).

Türkiye’de her bölgenin sahip olduğu farklı iklim, toprak ve yetiştiricilik koşulları nedeniyle belirli bir bölgede kullanılacak çeşit veya çeşidin anaç ile uyumu, kullanılacak anacı belirlemede önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Bölgeye uyum sağlayan bir anacın çeşit ile iyi uyuşması ve anacın özellikle verim ve meyve kalitesi bakımından çeşit üzerinde olumlu etki göstermesi gerekmektedir. Anacın çeşit ile uyuşmazlık göstermesi veya anacın bölgeye uygun olmaması gibi durumlar yetiştiricilikte yeni anaç geliştirilmesini bir zorunluluk haline getirmektedir (Biçen, 2008).

Dünya üzerinde giderek etkisini artıran kuraklık ülkemizde ve dünyada diğer meyve türlerinde olduğu gibi turunçgil yetiştiriciliğini de olumsuz yönde etkilemektedir. Türkiye’nin de içinde bulunduğu Akdeniz kuşağında yüksek toprak pH’sına orta derecede dayanım göstermesi ve ağır, drenajı zayıf topraklara adaptasyon göstermesinden dolayı turunçgil yetiştiriciliğinde yaygın olarak turunç anacı kullanılmaktadır. Bununla birlikte turunç anacı kuraklığa orta derecede tolerans göstermektedir. Bu nedenle de turunç anacının kuraklığa toleransının artırılması gerekmektedir. Turunçgil yetiştiriciliğinde kuraklığa dayanıklılık özelliğinden dolayı anaç olarak özellikle Brezilya’da Rangpur laym kullanılmaktadır ve Rangpur laym turunçgil anaçları arasında kuraklığa dayanıklılıkta en önemli anaç olarak bilinmektedir ve su tutma özelliği olmayan tınlı veya kumlu-tınlı topraklara daha iyi uyum sağlamaktadır. Ülkemizde ise kireçli toprak yaygındır ve Rangpur laym ise kireçli topraklara orta derecede dayanıklılık göstermektedir. Bu nedenle de ülkemizde kullanılamamaktadır.

2.2. Çevresel Stres Faktörleri

Tarımsal üretimde çeşitli biyotik ve abiyotik faktörler bitkilerde strese neden olarak verim ve kaliteyi olumsuz yönde etkilemektedirler. Bitkilerde abiyotik strese fiziksel ve kimyasal çevre faktörleri neden olurken, biyotik strese ise doğada yaşayan organizmalar, bakteriler, virüsler, böcekler ve nematodlar neden olmaktadır (Mittler, 2006; Khraiweh vd., 2012; Maheswari vd., 2012). Bitkisel üretimde en

önemli abiyotik stres faktörleri ise kuraklık, tuzluluk, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, besin stresi ve ağır metallerdir (Maheswari vd., 2012).

Abiyotik stres etmenlerinin, tarımsal üretimi yaklaşık olarak %50 oranında azalttığı belirlenmiştir (Wang vd., 2003, Grigorova vd., 2011). Verimin düşmesine neden olan bu stres faktörlerinin gelecek yıllarda da küresel mevsim değişiklikleri nedeniyle daha çok artacağı düşünülmektedir (Hirayama ve Shinozaki, 2010).

Bitkilerde abiyotik stres etmenleri, bitkinin büyümesini ve verimliliğini etkileyerek bitki bünyesinde çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olmaktadır. Örneğin; kuraklık veya tuz stresi bitkide öncelikle ozmotik stresi ortaya çıkararak hücrenin homeostasisinin ve iyon dengesinin bozulmasına neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık, tuzluluk veya kuraklık stresleri sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres ise yapısal ve fonksiyonel proteinlerin denatürasyonuna neden olmaktadır (Wang vd., 2003). Bitkide yaşanan bu değişiklikler bitkinin ölümüne neden olabilmektedir. Ancak bitkiler streslerin yaratmış olduğu bu olumsuz durumlardan kendilerini koruyabilmek amacıyla bünyelerinde bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bitkide savunma amacıyla geliştirilen bu mekanizmalar bitki tür ve çeşidine göre büyük farklılıklar göstermektedir ve dolayısıyla da bu mekanizmaların bitkileri stres faktörlerinin yaratmış olduğu olumsuz durumlardan koruma derecelerinde de farklılar bulunmaktadır (Redondo-Gomez, 2013).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26'lık payla en büyük dilimi içermektedir. Bunu %20 ile tuz stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum, 1986).

2.3. Kuraklık Stresi

Kuraklık; yağış miktarındaki azalmadan ya da düzensizlikten dolayı meydana gelen bir durumdur. Belli bir bölgedeki yağış ve buharlaşma arasındaki dengenin

bozulması sonucunda kuraklıktan bahsedilmektedir. Yüksek sıcaklık, yağış miktarındaki değişiklikler, yağış mevsiminin gecikmesi, şiddetli rüzgar ve düşük nem miktarı kuraklığın oluşmasında rol alan önemli etkenler arasında sayılmaktadır. Kuraklık özellikle nüfus artışı ve küresel ısınmayla birlikte etkisini daha da çok arttırarak son yıllarda daha da önemli bir hale gelmiştir. Tarımsal anlamda kuraklık, toprakta bitkinin ihtiyacının karşılanacağı miktarda su bulunmaması olarak tanımlanmaktadır. Kuraklık bitkilerin gelişmesinde yavaşlamaya ve ürün miktarında azalmaya neden olmaktadır (Miyashita vd., 2005; Çırak ve Esendal, 2006).

Bitkiler kısıtlı su koşullarında yaşamlarını sürdürebilmek amacıyla farklı adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Jenks ve Hasewaga, 2008). Kurak koşullarda bitkinin hayatta kalmasını sağlayan ve vejetatif dokularda su stresine karşı bitki bünyesinde geliştirilen başlıca iki mekanizma bulunmaktadır; stresten kaçınma ve strese karşı tolerans gösterme (Levitt, 1980; Laffray ve Louguet, 1990; De Carvalho vd., 1998).

2.3.1. Kuraklık stresinden kaçınma

Kaçınma, su stresi sırasında hayatta kalmak için çok önemli bir adaptasyon mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın oluşması sırasında bitkinin çevreyle temasta olan yüzeylerinde birtakım morfolojik değişiklikler meydana gelmekte ve aynı zamanda kimyasal yapısında da değişiklikler göstermektedir. Bitkide meydana gelen bu değişiklikler arasında kütikulanın gelişmesi, yaprak yüzeylerinin tüylerle kaplanması, stomaların büyüklüğünün, dağılımının ve yerleşiminin değişimi, oransal su içeriğinin artışı, vejetatif ve vaskular dokularda meydana gelen değişiklikler, çoğalma ve dölleme stratejilerinin gelişmesi ve ksilem kanallarının ligninleşmesi gibi değişiklikler sayılabilir. Bitkiler meydana gelen bu değişiklikler sayesinde kurak koşullarda da büyüme ve gelişmelerini sürdürebilmektedirler (Jenks ve Hasegawa, 2008).

Bitkiler dokularındaki uygun su içeriğini koruyabilmek ve su kaybını azalabilmek amacıyla morfolojik olarak bazı değişikliklere gitmektedirler. Bitkilerde yaprak yüzey genişliği ne kadar fazla ise, su kaybı da o kadar çok fazla olmaktadır. Transpirasyonun azalması, mevcut suyun korunmasına yardım etmektedir.

Bitkilerde, kuraklık stresine karşı yaprak büyümesinin engellendiği ve yeni yaprak oluşumunun sınırlandırıldığı bilinmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005). Yaprak alanının küçülmesi, nemli toprak tabakalarına doğru derinlemesine kök gelişimi ve stomaların kapanması, kuraklığa karşı savunmanın ilk adımları olarak bitkide görülen değişimlerdir. Kurak koşullarda yapraklarda meydana gelen morfolojik değişimler, genelde transpirasyonla kaybedilen su miktarını azalmaya, köklerde oluşan morfolojik değişimler ise topraktaki suyu daha yüksek bir kuvvetle absorbe etmeye yöneliktir (Çırak ve Esenal, 2006). Kuraklık stresine tepki olarak, bazı bitkilerde yaprak yüzeylerinin sık tüylerle kaplanması şeklinde morfolojik değişimler de görülmektedir. Bu tüyler, altaki hücrelerin sıcaklığını 1-2 °C düşürerek, transpirasyon hızını azalmaktadır. Ayrıca yaprak epidermal yüzeyi üzerinde oluşan kalın mumsu kütikula tabakası, güneş ışınlarını yansıtarak sıcaklığın etkisini azalmakta ve böylece transpirasyon hızını düşürmektedir (Göksöy ve Turan, 1991).

2.3.2. Kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmaları

Bitkiler kuraklık stresinin yaratmış olduğu olumsuz etkilerden kendilerini koruyabilmek ve yaşamlarını devam ettirebilmek amacıyla bazı tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir. Öncelikle su kaybının azalması için stomalarını kapatmaktadırlar (Muller ve Whitsitt, 1996; Kalefetoğlu ve Ekmekci, 2005; Redondo-Gomez, 2013; Verma vd., 2013). Stomaların kapanması bir bitki hormonu olan ABA absisik asit (ABA) tarafından gerçekleştirilmektedir ve ABA kuraklık stresi sırasında stomal davranışın ve metabolizmanın regülasyonunda görevlendirilmiştir (Sauter vd., 2002).

2.3.2.1. Kuraklık stresi ve stomaların kapanması

Kuraklık, bitkiyi farklı seviyelerde, fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda olumsuz yönde etkilemektedir. Öncelikle kuraklık başladığında hücre genişlemesi ve büyümesinde azalmalar görülmektedir. Kuraklıkta ilerleme devam ettiği takdirde bitkide zararlanmalar meydana gelmekte ve özellikle fotosentez bundan oldukça fazla etkilenmektedir. Transpirasyon oranı düşmekte, dokularda ozmotik potansiyel ve solunum aktivasyonu azalmaktadır. Hüresel düzeyde ise reaktif oksijen türleri (ROT) seviyesinde artışlar meydana gelecek ve membranlar ve proteinler zarar

görecektir. (Redondo-Gomez, 2013; Verma vd., 2013). Kuraklık stresi altında turgor kaybı nedeniyle hücre büyümesi olumsuz olarak etkilenmekte ve hücreler küçük kalmaktadır. Kuraklık stresi ile tohumların çimlenme yeteneklerinde de azalmalar meydana gelmektedir. Yeterli miktarda suyun olmaması ksilem ve floem aktivitelerini de olumsuz olarak etkilemekte ve meyveler küçük kalmakta ve dolayısıyla da ürün kalitesi düşmektedir. Kuraklık boyunca fotosentez ve solunum yavaşlamakta, hatta durabilmektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekci, 2005).

Kuraklık devam ettiği sürece yapraklar su kaybetmeye devam eder ve böylece yaprak dokularında ki turgor basıncı düşer ve yapraklar solmaya başlar. Bitki bu durumla karşılaştığında güneş ışınlarından korunabilmek amacıyla ilk olarak fotosentetik mekanizmayı koruma altına almaktadır. Kuraklık bitkilerde fotosentezin azalmasına da neden olmaktadır. Kuraklık stresine giren bitkilerde yaprak alanı azalmakta ve fotosentez yavaşlamaktadır. Fotosentezin kuraklık stresine bağlı olarak azalışında kloroplastın da önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Fotosentez kloroplastlarda meydana gelmektedir. Kloroplastların stoma bölgesinde CO₂'yi sabitleyen ve indirgeyerek organik bileşiklere dönüşmesini sağlayan rübuloz bifosfat karboksilaz gibi enzimlerin su kaybı ile aktiviteleri azalmakta, dolayısıyla CO₂ fiksasyonu zarar görmektedir. Başlangıçta fotosentez stomatal faktörler tarafından azalılmakta ise de, kuraklık stresinin devam etmesi ve şiddetinin artmasıyla kloroplast ve enzim aktivitesi zarar görmekte, bundan dolayı da fotosentez stomalar dışındaki faktörler tarafından azalılmaktadır. Ayrıca kuraklığın ileri safhalarında mezofil hücrelerinin hücre duvarının difüzyon direnci artmakta ve böylece mezofil hücrelerine CO₂ girişi önlenmektedir (Çırak ve Esendal, 2003). Kloroplastlarla yapılan çalışmalar sonucunda iki fotosistemin özellikle de fotosistem II'nin kuraklık stresinden oldukça fazla etkilendiği görülmüştür. Fotosistem II'nin reaksiyon merkezinde yer alan ve fotoinhibisyonun en etkili olduğu bölgeler olan D1 ve D2 proteinlerinin güçlü stres altında degradasyonları gerçekleşmekte ve bunun sonucunda tüm fotosistem II parçalanmaktadır. Bunun olmaması için kuraklık stresinde stomal koruma gerçekleştirilir, stomalar kapatılır ve CO₂ akışı sınırlandırılır (Giardi vd., 1996; Lu ve Zhang, 1999; Redondo-Gomez, 2013).

Sıcaklık artışı veya nemin hızlı bir şekilde düşüşü ile birlikte bitkilerde aşırı düzeyde bir su kaybı meydana gelmektedir. Ayrıca çevreye doğru taşınan kuru hava kütlesi

bitkilerden hızlı ve aynı zamanda aşırı düzeyde bir su kaybına neden olmaktadır. Atmosferde meydana gelen değişiklikler yaprak ve çevre arasındaki buhar basıncı değişikliğinde önemli bir artışa neden olmaktadır. Bu durum terleme oranını artırmakta ve aynı zamanda topraktan su kaybını da artırmaktadır. Aşırı su kaybında bütün bitkilerin ilk tepkisi terleme ile su kaybının engellenmesi için stomaların kapanmasıdır (Mansfield ve Atkinson, 1990). Son yıllarda yapılan çalışmalarla stoma kapanmasının yapraktaki su potansiyelinden çok, toprağın su potansiyeline bağlı olduğu anlaşılmıştır (Muller ve Whitsitt, 1996; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Stomaların kapanması herhangi bir metabolik ilişkisi olmayan bekçi hücrelerinden suyun doğrudan buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. Bu stomaların kapanması işlemi hidropasif kapanma olarak adlandırılmaktadır. Diğer stoma kapanması ise transpirasyonla bekçi hücrelerine taşınan absisik asit (ABA)'nın bekçi hücrelerindeki ABA reseptörüne bağlanmasıyla gerçekleşen iyon akışının ani değişikliği sürecini içermektedir. Bu stoma kapanması süreci iyon ve metabolit gerektiren hidroaktif kapanma olarak bilinmektedir. Bu sürecin ABA ile düzenlendiği bilinmektedir. Bitkinin büyüme ve stres koşullarına tepkisi büyük ölçüde hormonların kontrolü altındadır. Bu hormonlar arasında sitokinin ve etilen ile birlikte özellikle ABA'da etkili olmaktadır ve köklerden salgılanan ABA'nın sürgünlere doğru etkisi söz konusudur. Bu uzun mesafeli sinyalleme sırasında ABA ve reaktif oksijen türlerinin birlikte etkisi bulunmaktadır (Lake vd., 2002). Yapılan bazı çalışmalarda kök ABA'nın taşınımında ksilem pH'ı ve ışıklenme süresi gibi diğer çevresel faktörlerin de etki ettiği belirlenmiştir (Wilkinson ve Davies, 2002). Su kaybı durumunda ksilem özsuyu pH'ının artması ile kök ksilemine ABA'nın yüklenerek sürgüne doğru taşınımı teşvik edilmektedir (Hartung vd., 2002). Terleme oranını arttıran çevresel koşullar ABA birikimini teşvik etmekte ve yaprak özsuysundaki pH artışı ile stoma iletkenliğinin azalmasına da neden olmaktadır (Wilkinson ve Davies, 2002; Davies vd., 2002).

ABA, turgor basıncının kaybı ile bekçi hücrelerinden K^+ iyonlarının akışını teşvik ederek stomaların kapanmasına neden olmaktadır. Stoma kapanması her zaman artan su kaybı sinyallerinin algılanmasına bağlı olmamaktadır. Stoma kapanması yapraktaki mezofil turgor basıncında herhangi bir önemli azalma olmasından daha önce toprak kurumasına da doğrudan tepki verebilmektedir. ABA, yaklaşık 20 yıldır

stomanın kapanmasını teşvik ederek kök ve yapraklardaki su kaybı arasında uzun mesafeli iletişim sinyali olarak bilinmektedir (Blackman ve Davies, 1985). Bitkiler stresler sırasında geri dönüşümü olmayan zararlardan fotosentetik mekanizmalarını korumak için hızlı tepki vermek zorundadırlar. Stoma kapanması fotosentez oranının azalmasına bağlı olarak bitkilerde gelişen hızlı ve ilk tepki mekanizması olarak sayılabilir.

2.3.2.2. Kuraklık stresinin ozmotik düzenleme üzerine etkisi

Kuraklık stresine toleransta en önemli mekanizmalardan birisi de şeker ve diğer çözünen maddelerin kullanılmasını gerektiren osmotik düzenlemelerdir. Bitkiler osmotik ayar olarak bilinen bu süreç tarafından su eksikliği ile mücadele etmektedirler. Bu süreçte bitkiler solütlerin birikmesi ile hücredeki osmotik potansiyeli azalmaktadır. Belirli metabolik süreçler yapraktaki turgor artışı sonucunda yaprağa doğru suyun hareket etmesini sağlayan hücredeki net solüt konsantrasyonunun artması ile strese karşı tepkiyi başlatmaktadır. Osmotik dengeyi ve membranları korumak için makromoleküllerle birlikte anahtar rol oynayan çok sayıda bileşik sentezlenmektedir. Bu bileşikler prolin, glutamat, glisin-betain, karnitin, mannitol, sorbitol, fruktan, poliyol, trihaloz, sükroz, oligosakkaritler ve K^+ gibi inorganik iyonları içermektedir. Şeker alkollerin OH^- grubu membran lipitleri ve proteinleri ile hidrofilik etkileşimi korumak için sudaki OH^- grubu ile yer değiştirmektedir. Böylelikle bu moleküller membranların yapısal bütünlüğünü korumaya yardım etmektedirler. Sonuç olarak bu bileşikler kuraklık ve hücre dehidrasyonuna karşı direnç sağlamak için işlev göstermektedirler (Hoekstra vd., 2001; Ramanjulu ve Bartels, 2002).

Aminoasitlerden prolinin kuraklık stresinde oldukça etkili bir ozmoregülatör olduğu, kuraklık şiddeti arttıkça prolin birikiminin de artış gösterdiği ifade edilmiştir (Gusta ve Chen, 1987). Ayrıca prolinin osmotik bir dengeleyici olduğu, hücresel yapıların korunması ile serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Mani vd., 2002). Prolinin yanında betainin de kuraklık stresi koşulları altında hasara karşı hücre zarı bütünlüğünün korunmasında ve fotosentetik mekanizmanın ve yapısının stabilizasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Sakamoto ve Murata, 2002; Ashraf ve Foolad, 2007).

Kuraklık stresi sırasında membrandan suyun uzaklaşması ile hücrenin çift tabakalı yapısı bozulmaktadır. Stres sırasında yağ tabakası membran proteinlerinin yerini almaktadır. Böylece membran bütünlüğünün ve seçiciliğinin kaybı, hücresel kompartımanlaşmanın bozulması ve öncelikle membrana bağlı olan enzimlerin aktivasyonunun kaybına neden olmaktadır (Liu ve Zhu, 1998). Kuraklık stresi sırasında hücresel dengenin korunması için hücre iyon dengesi ve ozmotik denge eski haline getirilmeye çalışılmaktadır. Daha sonra ise detoksifikasyon mekanizması ile stres zararı onarılmakta ve kontrol edilmektedir.

Ayrıca kuraklık stresinin üstesinden gelebilmek için bazı genlerin kodladığı düzenleyici proteinler de bulunmaktadır. Bu proteinler, stres sinyalinin transdüksiyonunu regüle etmekte ve gen ekspresyonunu düzenleyerek çözünen maddelerin birikiminin yönetilmesini, membranlar arasındaki pasif taşınmayı, su taşınma sisteminde gerekli enerji ihtiyacının düzenlenmesini ve hücre yapısının korunmasını ve anı zamanda reaktif oksijen türlerinin yaratmış olduğu hasardan hücrenin korunmasını sağlamaktadırlar (Redondo-Gomez, 2013).

2.3.2.3. Kuraklık stresi, reaktif oksijen türleri (ROT) ve detoksifikasyonları

Bitki büyümesi ve gelişimi için enerji sağlayan aerobik metabolizma genellikle O_2 , H_2O_2 , O_2^- , ve OH^- gibi yan ürünler olan ROT'ların oluşumunu beraberinde getirmektedir. Normal koşullar altında ROT'un hücre içi üretimi ve uzaklaştırılması dinamik denge içindedir. Bitkiler kuraklık stres koşullarına maruz kaldıklarında dinamik denge bozulmaktadır. ROT'un aşırı miktarda birikimi hücrelere zarar vermekte ve oksidatif hasar sonucunda hücre ölümüne neden olabilmektedir (Cruz de Carvalho, 2008). ROT'un aşırı birikimine duyarlı olan zar fosfolipidleri ve yağ asitleri bu durumda hasar görmekte ve böylece membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olmaktadır (Moller, 2001). Ayrıca membran geçirgenliğinin ve iyon kaçağının artmasına neden olmaktadır. Daha sonra ise metabolizma üzerinde bozulmalar ve bunun sonucunda da bitkilerde ciddi hasarlar veya ölüm meydana gelmektedir (Gill ve Tuteja, 2010).

Şiddetli kuraklık koşulları altında Rubisco aktivitesinin azalması nedeniyle fotosentez sınırlandırılmaktadır (Bota vd., 2004). Kuraklık koşulu altında fotosentetik elektron

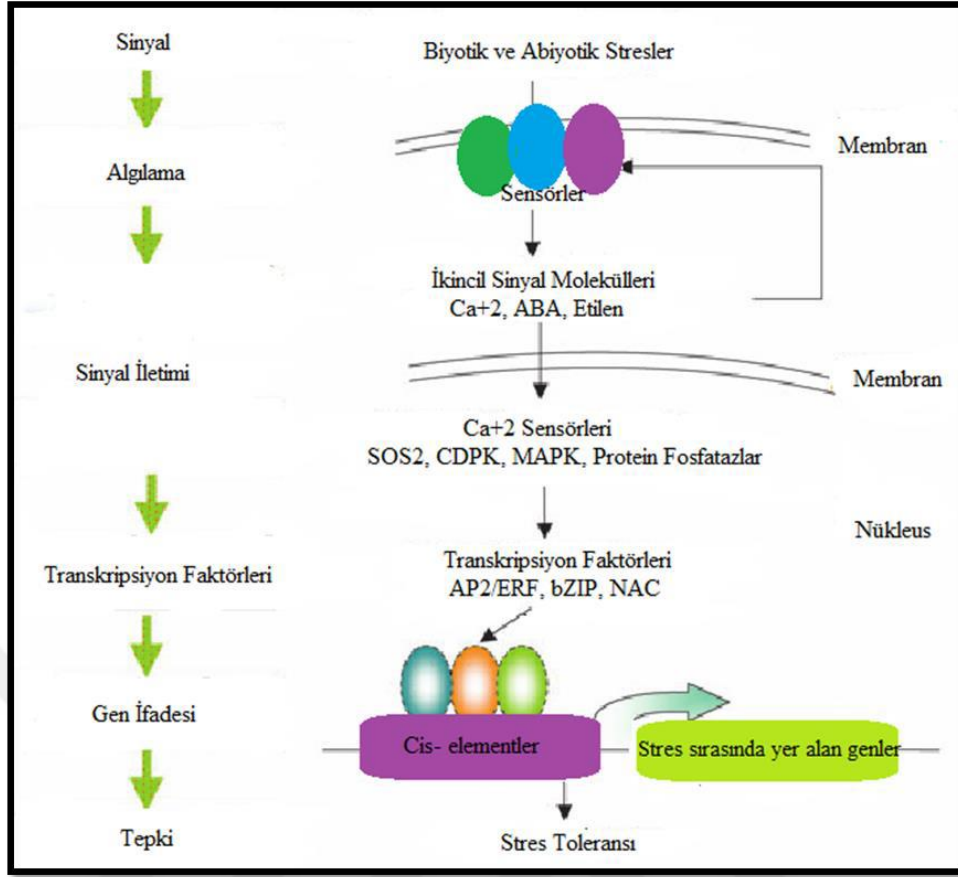
zinciri aktivitesi bitkideki CO₂'in ve fotosistem II'nin kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (Loreto vd., 1995). Hücre içi CO₂ seviyesinin azalması, elektron taşıma zinciri içerisindeki bileşiklerin aşırı azalmasına neden olmaktadır. Daha sonra elektronlar fotosistem I'de bulunan oksijene transfer edilmektedir. Bu durumda süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil (OH⁻) radikallerini içine alan ROT'lar meydana gelmektedir. ROT konsantrasyonunun artması ile bitkiler oksidatif strese girerler. Böylece hücre içinde ROT'ların artışı lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asit hasarına, enzim inhibisyonuna ve hücrelerin ölümüne kadar birçok hasara yol açmaktadırlar. Bu nedenle ROT'lar fotooksidasyona neden oldukları için bitkiler tarafından detoksifikasyonu gerekmektedir. Bitki hücreleri, aşırı ROT birikiminin zararlı etkilerinden ve hücre içi homeostasını korumak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant koruma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Ingram ve Bartels, 1996). Bunlardan enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit, tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşiklerdir (Bowler vd., 1992).

Askorbat ve glutatyonun yer aldığı bitki detoksifikasyon sistemleri ROS'ların hücre içi konsantrasyonlarını kontrol etmektedir. ROT'lar redoks sinyal iletiminde ikincil mesajcılar olarak görev almaktadırlar (Foyer ve Noctor, 2003). H₂O₂ yapraklarda stomaların kapanması, fazla ışıkta yaprağın ortama alışması ve ısı şoku proteinlerinin teşvik edilmesi için sinyal olarak görev almaktadırlar (Karpinska vd., 2000). *Arabidopsis*'te bekçi hücrelerine ABA uygulandığında stomaların kapanması ile H₂O₂'nin parçalanmasının teşvik edildiği gösterilmiştir (Desikan vd., 2004). Çok şiddetli ve uzun süreli su eksikliği durumunda bitkiler solmaktadır ve hücreler de büzülme meydana gelmektedir. Bu nedenle hücre membranları üzerinde mekanik baskı oluşmaktadır. Membran üzerindeki basınç kuraklığın en önemli nedenlerinden biri olmaktadır. Bu basınç özellikle hem membran ile ilişkili enzimlerin hem de iyonların ve taşıyıcıların işlevlerini bozmaktadır. Kloroplast membranları ROT'ların aşırı miktarının oluşmasına neden olan oksidasyon stresi zararına özellikle duyarlıdır. GR veya APX antioksidant genlerinin bazı transkriptlerinin su eksikliği periyodunun düzelmesi süresince yüksek olduğu ve ROT'ların neden olduğu fotooksidasyona

karşı hücrel mekanizmanın korunmasında rol oynadığı bilinmektedir (Ratnayaka vd., 2003).

2.3.2.4. Bitkilerde abiyotik streslere dayanımın moleküler mekanizması

Bitkilerde kuraklık, tuzluluk gibi çevresel koşullarda uyarılan farklı genler, bir sinyal yolu tarafından denetlenmektedir. Stres ilk olarak bitki hücre membranı üzerinde bulunan membran reseptörler tarafından algılanmaktadır ve ikincil haberciler olan Ca^{+2} , ROT ve inositol fosfataz gibi ikincil mesajcılara iletilmektedir. Daha sonra hücre içindeki Ca^{+2} seviyesinde değişiklikler meydana gelmektedir. Sitozoldeki Ca^{+2} seviyesindeki değişiklik Ca^{+2} sensörleri olarak bilinen Ca^{+2} bağlama proteinleri tarafından algılanmaktadır. Bu sensör proteinleri fosforilasyonla stres tepkilerinde yer alan genlerin ifadelerini kontrol eden transkripsiyon faktörlerini (TF) aktif hale getirmektedirler. Aktif hale gelen TF'leri ise stresler sırasında etili olan genlerin ekspresyonunu düzenlemektedirler. Bu süreç içerisinde TF'leri ifadelerinde rol oynadıkları genlerin promotör bölgelerindeki özel regülatör dizilere bağlanıp genlerin aktif olmalarını sağlayarak bitkide streslere karşı dayanıklılık ve/veya tolerans geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Streslerle ilgili genlerin aktif olması bitkinin uygun olmayan çevre koşullarına karşı adaptasyonunu sağlayarak bitkinin hayatta kalma şansını artırmaktadır (Şekil 2.1). Böylece bitkilerin uygun olmayan şartlar karşısında yaşamlarını sürdürebilmeleri mümkün olabilmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005).



Şekil 2.1. Stres sırasında bitki hücrelerinde sinyal iletim yolu (Huang vd., 2012)

Bitkilerde yukarıda, Şekil 2.1’de yer alan stresle ilgili genler genel olarak 2 ana grupta incelenmektedir. Birinci gruba giren genler arasında abiyotik stresler sırasında sinyalleme yollarında görevli olan mitojenle aktive olmuş protein kinazlar (MAPK’lar), fosfolipazlar ve Ca^{+2} bağlama proteinleri ve gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu transkripsiyon faktörleri sayılabilmektedir. Bu genler stresin algılanmasının ilk aşamalarında yer alarak hücreleri streslerin yaratmış olduğu negatif etkilerden hücrelerin korunması amacıyla fonksiyon gösteren ve geç aktive olan proteinlerin ifadelerini düzenlemektedirler. Stresler sırasında hücrelerin korunmasından sorumlu olan bu proteinler fonksiyonel proteinler olarak adlandırılmaktadır ve aynı zamanda bu grup proteinler streslerle ilgili genlerin ikinci grubunu oluşturmaktadırlar. Bu gruba giren proteinler arasında ısı şoku proteinleri (HSPs) veya şaperonlar, geç embriyogenez bağımlı (LEA) proteinleri ve su kanal proteinleri sayılabilmektedir (Wang vd., 2003; Vinocur ve Alman, 2005; Bhatnagar-Mathur vd., 2008; Hirayama vd., 2010; Cramer vd., 2011).

Streslere dayanıklılık ve/veya tolerans sırasında hücrede meydana gelen ve/veya gelebilecek olan herhangi bir zararlanmanın önüne geçmek amacıyla aktif olan fonksiyonel proteinlerin ifadelerinin düzenlenmesinde TF'leri etkili olmaktadır. Transkripsiyon faktörleri stresler sırasında etkili olan birçok genin promotör bölgesine bağlanarak streslere dayanımda yer alan birçok genin aktivitesine etki etmektedirler. Streslere karşı dayanımda birçok genin aktif bir şekilde rol aldığı ve TF'lerinin de aynı anda birçok gene etki ettiği düşünülürse streslere dayanıklı ve/veya toleranslı bitki geliştirilmesinde TF'lerinin mükemmel adaylar olduğu anlaşılabacaktır (Century vd., 2008). Ayrıca stresler sırasında etkili olduğu belirlenen TF'lerinin genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak streslere dayanıklı ve/veya toleranslı bitkiler geliştirmek amacıyla kullanılması streslere karşı dayanıklı ve/veya toleranslı bitki üretilmesi için kullanılabilir alternatif bir yol olarak düşünülmektedir (Tran vd., 2010).

2.4. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri hedef genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirmek veya baskılamak için genlerin promotör bölgelerinde yer alan spesifik cis-etkili elementlere bağlanarak gen ifadesini düzenleyen proteinlerdir (Wray vd., 2003). Bu olay gen aktivasyonu için ilk adımdır ve genlerin transkripsiyonunda etkili olan RNA polimeraz II ile dolaylı veya doğrudan etkileşerek transkripsiyonu etkilemektedirler. Genel (bazal) ve spesifik olmak üzere iki transkripsiyon faktörü kategorisi vardır (Yanık, 2012). Genel (bazal) transkripsiyon faktörleri, RNA polimeraz II tarafından kopyalanan bütün genlerin üzerinde toplanan ve çok sayıda bulunan proteinlerdir. Bu transkripsiyon faktörleri RNA polimeraz II'nin, protein kodlayan bir dizinin başlangıç noktasına bağlanıp transkripsiyonu başlatması için bu bölgenin uygun hale getirilmesi açısından önemlidirler (Yanık, 2012). Gen spesifik transkripsiyon faktörleri ise hedef genin promotör bölgesindeki bazal transkripsiyonu etkinleştirerek veya baskılayarak gen ifadesini düzenleyen proteinlerdir. İçerdikleri DNA bağlanma domainlerine göre TF'leri farklı gruplara ayrılmaktadırlar (Luscombe ve Thornton, 2002). Bugüne kadar abiyotik streslerde etkili olan birçok TF'nün AP2/ERF (apetella2/ethylene response factor, apetal2/etilen tepki faktörü), bZIP (basic leucine zipper domain, bazik lösün fermuarı), MYB (Myeloblastosis onkogen), MYC (Myelocytomatosis onkogen), Cys₂His₂ çinko parmak, WRKY ve NAC gibi geniş

transkripsiyon faktör ailelerinin üyesi olduğu belirlenmiştir (Singh vd., 2002; Umezawa vd., 2006; Rushton vd., 2010; Mizoi ve Yamaguchi-Shinozaki, 2012; Nakashima vd., 2012). Abiyotik stres koşulları altında gen ifadesi, ABA'ya bağımlı ve ABA'dan bağımsız yollarla kontrol edilmektedir. Bu yollar ile aktive olan TF'leri streslere dayanıklılıkta ve/veya toleransta rol oynayan genlerin promotör bölgelerinde yer alan ABRE (ABA response element, ABA tepkili element) ve DRE (drought response element, kuraklık tepkili element), CRT (C-repeat, C-tekrarlı) gibi cis-etkili elementlere bağlanarak gen ifadesini düzenlemektedirler.

2.4.1. NAC transkripsiyon faktörleri

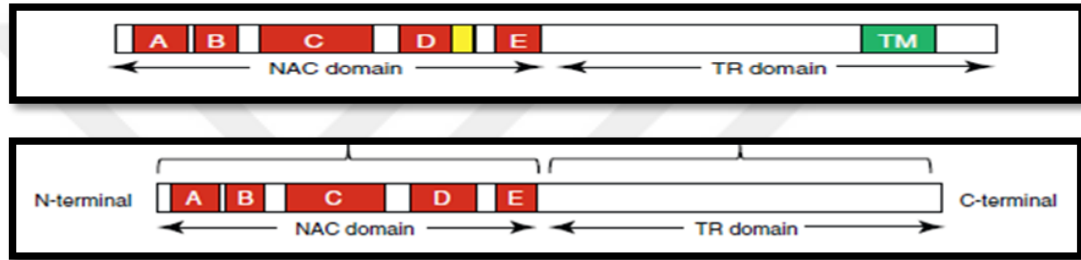
NAC (NAM, ATAF1,2, CUC2) proteinleri bitkiye özel TF'lerinin en geniş ailelerinden birini oluşturmaktadır. NAC ismi daha önce tanımlanmış olan *NAM* (no apical meristem), *ATAF1-2* (*Arabidopsis* transcription activation factor) ve *CUC2* (cup-shaped cotyledon 2) genlerinden gelmektedir. *NAM* geni karakterize edilen ilk NAC genidir. *NAM* geni yönünden mutant olan birçok petunya (*Petunia hybrida*) bitkisinde, sürgün apikal meristemi (SAM) oluşmadığı ve bu nedenle de fide aşamasında birçok petunya bitkisinde ölümler gözlemlenmiştir. Aynı zamanda gelişme gösteren birkaç mutant fidelerde de çiçek gelişiminin normal olmadığı belirlenmiştir. *NAM* geninin izolasyonu ve karakterizasyonundan sonra *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) *CUC* genleri izole edilerek karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. *CUC1* ve *CUC2* genleri yönünden mutant bitkilerde de *NAM* geni bakımından mutant olan bitkilerde gözlemlenen bazı gelişim bozuklukları görülmüştür (Olsen vd., 2005).

NAC gen ailesinin birkaç üyesi model bitki *Arabidopsis*, çelik (*Oryza sativa*), soya fasulyesi (*Glycine max*) ve buğday (*Triticum aestivum*) bitkilerinin yanında kavak (*Populus trichocarpa*) ve turunçgil (*Citrus sinensis*) gibi bazı çok yıllık bitkilerde de tanımlanmış ve kısmen karakterize edilmişlerdir (Riechmann vd., 2000; de Oliveira vd., 2011). Yakın zamanda yapılan genom analizleri sonucunda *Arabidopsis*'te (*Arabidopsis thaliana*) 117 (Nuruzzaman vd., 2010), çelikte (*Oryza sativa*) 151 (Nuruzzaman vd., 2010), kavakta (*Populus trichocarpa*) 163 (Hu vd., 2010), tilki kuyruğu darıda (*Setaria italica*) 147 (Puranik vd., 2013), mısırdaki (*Zea mays*) 152 (Shiriga vd., 2014), tütünde (*Nicotiana tabacum*) 152 (Rushton vd., 2008), asmada

(*Vitis vinifera*) 74 (Wang vd., 2013), muzda (*Musa acuminata*) 167 (Cenci vd., 2014), domateste (*Solanum lycopersicum*) 104 (Su vd., 2015) ve çin lahanasında ise (*Brassica rapa*) 188 (Ma vd., 2014) NAC geni tanımlanmıştır (Wang vd., 2016).

2.4.1.1. NAC transkripsiyon faktörlerinin yapısı

Genel olarak NAC TF'leri iyi korunmuş N terminal bölgesinde yer alan NAC domaini ve farklılaşmış C terminal bölgesinde yer alan transkripsiyonel düzenleyici bölgeden oluşmaktadır (Ernst vd., 2004). N terminal bölgesinde yer alan NAC domaini yaklaşık olarak 150 aminoasit uzunluğundadır ve 5 farklı al domaininden



Şekil 2.2. NAC domainin yapısı (Puranik vd., 2012)

(A-E) oluşmaktadır (Olsen vd., 2005). Bu domainler NAC TF'lerinin spesifik koşullarda farklı proteinlere bağlanma fonksiyonlarının gerçekleşmesinde rol oynamaktadırlar. C terminal bölgesinde bulunan transkripsiyon düzenleyici bölgeler (TRR) ise transkripsiyonun aktivasyonu (Puranik vd., 2012) veya baskılanmasında (Yamaguchi vd., 2010) görev almaktadırlar. Transkripsiyon düzenleyici bölgeler tekrarlı olarak yer alan serin-treonin, prolin-glutamin gibi aminoasitlerce zengin spesifik motiflere sahip bölgelerden oluşmaktadır. Örneğin çelik NAC proteinlerinin transkripsiyonel düzenleyici bölgelerinde 10 tane farklı motif belirlenmiş ve bu motiflerin farklı al familyalara göre değiştiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar NAC proteinlerinin farklı al familyalara göre değişen farklı fonksiyonlarının transkripsiyonel düzenleyici bölgelerde görülen farklılıklardan kaynaklandığını açıklamaktadır (Puranik vd., 2012).

Stres ile uyarılan NAC genlerinin ifadesi promotör bölgelerinde bulunan strese tepkide yer alan cis-etkili elementlerle düzenlenmektedir. Bu cis-etkili elementler ABRE, DRE, LRE (Low-temperature responsive element, düşük sıcaklık cevap

elementi), MYB, MYC, W-kutusu jasmonik asit ve salisilik asit gibi spesifik tepki elementlerini içermektedir (Nakashima vd., 2012).

2.4.1.2. NAC transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları

NAC TF'leri çeşitli apikal meristemlerin oluşması ve muhafazası (Takada vd., 2001), çiçek gelişimi ve morfogenez (Sablowski ve Meyerowitz, 1998), embriyo gelişimi, senesens (Breeze vd., 2011) ve hormon sinyalinin içeren birçok bitki gelişiminde ve biyotik ve abiyotik stresler sırasında (Olsen vd., 2005; Tran vd., 2010; Nakashima vd., 2012) rol oynamaktadırlar (Puranik vd., 2012). Ayrıca NAC genlerinin ışığa karşı tepki, programlanmış hücre ölümlerinde de rol oynadığı belirlenmiştir.

NAC TF'lerinin patojene karşı bitki savunma yanıtının nasıl düzenlediğinin araştırıldığı Collinge (2001) tarafından yapılan bir çalışmada *Phytophthora infestans* ile enfekte olmuş patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkilerinde *StNAC* geninin aktive olduğu belirlenmiştir. Daha sonra biyotik streslere dayanıklılık alanında yapılan çalışmalarda NAC genlerinin birkaç fungal, bakteri ve virüs saldırılarına karşı ekspresyon seviyelerinde artışlar olduğu belirlenmiştir (Ren vd., 2000; Xie vd., 2002; Hegedus vd., 2003; Oh vd., 2005; Xia vd., 2010).

Oldukça geniş bir grup olmaları nedeniyle, NAC proteinlerinin fonksiyonlarını tanımlamak oldukça güçtür. Bunu anlamak için NAC proteinlerinin bağlandığı hedef genlerin bilinmesi gerekmektedir. NAC genlerinin ifade düzeyinin artırılarak bunun mikroarray tekniği ile birlikte kullanılması veya sadece mikroarray tekniği kullanılarak NAC genlerinin spesifik koşullarda ifade düzeylerinin araştırılması NAC genlerinin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi açısından oldukça önemlidir.

Arabidopsis ve çelikte yapılan genom düzeyinde gen ekspresyonu belirleme çalışmaları, NAC genlerinin tuzluluk, kuraklık, soğuk stresleri veya ABA hormon uygulamaları sonrasında aktive oldukları belirlenmiştir (Fujita vd., 2004; Kawaura vd., 2008; Fang vd., 2008). Jensen vd. (2010) tarafından *Arabidopsis*'te bulunan NAC genlerinin yüksek sıcaklık ve tuz stresine karşı tepkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise incelenen birçok NAC geninin ekspresyon düzeylerinde artışların

olduğu belirlenmiştir. elik bitkisinde yapılan bir mikroarray çalışmasında ise abiyotik stresler sırasında 45’den fazla *NAC* geninin, biyotik stresler sırasında ise 26 *NAC* geninin uyarıldığı belirlenmiştir (Nuruzzaman vd., 2010).

Tran vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *Arabidopsis NAC* genleri arasında yer alan *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072* *NAC* genlerinin aktivitelerinin kuraklık ve tuzluluk stresleri sırasında ve ABA uygulamasından sonra arttığı belirlenmiştir. Bu genler arasında yer alan *ANAC072* geninin (RD26) yeni bir ABA-bağımlı stres sinyalizasyon yolunda yer aldığı düşünlmüştür (Fujita vd., 2004). Bazı türlerde yapılan çalışmalarda abiyotik stresler sırasında etkili olduğu bilinen bazı *NAC* genlerinin aynı zamanda jasmonik asit, salisilik asit ve etilen gibi fitohormonların uygulanması sonucunda da teşvik oldukları belirlenmiştir. Bu genler arasında yer alan *RD26/ANAC072* geninin hem abiyotik streslerde hem de patojenlere karşı savunma sırasında fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. Yine *ANAC019* ve *ANAC055* genlerinin de hem ABA aracılı hem de jasmonik asit aracılığı ile düzenlenen gen ifadesinde yer aldıkları bilinmektedir.

Birçok streste etkili olduğu bilinen *NAC* genlerinin gen muhendisliği yöntemleri kullanılarak aktivitelerinin arttırılması hem elde edilen transgenik bitkilerin streslere karşı dayanıklılık düzeylerinin belirlenebilmesi hem de *NAC* genlerinin stresler sırasında ifadelerini düzenledikleri yani hedeflemiş oldukları streslerle ilgili genler tespit edilebilmektedir. Hu vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *SNAC1* (stress responsive *NAC1*, strese cevapta etkili *NAC1*) geninin çelikte ifade düzeyi arttırılarak elde edilen transgenik elik bitkilerinin (*Oryza sativa*) kuraklık ve tuz stresine karşı dirençlerinin kontrol bitkilerine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda elde edilen transgenik bitkilerin ABA’ya daha duyarlı oldukları ve stomalarını daha çabuk kapatarak daha yavaş su kaybettikleri belirlenmiştir.

Nakashima (2007)’nın çelikte yaptığı bir çalışmada ise *OsNAC6* geninin soğuk, kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stresler sırasında aktif olduğu belirlenmiştir. *OsNAC6* geninin aşırı düzeyde ifade edildiği transgenik elik bitkilerinde yapılan mikroarray analizleri sonucunda abiyotik ve biyotik streslerle uyarılan birçok genin aktif olduğu belirlenmiştir. *OsNAC6* geninin aşırı düzeyde ifade edildiği transgenik

çelik bitkilerinde genom düzeyinde yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda genlerin yaklaşık olarak %40'ının dehidrasyon, yüksek tuzluluk veya soğuk stresleri sırasında aktivitelerinde değişiklikler olduğu belirlenmiştir.

Xue vd. (2011), buğday (*Triticum aestivum*) genom verileri ve kantitatif RT-PCR kullanılarak ekmeçlik buğdayda *TaNAC69* geninin ifadesi analiz edilmiştir. *TaNAC69* geninin ifadesinin abiyotik ve biyotik streslerle pozitif ilişkili olduğu görülmüştür ve aynı zamanda bu genin ifadesinin stresler sırasında ifade düzeyi artan genlerle de yakın ilişkili olduğu görülmüştür. *TaNAC69* geninin aşırı ifade edildiği transgenik buğday hatlarında yapılan analizler sonucunda tuz ve kuraklık stresi sırasında transgenik olmayanlara göre daha fazla sürgün meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca kuraklık stresi sırasında incelenen transgenik bitkilerin kök büyüme oranında da artışlar meydana geldiği tespit edilmiştir.

Hao vd. (2011), tarafından soya fasulyesinde yüksek tuzluluk, kuraklık ve soğuk streslerine ve ABA ve NAA uygulamalarına karşı *GmNAC11* ve *GmNAC20* genlerinin fonksiyonu araştırılmıştır. Bu amaçla *GmNAC20* ve *GmNAC11* genleri *Arabidopsis* bitkilerinde ayrı ayrı olarak aşırı düzeyde ifade edilerek transgenik bitkiler elde edilmiştir. *GmNAC20* geninin aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin tuz ve don stresine karşı dirençlerinde artışlar olduğu gözlemlenmiştir. Ancak *GmNAC11* geninin ile aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin ise yalnızca tuz stresine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir.

Liu vd. (2011), kuraklık sırasında diğer bitkilerde aktif olduğu bilinen *NAC2* geninin *Arachis hypogaea*'dan izolasyonu yapılarak (*AhNAC2* geni) *Arabidopsis* bitkisine aktarılmıştır. Elde edilen transgenik bitkilerin yabancı tiplere göre kök büyüme ve tohum çimlenme oranlarında ve aynı zamanda *AhNAC2* geninin ifade düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir.

Tang vd. (2012) tarafından buğdayda NAC TF'lerini kodlayan altı yeni gen (*TaNAC2a*, *TaNAC4a*, *TaNAC6*, *TaNAC7*, *TaNAC13* ve *TaNTL5*) belirlenmiştir. Bu genlerin ifade düzeyleri kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık stresleri sırasında veya bu streslerin kombine bir şekilde uygulandığı bitkilerde araştırılmış ve bu genlerin ifadelerinin incelenen stresler sırasında değişik düzeylerde artışlar gösterdikleri

belirlenmiştir. Aynı zamanda *TaNAC2a* geninin aşırı düzeyde ifade edildiği transgenik tütün bitkileri üzerinde yapılan analizler sonucunda kurak koşullar altında transgenik tütün bitkilerinin transgenik olmayan bitkilere göre daha taze ve kuru ağırlığa sahip olduğu ve aynı zamanda *TaNac2a* geninin ifade seviyesinin transgenik tütün bitkilerinde transgenik olmayanlara göre daha fazla olarak belirlenmiştir.

Lu vd. (2012), mısır (*Zea mays*) bitkisinden *NAC* geninin (*ZmSNAC1*) izolasyonunu yaparak karakterize etmişlerdir. Düşük sıcaklık, kuraklık ve tuz stresi sırasında ve ABA uygulaması ile *ZmSNAC1* geninin ifadesinin güçlü bir şekilde uyarıldığı belirlenmiştir. *ZmSNAC1* geninin *Arabidopsis*'te aşırı düzeyde ifade edilmesi ile elde edilen transgenik bitkilerin ise çimlenme aşamasında ozmotik strese karşı ve genel olarak da kuraklık stresine karşı dirençlerinin arttığı belirlenmiştir.

Liu vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise çelikten izolasyonu yapılan *SNAC1* geni, *Agrobacterium tumefaciens* aracılı yöntemle YZ1 pamuk (*Gossypium hirsutum*) çeşidine aktarılmıştır. Elde edilen transgenik pamuk bitkilerinin kuraklık ve tuz stresleri sırasında transpirasyon oranının transgenik olmayanlara göre önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda elde edilen transgenik pamuk bitkilerinin gelişmiş kök gelişimine de sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *SNAC1* geninin pamuk bitkisinde aşırı ekspresyonunun transgenik bitkilerde daha gelişmiş kök gelişimine ve terlemenin azalmasına neden olarak transgenik pamuk bitkilerinin kuraklık ve tuz stresine karşı daha fazla tolerans geliştirdikleri belirlenmiştir.

Huang vd. (2015), yeni bir transkripsiyon faktörü olan *TaNAC29* genini ekmeklik buğdaydan (*Triticum aestivum*) izole etmişlerdir. *TaNAC29* geninin yaşlı yapraklarda ifade seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir ve bu nedenle de *TaNAC29* geninin yaşlanma sürecinde rol oynadığı anlaşılmıştır. *TaNAC29* geninin transkriptlerinin tuzluluk, kuraklık, oksidatif stres ve ABA uygulamaları ile arttığı gösterilmiştir. *TaNAC29* geninin tam olarak fonksiyonunu ortaya koymak amacıyla *Arabidopsis* bitkisinde aşırı düzeyde ifade edilmiştir. Serada yetiştirilen *TaNAC29* geninin aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde yapılan analizler sonucunda transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin tuzluluk ve kuraklık stresine karşı transgenik

olmayanlarla aynı şekilde direnç göstermelerine karşın transgenik bitkilerde SOD, ve CAT gibi antioksidan enzimlerinin aktivitelerinde artışların olduğu rapor edilmiştir.

Zhang vd. (2016) tarafından buğdaydan *TaNAC47* geni izole edilerek karakterize edilmeye çalışılmıştır. *TaNAC47* geninin tuzluluk, kuraklık, soğuk stresleri sırasında ve ABA uygulaması ile uyarıldığı belirlenmiştir. *TaNAC47* geninin aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin ise kuraklık, tuzluluk ve soğuk stresine karşı dirençlerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Zhao vd. (2016) tarafından *Miscanthus lutarioriparius* bitkisinde abiyotik stresler sırasında etkili olduğu düşünülen *MINAC9* geninin fonksiyonel olarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen *MINAC9* geninin tohum çimlenmesi ve kök uzaması gibi süreçlerde ABA'ya karşı oldukça duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak *MINAC9* geninin aşırı ifade edildiği bitkilerde kuraklık ve soğuk stresine karşı direncin arttığı ortaya çıkmıştır. Elde edilen transgenik bitkiler transgenik olmayan bitkilerle karşılaştırıldığında kuraklık, tuzluluk ve soğuk stresleri sırasında ve ABA uygulaması ile streslerde yer alan genlerin ifadelerinde önemli bir şekilde artış olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak kuraklık ve tuzluluk koşulları altında SOD, POD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de artışlar meydana gelmiştir.

Fang vd. (2016) tarafından asmada yapılan bir çalışmada (*Vitis amurensis*) NAC transkripsiyon üyesi olan *VaNAC26* geninin kuraklık, tuzluluk uygulamaları sırasında ifadesinin arttığı belirlenmiştir. *VaNAC26* geninin aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde kuraklık ve tuzluluk stresleri sırasında yapılan analizler sonucunda ise transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin incelenen streslere karşı dirençlerinde artışlar olduğu gözlemlenmiştir. Kuraklık stresi altında transgenik *Arabidopsis* bitkileri yabancı tiplerle karşılaştırıldığında antioksidan enzimlerinin aktivitelerinde de artışlar olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlarla bağlantılı olarak da H_2O_2 ve O_2^- radikallerinin konsantrasyonlarında da azalmaların olduğu tespit edilmiştir.

Mao vd. (2016), mısır bitkisinden NAC transkripsiyon faktörlerinden biri olan *ZmNAC55* genini izole etmişler ve kuraklık, tuz ve soğuk stresleri sırasında ve ABA

uygulaması ile *ZmNAC55* geninin uyarıldığı belirlenmiştir. *ZmNAC55* geninin promotörü bölgesinde yapılan analizler sonucunda çoklu streslerle ilişkili olan cis-etkili elementlerin *ZmNAC55* geninin promotör bölgesinde yer aldığı bulunmuştur. *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen *ZmNAC55* geninin çimlenme sürecinde ABA'ya oldukça fazla duyarlı hale geldiği belirlenmiştir. Transgenik *Arabidopsis* bitkilerinin transgenik olmayanlara göre kuraklık stresine karşı daha toleranslı oldukları gözlemlenmiştir. Transgenik ve transgenik olmayan *Arabidopsis* bitkilerinde yapılan transkriptom analizlerin sonucunda ise strese karşı tepkide yer alan birçok gen farklı şekilde tanımlanmıştır. Bunlardan 12 tanesinin kuraklık stresi sırasındaki ifade düzeyleri real-time RT-PCR yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır.

Yang vd. (2016) tarafından krizantem (*Dendranthema lavandulifolium*) bitkisinden NAC benzeri bir genin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır ve izole edilen bu geni *DINAC1* geni olarak adlandırmışlardır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda *DINAC1* geninin tipik bir NAC domaini içerdiğini ve ONAC022 al grubuna ait olduğunu belirlemişlerdir. *DINAC1* geninin transkripsiyon aktivasyon yeteneğine sahip olduğunu göstermek için yapılan subsellüler lokalizasyon analizleri sonucunda genin çekirdekte lokalize olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda da *DINAC1* geninin düşük sıcaklık, yüksek tuzluluk ve kuraklık koşulları sırasında uyarıldığını ancak ısı şoku stresi ve ABA uygulamaları sonucunda uyarılmadığını belirlemişlerdir. Sonra *DINAC1* geninin abiyotik stresler sırasındaki rolünü tam olarak aydınlatmak amacıyla *DINAC1* genini tütün bitkisinde aşırı düzeyde ifade ederek transgenik tütün bitkileri elde etmişlerdir. Elde edilen transgenik tütün bitkilerinin kuraklık ve tuzluluk sırasında tepkilerinin değerlendirilmesi sonucunda ise bitkilerin her iki strese karşı da tolerans düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizlerin hepsi birlikte değerlendirildiğinde ise krizantem bitkisinden izole edilen *DINAC1* geninin, özellikle kuraklık ve tuz stresine karşı bitkilerde dayanıklılık ve/veya toleransta etkili olan NAC TF'lerinden biri olduğu sonucuna varılmıştır.

Wang vd. (2016) tarafından domates bitkisinde yapılan bir çalışma sonucunda ise *SINAC35* geni olarak isimlendiren bir NAC geni izole edilmiştir. *SINAC35* geninin abiyotik ve biyotik stresler sırasında rolünü aydınlatmak amacıyla *SINAC35* genini tütün bitkisinde aşırı düzeyde ifade ederek transgenik tütün bitkileri elde etmişlerdir.

Transgenik tütün bitkilerinde yapılan analizler sonucunda ise *SINAC35* geninin ifadesinin kuraklık, tuz stresi ve bakteriyel enfeksiyon sırasında uyarıldığını belirlemişlerdir. Ayrıca transgenik tütün bitkilerinin transgenik olmayanlara göre daha fazla sayıda ve daha uzun bir kök yapısına sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda *SINAC35* geninin aktarıldığı transgenik tütün bitkilerinde kuraklık ve tuz stresleri sırasında yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda ise tütünde oksin sinyallemede etkili olduğu bilinen *NtARF1*, *NtARF2* ve *NtARF8* genlerinin ekspresyon düzeylerinin fazla olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak *SINAC35* geninin aşırı ekspresyonunun, kuraklık ve tuz stresleri sırasında oksin sinyallemesinden sorumlu *NtARF* genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek kök büyümesini ve gelişimini teşvik ettiği ve böylece de transgenik bitkilerin streslere karşı dayanıklılık ve/veya tolerans düzeylerinin transgenik olmayan bitkilere göre arttığı sonucuna varılmıştır.

Kabak bitkisinde (*Cucurbita moschata*) ise strese karşı dayanıklılıkta etkisi olduğu düşünülen ve *CmNAC1* geni olarak adlandırılan bir NAC TF'nün rolü Cao vd. (2017) tarafından araştırılmıştır. *CmNAC1* geninin green floressent proteini (GFP) ile füzyonu sonucunda elde edilen *CmNAC1*-GFP füzyon proteininin tütün yapraklarında geçici olarak ifade edilmesi ile genin hücre içerisinde lokalizasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan lokalizasyon analizleri sonucunda *CmNAC1* geninin çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir. Böylece *CmNAC1* geninin transkripsiyon sırasında rol aldığı onaylanmıştır. Sonra maya hücrelerinde yapılan analizler sonucunda ise genin C-terminal bölgesinin transkripsiyon sırasında aktivatör olarak görev aldığı sonucuna varılmıştır. Daha sonra *CmNAC1* geninin farklı organlarda ifadesi sonucunda elde edilen bitkilerde yapılan analizler sonucunda *CmNAC1* geninin ifadesinin tuz, soğuk ve kuraklık stresleri ile ve H₂O₂ ve ABA uygulamaları ile arttığı belirlenmiştir.

NAC genleri ile yapılmış olan çalışmalar daha çok tek yıllık bitkilerde ve özellikle de *Arabidopsis* ve çelik gibi bitkilerde yapılırken, turunçgiller gibi çok yıllık bitkilerde ise *NAC* genleri ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlı sayıda kalmıştır. Turunçgillerde Fan vd. (2007) tarafından ilk kez *NAC*-benzeri bir genin varlığı hasat sonrası meyvelere uygulanan stresler sırasında rapor edilmiştir. Bu genin karakterizasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sonucunda ise *NAC*-benzeri genin ifadesinin hasat

sonrası uygulanan düşük sıcaklık, yaralama, anoksi, ve etilen dahil olmak üzere birkaç stres sırasında uyarıldığı belirlenmiştir. Sonra Liu vd. (2009) tarafından turunçgillerde meyve gelişimi ve yaşlanma sırasında etkili olan başka bir NAC-benzeri bir gen izole edilmiştir.

de Oliveira vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise turunçgillerde bulunan NAC genleri daha kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Yapılan bu çalışmada öncelikle turunçgil veritabanı kullanılarak 45 NAC proteini tespit edilmiştir. Turunçgillerden tespit edilen 45 NAC geninin filogenetik analizleri sonucunda bu genlerin 13 farklı al familyaya ayrıldığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç turunçgillerde de farklı fonksiyonlara sahip NAC genlerinin olduğunu ortaya koymuştur. Aynı zamanda 45 NAC geni arasından seçilen *CsNAC1* geninin çevresel stresler sırasındaki ifadesi incelenmiştir. Kuraklık stresi sırasında mandarin (*Citrus reshni*) ve Rangpur laym (*Citrus limonia*) yapraklarında yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda *CsNAC1* geninin kuraklık stresi sırasında her iki bitkide de uyarıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca *CsNAC1* geninin mandarinde (*C. reshni*) tuz ve soğuk stresi sırasında ve ABA uygulamasından sonra da yapraklarda ve köklerde uyarıldığı belirlenmiştir.

Yukarıda özetlenen bazı çalışmalar incelendiğinde NAC genlerinin tam olarak fonksiyonunu belirlemek amacıyla bazı bitkilerden izole edilen genler tütün veya *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı düzeyde ifade edilmiştir. Bu strateji tarımsal biyoteknolojide genlerin fonksiyonlarının tam olarak ortaya konması amacıyla kullanılan yaygın bir stratejidir. Bu strateji kullanılarak genlerin fonksiyonları tam olarak ortaya konduktan sonra streslere dayanıklı bitki geliştirmek amacıyla streslere dayanıklılıkta rolü olan genler istediğimiz bitkiye çeşitli yöntemler kullanılarak aktarılmaktadır. Streslere dayanıklı bitki geliştirmek amacıyla streslere dayanıklılıkta rol oynayan genler arasından belirlenen TF'lerinin bitkilere aktarılması özellikle abiyotik streslere dayanıklı bitki geliştirmek açısından önemlidir. Çünkü bitkilerde abiyotik streslerin de dahil olduğu birçok strese dayanım muligeniktir yani dayanıklılıkta ve/veya toleransta birçok gen etkilidir (Tran vd., 2010).

2.5. Gen Aktarım Yöntemleri

Bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler dahil olmak üzere verimi ve kaliteyi etkileyecek çok sayıda sınırlayıcı faktör mevcuttur. Bu güçlüklerle karşı binlerce yıldır ıslah çalışmaları yapıyor ancak tarla bitkilerinin klasik ıslah çalışmalarından elde edilen verimlilik artışı; ekilebilir alanların kritik değerlere gelmesi nedeniyle, giderek artan dünya nüfusunun temel gıda ihtiyaçlarının karşılanmasına yetmemektedir. Bu durum bitki ıslah çalışmalarında yeni teknolojilerin kullanılmasını gündeme getirmiştir (Halford, 2012; Safitri vd., 2016). Etkili transformasyon tekniklerinin uygulanması transgenik bitki üretimindeki en zorlu noktalardan biridir. Uygun transformasyon tekniğinin seçilmesi ve geliştirilmesi gibi transgenik tarla bitkilerinin rejenerasyonu da otuz yıllık teknolojik ilerlemeden sonra bile hala aşılması gereken bir güçlük olarak bilinmektedir (Alpeter vd., 2016).

Dolaylı gen aktarım yöntemlerinden biri olan *Agrobacterium* aracılığıyla gen transformasyonu basitliği ve etkinliği sayesinde, çok sayıda kararlı transformant üretmeyi mümkün kılmaktadır (Michielse vd., 2005). Ayrıca büyük, tek parça DNA segmentlerinin aktarılabilmesi, düşük kopya sayılarına sahip basit transgenlerin sokulabilmesi, kararlı entegrasyon ve aktarılan genlerin nesiller boyunca kalıtılabilmesi gibi sebeplerden dolayı doğrudan transformasyon tekniklerine göre daha çok tercih edilmektedir (Barampuram ve Zhang, 2011).

2.6. Turunçgillerde Gen Aktarım Yöntemlerinin Geliştirilmesi

Uzun yıllardan beri turunçgillerde etkin bir transformasyon yönteminin geliştirilmesi için farklı turunçgil türleri üzerinde değişik transformasyon teknikleri kullanılarak çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bu çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Turunçgillerde genetik transformasyon ilk defa polietilen glikol'le (polyethylene glycol, PEG) doğrudan DNA aktarımı (direkt DNA uptake) yöntemi kullanılarak, Trovita portakal (*C. sinensis*) çeşidinin protoplastları kullanılarak yapılmıştır (Kobayashi ve Uchimiya, 1989). Bu amaçla Trovita portakalından elde edilen protoplastlar kanamisin dayanıklılık geni ve bakteriden izole edilen aminoglikozit fosfotransferaz genini içeren DNA konstraktı ile transforme edilmiş ve transformasyon Southern blot hibridizasyonu ile doğrulanmıştır (Kobayashi ve Uchimiya, 1989; Çevik ve Şahin-Çevik, 2006).

PEG ile doğrudan DNA aktarımı daha sonra Vardi vd. (1990) tarafından yapılan bir çalışmada kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush.) protoplastları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra turunçgillerde gen transformasyon çalışmalarında Hidak.a ve Omura (1993) tarafından mandarin (*Citrus reticulata*) protoplastları ve elektroporasyon (electroporation) yöntemi bir arada kullanılarak, transformasyon başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Doğrudan DNA aktarımına alternatif transformasyon yöntemleri geliştirmek amacıyla Hidak.a vd. (1990) tarafından gen transformasyonuna alternatif bir yöntem olarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen transformasyon yöntemi turunçgillerde kullanılmaya başlanmıştır (Çevik ve Şahin-Çevik, 2006). Hidak.a vd. (1990) tarafından portakal kallusundan elde edilen süspansiyon hücre kültürleri kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bu çalışmaların sonucunda turunçgil protoplastları ve embriyogenik kalluslardan elde edilen hücre kültürlerinde PEG ve elektroporasyona dayalı doğrudan DNA aktarım yöntemleri yanında, gen tabancası ve *Agrobacterium* kullanılarak da transgenik bitki üretilebileceği gösterilmiştir. Ancak protoplast ve hücre süspansiyon kültürlerinin hazırlanmasının zor olması (Gmitter vd., 1992) ve bu yöntemler kullanılarak elde edilen transgenik bitkilerin yetiştirilmesi sırasında daha fazla güçlüklerle karşılaşılması ve daha uzun süre gerektirmesinden dolayı geliştirilen bu yöntemler turunçgillerde rutin olarak gerçekleştirilebilecek genetik mühendisliği çalışmaları için yetersiz kalmışlardır.

Bu transformasyon yöntemlerinin yetersizliğini gidermek amacıyla, turunçgil epikotil parçalarının *A. tumefaciens* aracılığı ile gen transformasyonunu sağlayacak olan bir gen transformasyonunun geliştirilmesi için çalışmalara başlanmıştır. Geliştirilen bu yöntemde öncelikle Carrizo citrange ve Swingle citrumelo bitkilerinin fidanlarından epikotil parçaları elde edilmiştir. Elde edilen bu epikotil parçaları *A. tumefaciens*'le birlikte bekletilerek transformasyon sağlanmış ve bu parçalardan organogenik rejenerasyonla transgenik sürgünler elde edilmiştir. Sonra elde edilen bu transgenik sürgünlerin köklendirilmesi ile de transgenik olarak tam bir turunçgil bitkisinin elde edilmesi sağlanmıştır (Moore vd., 1992, 1993).

Yukarıda Moore vd. (1992, 1993) tarafından geliştirilen bu yöntem Kaneyoshi vd. (1994) tarafından daha da geliştirilerek üç yapraklı portakal (*P. trifoliata*) epikotil parçalarının daha etkin bir şekilde transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra epikotil parçalarının *Agrobacterium*'la transformasyonunu sağlayan geliştirilen bu yöntem Gutierrez vd. (1997) tarafından transformasyon ve rejenerasyonu etkileyen bütün faktörler ayrıntılı olarak incelenmiş ve yöntem citranjlar, laym ve turunç gibi turunçgil türleri için optimize edilmeye çalışılmıştır.

Pena vd. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada ise pineapple portakal çeşidinden alınan epikotil parçaları kullanılarak transgenik sürgünler elde edilmiştir. Elde edilen bu transgenik sürgünler sürgün ucu aşılama tekniğiyle *in vitro* kültürde yetiştirilen kaba limon (*C. jambhiri*) anacı üzerine aşılarak, transgenik bitkilerin elde edilmesi sağlanmıştır.

Turunçgillerde yapılan gen transformasyon çalışmalarında daha sonra Yao (1996) tarafından tangelolardan elde edilen embriyogenik hücreler ve gen tabancası kullanılarak transformasyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda transgenik embriyoların başarıyla üretimi gerçekleştirilmiştir.

Cervera vd. (1998) tarafından yapılan başka bir çalışmada Pineapple portakal çeşidi transgenik bitki geliştirmek amacıyla kullanılmıştır. Pineapple portakal çeşidinin ağaçlarından alınan boğum arası parçacıkları *Agrobacterium* aracılığı ile yapılan gen transformasyonunda kullanılmıştır. Elde edilen transgenik sürgünler, anaçlar üzerine mikro-aşılama yöntemiyle aşılarak birkaç transgenik bitkinin elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu transgenik bitkiler 14 ayda meyve vermeye başlamışlardır.

Bond ve Roose, (1998) tarafından 7 turunçgil çeşidine ve/veya anacına ait bitkilerde (Washington Navel, Olinda Valencia, Lisbon Limon, Rio Red greyfurt, Carrizo, mandarin ve Mexican laym) *Agrobacterium* aracılığı ile gen transformasyonu ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda sadece Washington Navel çeşidinde ve Carrizo anacında GUS testi ile ilgili olarak pozitif sürgünler elde edilmiştir. Alınan bu sonuçlar Washington Navel ve Olinda Valencia gibi iki portakal çeşidi arasında çok az farklılık olmasına rağmen bu farklılığın

transformasyon verimliliğini etkilemek için yeterli olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak farklı turunçgil türleri ve çeşitleri için farklı protokollerin geliştirilmesi gerektiği bu ve turunçgiller için yapılan diğer çalışmalarla da ortaya çıkmıştır (Pena vd., 1997; Bond ve Roose, 1998; Costa vd., 2002).

Gutierrez vd. (1997) tarafından diğer turunçgil türleri için optimize edilmeye çalışılan ve epikotil parçalarının kullanılarak *Agrobacterium* aracılığı ile gen transformasyonunun sağlanmasını sağlayan yöntem Luth ve Moore (1999) tarafından daha da etkin hale getirilerek standardize edilmiştir. Luth ve Moore (1999) tarafından geliştirilen bu yöntemde T-DNA vektörü içerisinde transforme olmuş bitkilerde seçiciliği sağlayan NptII geni ve genin anlatımının olup olmadığını sağlayan β -glukuronidaz (GUS) geni yer almakta idi. Kanamisin (NptII) varlığında nucellar fidelerin epikotil segmentlerinden rejenere edilen sürgünler histokimyasal boyama yöntemi kullanılarak rejenerasyonu gerçekleştirilen sürgünlerin %43,5'inin GUS raportör geni bakımından pozitif olduğu belirlenmiştir. Elde edilen transgenik greyfurt bitkilerinin transgenik olup olmadıkları polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) ve Southern blot hibridizasyonu ile doğrulanmıştır. Luth ve Moore (1999) tarafından Duncan greyfurt (*C. paradisi*) kullanılarak geliştirilen bu yöntem daha sonra Duncan greyfurt (*C. paradisi*) başta olmak üzere birçok turunçgil türünde farklı amaçlar için gen aktarımında kullanılmıştır. Böylelikle farklı turunçgil türlerinde ve akrabalarında kullanılacak bir transformasyon ve rejenerasyon yöntemi oluşturulmuştur. Turunçgillerde geliştirilen bu protokol diğer bitkilerde daha kaliteli ve aynı zamanda çevresel streslere dayanıklı bitki geliştirilmesi amacıyla yapılan gen transformasyon çalışmalarının turunçgillerde de yapılabilmesinin önünü açmıştır. Ayrıca turunçgiller içerisinde greyfurtta geliştirilen bu protokol temel olarak alınarak istenen özellikte turunçgil bitkilerinin geliştirilmesi amacıyla modifiye edilerek umut verici bir yöntem olarak günümüzde de farklı turunçgil türlerinde *Agrobacterium* aracılığı ile gen transformasyonunun yapıp transgenik bitkiler üretmek amacıyla da kullanılmaktadır.

Dominguez vd. (2000) tarafından CTV'nin kılıf protein geni (coat protein, CP geni) pBI-121 ikili vektöre aktarılmıştır. pBI-121 ikili vektöre klonlanan CP geninin (CTV-CP geninin) *Agrobacterium*'un EHA-105 ırkı ve elektroporasyon yöntemi

kullanılarak *Agrobacterium*'a transformasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Serada yetiştirilen 6-12 aylık Mexican laym bitkilerine ait parçacıklar gen transformasyonu için pBI-121 ikili vektöre klonlanan CP genini taşıyan *Agrobacterium* solüsyonunda 15-30 dak. bekletilmiştir. İnternodal gövde segmentleri Murashige Skoog (MS) + 0,2 mg^l⁻¹ thiamine hydrochloride, 1 mg^l⁻¹ pyridoxine hydrochloride, 1 mg^l⁻¹ nicotinic asit, %3 sükröz ortamına alınmıştır ve 3 gün ko-külivasyon ortamında bekletilmiştir. Daha sonra transgenik bitkilerin rejenerasyonu için MS + 0,2 mg^l⁻¹ thiamine hydrochloride, 1 mg^l⁻¹ pyridoxine hydrochloride, 1 mg^l⁻¹ nicotinic asit, %3 sükröz, 1 mg^l⁻¹ BAP, 100 mg^l⁻¹ kanamisin, 250 mg^l⁻¹ vancomycin, 500 mg^l⁻¹ cefotaxime içeren ortam kullanılmıştır. Transgenik olduğu düşünülen rejenere olan filizlere GUS testi ve ardından da PCR analizi yapılmıştır ve bu testler sonucunda transgenik olduğu düşünülen bitkilerin seçimleri yapılmıştır.

Febres vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada Florida T36 T30, B249 ve DPI3800 CTV izolatları Mexican lime üzerinde çoğalmış ve bu izolatlara ait kılıf protein (coat protein, CP) genleri PGA482GG, pMON10098 ve pCAMBIA 2201 vektörlerine aktarılmıştır. Daha sonra ise Duncan greyfurt bitkilerinin tohumlarından geliştirilen etiole olmuş epikotil parçaları ve Luth ve Moore (1999) tarafından geliştirilen *A. tumefaciens* aracılığı ile gen protokolü kullanılarak gen transformasyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Boscariol vd. (2003) tarafından gen transformasyonu sırasında seleksiyon için antibiyotik ve herbisitlerin kullanılması yerine transforme olacak hücreler için karbon kaynağı olan mannozun kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle alternatif seleksiyon geni olarak ManA geninin transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon için Valencia, Natal, Hamlin ve Pera portakallarının olgun meyvelerinin tohumları kullanılmıştır. Tohumdan çoğalılan bitkiler 12-15 cm olduğunda 10 gün 16/8 saat ışık periyoduna alınmıştır. *In vitro* koşullarda çimlendirilen Pera ve Natal bitkileri 1 cm uzunluğunda olacak şekilde epikotil parçaları elde edilmiş ve früktoz, sükröz veya mannoz içeren EME besiyerine alınmıştır. ManA geni pNOV2116 plazmitine aktarılmıştır ve ManA genini taşıyan bu plazmit *Agrobacterium tumefaciens* EHA-101 ırkına transforme edilmiştir. Valencia, Natal, Hamlin ve Pera epikotil segmentleri ManA geninin *Agrobacterium*

aracılığı ile transformasyonu için 20 dak. *Agrobacterium* içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra EME + 1 mg^l⁻¹ BAP, 500 mg^l⁻¹ cefotaxime içeren besi ortamında 24 °C'de 3 gün ko-külvasyona alınmıştır. Rejenerasyon süresince seçiciliği sağlamak üzere mannoz konsantrasyonu seleksiyon süresince 73 µM ile 112.3 µM arasında kullanılmıştır. İyi gelişen sürgünler ayrılarak Carrizo anacı üzerine mikro aşılama yöntemi kullanılarak aşılanmıştır.

Li vd. (2003) tarafından Valencia portakalına (*C. sinensis*) ait kalluslar, turunçgiller için *Agrobacterium* aracılığı ile yeni bir transformasyon yönteminin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Valencia'nın embriyogenik kallusları 25 dak. boyunca pTA29-barnaz genini içeren *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* EHA105 suşu) süspansiyonuna daldırılarak steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Daha sonra 100 µM asetosiringon (AS) içeren katı Murashige & Tucker (MT) besi ortamına aktarılmıştır. 19 °C'de karanlıkta 3 günlük bir inokülasyondan sonra, kalluslar higromisin (50 mg^l⁻¹) ve sefotaksim (400 mg^l⁻¹) içeren MT ortamına aktarılmıştır. Transformasyon oranı, ko-külvasyonda 3 gün boyunca 19 °C'de tutulanlarda, 23 °C veya 28 °C'ye kıyasla daha yüksek oranda elde edilmiştir. Ayrıca ko-külvasyon ortamının asetosiringon (AS) içermediği durumlarda herhangi bir pozitif sonuç veren kallus elde edilememiştir. Bu nedenle en uygun transformasyon koşulları daha sonra transgenik Valencia bitkileri üretmek için kullanılmıştır. 3 gün süren karanlık ko-külvasyon sonrasında, kalluslar glufosinat bazlı herbisit Basta (50 mg^l⁻¹) ve sefotaksim (400 mg^l⁻¹) içeren seçici MT ortamına aktarılmıştır. Gelişen embriyolar, daha sonra benziladenin (BA) (0,5 mg^l⁻¹), kinetin (KIN) (0,5 mg^l⁻¹) ve naftelen asetik asit (NAA) (0,1 mg^l⁻¹) ile takviye edilmiş ortama aktarılmıştır. Gelişen sürgünler üç yapraklı portakal (*P. trifoliata*) anacı üzerine aşılanmıştır. pTA29-barnaz genini içeren transgenik Valencia bitkileri PCR ve Southern blot analizleri ile doğrulanmıştır.

Ballester vd. (2008), Carrizo anacına ait tohumlar *in vitro* koşullarda yetiştirmiş ve gelişen epikotil parçaları *Agrobacterium* aracılığı ile yapılacak olan gen transformasyonunda kullanılmıştır. Aynı zamanda *Agrobacterium* aracılığı ile yapılacak olan gen transformasyonunda transformasyonda serada yetiştirilmiş olan Pineapple portakallarının internodal segmentleri kullanılmıştır. Turunçgil sürgün gelişim ortamı (CRM) olarak MS sals + 30 gl⁻¹ sükröz, 100 mg^l⁻¹ myo-inositol, 0,2

mg⁻¹ thiamine-HCL, 1 mg⁻¹ pyrdoxine-HCL, 1 mg⁻¹ nicotinic asit, 3 mg⁻¹ BAP kullanılmıştır. p35SGUSINT, pMATIMH ve pMOV2819 plazmitleri öncelikle *A. tumefaciens* EHA-105 ırkına aktarılmıştır. Eksplantlar daha sonra bakteri inokülasyonunda 15 dak. bekletilmiştir ve daha sonra IM+ 2 mg⁻¹ IAA, 1 mg⁻¹ 2 isopentenyl adenin, 2 mg⁻¹ 2,4D içeren ko-külivasyon (CM) ortamında 3 gün bekletilmiştir. Daha sonra 500 mg⁻¹ cefotaxime, 250 mg⁻¹ vancomycin ve 100 mg⁻¹ kanamisin besi ortamına alınarak kanamisin antibiyotiğine dayanıklı olanların gelişmesi sağlanmıştır. Gelişen pozitif sürgünler ise Troyer anacı üzerine aşılmıştır.

Cervera vd. (2009) tarafından yine Carizo anacına ait epikotil segmentleri kullanılmıştır. Transformasyonda öncelikle optimizasyon için bazı çalışmalar yapılmıştır. Plazmitler *Agrobacterium*'a aktarıldıktan sonra 3 gün kokülivasyon besiyerinde bekletilmiştir. Daha sonra 0, 2, 5, 10 veya 20 mg⁻¹ higromisin ve 0, 0.5, 2, 5, 10, 20 veya 50 mg⁻¹ bialaphos içeren sürgün gelişim ortamına (SRM) 2-3 ay süre ile geçirilmiştir. Sürgünlerin uygun olarak gelişimi için ortamda bulunan higromisin için 5 ya da 10 mg⁻¹ ve Bialaphos için ise 5 mg⁻¹ en uygun konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir. Daha sonra AP1 geninin transformasyonu için AP1 geni öncelikle pCAMBIA 1302 ve pCAMBIA 3300/sgfp'ye aktarılmıştır. Daha sonra ise *Agrobacterium*'un EHA-105 ırkına transforme edilmiştir. Higromisin değeri normal büyümenin olması için 5 mg/l'ye düşürülmüştür. Daha sonra gelişen sürgünlerde GFP, PCR ve Southern blot analizleri ile gelişen sürgünlerin transgenik olup olmadıkları teyit edilmiştir.

Lopez vd. (2010), CTV'ne karşı dayanıklılık geliştirmek amacıyla CTV'nin p23 geninin sense, anti-sense ve intro-hairpin formları Mexican laymı bitkilerinde aşırı düzeyde ifade edilmiştir ve elde edilen transgenik bitkiler CTV'ye dayanıklılık bakımından karşılaştırılmıştır. Gen transformasyon çalışmalarında CTV p23 genine ait farklı formlar 35S promotörü içeren pMOG180 vektörüne daha sonra da pBİN-19-sgfp vektörüne klonlanmıştır. CTV p23 geninin farklı formlarını taşıyan pBİN-19-sgfp vektörü ayrı ayrı olarak *Agrobacterium* aracılığı ile bitkiye transformasyonunun gerçekleştirilmesi için öncelikle *A. tumefaciens* EHA-105 ırkına sonrada Mexican layma bitkisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. CTV p23 geninin sense, anti-sense, intro-hairpin formlarının aktarıldığı ve sürgün gelişmeleri

gözlenen bitkiler troyer anacı üzerine aşılansarak 24-26 °C'de %60-80 nem ortamında doğal ışık sağlanan ortamda büyümeleri sağlanmıştır. Yapraklardaki virüs varlığını doğrulamak için RT-PCR analizi yapılmıştır. Aynı zamanda transgenik bitkilerin Southern ve Northern blot analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Yang vd. (2011), enfekteli portakaldan (*C. sinensis*) *Xanthomonas* pv. Citri izole edilmiştir. PthA geni turunçgil kanserine karşı dayanıklılık geliştirmek üzere NptII içeren pBI121 plazmit içerisine klonlanmıştır. Daha sonra bu vektörün *A. tumefaciens* EHA105 ırkına transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Succari ve Bingtong portakal tohumları sterilize edilerek 26°C'de karanlıkta 3 hafta çimlenmeye bırakılmıştır. Daha sonra 1 hafta da 16/8 saat ışık periyoduna alınmıştır. İnternodal gövde segmentleri pthA genini ve pBI121 plazmiti taşıyan *Agrobacterium* içerisinde 15 dak. bekletilerek MS + 0,1 mg⁻¹ tiamin hidroklorit, 0,5 mg⁻¹ pyridoxine hidroklorit, 0,5 mg⁻¹ nikotinik asit, 2 mg⁻¹ glisin, 100 mg⁻¹ inositol, 3 mg⁻¹ BAP ve 30 gl⁻¹ sükroz içeren ko-külivasyon ortamına alınmıştır. Sürgün gelişim ortamı için ise (SRM) MS + vitamins (White,1951), 1 mg⁻¹ BAP, 30 gl⁻¹ sükroz, 75 mg⁻¹ kanamisin ve 500 mg⁻¹ cefotaxime içeren ortam kullanılarak 26°C'de 16 saat ışık periyodunda 4 veya 6 hafta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda gelişen sürgünler Troyer anacı üzerine aşılanmıştır. Elde edilen transgenik bitkilerde yapılan analizlerde tekrarlanan inokülasyonların ardından iki transgenik bitkinin, turunçgil kanserine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

Dutt vd. (2011) tarafından turunçgillerde *Agrobacterium* aracılığı ile gerçekleştirilen transforme olmuş bitki elde etme oranını artırmak amacıyla ortamlara glisin betain, glutatyon, lipoik asit ve polivinilpirrolidon içeren dört farklı antioksidanın eklenmesi ile ilgili olarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada kullanılan gus-egfp füzyon geni kullanılmıştır. Ko-külivasyon ortamı (CM), 13.2 µM için BAP, 0.5 uM NAA ve 4.5 1M 2,4-D, 30 gl⁻¹ sukroz, 0.5 gl⁻¹ 2- (N-morfolino) etansülfonik asit (MES) ile takviye edilmiş MS tuzları ve vitaminlerden oluşmuştur. Kesilmiş eksplantlar, önce sıvı CM ortamında inkübe edilirken, daha sonraki inkübasyon için 100 mM asetosyringon içeren katı CM ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamı (RM), 13.2 uM BAP ve 2.5 uM NAA, 0.5 gl⁻¹ MES, 30 gl⁻¹ sakaroz ve 8 gl⁻¹ agar içeren MS tuzları ve vitaminlerden oluşmuştur. Ayrıca transgenik sürgünlerin seçilmesi için kanamisin (70 mg⁻¹) ve *Agrobacterium* büyümesinin önlenmesi için ise timentin

(400 mg^l⁻¹) eklenmiştir. Lipoik asitin, Meksika laymında kallus gelişiminde verimliliği önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. *Agrobacterium* ile birlikte inoküle edilmiş epikotil segmentlerin uç kısımlarından kesilerek sürgün büyümesi geliştirilmiş ve ortama eklenen glisin betain, glutasyon ve polivinilpirolidon antioksidantlarının transformasyon verimliliğini geliştirmede herhangi bir katkılarının olmadığı belirlenmiştir.

Miyata vd. (2012) tarafından turunçgillerde phloeme spesifik olarak gerçekleşen Citrus phloem protein 2 (CsPP2) geninin ekspresyonunu incelemek için CsPP2 geni β glukuronidaz (GUS) ve seçici markör olarak kanamisin antibiyotiği içeren pCAMBIA 2201 vektörüne klonlanmıştır. Aynı zamanda *Arabidopsis thaliana* phloem protein 2 (AtPP2) ve *Arabidopsis thaliana* sukroz taşıyıcı 2 (*AtSUC2*) genleri de farklı promotörler altında GUS geni içeren pCAMBIA 2201 vektörüne ayrı ayrı klonlanmış ve farklı konstraktları içeren vektörlerin *Agrobacterium*'a transformasyonları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen vektörlerin transformasyonda kullanılması için çalışmada Hamlin, Valencia ve Pena portakal çeşitlerinin tohumları kullanılmıştır. Epikotil parçaları *Agrobacterium*'la inoküle edildikten sonra BAP 1,0 mg^l⁻¹ içeren MT (Murashige and Tucker) besiyerinde 2 gün 24 °C'de karanlıkta kökölüvasyona tabi tutulmuştur. Sonra eksplantlar MT + 1,0 mg^l⁻¹ BAP, 50 mg^l⁻¹ kanamisin, 500 mg^l⁻¹ cefotaxime içeren sürgün gelişme ortamına alınarak 27 °C de 4 hafta karanlık ortamda daha sonra 16/8 saat ışık periyodunda tutulmuşlardır. Gelişen sürgünlerin Carrizo anacı üzerine aşılınması sağlanmıştır. Carrizo anacı üzerinde gelişen bitkilerin yapraklarından genomik DNA izolasyonu yapılarak transgenik olup olmadıkları PCR analizi ile teyit edilmiştir.

Marutani-Hert vd. (2012) tarafından gen transformasyonu amacıyla turunçgil türleri arasında yer alan greyfurt (*C. paradisi*), portakal (*C. sinensis*, Valencia) ve ağaç kavunu (*C. medica*) ve US-942 anacına boğum araları segmentleri bu bitkilere ait serada yetiştirilen bitkilerden alınmış ve alınan bu segmentler gen transformasyonu amacıyla kullanılmıştır. Gen transformasyonu amacıyla öncelikle p35SGUSINT plazmitinin *A. tumefaciens*'in EHA-105 ırkına transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar *Agrobacterium*'la inokülasyona 15 dak. tabi tutulduktan sonra kurutularak 40 μ M asetosiringon içeren Sulfide Indole Motility (Sülfid İndol Motilite) SIM besiyerine geçirilmiştir ve burada 3 gün bekletilmiştir. Eksplantlar

daha sonra SIM+5 μM GA, 100 mg l^{-1} kanamisin, 250 mg l^{-1} vancomisin ve 250 mg l^{-1} cefotaxime içeren ortamda 27 $^{\circ}\text{C}$ 'de 2 hafta karanlıkta daha sonra 16/8 saat ışık periyodunda 30 gün süreyle tabi tutularak transgenik sürgünlerin gelişmesi takip edilmiştir.

Çevik vd. (2012) tarafından turunçgil tristeza virüsünün (CTV) normal ve mutant RNA-bağımlı RNA polimerazını (RdRp) kodlayan genin farklı formları Duncan greyfurt (*C. paradisi*) çeşidine *Agrobacterium* aracılığı ile transforme edilerek turunçgillerde replikaza dayalı etmeden elde edilen dayanıklılık araştırılmıştır. Bu amaçla RdRp geni CTV genomundan çoğaltılarak bitki transformasyonunda kullanılmak üzere bir normal ve 2 mutant RdRp genleri oluşturulmuştur. Tohumdan yetiştirilen Duncan greyfurt bitkisinin etiole olmuş epikotil parçaları hazırlanan bu gen yapıları kullanılarak *Agrobacterium* aracılığı ile transforme edilmiştir. Etiole edilmiş fidelerin epikotil kısımları 1 cm'lik kesitler halinde kesilmiştir ve 1 dak. 100 mM asetosiringon içeren MS ortamı içinde *Agrobacterium* ile inokule edilmiştir. İnoküle edilmiş segmentler, petri plaka ortamı (MS ortamı artı 7 g l^{-1} bacto agar ve 100 mM asetosiringon) üzerinde yatay olarak yerleştirilmiştir ve 2-3 gün oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. 2-3 gün süreyle ekim işlemi yapıldıktan sonra, epikotil segmentler bir seçim ortamına aktarılmıştır. Seçim ortamında 0,5-2,0 mg l^{-1} BA ile MS ortamı, 500 mg l^{-1} claforan ve 75 mg l^{-1} kanamisin ile 7 g l^{-1} bacto agar kullanılmıştır. Transformasyon yapılan 4540 epikotil parçasından 1402 tane sürgün kanamisine dayanıklı olarak elde edilmiştir. Yeşil floresan raportör geninin floresan mikroskop ve β -glukuronidaz (GUS) raportör geninin ise histokimyasal boyama yöntemiyle test edilmesi sonucunda belirlenen 146 GFP ve GUS pozitif bitki, köklendirilme ortamına alınmıştır. Köklerin geliştirilmesi için 3-5 hafta veya daha uzun bir süre boyunca köklenme gelişimi için 0,5 mg/l naftalen NAA içeren MS ortamına alınmıştır. Sonra köklenen ve canlı kalan bitkilerden 97 tanesi topraklı saksılara aktarılmıştır. Daha sonra toplam 70 bitkinin raportör GUS geni ve CTV RdRp transgenlerini içerip içermedikleri PCR yöntemiyle test edilmiştir. Bu testler sonucunda toplam 51 bitkinin GUS ve CTV RdRp transgenler yönünden pozitif özellikte oldukları tespit edilmiştir.

Khan vd. (2012) tarafından raportör gen olarak GFP ve 'Valencia' portakalının (*C. sinensis*) yaprak segmentleri kullanılarak *Agrobacterium* aracılığıyla yapılacak olan

gen transformasyonu için protokol geliştirmeye çalışmışlardır. Transgenik bitkilerin seçimi için kullanılan kanamisin konsantrasyonunun 50 mg/l olması test edilen diğer konsantrasyonlar arasında en iyisi olarak değerlendirilmiştir. Rejenerasyon için de MT bazal ortamına ek olarak 0,1 mg^l⁻¹ NAA, 0,5 mg^l⁻¹ BA ve 0,5 mg^l⁻¹ kinetin eklenmesi daha uygun bulunmuştur. Transformasyon için kullanılacak *Agrobacterium* konsantrasyonunun OD600'de 0.6'da olması ve 3 aylık *in vitro* fidelerden elde edilen yaprak segmentlerinin *Agrobacterium* süspansiyon kültüründe 10 dak. bekletilmesi uygun bulunmuştur. Ko- külivasyon süresinin de 3 gün olması yüksek oranda GFP ekspresyonunun belirlenmesi açısından uygun bulunmuştur. Daha sonra GFP yönünden pozitif olan sürgünlerin nptII genine spesifik primerler kullanılarak PCR analizi yapılmıştır.

Furman vd. (2013) tarafından 6 ve 12 aylık portakalların boğum arası segmentleri ve kanamisin dayanıklılık geni içeren Pbin19sgfp-Derivvektörü kullanılarak bir gen transformasyon çalışması yapılmıştır. Transgenik olarak gelişen kallusların seçimi için MS ortamı içerisinde 100 mg^l⁻¹ kanamisin kullanılması uygun bulunmuştur. Gelişen sürgünlerin öncelikle GFP yönünden pozitif olup olmadıkları belirlenmiş ve daha sonra da pozitif olarak belirlenen troyer anacı üzerine aşılama yapılmıştır. Daha sonra da transgenik bitkilerin 3-4 hafta sonunda GFP genine spesifik primerler kullanılarak PCR analizi yapılmıştır.

Zou vd. (2013), jincheng portakal (*C. sinensis*) tohumlarını kullanarak epikotil parçaları elde etmişlerdir. Sonra pGLINC ve pGLI35SC plazmitleri kullanılarak *Agrobacterium* aracılığı ile EHA-105'e aktarılmıştır. Epikotil parçaları 2 mg^l⁻¹ BA, 0,25 mg^l⁻¹ IAA, 1 mg^l⁻¹ 2,4D ve 100 µM asetosiringon içeren ko-külivasyon besiyerine geçirilmiştir. Daha sonra 2 gün 26 °C'de %60 nem bulunan karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Daha sonra 2 mg^l⁻¹ BA, 0,25 mg^l⁻¹ IAA, 50 mg^l⁻¹ kanamisin besi ortamına geçirilmiştir. Gelişen sürgünler citrange anacı üzerine aşılama yapılmıştır.

Turunçgillerde yapılan gen transformasyon çalışmaları kullanılan ortamın ve eklenecek hormon ve antibiyotik oranlarının turunçgil tür ve çeşitlerinin transformasyon verimliliğini etkilediğini gösterilmiştir. Genetik transformasyon yapılan çalışmalarda kullanılan eksplant ve süspansiyonların hazırlanmasının güçlüğü buna ek olarak elde

edilen transgenik bitkilerin yetiştirilmesinde zorluklar ve genel olarak turunçgillerde geliştirilen gen transformasyon protokolünün uzun sürmesi turunçgillerde gen transformasyonunun başarı düzeyini etkilemektedir. Ayrıca yukarıda özetlenen birçok çalışmada turunçgillerde *in vitro* ortamda köklenme sırasında karşılaşılan problemlerden dolayı transgenik sürgünlerin sürgün ucu aşılama tekniğiyle *in vitro* kültürde veya serada yetiştirilen anaçlar üzerine aşılammıştır.

2.7. Turunçgiller ve Kuraklık Stresi

Tek yıllık bitkilerin kuraklık stresine karşı tepkilerinin moleküler mekanizması geniş bir şekilde açıklanmış olmasına karşın turunçgillerinde dahil olduğu birçok bitki çok yıllık bitki grubunun streslere dayanıklılığın moleküler mekanizması tam olarak açığa çıkarılamamıştır ve bu konuda yapılan çalışmalarda oldukça sınırlı sayıda kalmıştır. Ekonomik değeri yüksek meyve türlerini oluşturan turunçgil meyve grubu çevresel streslere tolerans bakımından büyük farklılıklar göstermektedir. Ancak ticari olarak önemli olan turunçgil türleri soğuk, kuraklık ve tuzluluk streslerine karşı duyarlıdırlar. Kuraklık, birçok turunçgil yetiştirme bölgesinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Turunçgillerde kuraklık stresinin de aralarında bulunduğu genel olarak abiyotik streslere olan tolerans çalışmaları 2000'li yıllara kadar turunçgil tür, çeşit veya anaçlarının tarla koşullarında performanslarının belirlenmesi ve performansları iyi olan türlerin melezleme çalışmaları ile sınırlı kalmıştır (Davies ve Albrigo, 1994). yapılmış olan Yaklaşık olarak son 20 yıldır yapılan çalışmalarla da turunçgillerde abiyotik streslere dayanımın moleküler mekanizması belirlenmeye çalışılmış ve abiyotik streslere dayanıklılıkta rol alan genler belirlenmiştir.

Naot vd. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada, turunçgillerden izole edilen ve pamuktaki *Lea5* geni ile homoloji gösteren bir gen hücre süspansiyonu kültüründen izole edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu genin ekspresyonunun kuraklık, tuzluluk ve yüksek sıcaklık stresleri sırasında turunçgil yapraklarında arttığı gözlemlenmiştir.

Abiyotik streslerde etkili olduğu bilinen COR genlerinden biri olan *CrCOR15* geninin mandarin (*C. clementina*) yapraklarında kuraklık stresi sırasında

ekspresyonunda meydana gelen değişimler Sanchez-Ballesta vd. (2004) tarafından incelenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda kuraklık stresi sırasında *CrCOR15* geninin ekspresyonunun mandarin yapraklarında arttığı belirlenmiştir.

Abiyotik streslere toleransta önemli olan prolinin biyosentezinden sorumlu Prolin biyosentetik yolunda yer alan ezimi kodlayan prolin-5-karboksilat sentaz geninin carrizo sitranjlarında aşırı düzeyde ekspresyon göstermesi sağlanmıştır. Elde edilen transgenik carrizo sitranj bitkilerinin transgenik olmayanlara göre 15 günlük kuraklık stresi sırasında daha iyi gelişme gösterdiği belirlenmiştir (Molinaria vd., 2004).

ABA biyosentezinde kilit bir enzim olan 9-sis-epoksikrotenoid dioksijenazı kodlayan bir cDNA, portakaldan (*C. sinensis*) izole edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu genin ifadesinin kuraklık stresi sırasında portakal bitkisinin yapraklarında arttığı belirlenmiştir (Rodrigo vd., 2006). RING çinko parmak proteini, *Poncirus trifoliata*'dan izole edilmiştir.

Soğuk stresi sırasında etkili olduğu belirlenen ve üç yapraklı portakaldan (*P. trifoliata*) 2 günlük soğuk stresi sırasında Şahin-Çevik ve Moore (2006) tarafından izole edilen RING zinc finger proteininin ifadesi üç yapraklı portakal ve şadok bitkilerinde 15 günlük kuraklık stresi sırasında incelenmiştir. Yapılan northern blot analizleri sonucunda şadok (*Citrus grandis*) bitkilerinde kuraklık stresine karşı herhangi bir yanıt belirlenmemesine karşın üç yapraklı portakal bitkilerinde RING zinc finger geninin ifadesinde kuraklık stresi süresince artış olduğu belirlenmiştir.

Kuraklık stresi sırasında mandarin (*C. clementina*) bitkilerinde kök ve yapraklarda aktif olan ve aktiviteleri azalan genleri belirlemek için Gimeno vd. (2009) tarafından 6000 genin yer aldığı bir mikroarray çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonucunda mandarin yapraklarında 573 ve köklerinde ise 488 genin ekspresyonlarında artışlar olduğu belirlenmiştir. Aktiviteleri artan genler arasında *NAM18* ve *NAC18* *NAC* genleri de bulunmaktadır. Aynı zamanda yapraklarında 488 ve köklerinde ise 289 genin aktivitelerinde de azalmalar belirlenmiştir.

Uzun yıllar süren araştırmalar turunçgil anaçları içerisinde Rangpur laymının (*Citrus X limonia*) kuraklığa en dayanıklı anaç olduğu belirlenmiştir (Davies ve Albrigo,

1994). Bu nedenle de dünyada kuraklığın problem olduğu turunçgil üretim yerlerinde özellikle turunçgil üretiminde de önemli bir ülke olan Brezilya'da Rangpur laym anaç olarak kullanılmaktadır. Rangpur laymında kuraklığa dayanımın moleküler mekanizmasını belirlemek amacıyla kuraklık stresi uygulanan Rangpur laym bitkilerinin kökleri kullanılarak cDNA kütüphanesi oluşturulmuş ve bu kütüphaneden elde edilen bir dizi genin DNA sekanslamaları yapılmıştır (Boscariol-Camargo vd., 2007).

Şahin-Çevik vd. (2010, 2017) ise Rangpur laymına kuraklık dayanıklılık özelliğini veren genlerin neler olduğunu bulmak amacıyla bitkilere 14 günlük kuraklık stresi uygulanmıştır. Bu bitkilerden alınan yaprak örnekleri kullanılarak çıkarımlı hibridizasyon yöntemiyle (supression subtractive hybridization, SSH) kuraklık stresi sırasında aktiviteleri artan genleri içeren cDNA kütüphanesi oluşturmuştur. Yapılan bu çalışmanın sonucunda Rangpur laym bitkisinde 56 tane genin ekspresyonunun kuraklık stresi sırasında arttığı belirlenmiştir. Belirlenen bu genlerin arasında NAC TF'ni kodlayan iki farklı NAC geni de bulunmuştur.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında da Şahin-Çevik vd. (2010, 2017) tarafından Rangpur laym bitkisinden kuraklık stresi sırasında arttığı ve kısmi baz dizilimi belirlenen iki NAC geninden birinin seçimi yapılmış ve seçilmiş olan bu genin öncelikle tüm gen olarak izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Sonra Akdeniz Bölgesi ülkelerinde ve ülkemizde de turunçgil yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan turunç anacının kuraklığa dayanımını artırmak amacıyla Rangpur laym bitkisinden izolasyonu ve karakterizasyonu yapılan NAC geninin Luth ve Moore (1999) tarafından turunçgillerde geliştirilen ve turunçgil epikotil parçalarının *Agrobacterium* aracılığı ile gen transformasyonunu sağlayan yöntem kullanılarak turunç anacına aktarılmasına yönelik olarak çalışmalar yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kısmi Baz DNA Dizilimi Bilinen *NAC* Geninin RACE Yöntemiyle Tüm Gen Olarak Elde Edilmesi

3.1.1. Bitki materyali

Kısmi baz DNA dizilimi bilinen *NAC* geninin çoğalması amacıyla öncelikli olarak Rangpur laym anacına ait tohumlar Kaliforniya Turunçgil Germplazm Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Rangpur laym anacına ait tohumların ekimleri 1/3 oranında perlit-torf karışımı hazırlanan saksılar içerisinde gerçekleştirilmiş ve ekimi gerçekleştirilen tohumların çimlenmeleri ve daha sonra da çimlenen tohumların büyümeleri 28 °C sıcaklık, %60 ± 5 oransal nemde 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık süre ile aydınlatılan bitki büyütme kabinlerinde sağlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan Rangpur laym anacının özellikleri aşağıda verilmiştir.

Rangpur laym: Yapraklarının renkleri mor bir renk tonu ile donuk yeşil arasındadır. Dikenlerinin sayısı ve büyüklüğü ağaçtan ağaca değişmekte ve bazıları ise hemen hemen dikensizdir. Tohumlarının çoğunlukla poliembriyonik olması nedeniyle genellikle tohumları kullanılarak çoğaltılmaktadır. Bu nedenle de bazen farklı özelliklerde bitkiler oluşmaktadır. Örneğin meyve kabuklarının rengi ve dokusunda, tohum sayısında, dikenlerinin sayısında ve büyüklüğünde ara sıra farklılıklar meydana gelmektedir. Meyveleri son derece asidik ve çok suludur. Meyve kalitesi ve dona dayanıklılık bakımından Rangpur laym üzerine aşılı çeşitler limon ve turunç anaçlarına göre orta derecede bir özellik sergilemektedir. Bunun yanında kuraklık ve CTV'ye dayanıklılık bakımından da en önemli anaç olarak bilinmektedir. Su tutma özelliği olmayan tınlı veya kumlu-tınlı topraklara daha iyi gelişim göstermektedir. Bu özelliği nedeniyle de Rangpur laym kurak koşullarda özellikle Brezilya'da turunçgil yetiştiriciliğinde anaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çok tuzlu ve kalkerli toprak koşullarına toleransları fazladır.

3.1.2. 14 günlük kuraklık stresi uygulaması

Bitki büyüme kabininde yetiştirilen Rangpur laym bitkilerinden 5 tanesi seçilerek 14 gün boyunca bu bitkilere su verilmeyerek kuraklık stresi uygulanmıştır. Sonra kuraklık stresi uygulanan Rangpur laym bitkilerinden 14. gününde yaprak örnekleri toplanmış ve her bitkiden alınan yaprak örnekleri karıştırılarak sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Sıvı azot içerisinde dondurulan bu yaprak örnekleri bir sonraki aşamada mRNA izolasyonunda kullanılıncaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.3. mRNA izolasyonu

Kuraklık stresi uygulanan ve 14. günde yaprak örnekleri toplanan Rangpur laym bitkilerinden Fastract mRNA izolasyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kuraklık stresi uygulanmış ve -80 °C’de saklanan Rangpur laym bitkilerinin yaprak örneklerinden 100 mg alınarak sıvı azot içerisinde un haline gelinceye kadar ezilmiştir. Ezilen ve un haline getirilen yaprak örnekleri öncelikle 65 °C’ de üç saat bekletilmiştir. Sonra üzerine 3 µl Oligo-dt Prob ve 13 µl 20X SSC solüsyonları eklenip hafifçe karıştırılarak soğumaya bırakılmıştır. Örnek soğurken, kit içerisinde bulunan magnetik tüpler iyice karıştırılarak standaya yerleştirilmiştir. Magnetik tüplerin içerisinde oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve tüpler 3 defa 0,5X SSC solüsyonu ile yıkanmıştır. Her yıkama sonunda tüp standaya yerleştirilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. En son yıkamadan sonra tüplerin içerisindeki örnek 100 µl 0,5X SSC solüsyonunda çözülmüştür. Soğumaya bırakılan toplam RNA manyetik tüplerin içerisine eklenmiş ve 10 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 4 defa 0,1X SSC solüsyonu ile yıkanarak standaya yerleştirilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örnek 100 µl su içerisinde çözülüp standaya yerleştirilerek süpernatant dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarılmıştır. Son olarak 150 µl su ile tekrar çözülerek tekrar standaya yerleştirilmiş ve süpernatant yeni tüplere aktarılmıştır. Elde edilen mRNA konsantrasyonu spektrofotometre ile belirlenerek -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.4. RACE yöntemi

3.1.4.1. 3' ve 5' RACE ready cDNA'larının hazırlanması

Rangpur laym bitkilerinden elde edilen mRNA ve Smarter RACE kiti (Clontech, ABD) kullanılarak *NAC* geninin tüm gen olarak elde edilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla öncelikle 14 gün kuraklık stresi uygulanmış Rangpur laym bitkilerinden elde edilen mRNA'lar kullanılarak 3' ve 5' race ready cDNA'lar hazırlanmıştır.

3'RACE ready cDNA hazırlamak için 1.5 µl mRNA, 1µl 3'CDC primer A, 2.25 µl steril saf su eklenerek pipetleme yardımıyla karıştırılmıştır. Sonra 72 °C'de 3 dak. ve sonra da 42 °C'de 5 dak. inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 14.000 rpm'de yapılan 10 sn'lik santrifüj sonunda karışımın üzerine eklenmek üzere 2 µl 5X First Strand Buffer, 1µl DTT (20mM), 1µl dNTPs (10 mM) karışımından oluşan Buffer mix hazırlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra alınan 4.75 µl'lik karışımın üzerine hazırlanan 4 µl Buffer mix, 0.25 µl RNase inhibitör, 1 µl Smart Scribe Reverse Transcriptaz eklenerek toplam hacim 10 µl'ye ulaşmış ve hazırlanan karışımın pipetleme yardımıyla iyice karıştırılması sağlanmıştır. Hazırlanan bu karışım 42 °C'de 90 dak. 70 °C'de 10 dak. olarak ayarlanmış polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) cihazına (Bio-Rad, ABD) konulmuştur. Bu sürenin sonunda 50 µl Trisin-EDTA eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Hazırlanan bu 3' race ready cDNA 3' RACE-PCR işleminde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

5'RACE ready cDNA hazırlamak için 1.5 µl mRNA, 1µl 5'CDC primer A, 2.25 µl steril saf su eklenerek pipetleme yardımıyla karıştırılmıştır. Sonra 72 °C'de 3 dak. 42 °C'de 5 dak. inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra 14.000 rpm'de 10 sn. santrifüje tabi tuulduktan sonra üzerine 1µl Smarter II A Oligonükleotit eklenmiştir. Karışımın üzerine eklenmek üzere 2 µl 5X First Strand Buffer, 1µl DTT (20mM), 1µl dNTPs (10 mM) içeren bir Buffer mix hazırlanmıştır. Bir önceki aşamada hazırlanan toplam 4.75 µl'lik karışımın üzerine 4 µl Buffer mix, 0.25 µl RNase inhibitör, 1 µl Smart Scribe Reverse Transcriptaz eklenerek hacim toplam olarak 10 µl'ye tamamlanarak pipetleme yardımıyla karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım 42

°C'de 90 dak. ve ardından 70 °C'de 10 dak. olarak hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) cihazına (Bio-Rad, ABD) konulmuştur. Programın sonunda karışıma 75 µl Trisin-EDTA eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Hazırlanan bu 5' RACE ready cDNA bir sonraki aşamada RACE-PCR'da kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.4.2. 3' ve 5' RACE PCR'larının yapılması

Bu aşamada öncelikle 3' ve 5' RACE-PCR'larının yapılması için kısmi baz dizilimi daha önceki yapılan çalışmada Şahin-Çevik ve ark. (2010, 2017) tarafından elde edilmiş olan NAC geni kullanılarak 3' ve 5' RACE primerleri dizayn edilmiştir (Çizelge 3.1). 3' ve 5' RACE'e hazır cDNA'lar (RACE ready cDNA'lar) ile 5' ve 3' RACE primerleri kullanılarak 3' ve 5' RACE-PCR yapılmıştır. Dizayn edilen 5' RACE primeri ile yapılan 5' RACE-PCR'dan sonuç alınamaması nedeniyle 5' Nested RACE-PCR için tekrar 5' Nested RACE primer dizayn edilmiş ve NAC geninin 5' bölgesinin eldesi için Nested RACE PCR yapılmıştır. 3' ve 5' RACE'e hazır cDNA'lar ve genlerin 5' ve 3' bölgelerine spesifik primerler ve SMARTER-RACE cDNA çoğaltım kiti (Clontech, ABD) içerisinde yer alan universal primer kullanılarak 3' ve 5' RACE-PCR'lar yapılmıştır. Bu amaçla 3' ve 5' RACE için 3' ve 5' RACE'e hazır cDNA, ve Advantage II DNA Polimeraz enzimi (Clontech, ABD) buna spesifik tampon solüsyonu yanında 0.2 mM dNTPs, 3' veya 5' gen spesifik primer ve universal primerler kullanılarak RACE PCR karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım MJ Mini Termal Cycler PTC1148 (Bio-Rad, ABD) marka PCR cihazı, 5 defa tekrarlanmak üzere 94 °C'de 30 s ve 72 °C 3 dak. bunu takiben 5 defa tekrarlanmak üzere 94 °C'de 30 s, 70 °C'de 30 s ve 72 °C 3 dak. ve son olarak 25-35 defa tekrarlanmak üzere 94 °C'de 30 s, 68 °C'de 30 s ve 72 °C 3 dak. olacak şekilde programlanmıştır. 3' ve 5' RACE-PCR ile elde edilen ürünler DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1,5 agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, Israil) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kısmi baz dizilimi bilinen NAC geninin 3' ve 5' uç kısımlarını bulmak için tasarlanan 3' ve 5' RACE Primerleri ve dizileri

Race Primer Adı	Primer Dizisi
MSC152 (3' Race)	CCC AAC CGA ACT TCT GTA GCC CGG
MSC153 (5' Race)	CCC AAT CAT CTA ACT TGG AGC TGC C

3.1.4.3. 3' ve 5' RACE-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerin DNA dizilerinin analizi

3' ve 5' RACE PCR sonrasında elde edilen bantlar %1,5 agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. Daha sonra RACE-PCR ürünleri bir büstürü yardımıyla jel üzerinden kesilerek ve ardından jel ekstraksiyon kiti kullanılarak (Qiagen, Almanya) DNA'ların saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırılan DNA'ların dizisinin belirlenmesi amacıyla pGEMT-easy plazmiti (Promega, ABD) içerisine klonlanmıştır. Klonlama aşamasında ilk olarak ligasyon yapılmıştır. Ligasyon aşamasında 3' RACE PCR ürünü, pGEMT-easy plazmiti ve T4 DNA ligaz enzimi karıştırılarak ligasyon 4 °C'de 16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen ligasyon ürünü kullanılarak *Escherichia coli* bakterisinin DH5@ ırkına ısı şoku yöntemiyle aktarılıp büyütülmek üzere ampisilin (Amp) antibiyotiği, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-gal) ve Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) içeren petri kaplarında bulunan LB- Broth (Miller) (LB) besi ortamlarına ekimleri gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin ekimlerinin gerçekleştirildiği petri kapları 37°C'de bir gece bekletildikten sonra Amp antibiyotiğine dayanıklı mavi ve beyaz koloniler elde edilmiş ve mavi beyaz seleksiyonu yapılmıştır. Klonlanan DNA parçalarını içerdiği düşünülen koloniler beyaz kolonilerdir. Bu nedenle beyaz koloniler seçilerek hem koloni PCR yapılmış hem de seçilen koloniler ayrı bir Amp antibiyotiği, X-gal ve IPTG içeren LB besi ortamı petri kaplarına çizimleri gerçekleştirilerek 37°C'de bir gece büyümeleri sağlanmıştır. Koloni PCR için 10 pmole M13F ve M13R primerleri 1X PCR tampon solüsyonu, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1,25 U Taq DNA polimeraz (Fermentas,

Almanya) eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra petri kabında büyütülen bakteri kolonilerinden bir pipet ucuyla alınarak hazırlanan bu karışıma eklenmiştir. Bu karışım MJ Mini Termal Cyclers PTC1148 (Bio-Rad, ABD) marka PCR cihazında 94 °C'de 5 dak. ilk denatürasyondan sonra 35 defa tekrarlanmak üzere 94 °C'de 30 s primer bağlanması, 55 °C de 30 s ve primer bağlanması, 72 °C 1 dak. primer uzaması için ve 72 °C'de 10 dak. son primer uzaması olacak şekilde programlanmıştır. Koloni PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak görüntülenip analiz edilmiştir. Analiz sonrasında her bir DNA parçası için istenilen büyüklükte bantlar veren kolonilerden biri seçilerek ampisilin içeren sıvı LB besi ortamı içerisinde büyütülmüşlerdir. Daha sonra miniprep kiti (Qiagen, Almanya) kullanılıp plazmit izolasyonu yapılarak klonlanan DNA parçalarını taşıyan plazmitler saflaştırılmıştır. Sonra bu plazmit DNA'ları *EcoRI* (New England BioLab, ABD) enzimiyle kesilerek istenilen *NAC* genine ait cDNA parçalarını içerip içermedikleri onaylanmıştır. *EcoRI* enzimiyle kesilen plazmit DNA'ları %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenerek istenilen *NAC* genine ait DNA parçalarını içerip içermedikleri onaylanmıştır. *NAC* genine ait DNA parçalarını taşıyan plazmitlerin M13F ve M13R primerleri kullanılarak DNA dizilimlerinin yapılması için ODTÜ Teknokent bünyesinde yer alan RefGen firmasına gönderilmiştir. 3' ve 5' dizilimleri belirlenen *NAC* geninin DNA dizileri ve daha önce belirlenmiş olan kısmi baz dizilimi Vector NTI programı (Invitrogen, ABD) kullanılarak *NAC* geninin tüm gen (full-length) olarak DNA dizilimi elde edilmiştir.

3.1.4.4. Tüm gen olarak elde edilen *NAC* geninin dizi analizi ve diğer bitkilerde bulunan diğer *NAC* genleri ile karşılaştırılması

Elde edilen *CINAC* geninin DNA dizisi kullanılarak Gen Bankası veri tabanında (www.ncbi.nlm.nih.gov) yer alan DNA dizileri ile benzerlikleri BLASTN, BLASTX ve BLASTP analizleri yapılarak araştırılmıştır.

3.2. NAC Geninin Kuraklık Stresi Sırasında Gen İfadesinin Rangpur laym ve Turunç Anaçlarında İncelenmesi

3.2.1. Bitki materyali

Gen ekspresyon kapsamında turunçgillerde yaygın olarak kullanılan anaçlar arasında yer alan Rangpur laym ve turunç anaçları kullanılmıştır. Rangpur laym tohumları Kaliforniya Turunçgil Germplazm Koleksiyonu'ndan turunç anacına ait tohumlar ise Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden sağlanmıştır. Tohumların ekimleri 1/3 oranında perlit-torf karışımı olarak hazırlanan saksılar içerisinde gerçekleştirilmiş ve ekimi gerçekleştirilen tohumların çimlenmeleri ve daha sonra da çimlenen tohumların büyümeleri 28 °C sıcaklık, %60±5 oransal nemde 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık süre ile aydınlatılan bitki büyütme kabinlerinde gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizlerinde kullanılan Rangpur laym anacının özellikleri 3.1.1. kısmında verilmiştir. Gen ekspresyon analizlerinde kullanılan turunç anacının özellikleri ise aşağıda verilmiştir.

Turunç: Turunçgil yetiştiriciliğinde Dünyada en geniş dikim alanına sahip bulunan bir anaçtır. Ülkemizde ise daha çok Akdeniz bölgesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Turunçgil içerisindeki önemli tür ve çeşitlerle uyuma özelliği bulunmaktadır ve aynı zamanda verim ve kalite yönünden de herhangi bir sorunla karşılaşmamaktadır. Turunç anacı kazık kök yapısına sahip olup ağır topraklarda gelişebilmekte, kireçli topraklara dayanıklı ve tuzlu topraklara iyi adapte olmaktadır. Turunç üzerinde yetiştirilen çeşitlerin meyve kabukları genellikle pürüzsüz ve ince olmaktadır. Turunç meyvesi genellikle kabuk reçeli, marmelat ve turunç kabuk yağı üretiminde kullanılmasından dolayı oldukça önemli bir meyvedir. Aynı zamanda turunç meyvesi, yüksek oranda asitlik özelliğinden dolayı da limon yerine kullanılmaktadır.

3.2.2. 14 günlük kuraklık stresi uygulaması

Rangpur laym ve turunç anaçlarına 14 günlük kuraklık stresi uygulanmıştır. Bu amaçla 28°C'de sıcaklık, ışık ve nem kontrollü bitki büyütme odasında yetiştirilen her bir türe ait bitkilerden yaklaşık 10 tanesi kontrol ve yaklaşık 10 tanesi de kuraklık

stresi uygulaması için ayrılmıştır. Bitkilere kuraklık stresi uygulamasına başlamadan önce sabah saatlerinde su verilmiştir. Daha sonra aynı günün akşam saatlerinde topraktaki nem TRIME-EZ TDR probe toprak nem ölçüm cihazıyla (IMKO, Almanya) ölçülerek kontrol ve stres gruplarından yaprak örnekleri ayrı ayrı alınarak her bir grup için alınan yaprak örnekleri karıştırılmıştır. Kontrol ve stres grupları için alınan bu yaprak örnekleri stres uygulamasının 0. günü olarak kaydedilmiş ve -80 °C'de saklanmıştır. Daha sonra kontrol grubu bitkilere su verilerek diğer stres uygulaması yapılan bitkiler aynı koşullarda bırakılıp hiç su verilmeyerek kuraklık stresi uygulanmıştır. Kuraklık stresi uygulanan kontrol ve stres grubunu oluşturan bitkilerden ayrı ayrı yaprak örnekleri 1. 7., 9., 11. ve 14. günlerde toplanmış ve her bir zaman aralığında alınan yaprak örnekleri alındıktan sonra kontrol ve stres grubunu oluşturmak üzere her bir grubu oluşturan bitki örnekleri karıştırılarak sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve -80 °C'de ayrı ayrı saklanmıştır. Kuraklık stresi uygulaması iki farklı anaca da farklı zamanlarda ikişer defa uygulanmıştır.

3.2.3. Toplam RNA izolasyonu

Kuraklık stresi uygulanan ve kontrol bitkilerinden ayrı ayrı olarak 0., 1., 7., 9., 11. ve 14. günlerde alınan ve karıştırılan yaprak örneklerinden Trizol RNA izolasyon solüsyonu (Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonra RNA içerisinde olabilecek herhangi bir DNase kontaminasyonuna karşı DNase kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak DNase uygulaması yapılmış ve DNase uygulamasından sonra da RNA'nın saflaştırılması için RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları nanodropta (Termo, ABD) ölçülerek konsantrasyonları belirlenmiş kaliteleri de %1'lik agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Toplam RNA izolasyonları farklı bir önceki aşamada uygulanan her bir stresin ardından toplanan RNA örnekleri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Ve böylece her bir bitki grubunda her bir zaman aralığı için ikişer farklı RNA izolasyonları bulunmaktadır.

3.2.4. Real-time RT-PCR analizi

Bir önceki aşamada izole edilen toplam RNA'lardan 100 ng/ul olacak şekilde real-time RT-PCR yönteminde kullanılmak üzere cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti (Thermo) ve kit içerisinde yer alan oligo (dT) primeri kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sonra SyberGreen real-time RT-PCR yöntemiyle *NAC* geninin farklı zamanlardaki ifadesi sentezlenen bu cDNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Real-time RT-PCR'da kullanılacak olan karışım toplamda 20 µl'lik reaksiyon içinde 100 ng/ul cDNA, 0.5 mM dNTPs, 20 pmol *NAC* genine spesifik primerler (MSC 148 ve MSC 149) ve 10X PCR EvaGreen Supermix (Biorad) kullanılarak üretici firmanın protokollerine uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR çalışması CFX96-Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad) kullanılarak ve ilk denatürasyon aşamasında 95 °C'de 30 sn, daha sonra 40 döngü olacak şekilde denatürasyon 95 °C'de 30 sn, bağlanma 60 °C'de 30 sn, uzama 72 °C'de 30 sn olarak ayarlanmıştır. Real-time PCR çalışmalarında referans gen olarak aktin ve ubikutin genleri kullanılmış ve farklı zamanlarda uygulanan iki farklı kuraklık stresinden elde edilen farklı RNA'lar kullanılarak her bir bitki grubu için ikişer defa tekrar edilmiştir. Ve böylece real-time RT-PCR sonuçları iki farklı zamanda yapılan real-time PCR sonuçlarının ortalaması alınarak analiz edilmiştir. Real-time RT-PCR sonuçları analiz edilirken ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ komperatif CT metodu (Livak & Schmittgen, 2001) kullanılarak CFX Manager™ programında (Bio-Rad, USA) analiz edilmiş ve gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişiklikler referans genlerin ekspresyon düzeyine göre normalize edilerek kontrole orantılı olarak hesaplanmıştır.

3.3. Rangpur laym Anacından İzole Edilen *NAC* Geninin Turunç Anacına Transformasyonu

3.3.1. *NAC* geninin çoğaltılması

Vector NTI programı (Invitrogen, ABD) kullanılarak tüm gen DNA dizilimi belirlenen *NAC* genininin Rangpur laym anacından çoğaltımı için *NAC* geninin 5' ve 3' uçlarına spesifik olarak primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin uçlarına *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimiyle kesim bölgeleri de eklenmiştir. Dizayn

edilen ve sentezlemesi yapılan gen spesifik primerlerden sonra Rangpur laym anacından çoğalımı için öncelikle Rangpur laym bitkilerinden izole edilen total RNA ve ters transkripsiyon (reverse transcription, RT) kiti (Thermo, Almanya) içerisinde yer alan oligo dT primeri ve revertaid revers transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen cDNA'lardan RT-PCR yöntemi ile NAC geninin Rangpur laym anacından çoğalımı gerçekleştirilmiştir. RT-PCR karışımına 1X PCR tampon solüsyonu, 500 ng/µl cDNA, 0.5 mM dNTPs, 20 pmol *HindIII* ve *BamHI* restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren MSC 229 ve MSC 230 primerleri, 0.25 ünite hata oranı düşük (proofreading) Pfu DNA polimeraz enzimi (Thermo, ABD) ve steril saf su eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım önce 94 °C'de 5 dak. bekletilmiş ve daha sonra 94 °C 30 s, 65 °C 30 s ve 72 °C 1 dak. süreyle 39 döngüyü tamamladıktan sonra 72 °C 10 dak. bekletildikten sonra 4 °C sürekli kalacak şekilde programlanan MJ Mini Termal Cyler PTC1148 PCR cihazına (Bio-Rad, ABD) konularak NAC geninin çoğalımı sağlanmıştır. Elde edilen RT-PCR ürünü DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1 agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Rangpur laym anacından RT-PCR yöntemiyle çoğalılmış olan NAC geni EZ Coloum PCR saflaştırma kiti (Bio Basic, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. Bu amaçla, 45 µl'lik olan PCR ürününün içerisinde 135 µl bağlanma tampon solüsyonu eklenmiştir. Sonra elde edilen karışım kolonlara aktarılmış ve 2 dak. süreyle 10000 dev/dak. hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolondan geçen sıvı kısım dökülerek 500 µl daha önce etil alkol eklenmiş olan yıkama tampon solüsyonundan eklenmiş ve 2 dak. 10000 dev/dak. hızda santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrasında kolondan geçen sıvı kısım dökülmüş ve yıkama aşaması bir kez daha tekrar edilmiştir. Kolonlarda kalmış olan etil alkolün tamamen uzaklaştırılması amacıyla da tüpler bir defa da boş olarak 1 dak. süre ile 10000 dev/dak. hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolonlar önceden etiketlenmiş olan steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra kolonlara bıraktırma tampon solüsyonundan 30 µl konularak 2 dak. süre ile bekletilmiştir. Son olarak tüpler içerisinde bekletilen kolonlar 2 dak. 10000 dev/dak.'da santrifüj yapılarak saflaştırılmış PCR ürünlerini içeren ependorf tüpleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. pGEM-T Easy vektörüne klonlanması

Bir önceki aşamada Rangpur laym bitkisinden çoğalılan ve PCR saflaştırılması tamamlanan *NAC* geni öncelikle T-A klonlaması yöntemiyle pGEM-T easy plazmitine klonlanmıştır. Bu amaçla öncelikle saflaştırılan *NAC* genine ait DNA'lar pGEM-T vektörüyle (Promega, ABD) karıştırılmış ve T4 DNA ligaz enzimi eklenerek *NAC* genine ait DNA parçalarının vektör içerisine klonlanması sağlanmıştır. Daha sonra DNA'ları içeren plazmit vektörü *Escherichia coli* bakterisinin DH5- α ırkına ısı şoku yöntemiyle aktarılıp büyütülmek üzere Amp antibiyotiği, X-gal ve IPTG içeren LB besi ortamlı petri kaplarına ekimi gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin ekimlerinin gerçekleştirildiği petri kapları 37°C'de bir gece büyütüldükten sonra Amp antibiyotiğine dayanıklı mavi ve beyaz koloniler elde edilmiştir. Beyaz koloniler klonlanan *NAC* genine ait DNA parçalarını içerdiği düşünülen kolonilerdir ve bunlardan bazılarının seçimi yapılarak klonlanan DNA parçalarını içerip içermediklerinin anlaşılması için koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 10 pmole M13F ve M13R primerleri 1XPCR tampon solüsyonu, 2,5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.25 U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Almanya) eklenerek PCR karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra petri kabında büyütülen bakteri kolonilerinden bir pipet ucuyla alınarak hazırlanan bu karışıma eklenmiştir. Bu karışım MJ Mini Thermal Cycler PTC1148 (Bio-Rad, ABD) marka PCR cihazında 94 °C'de 5 dak. ilk denatürasyondan sonra 35 defa tekrarlanmak üzere 94 °C'de 30 s primer bağlanması, 55 °C de 30 s ve primer bağlanması, 72 °C 1 dak. primer uzaması için ve 72 °C'de 10 dak. son primer uzaması için olacak şekilde programlanmıştır. Koloni PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1 agaroz jelinde elektroforez yoluyla ayrıştırılarak Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak görüntülenip analiz edilmiştir. Koloni PCR sonucunda *NAC* geninin pGEMT-Easy plazmitine klonlandığını gösteren koloni ampisilin içeren sıvı LB besi ortamı içerisinde 37 °C'de bir gece çalkalamalı inkübatörde 180 rpm'de büyütülmüştür. Daha sonra büyütülen bu bakterilerden plazmit DNA izolasyonu miniprep kiti (Qiagen, Almanya) kullanılıp plazmit DNA izolasyonu yapılarak klonlanan DNA parçalarını taşıyan plazmit DNA'sının saflaştırılması yapılmıştır.

3.3.3. pJIT30 plazmiti içerisine klonlanması

Bu amaçla bir önceki aşamada Rangpur laym bitkisinden çoğalılan ve PCR saflaştırılması tamamlanan *NAC* geni ve pGEMT easy plazmit DNA'sı *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesim yapılmıştır. Aynı şekilde Karnabahar mozaik virüsü (Cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S promotör ve terminatör bölgelerini ve bu bölgelerin arasında çoklu klonlama bölgesi içeren pJIT 30 plazmiti de aynı enzimlerle (*HindIII* ve *BamHI*) kesilmiştir. Kesim için yapılan PCR saflaştırmalarından 10 µl alınarak üzerine 10X NEB II tampon çözülüsünden 2 µl, *BamHI* ve *HindIII* enzimlerinden 1 µl, BSA'dan ise 0,2 µl eklenmiştir. Karışım steril saf ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlan bu karışımlar 37 °C de 4 saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Kesim sonrasında kullanılan plazmitin iki ucunun birleşmemesi için pJIT30 plazmit vektörüne alkalın fosfotaz uygulaması yapılmıştır. Alkalın fosfataz uygulaması için pJIT 30 plazmitinin 4 saatlik kesim uygulamasından sonra üzerine 3 µl 10X alkalın fosfataz buffer, 1 µl alkalın fosfataz, 6 µl H₂O eklenmiştir ve 37 °C'de 30 dak. inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra pJIT 30 plazmiti PCR pürifikasyon kiti kullanılarak (Bio Basic, ABD) saflaştırılmıştır. *NAC* genini içeren pGEM-T Easy plazmit DNA'sı restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimin ardından %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenmiştir. pGEM-T Easy plazmitine aktarılan *NAC* geninin *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda elde edilen bantlar jelden kesilerek ve sonrasında jel ekstraksiyonu kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak *NAC* genine ait DNA'nın saflaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra *NAC* genine spesifik DNA'yı CaMV 35S promotör ve terminatör bölgeleri arasına klonlanmak için kesim yapıp saflaştırılan *NAC* genine spesifik DNA'dan 15µl ve pJIT30 plazmitinden 10 µl kullanılarak üzerine 1 µl T4 DNA ligaz enzimi, 3 µl 10X ligasyon tamponu ve 1 µl'de H₂O kullanılarak ligasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım 16 saat süreyle 4 °C'de bekletilerek birleştirme işleminin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Ligasyon tamamlandıktan sonra ligasyon ürünlerinin *E. coli* bakterisine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon yapılan bakteriler ampisilin antibiyotiği içeren LB besi ortamlı petri kaplarında büyütülerek seleksiyon yapılmıştır. Transformasyon sonunda elde edilen kolonilerden pozitif olanı belirlemek için kullandığımız 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren pJIT 30 plazmitinin üzerinde yer alan primerler (BC200-201) ve

NAC genine spesifik primerler kullanılarak koloni PCR koloni PCR yapılmıştır. Bu amaçla 25 µl'lik PCR karışımına 1X PCR tampon solüsyonu, 0.5 mM dNTP, 20 pmol primer, 0.25 ünite Taq DNA polimeraz ve steril saf su eklenmiştir. PCR karışımının içerisine petri ortamlarında meydana gelen kolonilerden pipet ucu ile değiştirilerek örnekler eklenmiştir. Karışım önce 94 °C'de 5 dak. bekletilmiş ve daha sonra 94 °C 30 s, 55 °C 30 s ve 72 °C 1 dak. süreyle 39 döngüyü tamamladıktan sonra 72 °C 10 dak. bekletildikten sonra 4 °C sürekli kalacak şekilde programlanan PCR makinesine konularak *NAC* geni ve 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren pJIT 30 plazmitinin üzerinde bölgenin çoğalımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünü DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1,5 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında MiniBus Pro (DNR, İsrail) jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Koloni PCR sonucunda pozitif olarak belirlenen koloniler sıvı LB bakteriyel besi ortamında büyütülmüş ve mini prep DNA izolasyon (GeneJET plazmid Miniprep) kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. pCAMBIA 1304 ikili vektöre klonlanması

Başına CaMV 35S promotör sonuna 35S terminatör bölgesi eklenerek bitkide fonksiyonel olacak hale getirilen *NAC* genine spesifik DNA'nın pJIT30 plazmitinden binary bitki transformasyon vektörü içerisine klonlanmıştır. Binary vektör olarak yeşil floresan protein (GFP) ve β-glukuronidaz (GUS) raportör genleri ve seçiciliği sağlamak amacıyla bakteride kanamisin (Kan) ve bitkide higromisin (Hyg) antibiyotik dayanıklılık genlerini içeren pCAMBIA 1304 ikili (binary) vektörü kullanılmıştır. Klonlama için başına CaMV 35S promotör ve sonuna 35S terminatör bölgesi eklenerek bitkide fonksiyonel olacak hale getirilen *NAC* genine spesifik DNA'dan oluşan transformasyon kasetini içeren pJIT30 plazmiti ve pCAMBIA 1304 ikili (binary) vektörü PstI enzimiyle kesilmiştir. Bu amaçla PCR pürifikasyon kiti (Bio Basic) ile saflaştırılan CaMV 35S promotör ve 35S terminatör bölgesini içeren transformasyon kasetini içeren pJIT30 plazmiti ve pCAMBIA 1304 ikili (binary) vektörüne PstI enzimi ile kesim uygulanmıştır. Kesim için yapılan PCR saflaştırmalarından 10'ar µl ve üzerine 10X NEB 4 tampon çözelisinden 2 µl, PstI enziminden 1 µl, BSA'dan ise 0,2 µl eklenmiştir. Karışım steril saf ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlan bu restriksiyon enzim karışımları 37 °C'de 4 saat

inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Kesim sonrasında kullanılan plazmitin iki ucunun birleşmemesi için pCAMBIA 1304 plazmitine alkalın fosfataz uygulaması yapılmıştır. Alkalın fosfataz uygulaması için pCAMBIA 1304 plazmitinin 4 saatlik kesim uygulamasından sonra üzerine 3 µl 10X alkalın fosfataz buffer, 1 µl alkalın fosfataz, 6 µl H₂O eklenmiştir ve 37 °C'de 30 dak. inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra her iki örnek PCR pürifikasyon kiti (Bio Basic) kullanılarak saflaştırılmıştır. Daha sonra CaMV 35S promotör, NAC geni ve 35S terminatör bölgelerini içeren ve NAC gen kaseti olarak adlandırılan transformasyon kasetini içeren pJIT30 plazmitinden ve pCAMBIA 1304 plazmitinden 10µl kullanılarak üzerine 1µl T4 DNA ligaz enzimi, 3µl 10X ligasyon tamponu ve 1µl de H₂O kullanılarak ligasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 16 saat süreyle 4 °C'de bekletilerek iki farklı DNA parçasının ligaz enzimi yardımıyla birleştirme işleminin, ligasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Ligasyon tamamlandıktan sonra, ligasyon karışımının bir kısmı, hücre duvarı kimyasal uygulamalarla (10 mM CaCl₂) geçirgen hale getirilmiş (competent) *Escherichia coli* bakterisinin DH5α ırkına transformasyonu yapılarak aktarılmıştır. Transformasyon yapılan bakteriler kanamisin antibiyotiği içeren katı LB besi ortamlı petri kaplarında 37°C'de bir gece büyütülmüştür. Transformasyon ile elde edilen bakteri kolonileri içerisinde koloni seçilerek istenilen NAC genine spesifik DNA kasetini içerip içerip içermedikleri CaMV promotör ve terminatör bölgelerine spesifik primerler veya gen spesifik primerler kullanılarak koloni PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Koloni PCR'da pozitif kolonilerin belirlenmesinde primer olarak CaMV promotör ve terminatör bölgelerine spesifik primerler ve gen spesifik primerler kullanılmıştır. Bu amaçla 25 µl' lik PCR karışımına 1X PCR tampon solüsyonu, 0.5 mM dNTP, 20 pmol primer, 0.25 ünite Taq DNA polimeraz ve steril saf su eklenmiştir. PCR karışımının içerisine petri ortamlarında meydana gelen kolonilerden pipet ucu ile değdirilerek örnekler eklenmiştir. Karışım önce 94 °C'de 5 dak. bekletilmiş ve daha sonra 94 °C 30 s, 55 °C 30 s ve 72 °C 1 dak. süreyle 39 döngüyü tamamladıktan sonra 72 °C 10 dak. bekletildikten sonra 4 °C sürekli kalacak şekilde programlanan PCR makinesine konularak hedef bölgelerin çoğaltılmaları sağlanmıştır. Koloni PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1.5 agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak görüntülenip

analiz edilmiştir. Pozitif olarak belirlenmiş olan koloniler bakteriyel besi ortamında büyütülmüş ve mini prep DNA izolasyon kiti (GeneJET plazmid Miniprep) kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. pCAMBIA 1304 ikili vektöre klonlanan *NAC* geninin *Agrobacterium tumefaciens* 'e aktarılması

CaMV promotör ve terminatör bölgesi arasına yerleştirilerek pCAMBIA 1304 ikili vektörünün T-DNA bölgesine klonlanan fonksiyonel *NAC* geninin bitkiye aktarılması *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gerçekleştirileceği için öncelikle *NAC* genini taşıyan pCAMBIA 1304 vektörünün *A. tumefaciens*'e aktarılması gerekmektedir. Bu amaçla bir önceki aşamada pozitif olarak belirlenen kolonilerden, *NAC* genine spesifik DNA bakımından pozitif bulunan pCAMBIA 1304 ikili vektörünün saflaştırması kullanılarak, elektroporasyon yöntemiyle *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ırkına transfer edilmiştir. Bu amaçla öncelikle 1 µl *NAC* genine spesifik DNA yapısı içeren pCAMBIA ikili vektörü ile 20 µl elektroporasyona uygun hale getirilmiş *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 karıştırılmış ve daha önce buz üzerinde soğutulmuş olan 0.4 cm'lik elektroporasyon küvetlerine aktarılmıştır. Küvet elektroporasyon cihazına (Şekil 3.1) yerleştirildikten sonra 50/1800 µF/V kapasitans, 150 Ω yüklemeye rezistansı, 4.5 kv/cm, 5.0 kv/cm, 5.5 kv/cm ve 6.0 kv/cm elektriksel alan seçenekleri ile 25 mA değerleri kullanılarak elektrik akımı verilmiştir. Elektrik şoku uygulanan küvet içerisindeki örnek 1 ml YEP sıvı (10 gl⁻¹ Baktopepton, 10 gl⁻¹ yeast ekstrakt ve 5 gl⁻¹ NaCl pH 7,0) içeren sıvı besi ortamına eklenerek 30 °C'de ve 300 rpm'de 3 saat çalkalamalı inkübatöre konulmuştur. Inkübatörden alınan örnekler 50 µg/ml kanamisin içeren YEP katı besi ortama yayılmış ve 28 °C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1. *NAC* genine spesifik DNA'yı içeren pCAMBIA 1304 ikili vektörünün *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine aktarılmasında kullanılan elektroporatör cihazı

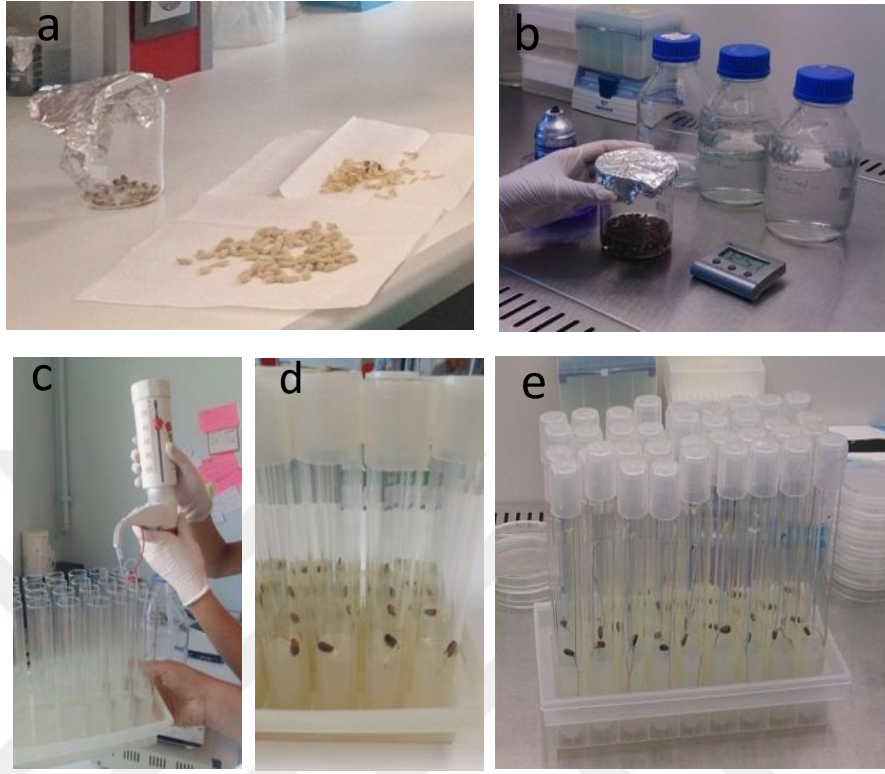
3.3.6. *NAC* geninin turunç anacına transformasyonu

Bu tez kapsamında *NAC* geninin bitkiye transformasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda turunçgillerde gen transformasyon protokolünü ilk olarak geliştiren Luth ve Moore (1999) çalışması referans alınmıştır. Luth ve Moore (1999) tarafından greyturta geliştirilen bu protokol birçok araştırmacı tarafından bazı değişiklikler yapılarak *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla bitkiye gen transformasyonu amacıyla kullanılmıştır. Bu tez çalışması kapsamında uygulanan genetik transformasyon aşamaları ise daha önce Çevik vd. (2006) tarafından rapor edildiği şekilde ve aşağıda açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.3.6.1. Tohum çimlendirme

Genetik transformasyonda kullanılan turunç tohumları Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden (BATEM) temin edilmiştir. Turunç tohumlarının dış kabukları soyulduktan sonra önce %70'lik etil alkol ile 5 dak. daha sonra %0,525 NaOCl (Sodyum Hipoklorit) ve %0,05 Tween-20 karışımı içerisinde 10 dak. bekletilerek yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır (Şekil 3.2). Daha sonra tohumlar steril saf su içerisinde 5 defa 5'er dak.. bekletilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar MS ortamı (Murashige & Skoog Medium - Murashige, 1962) (2.13 g⁻¹ MS, 50 mg⁻¹ myo-inositol, g⁻¹ sükröz, pH 5,7, 7 g⁻¹ agar,) içeren 200 x 20 mm tüplere teker teker ekilmiştir. Ekilen tohumlar 4-6 hafta süreyle 28 °C'de karanlıkta

tutulup çimlendirilerek uzun etiole olmuş epikotilleri olan küçük bitkiler elde edilmiştir.

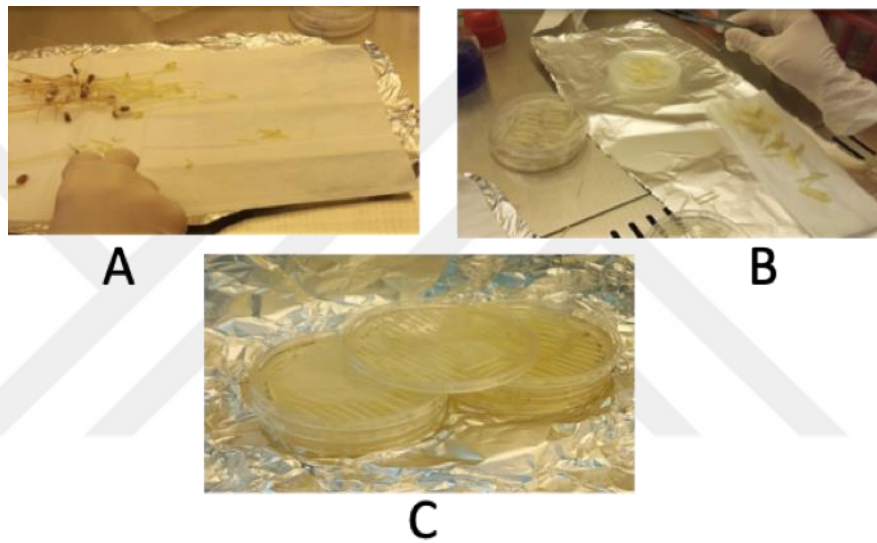


Şekil 3.2. Turunç tohumlarının çimlendirilerek epikotil oluşturmasının aşamaları a) Turunç tohumlarının kabuklarının soyulması b) Yüzey sterilizasyonu c) Medya hazırlama d) Tohum çimlenmesi e) Epikotil gelişimi

3.3.6.2. NAC geninin turunç epikotil parçaları kullanılarak turunç anacına transformasyonu

NAC genine spesifik DNA'yı içeren pCAMBIA 1304 ikili vektörü önceki aşamalarda *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ırkına aktarılmıştı. Aktarılan *A. tumefaciens* LBA4404 ırkı uygun antibiyotik içeren YEP (10 gl⁻¹ Baktopepton, 10 gl⁻¹ yeast ekstrakt ve 5 gl⁻¹ NaCl pH 7,0) ortamı içerisine inoküle edilip 180 rpm ve 28 °C'de gece boyunca büyütülmüştür. Daha sonra bu külürler 4 °C 6000 rpm'de 5 dak.. santrifüj yapıp pelletler son konsantrasyon 5x10⁸ cfu/ml olacak şekilde süspansen edilerek 100 mM asetosiringon eklenmiştir. Işıksız ortamda yetişen fidelerin epikotil kısımlarından 1'er cm'lik kesitler alınarak bu ortamda bir dak.. inoküle edilmiştir. İnoküle edilen segmentler petri ortamına (7 gl⁻¹ Bacto agar ve 100 mM asetosiringon eklenmiş MS ortamı) alınarak *Agrobacterium* ile karanlıkta oda sıcaklığında 2-3 gün

ko-külüvasyona alınmıştır. Ko-külüvasyondan sonra organogenez yoluyla sürgün gelişimini teşvik eden $50 \mu\text{gml}^{-1}$ higromisin ve $0,5-2,0 \text{ mg l}^{-1}$ benzyl adenine (BA) içeren MS besi ortamına aktarılmıştır. Daha sonra sürgün gelişimi için bitkiler bitki büyütme kabininde beyaz floresan ışık altında ve $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 16/8 saatlik saatlik fotoperiyot uygulaması ile 4-5 hafta süreyle muhafaza edilmiştir. Sürgün gelişimi gösteren bitkilerin köklenmesi amacıyla gelişen sürgünler $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ naftalin asetik asit (NAA) içeren MS ortamına 3-5 hafta süreyle aktarılmıştır. Köklendirilmiş bitkiler daha sonra tekrar 2 hafta ara ile al külüre alınmıştır ve $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de yetiştirilmeye devam edilmiştir.



Şekil 3.3. Turunç epikotil parçaları kullanılarak yapılan genetik transformasyonun aşamaları. A) Fidelerin epikotil kısımlarının kesilmesi B) Agrobacterium ile inokülasyon C) Transformasyon yapılan segmentlerin ko-külivasyon ortamına alınması

3.3.6.3. Transgenik turunç bitkilerinin analizi

3.3.6.3.1. β -glukronidaz (GUS) testi

Oluşan transgenik sürgünlerden öncelikle 5-10 mm uzunluğundaki sürgün parçaları alınarak β -glukronidaz (GUS) enzim aktivitesi histokimyasal boyama işlemiyle incelenmiş ve bitkilerin transgenik olup olmadıkları belirlenmiştir. GUS testi için sürgünler köklendirme ortamına alınmadan önce uç kısımlarından 1-2 mm'lik küçük parçalar kesilerek 96 çukurlu plakaların her bir çukuruna bir örnek gelecek şekilde

mikro plakalara aktarılmıştır. 96 çukurlu bu plakalarda 50 mM NaPO₄ pH 7.0 10 mM Na₂EDTA and 5 mgml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide içeren β-glukronidaz boyama solüsyon içerisine konularak 37 °C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir. Boyaması tamamlanan sürgün parçaları %70 etil alkol ve %30 asetik asit solüsyonu içerisinde bekletilip klorofil uzaklaştırıldıktan sonra GUS boyaması yapılan doku parçalarında mavi renk oluşumu incelenmiştir.

3.3.6.4. PCR analizi

GUS testi sonucunda negatif sonuç veren bitkilerin transgenik olup olmadıkları bitki büyütme kabininde biraz daha gelişme gösterdikten sonra PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50-100 mg bitki doku örnekleri sıvı azot içerisinde havan ve havan eli kullanılarak ezildikten sonra CTAB DNA izolasyon yöntemi (Doyle & Doyle, 1986) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gen spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımının içerisine 10 pmole gen spesifik primerler BC 200 ve MSC 230) 1X PCR tampon solüsyonu, 2,5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.25 U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Almanya) eklenmiştir. Daha sonra bu karışım MJ Mini Termal Cyler PTC1148 (Bio-Rad, ABD) marka PCR cihazında 94 °C'de 5 dak.. ilk denatürasyondan sonra 35 defa tekrarlanmak üzere 94 °C'de 30 s primer bağlanması, 50-55 °C de 30 s ve primer bağlanması, 72 °C 1 dak.. primer uzaması için ve 72 °C'de 10 dak.. son primer uzaması olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1.5 agaroz jelinde 1X TAE buffer içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak görüntülenip analiz edilmiştir.

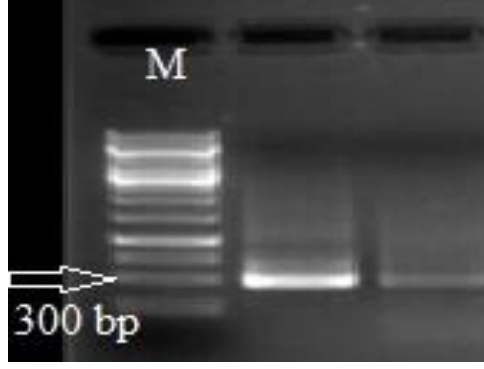
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *NAC* Geninin RACE Yöntemiyle Tüm Gen Olarak Elde Edilmesi

NAC geninin 3' ve 5' cDNA uçlarının bulunması için öncelikle Rangpur laym tohumları Kaliforniya Turunçgil Germplazm Koleksiyonu'ndan temin edilmiş ve tohumların ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi gerçekleştirilen tohumların bitki büyüme kabinlerinde yetiştirilmeleri sağlandıktan sonra bitkilere 14 günlük kuraklık stresi uygulanmıştır. 14 günlük olarak uygulanan kuraklık stresinin sonunda Rangpur laym bitkilerinden yaprak örnekleri toplanmış ve mRNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

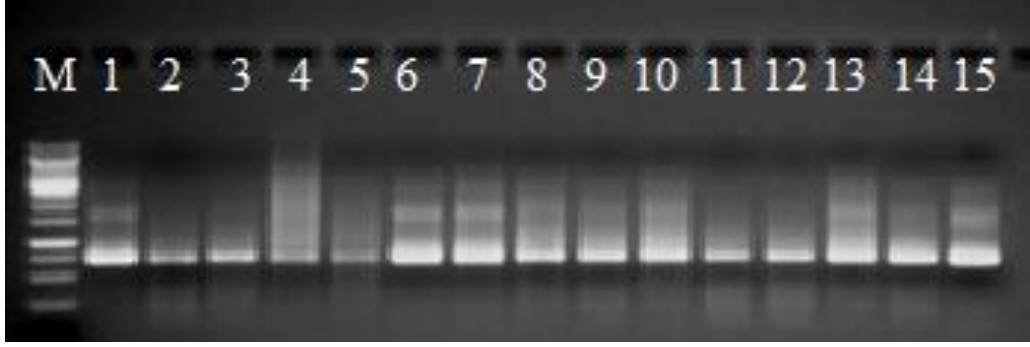
4.1.1. 3' RACE PCR

Kısmi baz dizilimi bilinen *NAC* geninin tüm gen olarak izole edilmesi için 3' ve 5' uçlarının baz dizilimlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla Smarter RACE kiti kullanılmıştır. Kullanılan Smarter RACE yöntemi ile kısmi baz dizilimi bilinen cDNA uçlarının hızlı bir şekilde sentezlenmesi sağlanarak RNA transkriptlerinin tam uzunlukta dizilerinin elde edilmesi sağlanmıştır. 14 günlük kuraklık stresi uygulanan Rangpur laym bitkisinden elde edilen mRNA kullanılarak öncelikle 3' RACE ready cDNA hazırlanmıştır. Sonra 3' RACE ready cDNA ile *NAC* geninin 3' ucuna spesifik olarak dizayn edilmiş MSC 152 primeri kullanılarak 3' RACE-PCR yapılmıştır. Yapılan RACE-PCR'da ilk olarak bağlanma sıcaklığı 78°C denenmiştir. Denenen bu bağlanma sıcaklığı sonucunda elde edilen RACE-PCR %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmıştır ve herhangi bir büyüklükte bant görülmemiştir. Yapılan denemeler sonucunda bağlanma sıcaklığı 68°C olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu bağlanma sıcaklığı kullanılarak yapılan 3' RACE-PCR sonucunda 300 bp uzunluğunda bir bant elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. RACE-PCR jel görüntüsü

Daha sonra klonlama öncesinde 300 bp uzunlukta 3' RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğine EZ Column PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma yapılan 3' RACE PCR örneği pGEMT-easy plazmitine klonlaması yapılmıştır. Klonlama aşamasında ilk olarak ligasyon yapılmıştır. Ligasyon aşamasında T4 DNA ligaz enzimi ile 3' RACE PCR saflaştırma örneği ve pGEMT-easy plazmiti karıştırılarak +4°C de bir gece bekletilerek ligasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bir gece inkübasyona bırakılan ligasyon ürünü ısı şoku transformasyon yoluyla *E. coli* bakterisinin DH5 α suşuna aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri ampisilin ve X-gal içeren LB besi ortamına ekilerek ampisilin antibiyotiğine dayanıklılık ve mavi beyaz koloni seçimi yoluyla 3' RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini içeren plazmitleri taşıyan bakteri kolonilerinin seçilimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mavi koloniler 3' RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini taşımayan pGEM-T Easy plazmitlerini içermekte ve klonlamanın gerçekleşmediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise 300 bp uzunlukta 3' RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini taşıyan pGEM-T Easy plazmitlerini içermekte olup klonlanma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. 3' RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğinin klonlanması sonucunda çok sayıda mavi ve beyaz koloniler elde edilmiştir. Meydana gelen beyaz kolonilerden 15 tane koloni seçilmiştir. Seçilen 15 koloni için ise M13F ve M13R primerleri ile koloni PCR yapılmıştır (Şekil 4.2).



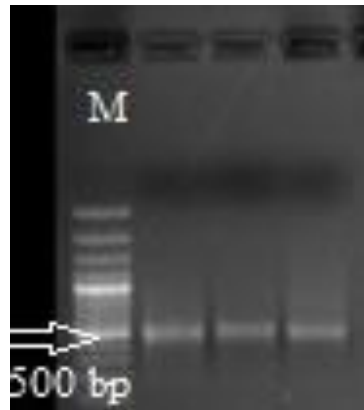
Şekil 4.2. pGEMT-easy plazmitine klonlanan 3'RACE-PCR örneğinin M13F ve M13R primerleri ile yapılan koloni PCR görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-15: Koloni PCR ürünleri

Yapılan koloni PCR sonrası sonuçlar incelendiğinde yaklaşık 400 bp büyüklüğünde pozitif bantlar elde edilmiştir. Koloni PCR sonucunda pozitif çıkarak 3' RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini içerdiği kesin olarak belirlenen beyaz kolonilerden iki tanesi seçilerek Amp içeren LB sıvı ortamı içerisinde 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca büyütülmüştür. Bu işlemin sonunda örnekler için ayrı ayrı gliserol stokları hazırlanmış ve daha sonra kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Gliserol stokları hazırlanan bakteri kolonilerinden MiniPrep plazmid DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Pozitif olarak belirlenen örneklerden bir tanesi seçilerek mini prep DNA izolasyon kiti (GeneJET plazmid Mini Prep) kullanılarak saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırması yapılan DNA'ların DNA dizimleri ODTÜ Teknokent bünyesi içerisinde yer alan Refgen firmasına gönderilerek DNA dizilimi gerçekleştirilmiştir. Gelen dizi Vector NTI programı kullanılarak analiz edildiğinde *NAC* geninin 3' ucunun DNA diziliminin elde edildiği belirlenmiştir.

4.1.2. 5' RACE PCR

Rangpur laym bitkisinden 14 günlük kuraklık stresinden sonra elde edilen mRNA ve Smarter RACE kiti kullanılarak 5' RACE ready cDNA hazırlanmıştır. Hazırlanan 5' RACE ready cDNA ve *NAC* geninin 5' ucuna spesifik olarak dizayn edilmiş MSC 153 primeri kullanılarak 5' RACE-PCR yapılmıştır. Yapılan 5' RACE-PCR denemesinde 68 °C ve 67 °C bağlanma sıcaklıkları ile RACE-PCR yapılmıştır. Yapılan RACE-PCR sonuçlarının analizlerinde %1'lik olarak agaroz jel

görüntülerinde sürüntü şeklinde parlaklıklar görülmüştür. Daha sonra farklı sıcaklıkları aynı anda denemek için radiant PCR yapılmıştır. Yapılan Gradient PCR'da 70 °C, 67 °C, 64,3 °C, 61 °C, 58,2 °C ve 55 °C bağlanma sıcaklıkları denenmiştir. Denenen Gradient PCR sonucunda da herhangi bir bant elde edilememiştir. Bu nedenle *NAC* geninin 5' ucunu bulmak için Nested RACE PCR yöntemi uygulanmıştır. Nested RACE-PCR yönteminde RACE-PCR yönteminde her bir gen için tasarlanan gen spesifik primerin çoğalım bölgesi içerisine yuvalanmış (nested) primer olarak adlandırılan ikinci bir gen spesifik primer daha tasarlanmaktadır ve Nested RACE-PCR'da bu tasarlanan 2. primer kullanılmaktadır. Nested RACE-PCR yapmak için öncelikle normal olarak 1. olarak tasarlanan gen spesifik primerle 5' RACE-PCR yapılmış ve daha sonra RACE-PCR ürünleri belli oranlarda seyreltilerek Nested RACE-PCR için kalıp olarak kullanılmıştır. Seyrelilen RACE-PCR ürünleri 2. olarak tasarlanan gen spesifik primer kullanılarak Nested RACE-PCR yapılmıştır. Yapılan Nested PCR'da ilk olarak 62 °C bağlanma sıcaklığı denenmiştir ve %1'lik agaroz jel de görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme sonrasında jelde sürüntü şeklinde net olmayan bantlar görülmüştür. Daha sonra ise ikinci olarak 65 °C bağlanma sıcaklığı denenmiştir. 65 °C bağlanma sıcaklığı ile yapılan 5'RACE-PCR sonucunda ise %1'lik agaroz jelde 500 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir (Şekil 4.3).

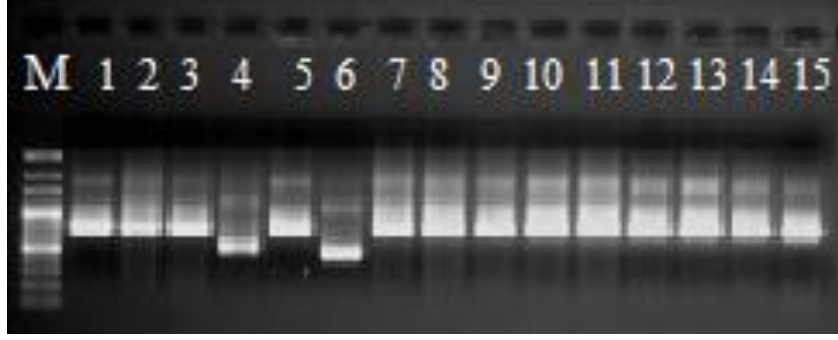


Şekil 4.3. Nested RACE-PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

500 bp uzunlukta 5'RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğine EZ Column PCR saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Yapılan saflaştırma örneği kullanılarak yapılan *E.coli* DH5 α transformasyon denemelerinde sonuç

alınmamıştır. Bu nedenle tekrar 65 °C bağlanma sıcaklığı ile 5' Nested RACE-PCR yapılmıştır ve %1'lik agaroz jel üzerine yükleme yapılmıştır. Daha sonra elde edilen 500 bp uzunluğunda 5' Nested RACE-PCR bant örneği jelden kesilerek saflaştırması jel ekstraksiyon kiti kullanılarak yapılmıştır.

Saflaştırma yapılan 5' Nested RACE PCR örneğinin pGEMT-Easy plazmitine klonlaması yapılmıştır. Klonlama aşamasında ilk olarak ligasyon yapılmıştır. Ligasyon aşamasında T4 DNA ligaz enzimi ile 5' Nested RACE PCR jel saflaştırma örneği ve pGEMT-easy plazmiti karıştırılarak +4 °C'de bir gece bekletilerek ligasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bir gece inkübasyona bırakılan ligasyon ürünü ısı şoku transformasyon yoluyla *E. coli* bakterisinin DH5α ırkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri Amp ve X-gal içeren katı LB besi ortamına ekilerek Amp antibiyotiğine dayanıklılık ve mavi beyaz koloni seçimi yoluyla 5' Nested RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini içeren plazmitleri taşıyan bakteri kolonilerinin seçilimi yapılmıştır. Elde edilen mavi koloniler 5' Nested RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini taşımayan pGEM-T Easy plazmitlerini içermekte ve klonlamanın gerçekleşmediğini göstermektedir. Elde edilen beyaz koloniler ise 500 bp uzunlukta 5' Nested RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini taşıyan pGEM-T Easy plazmidlerini içermekte olup klonlanma işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. 5' Nested RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğinin klonlanması sonucunda çok sayıda mavi beyaz koloniler elde edilmiştir. Aktarıldığını düşündüğümüz 5' Nested RACE-PCR örneği için meydana gelen beyaz kolonilerden 15 tane koloni seçilmiştir. Seçilen 15 koloni için ise M13F ve M13R primerleri ile koloni PCR yapılmıştır (Şekil 4.4).



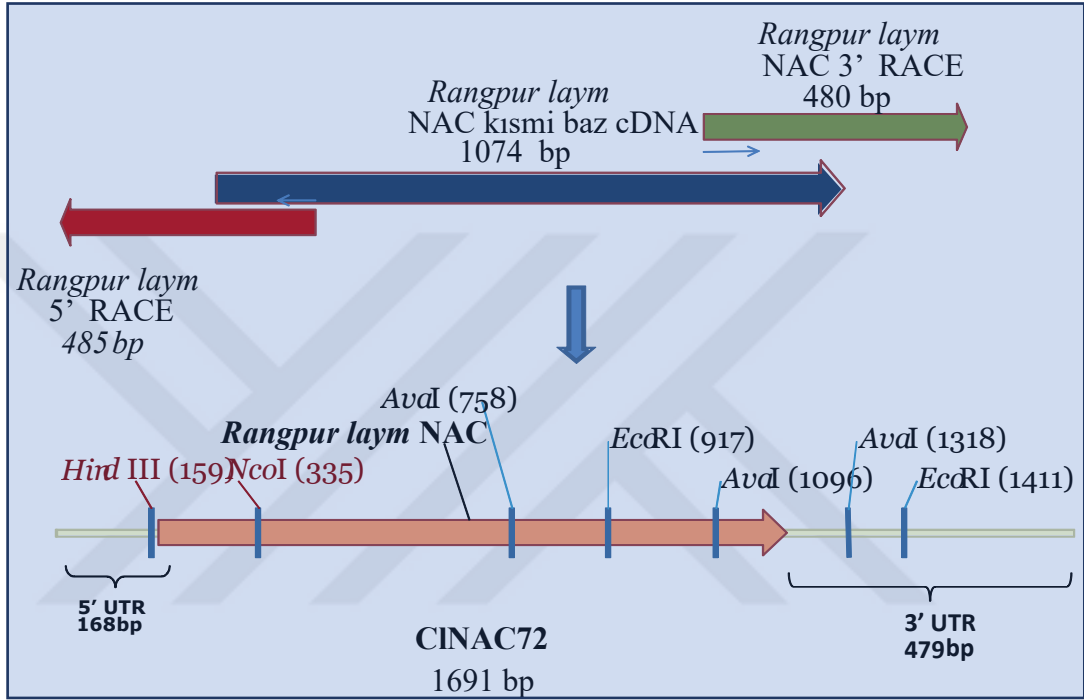
Şekil 4.4. pGEMT-easy plazmitine klonlanan 5' Nested RACE-PCR örneğinin M13F ve M13R primerleri ile yapılan koloni PCR görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-15: Koloni PCR ürünleri

Yapılan koloni PCR sonrası sonuçlar incelendiğinde yaklaşık 700 bp büyüklüğünde pozitif bantlar elde edilmiştir. Koloni PCR sonucunda pozitif çıkarak 5' Nested RACE-PCR ile elde edilen PCR örneğini içerdiği kesin olarak belirlenen beyaz kolonilerden iki tanesi seçilerek Amp içeren LB sıvı ortamı içerisinde 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca büyütülmüştür. Bu işlemin sonunda örnekler için ayrı ayrı gliserol stokları hazırlanmış ve daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Gliserol stokları hazırlanan ve büyütülen bakteri kolonilerinden ikisi seçilerek bunlardan MiniPrep plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Pozitif olarak belirlenen örneklerden bir tanesi seçilerek DNA dizilimi gerçekleştirilmek üzere ODTÜ Teknokent bünyesinde yer alan Refgen firmasına gönderilmiştir. Gelen dizi Vector NTI programı kullanılarak analiz edildiğinde *NAC* geninin 5' DNA diziliminin elde edildiği belirlenmiştir.

4.2. *CINAC* Geninin Dizi Analizi ve Karşılaştırılması

RefGen firmasında dizileme işlemi sonucunda elde edilen DNA dizileri öncelikle Vector NTI DNA dizi analiz programı kullanılarak önce vektör dizilerinden temizlenmiştir. Sonra elde edilen bu diziler analiz edildiğinde 3' RACE-PCR ürününden elde edilen kısım 480 bp ve 5' RACE-PCR ürününden elde edilen kısım 485 bp olarak bulunmuştur. Ardından temizlenen dizilere BLAST analizi yapılarak *NAC* genine ait olup olmadıkları belirlenmiştir. *NAC* geninin 5' ve 3' uçlarına ait olduğu belirlenen 5' ve 3' cDNA dizileri ve daha önce kütüphaneden elde edilen kısmi cDNA dizisi Vector NTI Contig Express modülünde birleştirilerek *NAC* geninin tüm gene ait cDNA dizisi (full-length DNA dizisi) elde edilmiş ve *CINAC*

geni olarak isimlendirilmiştir. Elde edilen 3' ve 5' RACE-PCR ürünleri ve daha önce cDNA kütüphanesinden elde edilen kısmi NAC geninin birleştirilmesi Şekil 4.5'de gösterilmektedir. *CINAC* geninin 1691 bp uzunluğunda cDNA'ya sahip olduğu ve 347 amino asitlik protein kodladığı belirlenmiştir. Ayrıca genin 5' ucunda 168 bp 3' ucunda ise 479 bp uzunluğunda protein kodlamayan bölgeler (Untranslated Region, UTR) bulunmaktadır.



Şekil 4.5. RACE yöntemi ile *CINAC* geninin tüm gen dizisinin elde edilmesi

1	CTAATACGAC TCACTATAGG GCAAGCAGTG GTATCAACGC AGAGTACATG GGGAAATAATA ATATTTCATA TTTTCCAATT TCCATTTCCT CCTCTGTGTT TOCCCATAGC TTATGCTCAG CACTTCATC	
	GATTATGCTG AGTGATAICC CGTTCGTCAC CATAGTGGC TCTCATGTAC CCGTATATT TATAAGTAT AAAAGGTAAA AGTAAAGAG GGAGACGAAC AGGGGTATCG AAATCGAGTC GTAGAAGTGG	
-1	-----HindIII-----	
131	TATATCTTTC ATTGGCAATT CATTGAAAG CTTGAAAAAAT GGGGTACCG GAGACCGACC CCTCTCACA ATTGAAGTTC CCTCCAGSTT TTAGGGTTTA CCGCACTAAT GAGGAAGTTC TAGTTCAATA	Met Gly Val Pro Glu Thr Asp Pro Leu Ser Gln Leu Asn Leu Pro Pro Gly Phe Arg Phe Tyr Pro Thr Asn Glu Glu Leu Leu Val Gln Tyr
	AATAGAAGG TAAGCGTAAA GTAAAGTTC GAAGTTTAA CCGCATGSC CTCTGGCTGG GOGAGAGTGT TAAGTTGAAT GGAGTCCAA AAGCCAAAT GGCGTATTA CTCCGTGAAG ATCAAGTAT	
-1	-----NotI-----	
261	TCCTGTGGC AAGTTGCAAG GSCAACATTT TTCCGTCGAA ATTATCGGTG AAATAGATT TTACAGTAT GACCATGGG TICTACCAAG CAAGCAATT TTGGAGAGA AAGAGTGGTA CTTTTCAGC	Tyr Leu Cys Arg Lys Val Ala Gly Gln His Phe Ser Leu Gln Ile Ile Gly Glu Ile Asp Leu Tyr Lys Phe Asp Pro Tyr Val Leu Pro Ser Lys Ala Ile Phe Gly Glu Lys Glu Tyr Tyr Phe Phe Ser
	AGAGACAGG TTTCACGTC CCGTGTAAA AAGCGAGSTT TAATAGCCAC TTTATCTAAA CATGTTCAAA CTGGSTACCC AAGATGGTTC GTTCGGTAAA AACCTCTGT TCTTACCAT GAAAAGTGC	
-1	-----PstI-----	
391	CCGAGGATA GAAAATATCC AAACGGGTCC CGAOCACCA GAGTAGCCGG GTCCGGSTAT TGGAGGCCA CAGCAGCGA CAAGATTAT CCAACTGAAG GTCGTAAGT TGSTATCAA AAGGCTCTTG	Pro Arg Asp Arg Lys Tyr Pro Asn Gly Ser Arg Pro Asn Arg Val Ala Gly Ser Gly Tyr Trp Lys Ala Thr Gly Thr Asp Lys Ile Ile Thr Thr Glu Gly Arg Lys Val Gly Ile Lys Lys Ala Leu Val
	GGTCCCIAT CTTTATAGG TTTCGCCAGS GCTGGSTGT CTATCGGCC CAGGCCATA ACCTCCSGT GTCCSTGSC TTCTAATAG TGTGACTTC CAGCATTCCA ACCATAGTTT TTCGAGAAC	
-1	-----XbaI-----	
521	TTTTTACGT AGGCAAAGCT CAAAAGGCC CAAAACCAC TTGGATCATG CAGGAATAIC GACTCTTGA ACTTCTGCG AAAAATGGCA GCTCCAAAT AGATGATTGG GTTCTGTCCA GAATCTATA	Val Phe Tyr Val Gly Lys Ala Pro Lys Gly Thr Lys Thr Asn Trp Ile Met His Glu Tyr Arg Leu Phe Glu Pro Ser Arg Lys Asn Gly Ser Ser Lys Leu Asp Asp Trp Val Leu Cys Arg Ile Tyr Lys
	AAAATGCA TCCGTTCGCA GGTITTCGST GGTITTGST AACCTAGTAC GTGGTATAG CTGAGAACT TGAAGAGCG TTTTACCGT CAGAGTCAA TACTACTAAG CAAGACAGT CTTAGATATT	
-1	-----AvaI-----	
651	GAAACATCA GGTTCOCARA AACCAAGTGC ABCAACAAGT TTCTTCGAA GCAAGAACA CAGTATGTT TCTTGTCAI CTTACTTTC TCACTTGTAT GATGTGCTG AGTCTTACC TGAATTGAT	Lys Lys His Ser Gly Ser Gln Lys Pro Val Ser Ala Thr Ser Val Thr Ser Lys Glu His Ser Asn Gly Ser Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser His Leu Asp Asp Val Leu Glu Ser Leu Pro Glu Ile Asp
	CTTCTGATG CCAAGSSTTT TTGSTCACG TCGTGTCCA CAAGAGRTI CGTITCTGTI GTCAATACCA AGACACAGTA GAGTAGAAG AGTAGACTA CTACAGGAC TCAGAAATGS ACITTAAGTA	
-1	-----KpnI-----	
781	GACGATTTT TCGCTTGGC ACGCATGAC TCACTCAAGA CTTTACAGCA AGAAGACAC AAGTTAACCA ATTTGACGA TCTGGGCTG GGTAAATTTG ACTGGGGAG TCTTGCGAGT CTTCAATCG	Asp Arg Phe Phe Ala Leu Pro Arg Met Asn Ser Leu Lys Thr Leu Gln Gln Glu Asp Asn Lys Val Asn Asn Leu Gln His Leu Gly Ser Gly Asn Phe Asp Trp Ala Ser Leu Ala Gly Leu His Ser Val
	CTGGCTAAA ACGCAAACGG TCGTACTTG AGTGAATCT GAAATGCTG TCTTCTGTI TTCCAATGT TAAACGTCT AGACCCOAG CCAITAAAAC TGACCCOCTC AGAAGGCCA GAAGTAGGC	
-1	-----EcoRI-----	
911	TCCCGAATT CGTCTCCGT GCACAGACAC AAGGACGAC TCAGATCAT GGGTGGCCT GTATGCGAA CAATGACTIT TATGTCCCT CAGTCCCCA AATGTGCCAC GTAATTCOG GAAGGTGGG	Val Pro Glu Phe Val Ser Ala Ala Gln Thr Gln Thr Thr Gln Ser His Gly Val Ala Cys Tyr Ala Asn Asn Asp Phe Tyr Val Pro Ser Met Pro Gln Met Cys His Val Asn Ser Gly Arg Val Gly
	AGGGCGTAA GCAGAGSCGA CBTGCTGTG TCTGCTGTA AGTCTCAGTA CCCACCGGA CAATAGCCTT GTTACTGAAA ATACAGGGA GCTACCGSTT TTACACGGT CAITTAAGG CTTCOCACCC	
-1	-----AvaI-----	
1041	CAACTCGTG GAAGAGGAG TTCAAGTGG CTTAGGAAAT CAACGGSTG ATACTTGGG GCTCTTTCAG CATAATTCGG CCGTATTGAC CCAACCGAAC TTCTGAGCC CGGTTGACC GTATGATTA	Gly Asn Ser Val Glu Glu Val Gln Ser Gly Leu Arg Asn Gln Arg Val Asp Asn Ser Gly Leu Phe Gln His Asn Ser Ala Val Leu Thr Gln Pro Asn Phe Cys Ser Pro Val Asp Pro Tyr Gly Leu
	GTTGAGCCAC CTTCTCCCTC AAGTCTCACC CGAATCTTAA GTTGCCAAC TATTAGCACC CGAGAAAGTC GTATTAGCC GCATAACTG GTTGGCTTG AAGACATCGG GCCAATCGS CATACTAAT	
-1	-----HpaI-----	
1171	AGCAGCCGA CCAATCAAG CAGSTTTGG TTAGACAIT GATATAGG TAAAATGTC GGCATTTGA AATGATGAT GATATTATGA AGAAAGGATA AGTGATTAC GAATGTAAA CTCTAGAGST	Arg His Pro Thr Gln Ser Ser Gly Phe Gly Phe Arg His
	TCCSTGGCT GGGTATGTC GCCCAAGCC AAATCTGAAA CTATATACC ATTTACAGS CCGTAAACT TTAACAGTA CTAATAACT TCTTTCCTAT TCACTACTG CTTAAGATTT GAGATCTCCA	

Şekil 4.6. *CINAC* geninin cDNA dizisi

Tüm gen olarak izolasyonu yapılan ve *CINAC* geninin DNA dizisi kullanılarak BLASTN analizleri yapılmış ve gen bankası veri tabanında yer alan DNA dizileri ile benzerlikleri araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda *CINAC* geninin DNA dizisinin başta turuncgiller olmak üzere gen bankasında yer alan farklı bitkilerden *NAC72* geni ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Bu sonuçlar elde edilen *CINAC* geninin diğer bitkilerde de bulunan *NAC72* geni olduğunu göstermiştir. Elde edilen tüm *CINAC* geninde yapılan protein transkripsiyon analizleri bu cDNA'nın 347 amino asitlik protein dizisi kodladığını göstermiştir. Bu amino asit dizisi kullanılarak *CINAC* geninin kodlamış olduğu fonksiyonel domainleri belirlemek üzere korunmuş domain (Conserved Domain, CD) araştırması yapılmıştır. Yapılan CD araştırmaları sonucunda bu proteinin sadece bitkilerde bulunan *NAC* proteinlerine adını veren domainlerden biri olan NAM (No Apikal Meristem) domainine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *CINAC* geninin kodlamış olduğu 347 amino asitlik protein dizisi ile BLASTP analizleri yapılarak gen bankası protein veri tabanındaki diğer proteinlerle benzerlikleri araştırılmıştır (Şekil 4.8). Yapılan analizler sonucunda *CINAC* geninin DNA dizisinde olduğu gibi başta portakal olmak üzere turuncgillerden ve çoğunlukla çok yıllık olmak üzere diğer bitkilerden elde edilen *NAC72* proteini ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar klonlanan

CINAC geninin NAC domainine sahip olduğunu ve farklı bitkilerden *NAC72* geninin homoloğu olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.8).

Tüm gen olarak izolasyonu yapılan ve *CINAC* geninin kodladığı proteinin amino asit dizilerinin diğer *NAC* genleriyle benzerliklerinin çoğu çok yıllık bitkilerden olmak üzere *CINAC* geni ile homoloji gösteren 24 tane *NAC* proteininin amino asit dizileri gen bankası veri tabanından alınarak *CINAC* proteinleriyle karşılaştırılmıştır. Vector NTI programının AlignX modülünde çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda *CINAC* proteininin diğer *NAC* proteinleriyle özellikle NAC domaininin bulunduğu amino terminal kısmında yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar *CINAC* geninin fonksiyonel NAC domaini içerdiğini göstermiştir. Tüm gen olarak izolasyonu yapılan ve *CINAC* olarak isimlendirilen *NAC* geninin gen bankasında yer alan diğer *NAC* genleriyle olan benzerliklerinin Vector NTI AlignX modülünde analizi sonucunda elde edilen çoklu sekans karşılaştırması Şekil 4.9'da gösterilmektedir.

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Job title: Rangpur Lime NAC

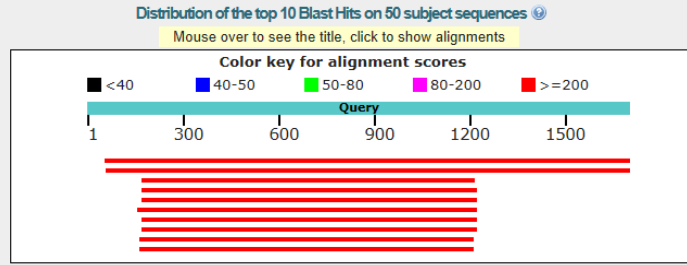
RID [G173Y9YU015](#) (Expires on 04-27 21:11 pm)

Query ID [Id|Query_191385](#)
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 1691

Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nt)
 Program BLASTN 2.6.1+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

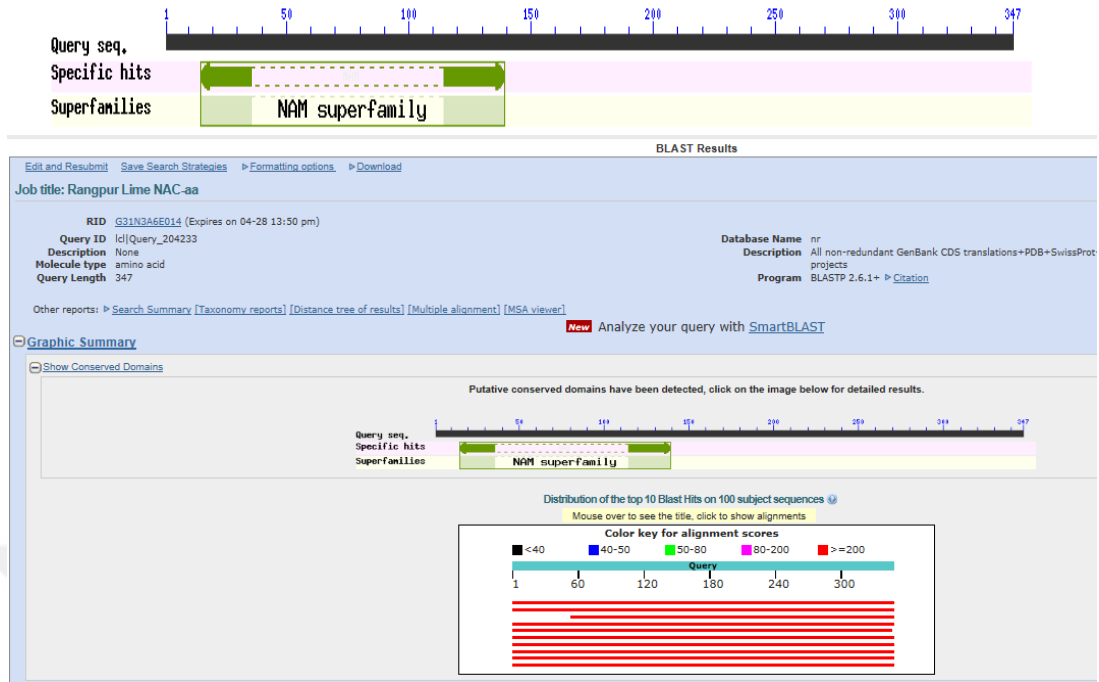
[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72 [Citrus sinensis]	721	721	100%	0.0	99%	XP_006464708.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein CICLE_v10088312mq [Citrus clementina]	721	721	100%	0.0	99%	XP_006451940.1
<input type="checkbox"/>	hypothetical protein CISIN_1q019011mq [Citrus sinensis]	596	596	84%	0.0	97%	K0074151.1
<input type="checkbox"/>	NAC domain class transcription factor isoform 1 [Theobroma cacao]	538	538	100%	0.0	77%	EOY12853.1
<input type="checkbox"/>	NAC domain-containing protein 72 [Morus notabilis]	536	536	99%	0.0	78%	XP_010089503.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72 [Theobroma cacao]	535	535	100%	0.0	76%	XP_007021328.2
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium ramondii]	529	529	100%	0.0	76%	XP_012458602.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium arboreum]	526	526	100%	0.0	75%	XP_017605223.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium hirsutum]	524	524	100%	0.0	75%	XP_016732489.1
<input type="checkbox"/>	NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium hirsutum]	516	516	100%	0.0	77%	MP_001314060.1
<input type="checkbox"/>	putative NAC-1 protein [Rosa chinensis]	512	512	100%	1e-100	74%	AKC88481.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	512	512	99%	2e-100	73%	XP_004291867.1
<input type="checkbox"/>	NAC transcription factors 22 [Manihot esculenta]	511	511	100%	3e-100	75%	ALC78999.1
<input type="checkbox"/>	NACA1 [Carica papaya]	510	510	100%	5e-100	73%	ANJ86371.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium hirsutum]	509	509	100%	3e-179	73%	XP_016685118.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium arboreum]	508	508	100%	5e-179	75%	XP_017639499.1

PREDICTED: Citrus sinensis NAC domain-containing protein 72 (LOC102612201), mRNA
 Sequence ID: [XM_006464645.2](#) Length: 1695 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Plus/Minus	Rela
2906 bits (3222)	0.0	1628/1638 (99%)	1/1638 (0%)			
Query 54	AAATAATAATTTTCATATTTTCCAAATTTCCATTTTCCCTCTGCTTGTCCOCCATAGCTTTAGCTCAGCATCTTCACTATATCTTTTCATTTGGCAATTCATTTGAAAGCTTGAABAAATGGGGTACCGGAGACGACCCGCTCTCCCAATTT	203				
Sbjct 2	AAATAATAATTTTCATATTTTCCAAATTTCCATTTTCCCTCTGCTTGTCCOCCATAGCTTTAGCTCAGCATCTTCACTATATCTTTTCATTTGGCAATTCATTTGAAAGCTTGAABAAATGGGGTACCGGAGACGACCCGCTCTCCCAATTT	155				
Query 204	GAACCTACCTCCAGGTTTTCGGTITTTACCGCACTAATGAGAACTTTGAGTCAATATCTCTGTGCGAAAGTTGCGAGGCAACATTTTGGCTGAAATATCGGTGAAATAGATTTGTACAAAGTTGACCCATGGGTTCTACCAAGCA	305				
Sbjct 156	GAACCTACCTCCAGGTTTTCGGTITTTACCGCACTAATGAGAACTTTGAGTCAATATCTCTGTGCGAAAGTTGCGAGGCAACATTTTGGCTGAAATATCGGTGAAATAGATTTGTACAAAGTTGACCCATGGGTTCTACCAAGCA	305				
Query 354	GGCAATTTTGGAGAGAAAAGATGGTACTTTTCAGCCCGGAGATAGAAAATATCCAAACGGGTCOCCGACCCACAGATAGCCGGGTCOCCGATTTGGAAAGCCACAGCCACCAAGATATACCAACTGAAAGTCGTAAGTTGG	503				
Sbjct 306	GGCAATTTTGGAGAGAAAAGATGGTACTTTTCAGCCCGGAGATAGAAAATATCCAAACGGGTCOCCGACCCACAGATAGCCGGGTCOCCGATTTGGAAAGCCACAGCCACCAAGATATACCAACTGAAAGTCGTAAGTTGG	455				
Query 504	TATCAAAAAGGCTCTGTTTTTAAAGTGGCAAAAGCTCCAAAAGGCCAAACCAACCAATGGATATGACGCAATATGCACTCTTTGAACTCTTGGCAAAAATGGCAGCTCCAGATAGATGGTCTCTGCGAATCTATAGAA	653				
Sbjct 456	TATCAAAAAGGCTCTGTTTTTAAAGTGGCAAAAGCTCCAAAAGGCCAAACCAACCAATGGATATGACGCAATATGCACTCTTTGAACTCTTGGCAAAAATGGCAGCTCCAGATAGATGGTCTCTGCGAATCTATAGAA	605				
Query 654	GCATTCAGGTTCCCAAAAACAGTGTGTCAGCAACAAGTGTTCCTCAAGCAAAAGACAGATAGTGTCTGTTGATCTTCACTCTTCACTTTGATGATGCTCGAGTCTTTAAGTAAATGATGACCGATTTTCGGTTTGGCAGC	803				
Sbjct 606	GCATTCAGGTTCCCAAAAACAGTGTGTCAGCAACAAGTGTTCCTCAAGCAAAAGACAGATAGTGTCTGTTGATCTTCACTCTTCACTTTGATGATGCTCGAGTCTTTAAGTAAATGATGACCGATTTTCGGTTTGGCAGC	755				
Query 804	CATGAATCCTCAAGATTTACAGCAAGAAAGCAAGGTTAACAAATTTGCAACATCGGGGTCGGGTAATTTGACTGGGCGAGTCTTGGGGTCTTCAATCGSCTCCCGAAATGGCTCCGCTCAGCAGACAGAGGAGACTCA	953				
Sbjct 756	CATGAATCCTCAAGATTTACAGCAAGAAAGCAAGGTTAACAAATTTGCAACATCGGGGTCGGGTAATTTGACTGGGCGAGTCTTGGGGTCTTCAATCGSCTCCCGAAATGGCTCCGCTCAGCAGACAGAGGAGACTCA	905				
Query 954	GACTCAGGGTGGGCTGTTATGCGAACAATGACTTTTATGCTCCCTGATGCCCCAAATGCGCACTAAATTCGGAAAGGTTGGGCACTGGTGGAAAGGAGAGGTTCAAGCTGGCTAGGAATCAGGGTTGATTAAGTCCGGGCT	1103				
Sbjct 906	GACTCAGGGTGGGCTGTTATGCGAACAATGACTTTTATGCTCCCTGATGCCCCAAATGCGCACTAAATTCGGAAAGGTTGGGCACTGGTGGAAAGGAGAGGTTCAAGCTGGCTAGGAATCAGGGTTGATTAAGTCCGGGCT	1055				
Query 1104	CTTTCAGCAATTTGGCCGATTTGACCCAAACCGAAGCTTCTGTAGCCCGGTTGACCCGATGGATTAAGGCAACCCGCAAAATCAAGGCGGTTGGGTTTGAACATTGAAATATGGTAAATGTCCGGCATTGAAATGATGATGAT	1253				
Sbjct 1056	CTTTCAGCAATTTGGCCGATTTGACCCAAACCGAAGCTTCTGTAGCCCGGTTGACCCGATGGATTAAGGCAACCCGCAAAATCAAGGCGGTTGGGTTTGAACATTGAAATATGGTAAATGCCCGCATTGAAATGATGATGAT	1205				
Query 1254	ATTATGAGAAAGGATAGTGAATGACAAATGTAACACTCTAGAGGTTCCGCTTGGAAATCTCTCTCGAGCATCGAAATTTGACAAAAGTGTGATCTTGGCTCGGGAGGATTTTAAACAAAAATGGAAATTTGGGCGAGTTGTCTAA	1403				
Sbjct 1206	ATTATGAGAAAGGATAGTGAATGACAAATGTAACACTCTAGAGGTTCCGCTTGGAAATCTCTCTCGAGCATCGAAATTTGACAAAAGTGTGATCTTGGCTCGGGAGGATTTTAAACAAAAATGGAAATTTGGGCGAGTTGTCTAA	1355				
Query 1404	AATTTGAAATCTTTGGGCTGACTTTTGGCTTCAGGTTCCAAAATATGGAAGTAGTGGGTTTTGTAGTACCGAATGGCCAAAATGGATTTGCTTTTTTGTCTGGTTAGTGTCTCCAAAAAATTAAGAAAATTAAGTGA	1553				
Sbjct 1356	AATTTGAAATCTTTGGGCTGACTTTTGGCTTCAGGTTCCAAAATATGGAAGTAGTGGGTTTTGTAGTACCGAATGGCCAAAATGGATTTGCTTTTTTGTCTGGTTAGTGTCTCCAAAAAATTAAGAAAATTAAGTGA	1504				
Query 1554	GAGACAGCAATTTATGTACAATAGATCTCAGATTTCCAAATAGGATGCAAGCTCAAGTAAATAGGTTTTGTGGGAAATTCGCAATTTCCACATTTGATGTTATTTAGCTCTCAATTCGTTGTGCTCTCCATTTTAA	1691				
Sbjct 1505	GAGACAGCAATTTATGTACAATAGATCTCAGATTTCCAAATAGGATGCAAGCTCAAGTAAATAGGTTTTGTGGGAAATTCGCAATTTCCACATTTGATGTTATTTAGCTCTCAATTCGTTGTGCTCTCCATTTTAA	1642				

Şekil 4.7. CINAC geninin tüm cDNA dizisi ile yapılan BLASTN analizlerinin sonuçları



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72 [Citrus sinensis]	721	721	100%	0.0	99%	XP_006464708.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein CICLE_v10008812m2 [Citrus clementina]	721	721	100%	0.0	99%	XP_006451940.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein C1SIN_1q019011mq [Citrus sinensis]	596	596	84%	0.0	97%	KD074151.1
<input type="checkbox"/> NAC domain class transcription factor isoform 1 [Theobroma cacao]	538	538	100%	0.0	77%	EOY12853.1
<input type="checkbox"/> NAC domain-containing protein 72 [Morus notabilis]	536	536	99%	0.0	78%	XP_010089503.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72 [Theobroma cacao]	535	535	100%	0.0	76%	XP_007021328.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium raimondii]	529	529	100%	0.0	76%	XP_012458602.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium arboreum]	526	526	100%	0.0	75%	XP_017605223.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium hirsutum]	524	524	100%	0.0	75%	XP_016732489.1
<input type="checkbox"/> NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium hirsutum]	516	516	100%	0.0	77%	NP_001314060.1
<input type="checkbox"/> putative NAC-1 protein [Rosa chinensis]	512	512	100%	1e-180	74%	AKC88481.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Fragaria vesca subsp. vesca]	512	512	99%	2e-180	73%	XP_004291667.1
<input type="checkbox"/> NAC transcription factors 22 [Manihot esculenta]	511	511	100%	3e-180	75%	ALC78999.1
<input type="checkbox"/> NAC4 [Carica papaya]	510	510	100%	5e-180	73%	ANJ86371.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium hirsutum]	509	509	100%	3e-179	73%	XP_016685118.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: NAC domain-containing protein 72-like [Gossypium arboreum]	508	508	100%	5e-179	75%	XP_017639499.1

PREDICTED: NAC domain-containing protein 72 [Citrus sinensis]

Sequence ID: [XP_006464708.1](#) Length: 347 Number of Matches: 1

> See 1 more title(s)

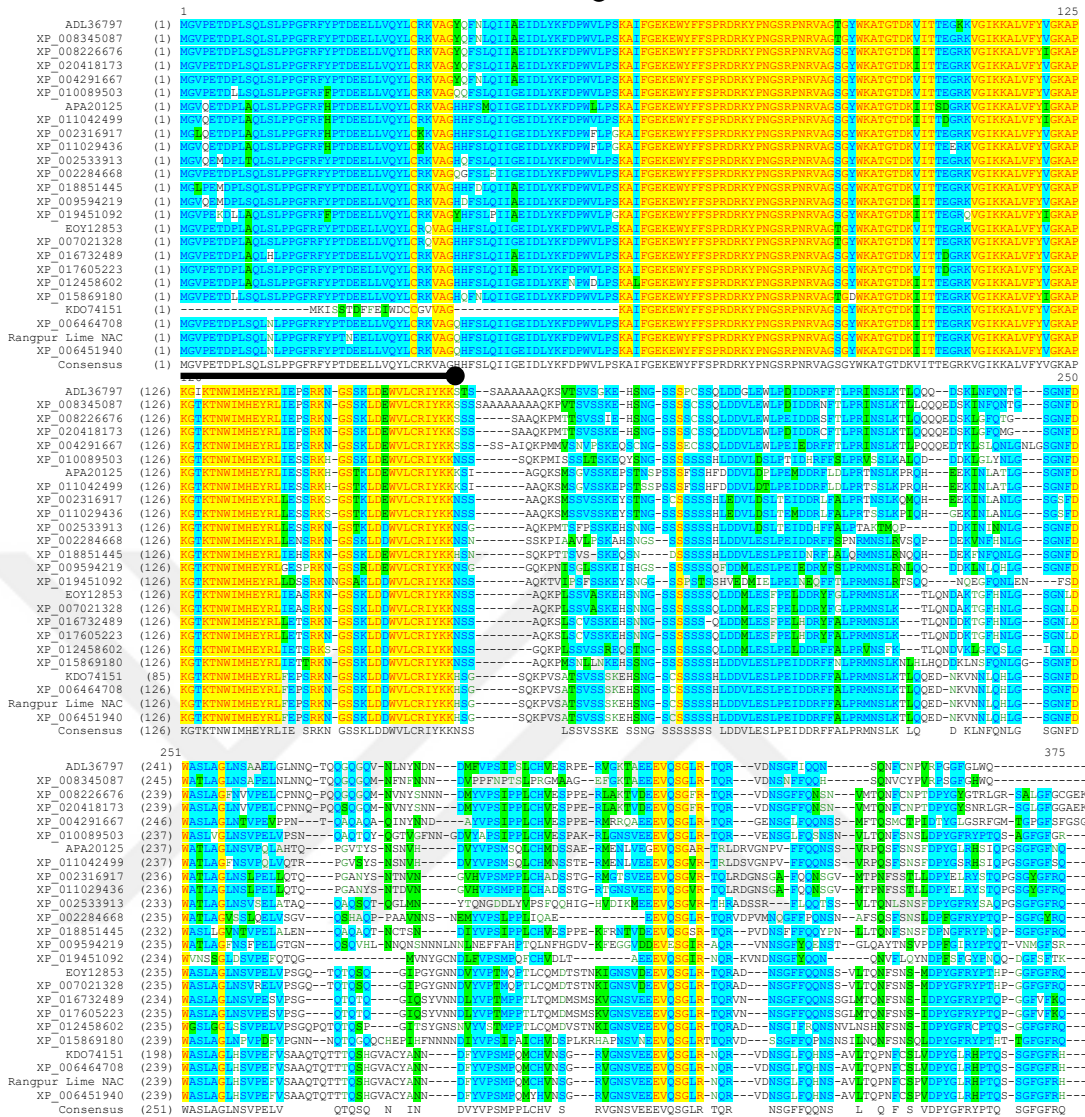
Range 1: 1 to 347 GenPept Graphics

Next Match Previous Match

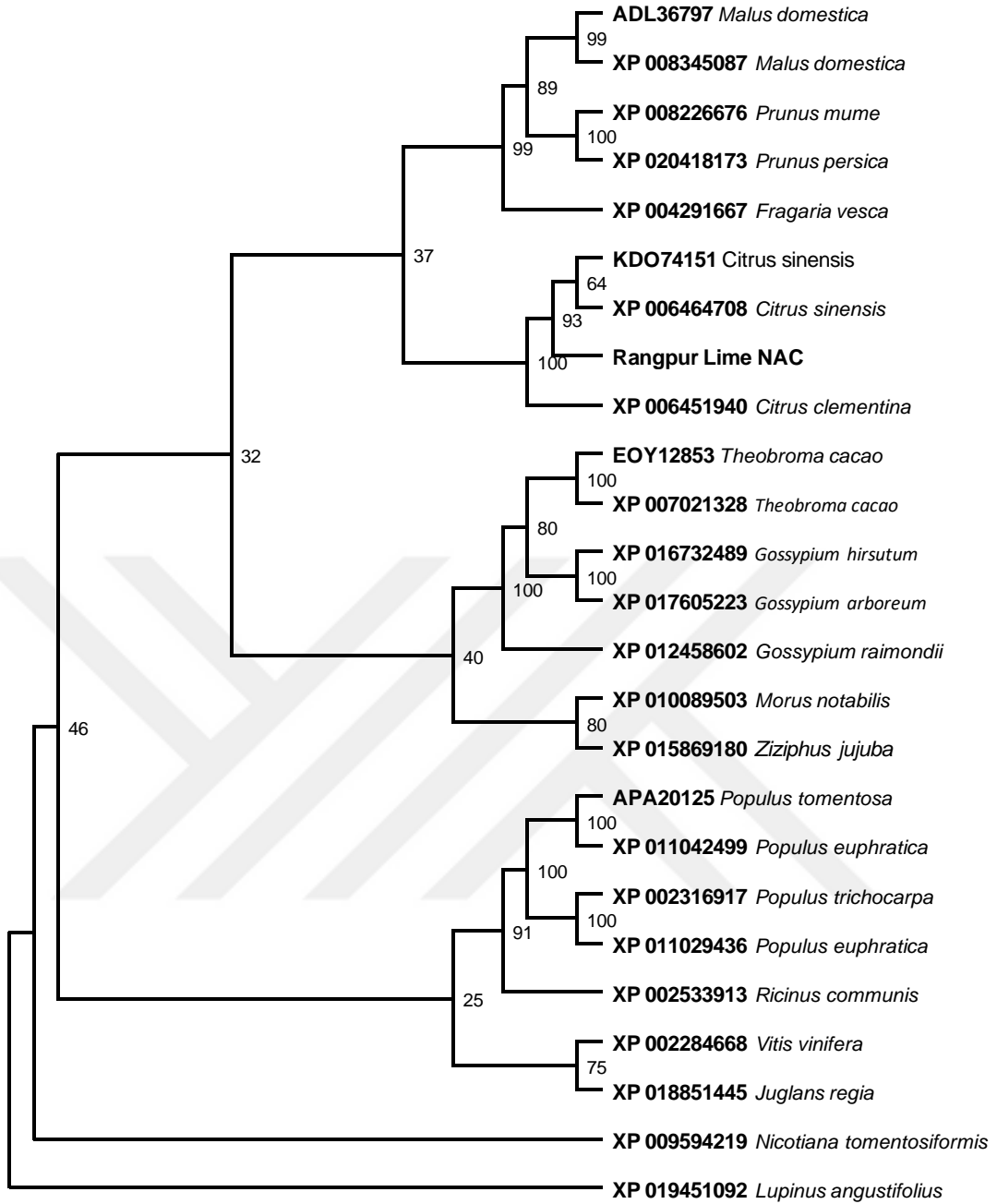
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
721 bits(1861)	0.0	Compositional matrix adjust.	345/347(99%)	346/347(99%)	0/347(0%)

Query	1	MGVPETDPLSQLNLPFGFRFYPTNEELLVQYLCKRVAGQHFSLQIIGIEDLYKFDPWVLP	60
Sbjct	1	MGVPETDPLSQLNLPFGFRFYPT+EELLVQYLCKRVAGQHFSLQIIGIEDLYKFDPWVLP	60
Query	61	SKAIFGEKEWYFFSPDRRKYPNGSRPNRVAGSGYWKATGTDKIITTEGRKVGIKKALVYF	120
Sbjct	61	SKAIFGEKEWYFFSPDRRKYPNGSRPNRVAGSGYWKATGTDKIITTEGRKVGIKKALVYF	120
Query	121	VGKAPFGTKTNWIMHEYRLFEPSSRKNSSKLLDDWVLCRIYKHHSGSQKPVSAATSVSSSKE	180
Sbjct	121	VGKAPFGTKTNWIMHEYRLFEPSSRKNSSKLLDDWVLCRIYKHHSGSQKPVSAATSVSSSKE	180
Query	181	HSNGSCSSSSSHLDDVLESLEPIDDRFFALPRMNSLKTQQEDNKNVNNLQHLGSGNFDWA	240
Sbjct	181	HSNGSCSSSSSHLDDVLESLEPIDDRFFALPRMNSLKTQQEDNKNVNNLQHLGSGNFDWA	240
Query	241	SLAGLHSHVPEFVSAAGTQTTTQSHGVACVANNDFYVPSMPQMCHVNSGRVGNSSVEEVQS	300
Sbjct	241	SLAGLHSHVPEFVSAAGTQTTTQSHGVACVANNDFYVPSMPQMCHVNSGRVGNSSVEEVQS	300
Query	301	GLRNQRVDNSGLFQHNSAVLTQPNFCSVPDYPYGLRHPTQSSSGFGRH	347
Sbjct	301	GLRNQRVDNSGLFQHNSAVLTQPNFCS VDPYGLRHPTQSSSGFGRH	347

Şekil 4.8. CINAC geninin kodladığı amino asit dizileri ile yapılan conserved domain (CD) araştırması ve BLASTP analizlerinin sonuçları



Şekil 4.9. CINAC geninin diğer gen bankasında yer alan diğer NAC genleriyle olan çoklu sekans karşılaştırması. ADL36797 *Malus domestica*, XP 008345087 *Malus domestica*, XP 008226676 *Prunus mume*, XP 020418173 *Prunus persica*, XP 004291667 *Fragaria vesca*, KDO74151 *Citrus sinensis*, XP 006464708 *Citrus sinensis*, XP 006451940 *Citrus clementina*, EOY12853 *Theobroma cacao*, XP 007021328 *Theobroma cacao*, XP 016732489 *Gossypium hirsutum*, XP 017605223 *Gossypium arboreum*, XP 012458602 *Gossypium raimondii*, XP 010089503 *Morus notabilis*, XP 015869180 *Ziziphus jujuba*, APA20125 *Populus tomentosa*, XP 011042499 *Populus euphratica*, XP 002316917 *Populus trichocarpa*, XP 011029436 *Populus euphratica*, XP 002533913 *Ricinus communis*, XP 002284668 *Vitis vinifera*, XP 018851445 *Juglans regia*, XP 009594219 *Nicotiana tomentosiformis*, XP 019451092 *Lupinus angustifolius*

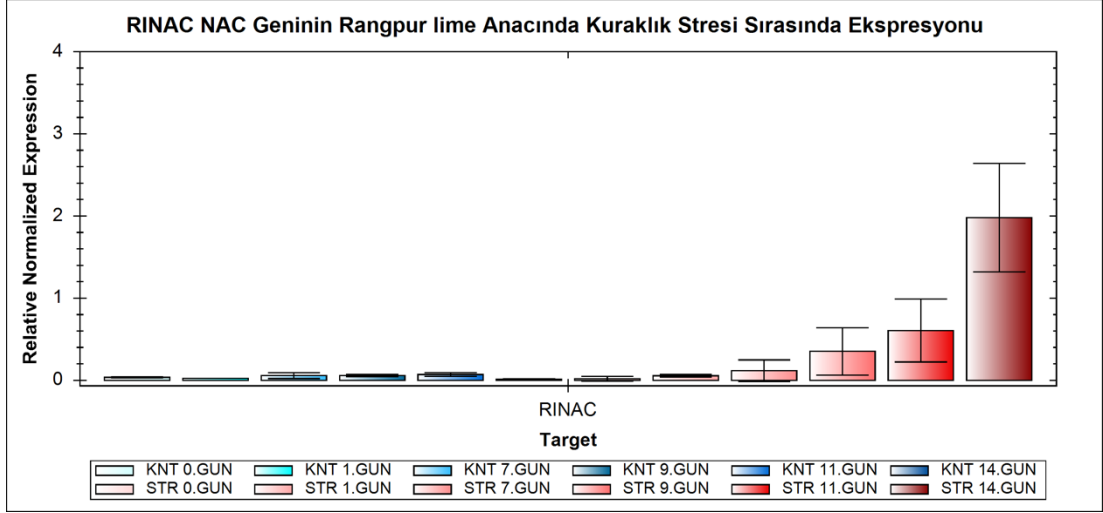


Şekil 4.10. *CINAC* geninin diğer gen bankasında yer alan diğer NAC genleriyle filogenetik analizi. ADL36797 *Malus domestica*, XP 008345087 *Malus domestica*, XP 008226676 *Prunus mume*, XP 020418173 *Prunus persica*, XP 004291667 *Fragaria vesca*, KDO74151 *Citrus sinensis*, XP 006464708 *Citrus sinensis*, XP 006451940 *Citrus clementina*, EOY12853 *Theobroma cacao*, XP 007021328 *Theobroma cacao*, XP 016732489 *Gossypium hirsutum*, XP 017605223 *Gossypium arboreum*, XP 012458602 *Gossypium raimondii*, XP 010089503 *Morus notabilis*, XP 015869180 *Ziziphus jujuba*, APA20125 *Populus tomentosa*, XP 011042499 *Populus euphratica*, XP 002316917 *Populus trichocarpa*, XP 011029436 *Populus euphratica*, XP 002533913 *Ricinus communis*, XP 002284668 *Vitis vinifera*, XP 018851445 *Juglans regia*, XP 009594219 *Nicotiana tomentosiformis*, XP 019451092 *Lupinus angustifolius*

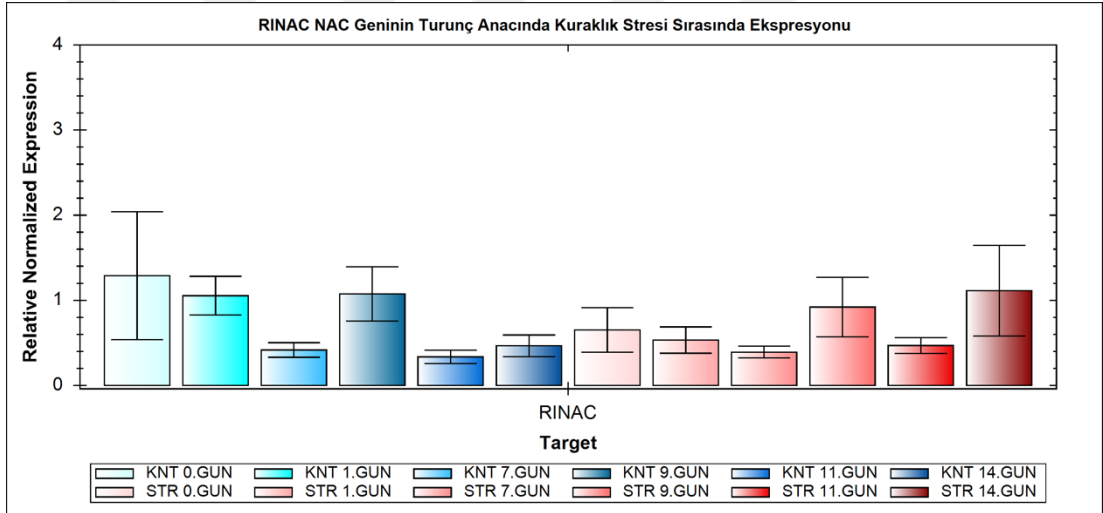
Tüm gen olarak izolasyonu yapılan ve *CINAC* geninin gen bankasında yer alan diğer *NAC* genleri ile filogenetik ilişkisini araştırmak için çoğu çok yıllık bitkilerden olmak üzere *CINAC* geni ile homoloji gösteren 24 tane *NAC* geni gen bankası veri tabanından alınarak protein dizileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen çoklu dizi karşılaştırmaları ve neighbor joining yöntemi kullanılarak *NAC* genlerinin filogenetik analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda *CINAC* geninin farklı bitkilerden *NAC* genleri ile filogenetik ilişki gösterdiği ve turunçgillerden elde edilen *NAC* genleri ile birlikte kümelendiği belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizlerinin sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmektedir.

4.3. *CINAC* Geninin Ekspresyonunun Rangpur laym ve Turunç Anaçlarında İncelenmesi

RACE yöntemiyle tamamı elde edilen *NAC* geninin kuraklık stresi sırasındaki ekspresyonu (ifadesi) Rangpur laym ve turunç anaçlarında kuraklık stresi uygulamasından önce (0. gün) ve kuraklık uygulamasının 7., 9., 11. ve 14. günlerinde alınan yaprak örneklerinden elde edilen total RNA'lar kullanılarak syber green real-time RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 4.11, 12). Real-time ekspresyon analizi sonuçlarına göre kuraklığa dayanıklı Rangpur laym anacında *CINAC* geninin ekspresyonunun kuraklık stresinin 9. gününden itibaren artış gösterdiği ve 14 günlük kuraklık stresinin sonunda ise bu genin ekspresyonunun maksimum düzeye ulaştığı görülmektedir. Buna karşın *CINAC* geninin ekspresyonunun turunç anacında 14 günlük kuraklık stresi boyunca önemli bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 4.11. *CINAC* geninin ekspresyonunun Rangpur laym (*C. limonia*) 14 günlük kuraklık stresi sırasında incelenmesi. KNT: Kontrol bitkileri. STR: Kuraklık stresi uygulanmış bitkiler



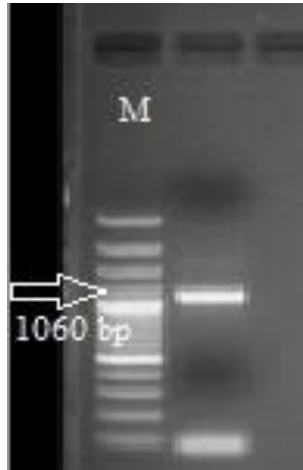
Şekil 4.12. *CINAC* geninin ekspresyonunun turunç 14 günlük kuraklık stresi sırasında incelenmesi. KNT: Kontrol bitkileri. STR: Kuraklık stresi uygulanmış bitkiler

4.4. *CINAC* Geninin Rangpur Laym'dan Tüm Gen Olarak Çoğalılması ve cDNA Sentezi

NAC geninin çoğalması için öncelikle Rangpur laym bitkilerine 14 günlük kuraklık stresi uygulanmıştır. 14 günlük kuraklık stresi uygulanan Rangpur laym bitkilerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu LiCl izolasyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen toplam RNA'ların kalitesini ve miktarını

belirlemek amacıyla RNA'ların bir kısmı %1 agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak görüntüleme yapılmıştır. Ayrıca spektrofometrede RNA yoğunluğu ölçülmüştür. RNA yoğunluğu 220 µg/ml olarak ölçülmüştür. 500 ng/µl olacak şekilde ayarlanarak RT-PCR reaksiyonunda kullanılmıştır.

Total RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan iki aşamalı tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak önce oligo dT primer ile tamamlayıcı (komplomenter) DNA (cDNA) sentezlenmiştir. Daha sonra *NAC* geninin 5' ve 3' ucunda bulunan korunmuş bölgelere spesifik MSC 229 ve MSC 230 primerleri kullanılarak Rangpur laym bitkilerinden elde edilen *NAC* geni RT-PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Gradient PCR yapılan çalışmada kullanılan MSC 229 ve MSC 230 primerlerinin en yüksek verimde çalıştığı sıcaklık değeri 65 °C olarak belirlenmiştir. RT-PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin bir kısmı 100bp plus DNA büyüklük markörüyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda elde edilen toplam RNA'dan yaklaşık 1074 bp büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir. Kuraklık stresi uygulanan Rangpur laym bitkilerinden elde edilen RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan *CINAC* geni (Şekil 4.13) 'de gösterilmektedir. RT-PCR yöntemi ile çoğaltılan *CINAC* genine PCR saflaştırması yapılmıştır.



Şekil 4.13. 14 gün kuraklık stresi uygulanmış Rangpur laym bitkilerinden izole edilen *CINAC* geninin MSC 229 ve MSC 230 primerleri ile yapılan RT-PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

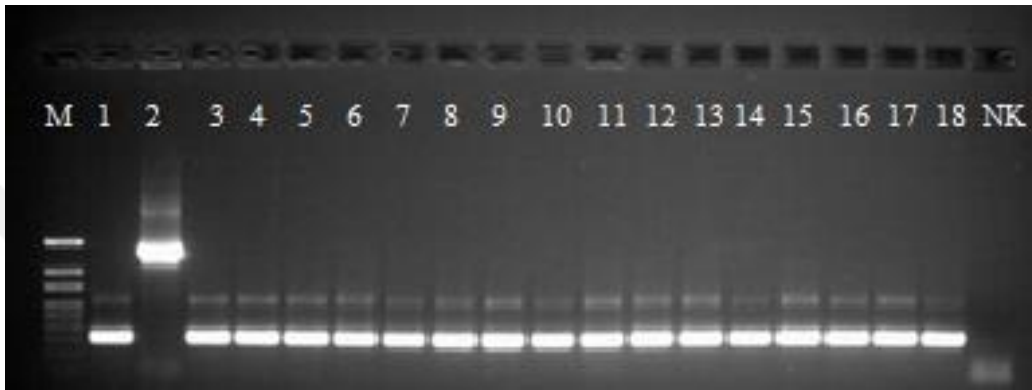
4.5. Tüm Gen Olarak Çoğalılan *CINAC* geninin pCAMBIA 1304 Vektörüne Klonlanması

4.5.1. *CINAC* genine promotör ve terminatör bölgelerin eklenmesi

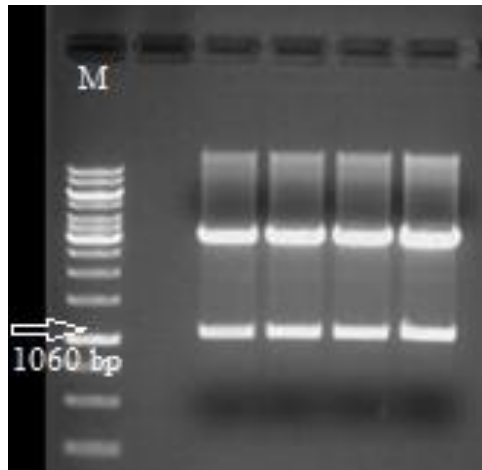
Saflaştırılması yapılan *CINAC* geninin MSC 229-230 primerleri ile eklenen *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılmıştır. Restriksiyon enzimleri ile yapılan kesimin ardından PCR saflaştırılması yapılmıştır. Daha sonra ise aynı şekilde Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic* virüs, *CAMV*) 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren pJIT 30 plazmitinin de *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılmıştır. Yapılan kesim sonunda pJIT 30 kesimine vektörün uç kısımlarının ligasyon sırasında birleşmemesi için alkalik fosfataz uygulanmıştır. Ardından her iki kesimi yapılan saflaştırma örnekleri kullanılarak T4 DNA ligaz enzimi ile 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen ligasyon ürünü *E.coli* DH5 α ırkına aktarımı için ısı şoku yöntemiyle transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrasında elde edilen ürün Amp ve X-gal içeren LB besi ortamına ekilerek büyütülmüştür. Ancak meydana gelen kolonilerden seçilerek pJIT 30 plazmiti üzerinde bulunan primerler BC 200-201 kullanılarak yapılan koloni PCR'lardan herhangi bir pozitif sonuç elde edilememiştir. Bu nedenle RT-PCR ile çoğalılan *CINAC* geninin öncelikle pGEM-T Easy plazmitine aktarımının gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Bu nedenle RT-PCR yöntemi ile çoğalılan ve PCR saflaştırması gerçekleştirilen *CINAC* geninin pGEMTY-Easy plazmitine klonlaması gerçekleştirilmiştir. Klonlama aşamasında ilk olarak ligasyon yapılmıştır. RT-PCR ile çoğalılan *CINAC* geninin PCR saflaştırma örneği, pGEM-T Easy plazmiti ve T4 DNA ligaz enzimi karıştırılarak +4 °C'de bir gece bekletilmiştir ve ligasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bir gece inkübasyona bırakılan ligasyon ürünü ısı şoku transformasyon yoluyla *E. coli* bakterisinin DH5 α suşuna aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri amp ve X-gal içeren LB besi ortamına ekilerek amp antibiyotiğine dayanıklılık ve mavi beyaz koloni seçimi yoluyla RT-PCR ile çoğalılan *CINAC* genini içeren plazmitleri taşıyan bakteri kolonilerinin seçilimi yapılmıştır. Elde edilen beyaz kolonilerden 18 koloni seçilmiştir ve pGEM-T Easy plazmiti üzerinde bulunan M13F ve M13R primerleri ile koloni PCR yapılmıştır. Yapılan koloni PCR

sonucunda bir tane pozitif bant elde edilmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen pozitif örnek için mini prep DNA izolasyon kiti kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılması yapılan pGEM-T Easy plazmitine aktarılan *CINAC* geninin *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi yapılmıştır ve %1'lik agaroz jelde yaklaşık 1074 bp uzunluğunda bantların elde edildiği görüntülenmiştir (Şekil 4.15). Daha sonra kesimi yapılan pGEM-T Easy plazmitine aktarılan *CINAC* geninin, plazmitten ayrı 1074 bp büyüklüğünde bulunan bantlara jel ekstraksiyonu yapılmıştır.



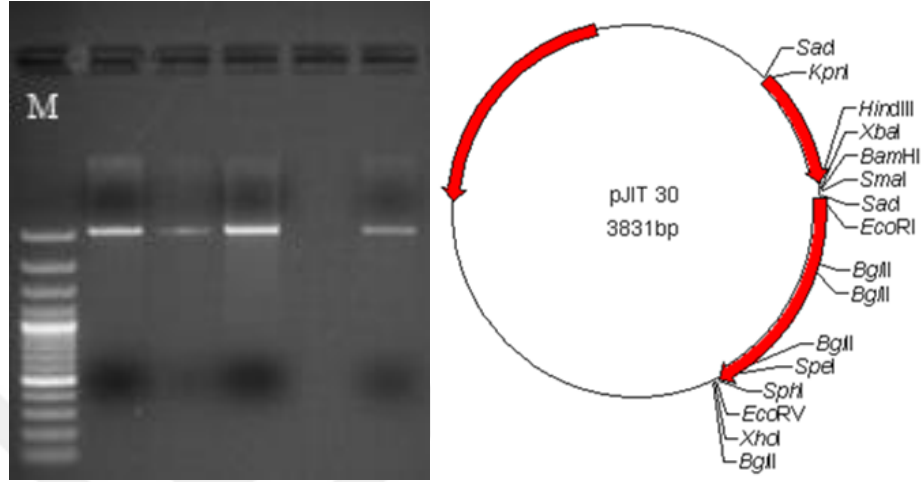
Şekil 4.14. *CINAC* geninin pGEMT Easy plazmitine klonlanması sonucunda elde edilen kolonilerin M13F-R primerleri ile yapılan PCR görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-18: Koloni PCR ürünleri. NK: Negatif kontrol



Şekil 4.15. pGEM-T Easy plazmitine aktarılan *CINAC* geninin *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesiminin ardından elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

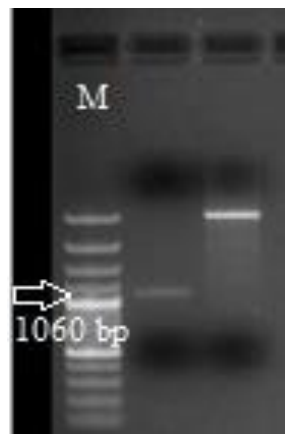
Aynı zamanda Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus, CAMV*) 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren pJIT 30 plazmitinin de *Bam*HI ve *Hind*III

restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılmıştır (Şekil 4.16). Kesim sonrasında pJIT 30 plazmitine alkalın fosfataz uygulanmıştır. Alkalın fosfataz uygulaması sonrasında PCR saflaştırması yapılmıştır ve %1'lik agaroz jelde koşturularak UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 4.16).



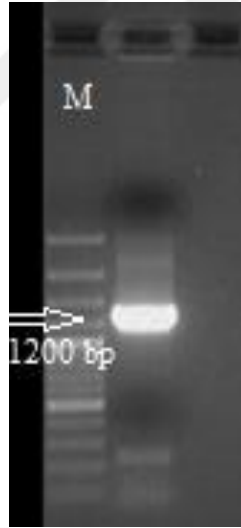
Şekil 4.16. pJIT 30 plazmitinin *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile jel kesim görüntüsü ve pJIT 30 plazmitinin şematik görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

BamHI ve *HindIII* ile kesilerek jel ekstraksiyonu yapılan yaklaşık 1074 bp uzunluğunda bulunan *CINAC* geni ve *BamHI* ve *HindIII* ile kesilerek PCR saflaştırması yapılan pJIT 30 plazmiti tekrar %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *CINAC* geninin ve pJIT 30 plazmitinin *BamHI* ve *HindIII* enzimleri ile kesim sonrasında sırasıyla jel ekstraksiyonu ve PCR saflaştırmasının jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

CINAC geninin jel ekstraksiyonu ve pJIT 30 plazmitinin PCR saflaştırması kullanılarak T4 DNA ligaz enzimi ile ligasyon yapılmıştır. Daha sonra ligasyon ürününün ısı şoku yolu ile *E. coli* bakterisinin DH5 α suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonunda Amp ve X-gal içeren LB besi ortamına ekilen kolonilerden tek bir koloni meydana gelmiştir. pJIT 30 plazmit içerisinde 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren bölgeye spesifik olarak dizayn edilmiş BC 200-201 ve BC 212-213 primerleri yer almaktadır. pJIT 30 plazmiti içerisinde bulunan primer çiftlerine bağlı olarak eğer *CINAC* geni 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren bölgeye aktarıldı ise BC 200-201 primerleri ile yapılan PCR sonucunda yaklaşık 1200 bp uzunluğunda bant görülmesi beklenmektedir. BC 212-213 primerleri ile yapılan PCR sonrasında ise yaklaşık 1800 bp uzunluğunda bant görülmesi beklenmektedir. Meydana gelen tek koloni için pJIT 30 üzerinde bulunan BC 200-201 primerleri ile yapılan koloni PCR sonucunda 1200 bp uzunluğunda beklenen pozitif bant görülmüştür (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. *CINAC* geninin pJIT 30 plazmitine klonlanması sonucunda elde edilen tek koloninin BC 200-201 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

Koloni PCR sonucunda pozitif olarak belirlenen pJIT 30 plazmitine aktarılan *CINAC* geninin sıvı LB-Amp besiyerine ekimi yapılmıştır. Ekim sonunda büyüyen bakteri kültürüne plazmit saflaştırılması yapılmıştır. Saflaştırma yapılan örnekten gliserol stok hazırlanarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Bunun sonucunda tüm gen olarak elde edilen *NAC* geninin karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virüs*,

CAMV) 35S promotör ve terminatör bölgelerini içeren pJIT 30 plazmiti içerisine klonlaması gerçekleştirilmiştir.

pJIT 30 plazmiti içerisine klonlanan *CINAC* geninin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlama aşamasına geçmek için ilk önce pJIT 30 plazmitine aktarılan *NAC* geninin PCR saflaştırması (*NAC* gen kaseti), pJIT 30 plazmitinin üzerinde yer alan primerler (BC 212 ve BC 213) ve pfu enzimi kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR örnekleri %1'lik agaroz jele yüklenmiştir ve jel görüntüsünde yaklaşık 1800 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. pJIT 30 plazmitine aktarılan *CINAC* geninin BC 212 ve BC 213 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü M: DNA büyüklük markörü.

4.5.2. *CINAC* geninin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması

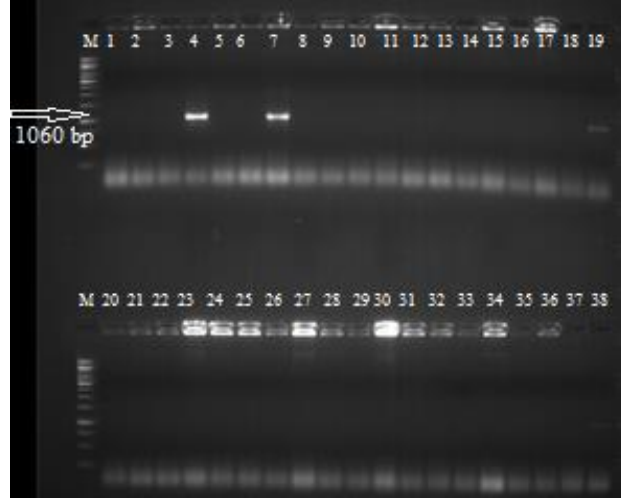
pJIT 30 plazmiti içerisine klonlanan *CINAC* geninin BC 212 ve BC 213 primerleri ile yapılan PCR'lar birleştirilerek PCR saflaştırması yapılmıştır. Ayrıca pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörü ise bakteride seçiciliği kanamisin olan LB-kanamisin besi yeri ortamında büyütülmüştür. Besi yeri ortamında büyütülen kültürlerden plazmid DNA izolasyon kiti kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. pCAMBIA 1304 vektörü içerisinde çoklu klonlama bölgesinde ve pJIT 30 plazmitinden *CINAC* genini çoğaltığımız BC 212 ve BC 213 primerleri içerisinde *Pst*I restriksiyon enzim kesim bölgeleri de yer almaktadır. Bu nedenle *CINAC* gen kaseti içeren saflaştırılmış DNA ve pCAMBIA 1304 plazmit saflaştırmasına ayrı ayrı *Pst*I enzim ile kesim uygulanmıştır. Kesim sonunda

pCAMBIA 1304 plazmitine alkalın fosfataz uygulanmıştır. Uygulama sonrasında her iki kesim örneklerine de PCR saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırma yapılan örnekler %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jel üzerinde pCAMBIA 1304 plazmit saflaştırması ve yaklaşık 1800 bp uzunluğunda bulunan *CINAC* gen kaseti içeren saflaştırılmış DNA görüntülenmiştir (şekil 4.20).



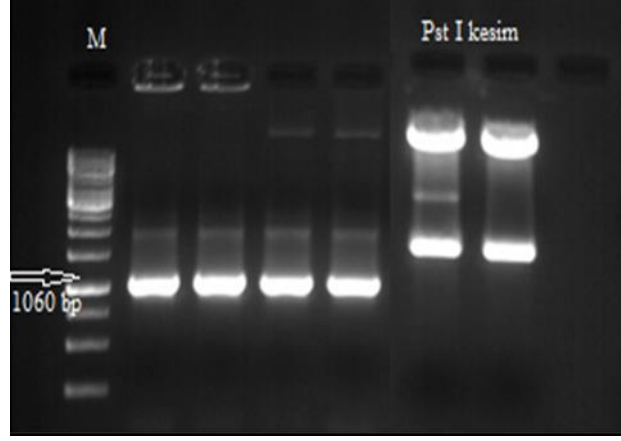
şekil 4.20. pCAMBIA 1304 plazmiti ve *CINAC* gen kaseti içeren saflaştırılmış DNA'nın PstI enzim ile kesim sonrasında yapılan PCR saflaştırma jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

CINAC gen kaseti içeren saflaştırılmış DNA, pCAMBIA 1304 plazmit saflaştırması ve T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak ligasyon yapılmıştır. Daha sonra ligasyon ürününün *E.coli* bakterisi DH5 suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonucunda LB-Kanamisin besi ortamında koloniler meydana gelmiştir. Meydana gelen kolonilerden 38 koloni seçilerek tümüne *CINAC* genine spesifik primerler kullanılarak (MSC 229 ve MSC 230) koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR sonrasında yaklaşık 1074 bp uzunluğunda beklenen 2 pozitif koloni belirlenmiştir (şekil 4.21).



Şekil 4.21. *CINAC* gen kasetinin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması sonucunda elde edilen kolonilerin MSC 229-230 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü. 1-38: Koloni PCR ürünleri

CINAC gen kasetinin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması sonucunda belirlenen pozitif kolonilerden 4. ve 7. koloniler için plazmit saflaştırması yapılmıştır ve gliserol stokları hazırlanmıştır. Jelde görülen sıra ile pozitif bulunan 4. ve 7. kolonilerin çizimleri ve plazmit saflaştırmaları kullanılarak tekrar gen spesifik (MSC 229 ve MSC 230) primerler ile PCR yapılmıştır. Ayrıca pozitif olarak belirlenen 4. ve 7. plazmit saflaştırmalarına *PstI* ile 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakılarak kesim yapılmıştır. 4. ve 7. Pozitif koloniler için yapılan PCR örnekleri ve *PstI* enzimi ile yapılan kesimin ardından %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Jelde beklenen yaklaşık 1074 bp uzunluğunda bantlar görülmüştür. Kesimin ardından ise jel üzerinde plazmit ve *CINAC* gen kaseti ayrı ayrı iki bant şeklinde görülmüştür (Şekil 4.22).



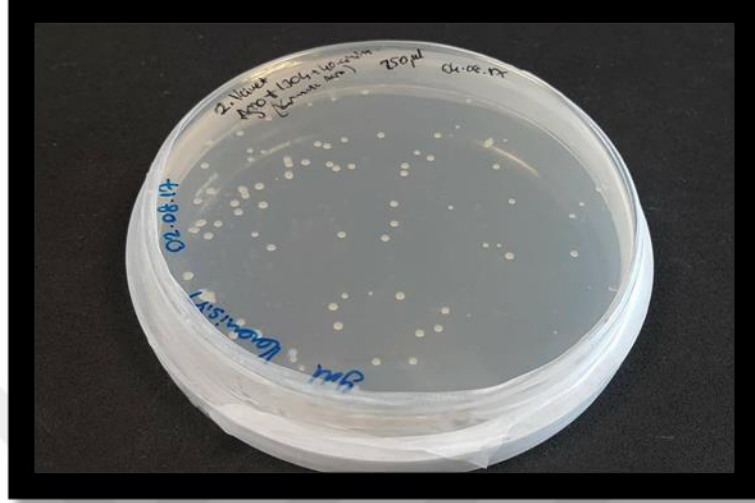
Şekil 4.22. *CINAC* gen kasetinin pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanması sonucunda elde edilen pozitif kolonilerin MSC229-230 primerleri ile yapılan PCR jel görüntüsü ve *PstI* ile kesim görüntüsü. M: DNA büyüklük markörü

4.5.3. pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörüne klonlanan *CINAC* gen kasetinin elektroporasyon yöntemi ile *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404'e aktarımı

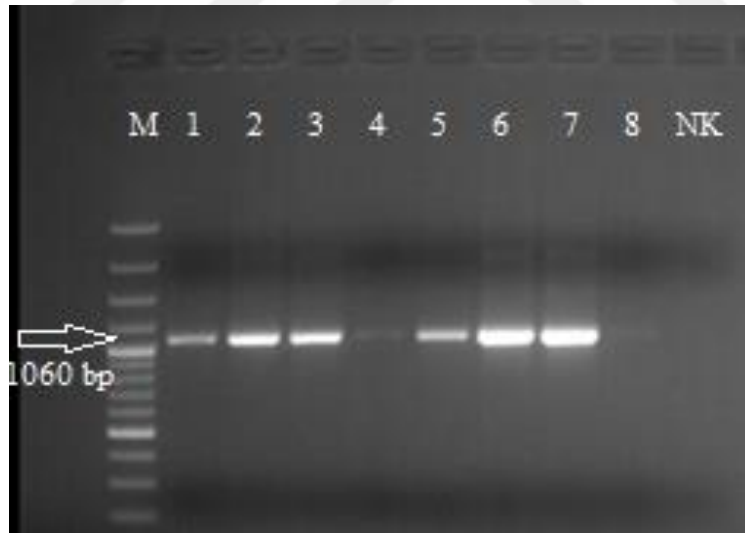
CINAC gen kasetinin yer aldığı pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörünün gliserol stoğu kullanılarak katı YM kanamisin besi ortamına çizimi yapılarak 1 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra üremenin gerçekleştiği katı besi ortamından sıvı besi ortamına ekim yapılmış ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de 1 gece üremeye bırakılmıştır. Üremenin olduğu sıvı ortamdan plazmit saflaştırması yapılmıştır. *CINAC* gen kasetinin yer aldığı pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörü plazmit saflaştırmasından 5 µl ve electrocompetent *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 saflaştırmasından ise 20 µl kullanılarak buz üzerinde yer alan elektroporasyon küveti içerisine aktarılmıştır. Daha sonra ise cihaz üzerinde yer alan Agr seçilerek elektroporasyon küveti cihaza yerleştirilmiş ve *Agrobacterium* elektrocompetent hücrelerinin porlarının açılması sağlanarak *NAC* geninin yer aldığı pCAMBIA 1304 plazmitinin hücre içerisine girişi sağlanmıştır. Bu şekilde elektroporasyon yöntemi ile transformasyon gerçekleştirilmiştir.

Transformasyon sonrasında elde edilen bakteri külürünün kanamisin içeren YM besi ortamına yayması yapılmıştır ve iki gün 28 °C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrasında ise koloniler meydana gelmiştir (Şekil 4.23). Meydana gelen kolonilerden 8 tane seçilerek bir de negatif kontrol olarak su kullanılarak gen spesifik

(MSC 229 ve MSC 230) primerleri ile koloni PCR yapılmıştır. Yapılan koloni PCR sonrasında yaklaşık 1074 bp uzunluğunda beklenen bant büyüklüğü 6 kolonide pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. *CINAC* gen kasetinin klonlandığı pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*'e transformasyonu sonrasında oluşan koloniler



Şekil 4.24. *CINAC* gen kasetinin klonlandığı pCAMBIA 1304 vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*'e transformasyonu sonrasında oluşan kolonilere gen spesifik MSC 229-230 primerlerle yapılan koloni PCR gel görüntüsü M: DNA büyüklük markörü. 1-8: PCR ürünleri. NK: Negatif kontrol

Daha sonra pozitif olarak belirlenen örneklerden biri seçilerek sıvı YM kanamisin besi ortamına ekimi yapılmış ve iki gün 28 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda üreme meydana gelmiştir. Sıvı besi yeri ortamında büyütülen kùlürden gliserol stoğu hazırlanmıştır ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Sonuç olarak *NAC* gen kaseti pCAMBIA 1304 vektörüne klonlanmıştır ve ardından *Agrobacterium tumefaciens*’e de transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.5.4. pCAMBIA 1304 ikili transformasyon vektörüne klonlanan ve *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404’e aktarımı yapılan *CINAC* geninin turunç anacına transformasyonu

4.5.4.1. Tohum sterilizasyonu ve ekimi

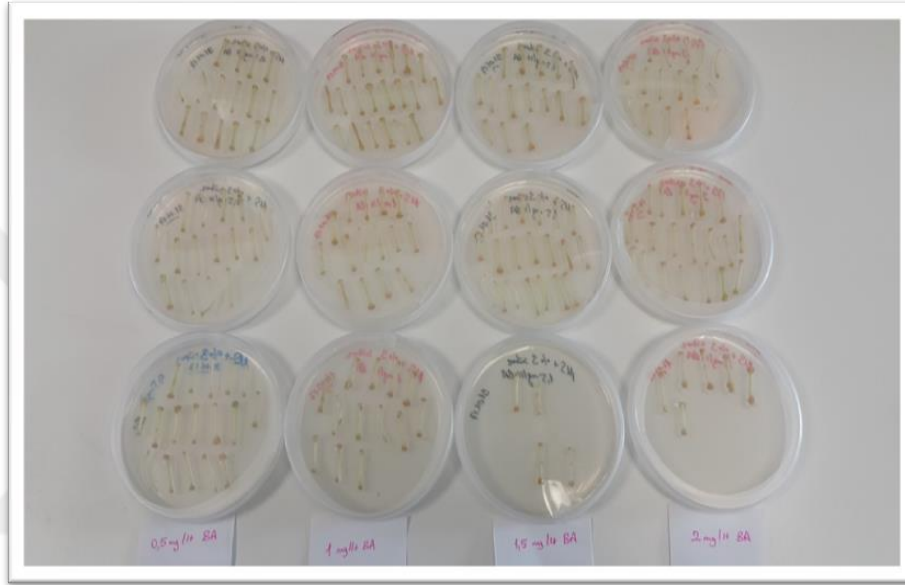
Turunç tohumlarının dış kabukları soyulduktan sonra yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumların 7 gl⁻¹ agar içeren MS ortamına ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekimleri yapılan turunç tohumları 5-6 hafta karanlık ortamda yetiştirilmiştir. Yapılan denemelerde ekilen tohumların büyük çoğunluğunun çimlendiği ve yeterli düzeyde gelişerek epikotil oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak ekilen tohumların bazıları hiç çimlenmezken bazılarında da çimlen gerçekleşmiş ancak yeterli düzeyde gelişerek sürgün ve epikotil elde edilememiştir. Çimlenmeyen tohumlarda genellikle bulaşma görülmüş olup bu tohumların üzerinde ve besiyerlerinde fungal büyüme ve renk değişiklikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca çimlenen tohumların bazılarında da çimlendikten sonra sürgün oluşumu gözlemlenmiş ancak sürgün ucunda kararma ve geriye doğru ölüm oluşarak epikotil gelişimi gerçekleşmemiştir. Ancak çimlenen tohumların sürgünlerinden genetik transformasyon için yeterli epikotil elde edilmiştir.

4.5.4.2. Turunç epikotil parçalarının transformasyonunda sürgün gelişim konsantrasyonunun belirlenmesi

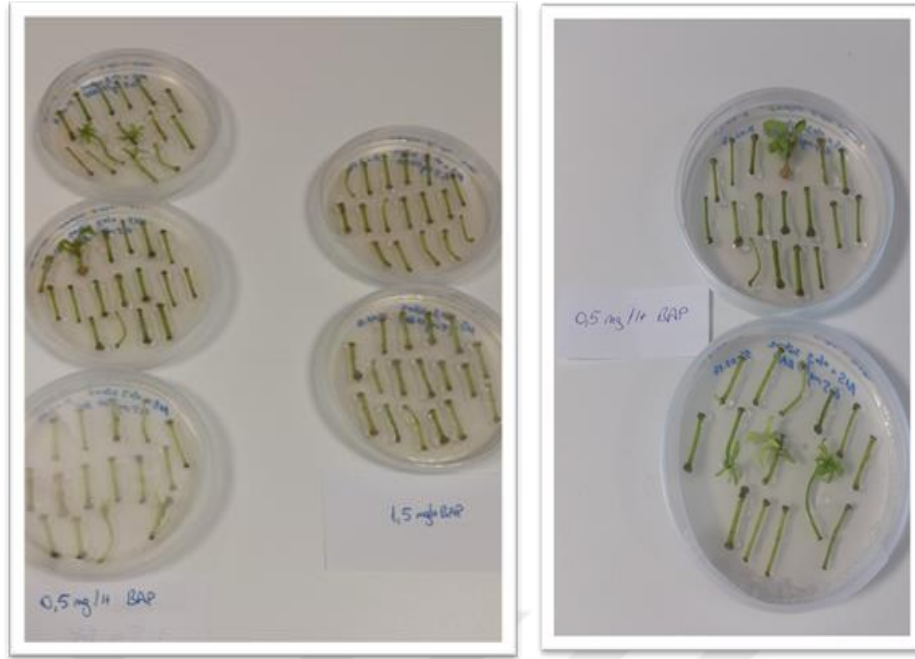
Etiole olmuş turunç bitkiciklerine transformasyonun gerçekleşmesi için uygulanan spesifik bir prosedür bulunmamaktadır. Bu nedenle sürgün gelişim aşaması için uygun BAP konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı düzeyde BAP konsantrasyonları denenmiştir. Bunun için kesilen turunç gövde segmentlerinin *Agrobacterium tumefaciens* ile herhangi bir inokülasyonu gerçekleştirilmeden direk sürgün gelişimi ortamlarına aktarımı yapılmıştır. Bu deneme de sürgün gelişim

ortamı için MS içerisine yalnızca farklı BAP konsantrasyonları kullanılmıştır. BAP konsantrasyon miktarları $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, 1 mg l^{-1} , $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ ve 2 mg l^{-1} olarak belirlenmiştir.

Yetiştirilen turunç bitkiciklerinin gövde segmentleri her bir petri kabında eşit sayıda ve her bir konsantrasyon için 3'er petri kabı olacak şekilde belirlenerek 4 farklı BAP konsantrasyonu ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$, 1 mg l^{-1} , $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ ve 2 mg l^{-1}) olan MS besi ortamlarına geçirilmiştir ve 2 hafta aralıklarla farklı BAP konsantrasyonu olan MS besi ortamları ile aynı şekilde tekrar al külüre alınmıştır (Şekil 4.25, 4.26, 4.27).



Şekil 4.25. $0,5$, 1 , $1,5$ ve 2 mg l^{-1} BAP konsantrasyonu içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunç segmentlerinin ikinci (üstte) ve dördüncü haftalardaki görüntüsü



Şekil 4.26. 0,5 ve 1,5 mg⁻¹ BAP konsantrasyonu içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunç segmentlerinin alıncı (solda) ve sekizinci haftalardaki görüntüsü



Şekil 4.27. 0,5 mg⁻¹ BAP konsantrasyonu içeren sürgün gelişim ortamında bulunan turunç segmentlerinin onuncu haftadaki görüntüsü

Yapılan bu deneme ile *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı yapıldıktan sonra elde edilecek olan transgenik turunç bitkilerinin sürgün gelişimi için uygun BAP konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, turunç bitkilerinin sürgün gelişim için 0,5 mg⁻¹ BAP konsantrasyonunun uygun olduğu belirlenmiştir.

4.5.4.3. Epikotil parçalarının transformasyonu

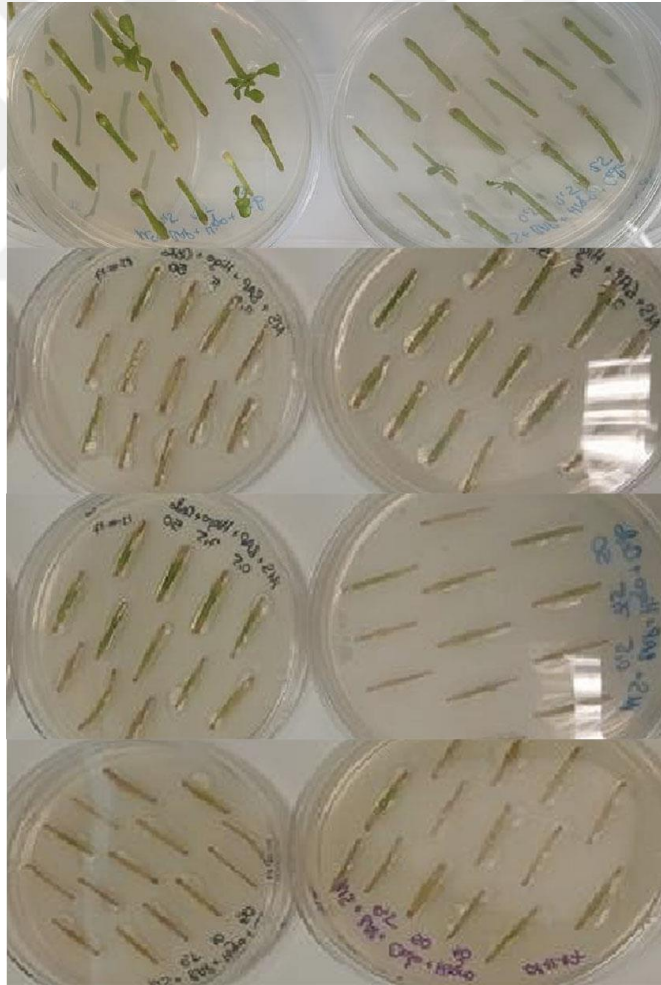
CINAC genini içeren pCAMBIA 1304 ikili vektörünü taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ırkı uygun antibiyotik içeren YEP ortamı içerisinde büyütülmüştür. Büyütülen *Agrobacterium* son konsantrasyonu 5×10^8 cfu/ml olacak şekilde MS ortamı içerisinde sulandırılmış karışıma 100 mM asetosiringon eklenerek gen aktarımı için uyarılmış *Agrobacterium* süspansiyonu elde edilmiştir. Işıksız ortamda yetişen fidelerin epikotil kısımlarından 1'er cm'lik parçalara bölündükten sonra hazırlanan *Agrobacterium* süspansiyonu içerisinde bir dak.. inoküle edilmiştir. İnoküle edilen segmentler petri ortamına asetosiringon içeren MS ortamına alınarak *Agrobacterium* ile karanlıkta oda sıcaklığında 2-3 gün ko-külivasyona tabi tutulmuştur. (Şekil 4.28).

4.5.4.4. Turunç epikotil parçalarının rejenerasyonu ve seleksiyonu

Ko-külivasyon yapılan epikotil segmentlerinin organogenez yoluyla sürgün gelişimi sağlanmaya çalışılmıştır. İlk olarak epikotil segmentlerinin sürgün gelişiminin teşviki için daha önce herhangi bir gen aktarımı yapılmadan gövde segmentlerinin sürgün gelişimi için belirlenen $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BAP konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu nedenle sürgün gelişimini teşvik eden $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BAP ve ortamda kalan *Agrobacterium*'u inhibe etmek için (50 mg l^{-1} cefotaxime sodium sal) eklenmiş MS besi ortamları kullanılmıştır. Bu MS besi ortamlarına ek olarak higromisin antibiyotiği eklenmiştir. Bu şekilde gen aktarımı yapılan sürgünlerin gen aktarımı yapılmayan sürgünlerden ayırt edilmesi sağlanmıştır. Uygun higromisin konsantrasyonunun belirlenmesi için ilk olarak $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, 5 mg l^{-1} , $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ ve 10 mg l^{-1} konsantrasyonlarında farklı konsantrasyonlarda sürgün gelişiminin olup olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.29). Daha sonra bunlar bitki büyüme dolabında beyaz florosan ışık altında ve $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 16 saatlik fotoperiyotta 4-5 hafta süreyle muhafaza edilmiştir. Bu muhafaza süresi içerisinde sürgünlerin bulunduğu MS besi ortamları 2 haftada bir al külüre alınmıştır. Transformasyon için toplam 360 epikotil parça kullanılmıştır.



Şekil 4.28. 2,5 mg⁻¹, 5 mg⁻¹, 7,5 mg⁻¹ ve 10 mg⁻¹ higromisin konsantrasyonları içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunc segmentlerinin ikinci haftadaki görüntüsü

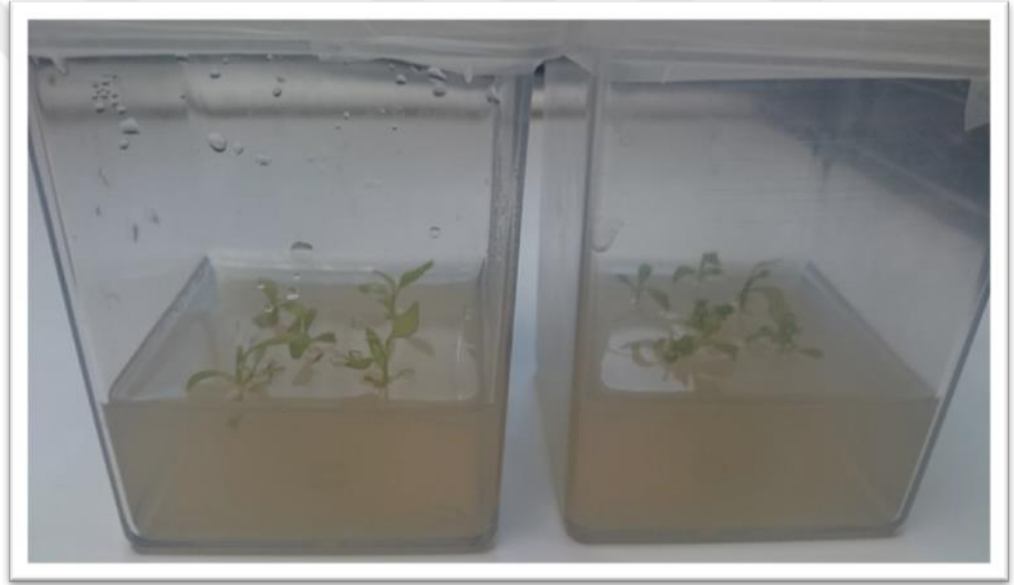
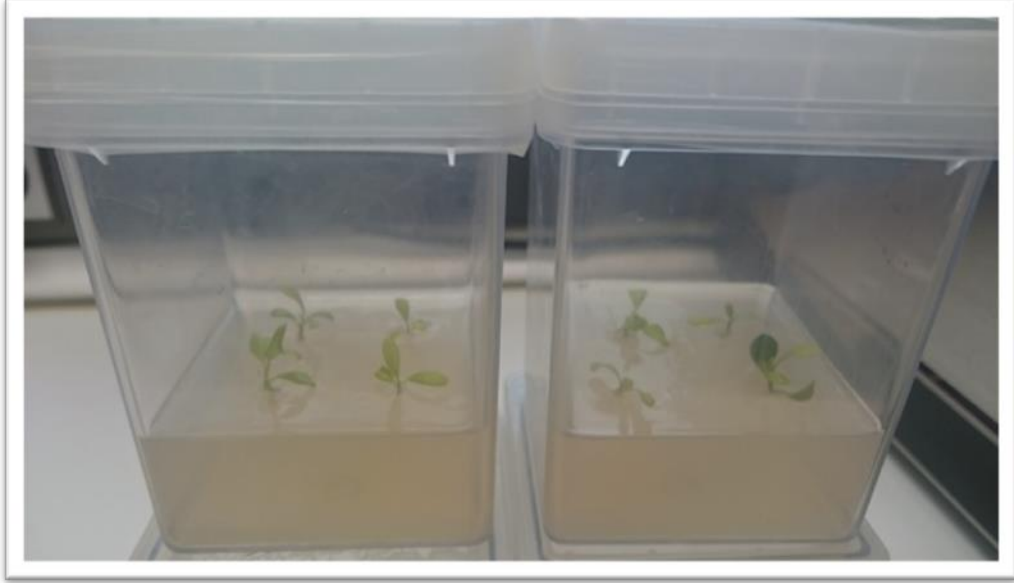


Şekil 4.29. 2,5 mg⁻¹, 5 mg⁻¹, 7,5 mg⁻¹ ve 10 mg⁻¹ higromisin konsantrasyonları içeren sürgün gelişim ortamlarında bulunan turunc segmentlerinin dördüncü haftadaki görüntüsü

Transgenik turunç segmentleri için deneme yapılan sürgün gelişim ortamındaki 5 mg^l⁻¹, 7.5 mg^l⁻¹ ve 10 mg^l⁻¹ Higromisin konsantrasyonu için segmentlerde kuruma görülmüştür ancak 2.5 mg^l⁻¹ Higromisin konsantrasyonunda ise sürgün gelişimi görülmüştür. Bu nedenle sürgün gelişim ortamında kullanılacak Higromisin konsantrasyonu 2.5 mg^l⁻¹ olarak belirlenmiştir.

4.6. Trasgenik Sürgünleri Köklendirme

Şeçici besiyerinde gen akatırımı yapılan epikotil parçalarının uçlarında gelişen potansiyel transgenik sürgünler teker teker kesilerek epikotil paraçalarından ayrılmıştır. Kesilen higromisin dirençli 5-10 mm uzunluğundaki sürgünlerin önce dip kısmından, histokimyasal GUS boyaması için küçük bir parça kesilmiştir. Geriye kalan kısımları köklendirme amacıyla NAA içeren köklendirme ortamına alınmıştır. Köklendirme ortamına alınan sürgünler köklenmesi için periyodik aralıklarla taze köklendirme ortamına alınarak 8-24 hafta süreyle köklenmeleri beklenmiştir. Bu süre içerisinde sürgünlerin diplerinde kallus dokusu oluşmasına rağmen hiç biri köklenmemiştir. Meydana gelen sürgünler kullanılarak 0.5 mg^l⁻¹ NAA olan köklendirme ortamlarına alınmıştır ve denemelere devam edilmiştir (Şekil 4.30, 4.31, 4.32).



Şekil 4.30. Turunç segmentlerinden gelişen sürgünlerin 6. haftadaki 0,5 mg⁻¹ NAA köklendirme ortamındaki görüntüsü



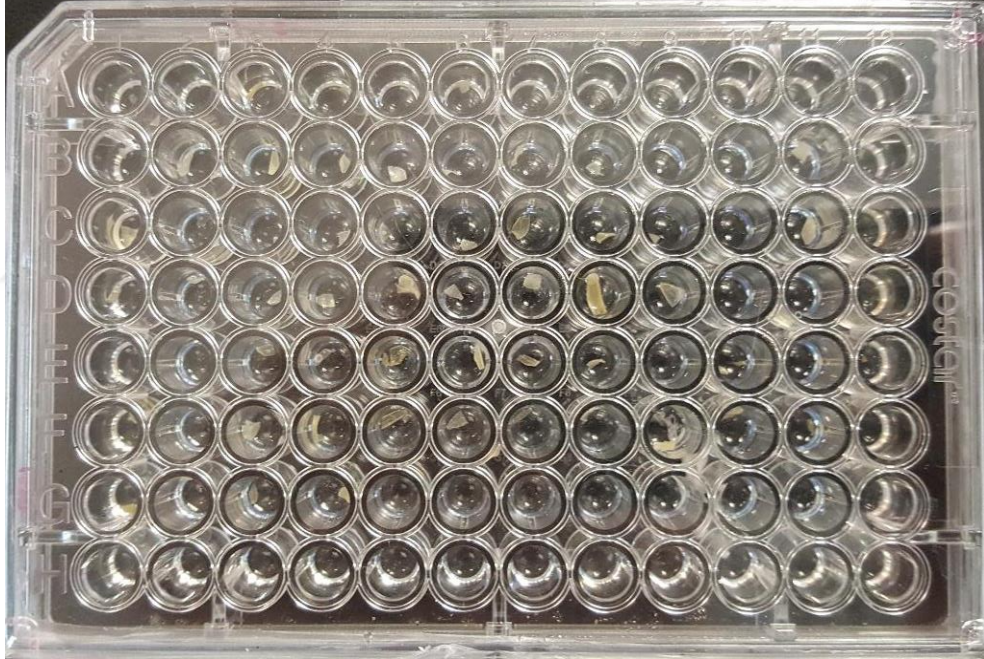
Şekil 4.31. Turunç segmentlerinden gelişen sürgünlerin 8. haftadak.i $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA köklendirme ortamındak.i görüntüsü



Şekil 4.32. Turunç segmentlerinden gelişen sürgünlerin 10. haftadak.i $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA köklendirme ortamındak.i görüntüsü

4.7. Glukuronidaz (GUS) testi

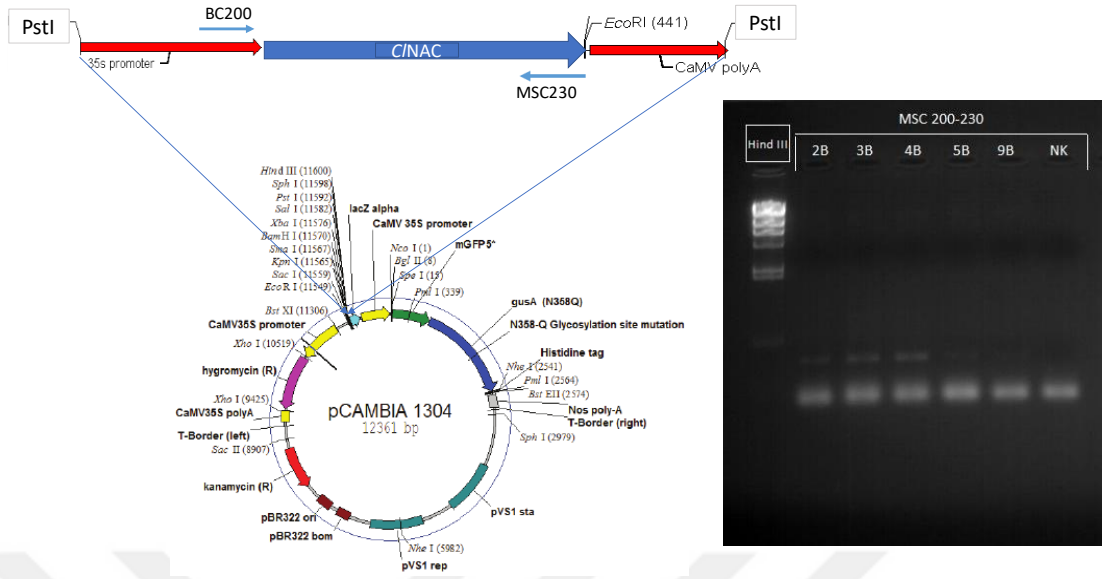
Epikotil parçalarının uçlarında gelişen sürgünler köklendirme ortamına alınmadan önce uç kısımlarından 1-2 mm'lik küçük parçalar kesilerek 96 çukurlu plakaların her bir çukuruna bir örnek gelecek şekilde mikro plakalara aktarılmıştır. Bu doku parçalarına daha sonra glukuronidaz solüsyonu eklenerek materyel ve yöntem kısmında belirtildiği gibi GUS boyaması yapılmıştır. Boyaması tamamlanan sürgün parçacıkları arındırıldıktan sonra gözle ve mikroskop altında incelenerek GUS boyama sonuçları analiz edilmiştir. Çıplak gözle veya steromikroskobu altında GUS boyaması yapılan doku parçalarında mavi renk oluşumu incelenmiştir. Bu amaçla 43 adet sürgüne GUS testi yapılmış test edilen örneklerin hiç birinde GUS raportör gen aktivitesi görülmemiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Transgenik olup olmadığı test edilen turunç bitkilerinin GUS testi

4.8. PCR Testi

GUS testi sonucunda negatif sonuç veren bitkilerin transgenik olup olmadıkları bitki büyütme kabininde biraz daha gelişme gösterdikten sonra PCR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan PCR analizleri sonucunda transgenik olarak elde edilen herhangi bir bitkinin elde edilmediği anlaşılmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Transgenik olup olmadığı test edilen turunç bitkilerinin PCR analizi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada öncelikle Şahin-Çevik vd. (2010; 2017) tarafından kuraklıkta aktif olduğu bilinen *NAC* geninin kısmi baz dizilimi kullanılarak RACE-PCR yöntemi ile 5' ve 3' uç kısımlarının cDNA dizileri elde edilerek tüm gen izolasyonu yapılmıştır. Rangpur laym bitkisinden tüm gen olarak izole edilen *NAC* geninin BLASTX ve BLASTN analizleri sonucunda *NAC* geninin Gen Bankasında bulunan ve streslerde etkili olduğu bilinen diğer *NAC* genleri ile benzer olduğu belirlenmiştir. En fazla benzer olduğu *NAC* genleri aralarında portakal (*Citrus sinensis*) ve mandarin (*Citrus clementina*) başta olmak üzere kakao (*Theobroma cacao*), pamuk (*Gossypium hirsutum* ve *G. raimondii*), çilek (*Fragaria vesca*) ve Çin gülü (*Rosa chinensis*) bitkilerinde bulunan *NAC* DNA bağlanma bölgesi içeren 72 geni ile benzerlik göstermiştir. *NAC* DNA bağlanma bölgesi içeren 72 geninin diğer isimleri ANAC072, F27G19.10, NAC072 ve RD26'dır. *NAC* genleri arasında yer alan ve kuraklıkta oldukça etkili olan *RD26* geni *Arabidopsis* bitkisinden dehidrasyon sonucu izole edilen ve abiyotik streslerde etkili olarak bulunan ilk *NAC* genidir (Yamaguchi-Shinozaki vd., 1992).

Model bitki *Arabidopsis* bitkisinde yapılan çalışmalar *Arabidopsis* bitkisinden izole edilen *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072* *NAC* genlerinin aktivitelerinin kuraklık ve tuz stresleri sırasında ve ABA ve metil jasmonat uygulamaları ile arttığı belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072* *NAC* genlerinin *Arabidopsis* bitkisinde kuraklık stresi de dahil olmak üzere diğer abiyotik streslere dayanımda etkili olan dehidrasyona erken cevap veren (Early Responsive to Dehydration 1), *ERD1* geninin promotör bölgesine bağlanarak *ERD1* geninin aktivitesini başlattıkları gösterilmiştir (Tran vd., 2004). *ERD1* geninin diğer bir özelliği de *Arabidopsis* bitkisinden izole edilen ikinci *NAC* geni olmasıdır (Kiyosue vd., 1993). *ERD1* geni ile daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda ise *ERD1* geninin abiyotik streslere tolerans sırasında yer almasının yanında aynı zamanda senesens ve etiolleşme sırasında da rollerinin olduğu Nakashima vd. (1997) tarafından belirlenmiştir.

Nuruzzanman vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada streslere cevapta rol oynayan *NAC* genlerinin SNAC (strese cevap veren *NAC* grubu, stress-responsive

NAC group) grubu içerisinde bulunduğu gösterilmiştir. SNAC grubuna dahil olan NAC genleri bitkilerde savunma mekanizmasından sorumlu genlerin aktivitelerini düzenlemektedirler. Çelikle yapılan bir çalışmada SNAC-A grubunda yer alan *OsNAC3*, *OsNAC4*, *OsNAC5*, *OsNAC6* ve *SNAC1* genlerinin ekspresyonlarının kuraklık, tuzluluk veya soğuk stresleri sırasında arttığı belirlenmiştir (Takasaki vd., 2010). *Arabidopsis* bitkisinden izole edilen *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072* NAC genlerinin de SNAC grubu içerisinde yer aldığı bildirilmiştir (Tran vd., 2004).

Bu tez çalışması kapsamında izole edilen ve gen transformasyon çalışmalarında kullanılan *CINAC* genine benzerlik gösteren *ANAC072* geni diğer bitkilerden de izole edilerek abiyotik stresler sırasında aktivitelerindeki değişimler gözlemlenmiştir. *ANAC072* genine benzeyen ve aynı zamanda *ANAC019* ve *ANAC055* genlerine de benzerlik gösteren bir NAC geni Ohnishi vd. (2005) tarafından çelik bitkisinden izole edilmiş ve *OsNAC6* geni olarak adlandırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda *OsNAC6* geninin ekspresyonunun soğuk, tuz ve kuraklık stresleriyle ve ABA ve metil jasmonat uygulamaları ile arttığı belirlenmiştir.

Rangpur laymdan izole edilen NAC geninin NAC DNA bağlanma bölgesini taşıyıp taşımadığına belirlemek için yapılan analizde (korunmuş DNA bağlanma bölgesi araştırması, conserved domain search, CD) diğer bitkilerde yer alan NAC DNA bağlanma bölgesi ile benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan CD araştırmaları sonucunda bu proteinin sadece bitkilerde bulunan NAC proteinlerine adını veren domainlerden biri olan NAM (No Apikal Meristem) domainine sahip olduğu tespit edilmiştir. NAM (no apical meristem) ATAF (*Arabidopsis* transcription activation factor) ve CUC (cup-shaped cotyledon) proteinlerinin içerdikleri ortak domain NAC olarak adlandırılmaktadır. NAC TF'leri bitkilerde bulunan en büyük TF ailelerinden birisini oluşturmaktadır (Olsen vd., 2005).

CINAC geninin kodladığı proteinin amino asit dizilerinin diğer bitkilerde yer alan ve benzerlik gösterdiği 24 tane NAC geni ile yapılan çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda *CINAC* proteininin diğer NAC proteinleriyle özellikle NAC domaininin bulunduğu amino terminal kısmında yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Benzerlik gösterdiği 24 NAC genleri aralarında elma (*Malus domestica*), şeftali (*Prunus persica*), çilek (*Fragaria vesca*), kakao (*Theobroma*

cacao), pamuk (*Gossypium hirsutum*), kavak (*Populus euphratica*), asma (*Vitis vinifera*) ve cevizin (*Juglans regia*) de yer aldığı farklı bitki gruplarından oluşmaktadır.

Yapılan filogenetik analiz sonucunda ise *CINAC* geninin farklı bitkilerden NAC genleri ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. *CINAC* geninin en çok benzerlik gösterdiği NAC genleri portakal (*Citrus sinensis*) ve mandarin (*Citrus clementina*) NAC genleridir. Çok benzerlik gösterdiği diğer bir grup ise elma (*Malus domestica*), şeftali (*Prunus persica*) ve çilek (*Fragaria vesca*) meyvelerinden izole edilen NAC genlerinin oluşturduğu gruptur. Bu gruplardan sonra benzerlik gösterdiği diğer bir grup ise (*Theobroma cacao*), pamuk (*Gossypium hirsutum*) ve kavak (*Populus euphratica*) bitkilerinden izole edilen NAC genleri ile benzerlik göstermektedir.

Rangpur laym bitkisinden kuraklık stresi sırasında aktivitesi artan genler arasında yer alan (Şahin-Çevik vd., 2010; Şahin-Çevik vd., 2017) ve daha sonra da tüm gen olarak izolasyonu gerçekleştirilen ve *CINAC* geni olarak isimlendirilen bu genin yapılan analizler sonucunda abiyotik streslerde etkili olabileceği belirlenmiştir. Bugüne kadar farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda NAC TF'lerinin aralarında abiyotik ve biyotik streslere dayanıklılığında bulunduğu birçok farklı süreçte rollerinin olduğu belirlenmiştir (Nakashima vd., 2012; Puranik vd., 2012). *CINAC* geninin Rangpur laym bitkisinde kuraklık stresine dayanımdaki rolünü tam olarak belirlemek amacıyla *CINAC* geninin ifadesi 14 günlük kuraklık stresi sırasında öncelikle Rangpur laymda daha sonra da Akdeniz iklim kuşağında yaygın olarak kullanılan bir turunçgil anacı olan turunç anacında 14 günlük kuraklık stresi sırasında incelenmiştir. Yapılan real-time PCR analizleri sonucunda turunçgillerde kuraklık stresine en dayanıklı anaçlardan biri olan Rangpur laym bitkisinde kuraklık stresi sırasında aktivitesi artış gösterirken kuraklık stresine dayanıksız ve/veya orta düzeyde tolerans gösteren turunç anacının aktivitesinde değişiklikler gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada ve farklı bitkilerde yapılan birçok çalışmada gözlemlendiği gibi NAC TF'nin abiyotik stresler sırasında özellikle kuraklık stresine dayanımda oldukça etkili oldukları belirlenmiştir (Pinheiro vd., 2009; Lv., 2016; Wu vd., 2016; Gong vd., 2019).

CINAC geninin kuraklık stresi sırasında Rangpur laym bitkisinde aktivitesinin olup turunç anacında olmaması nedeniyle yapılan bu tez çalışması kapsamında da *CINAC* geninin turunç anacında aşırı düzeyde ifade edilerek kuraklığa daha dayanıklı turunç anacı geliştirilmeye çalışılmıştır. Bugüne kadar diğer bitkilerde yapılan çalışmalarda değişik *NAC* genlerinin bitkilerde aşırı düzeyde ifade edilmesi ile (ekspres edilmesi) bitkilerin abiyotik streslere karşı dayanıklılık düzeyleri arttırılmıştır.

Birçok araştırma sonucunda *NAC* TF'nin kök gelişimi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Abiyotik streslere özellikle kuraklık stresine adaptasyonda bitkinin kök gelişiminin büyük etkisi bulunmaktadır (Tran vd., 2010). *Arabidopsis* bitkisinden izole edilen *AtNAC1* ve *AtNAC2* *NAC* genlerinin aşırı düzeyde ifade edildiği transgenik bitkilerin kök gelişimlerinin daha iyi olduğu belirlenmiştir ve aynı zamanda bu bitkilerde abiyotik streslerde etkili olduğu bilinen birçok genin de aktif hale geldiği belirlenmiştir (Xie vd., 2000; He vd., 2005). Yapılmış olan bu çalışma ile *NAC* TF'lerinin bitkide kuraklığa karşı tolerans sağlamak amacıyla hem kök gelişiminden sorumlu genlerin aktivitelerini artırdığı hem de kuraklık stresine dayanımda rol oynayan fonksiyonel proteinlerin aktivitelerini artırdığı sonucuna varılmıştır.

Yine *Arabidopsis* bitkilerinden izolasyonları yapılan *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072* *NAC* genlerinin ayrı ayrı olarak aşırı düzeyde ifade edilmeleri ile elde edilen transgenik bitkilerle yapılan mikroarray analizleri sonucunda stresler sırasında aktif hale gelen birçok genin transgenik bitkilerde de artmış oldukları gözlemlenmiştir. Aynı zamanda elde edilen transgenik bitkilerin kuraklığa karşı toleranslarında da önemli derecede artışlar olduğu belirlenmiştir (Tran vd., 2004). Yapılan bu çalışmalar *NAC* genlerinin bitkilerin kuraklık stresine dayanımda önemli rollerinin olduğunu bildiren ilk çalışmalardır.

Arabidopsis bitkisinde dehidrasyon sırasında aktivitesi artan ve yapılan bu tez çalışması kapsamında da çalışılan *CINAC* genine benzerlik gösteren *RD26* geninin aşırı ifade edildiği transgenik bitkilerde ise ABA tarafından ve streslerle uyarılan genlerin aktivitelerinde artış görüldüğü belirlenirken; inaktif edildiği transgenik bitkilerde bu genlerin aktivitelerinde azalmaların olduğu gözlemlenmiştir (Fujita vd.,

2004). Bu çalışma aynı zamanda *RD26* geninin stresler sırasında rol oynayan birçok genin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir.

Arabidopsis bitkisinde yapılan başka bir çalışmada ise bu tez çalışması kapsamında tüm gen olarak izole edilen *CINAC* genine benzerlik gösteren ve abiyotik streslerde etkili olduğu bilinen *RD26 NAC* geninin homoloğu olan *ATAF1* geni aşırı düzeyde ifade edilerek transgenik bitkiler elde edilmiştir. Elde edilen transgenik bitkilerin kuraklık stresi sırasındaki toleranslarında artışlar olduğu belirlenmiştir (Wu vd., 2009). Aynı zamanda bu çalışmayla *RD26 NAC* geninin homoloğu olan *ATAF1* geninin de streslere toleransta etkili olan genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek hücre ve organelleri kuraklık stresinin yaratmış oldukları zararlı etkilerden korudukları düşünülmektedir.

Çelikte yapılan başka bir çalışmada ise SNAC-A grubunda yer alan *SNAC1* geninin aşırı ifade edilmesi ile elde edilen transgenik çelik bitkilerinin kuraklık ve tuz streslerine karşı dayanıklı oldukları gözlemlenmiştir (Takasaki vd., 2010). Bitkilerde yer alan SNAC grubu genler bitkilerin streslere dayanımında rol oynayan genlerdir. Rangpur laym bitkisinden izole edilen *CINAC* genine benzer olduğu BLAST analizleri ile belirlenen genler aynı zamanda SNAC gruplarının da üyeleridir.

Yapılmış olan bu tez çalışması kapsamında da tüm gen olarak izolasyonu gerçekleştirilen *CINAC* geninin turunç anacında aşırı düzeyde ifade edilmesiyle turunç anacının kuraklık stresine karşı tolerans düzeyinin de büyük olasılıkla arttırılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla da bu çalışma kapsamında *CINAC* geninin turunç anacına *Agrobacterium* aracılığı ile transformasyonunun gerçekleştirilmesine çalışılmıştır. Ancak *CINAC* geninin turunç anacına transformasyonu ile yapılan çalışmalarda pek çok zorluklar ile karşılaşmıştır.

Turunçgillerde yaklaşık 20 yıldır transformasyon çalışmaları yapılmaktadır. Turunçgillerde başarılı gen transformasyon çalışmaları yapabilmek için her bitki tür ve çeşidinde olduğu gibi optimize edilmiş *in vitro* rejenerasyon protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle de araştırmacılar, gen transformasyon çalışmalarına başlamadan önce verimli rejenerasyon protokolünü çalışılacak olan tür ve/veya çeşit için geliştirmelidir. Bugüne kadar turunç bitkisi için yapılmış olan gen

transformasyon çalışmaları literatürde fazla yer almamaktadır. Bu nedenle de yapılmış olan bu tez çalışması kapsamında öncelikle bugüne kadar farklı tür ve çeşitlerde başarıyla uygulanmış protokoller gözden geçirilerek turunç anacı için uygun bir protokol geliştirilmeye çalışılmıştır.

Gen transformasyon çalışmalarında genin bitki içerisinde aktif hale gelebilmesi için uygun bir promotör alında çalışmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle de bu çalışma kapsamında yapılan gen transformasyon çalışmalarında kuraklığa dayanıklı Rangpur laymı bitkisinden izole edilen *CINAC* geni ve CaMV 35S promotörü ve terminatörü arasında klonlanarak aktif gen yapısı oluşturulmuştur. CaMV promotör ve terminatör bölgesi bitkilerde gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan düzenleyici elementlerdendir. Kullanıldıkları genlerin bitki hücresinde fazla miktarda mRNA üretilmesini sağlayarak genlerin aşırı düzeyde ifade edilmelerine yol açan güçlü bir promotör olduğu için bu çalışmada düzenleyici element olarak kullanılmıştır. Turunçgillerde daha önce yapılan gen aktarım çalışmalarında da CaMV 35S promotörü kullanılmıştır (Luth ve Moore, 1999; evik vd., 2012).

Oluşturulan gen yapısı daha sonra pCAMBIA 1304 binary vektörüne klonlanmıştır. Bitki transformasyonunda kullanılan çok sayıda binary plazmit olmasına rağmen gen aktarımında yaygın olarak kullanılan ve standardize edilmiş bir binary vektör seti olan pCAMBIA (Febres vd., 2003) tercih edilmiştir. Turunçgillerde daha önce yapılan birçok transformasyon çalışmasında da pCAMBIA binary vektör serisi başarılı bir şekilde kullanılmıştır (evik vd., 2012; Cervera vd., 2009; Miyata vd., 2012). pCAMBIA binary vektör serisi içerisinde çok sayıda plazmit vetörü olmasına rağmen bu çalışmada gene aktarımında kullanılacak NAC geni pCAMBIA 1304 plasmitine klonlanmıştır. pCAMBIA 1304'ün seçilmesinin en önemli nedeni raportör gen olarak ise hem GUS hem de GFP geni içermesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte pCAMBIA 1304 plasmiti bitkilerde transformasyonda sıkıntılıların yaşanmasına neden olan ve transgenik bitkilerin seçilmesinde kullanılan higromisin antibiyotik dayanıklılık geni içermektedir.

Binary vektöre klonlama yapıldıktan sonra gen aktarım yöntemi olarak daha önce trungillerde başarılı ve etkin bir şekilde kullanılan *Agrobacterium tumefaciens* tercih edilmiştir (Khan vd., 2012; Zou vd., 2013). *Agrobacterium*'un çok sayıda

rekombinant ırkı bitkilere gen aktarımında kullanılmaktadır. Bu çalışmada ise ticari olarak satılan ve hem elektroporasyon hem ısı şoku transformasyonuna uygun olan LBA4404 ırkı kullanılmıştır. Turunçgillerde farklı gruplar tarafından bugüne kadar yapılan gen aktarım çalışmalarında aralarında LBA105, Agl1, EHA-105 ve LBA4404'ün de bulunduğu farklı *Agrobacterium* ırkları kullanılmıştır (Febres vd., 2003; Ballester vd., 2008; Yang vd., 2011). Bu çalışmada erişim kolaylığı bakımından ve daha önce turunçgil transformasyonunda etkin bir şekilde kullanılan *Agrobacterium* ırkı LBA4404 kullanılmıştır.

Rangpur laym bitkisinden izole edilen *CINAC* geni seçilen promotör, terminatör ve binary vektör sistemleri kullanılarak ve yapılan çalışmanın amacına uygun *Agrobacterium*'a dayalı gen aktarım yöntemi kullanılarak turunç anacına aktarılmıştır. Turunçgillerde gen aktarımı aşamalarında bugüne kadar pek çok farklı bitki dokusu kullanılmıştır. Ancak en yüksek başarı oranı *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlardan elde edilen epikotil parçalarının kullanılması ile elde edilmiştir (Gutierrez vd., 1997; Singh ve Rajam, 2009). Yapılan bu tez çalışması kapsamında da turunç tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilerek epikotil parçaları elde edilmiş ve gen transformasyonunda kullanılmıştır. Ancak bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde 1 cm olarak kesilen epikotil parçalarından oldukça fazla sayıda (7000-1000 adet) kullanılması transgenik bitki elde etme şansını artırdığı rapor edilmiştir (Febres vd., 2003; Çevik vd., 2012).

Gen transformasyon aşamaları arasında en önemli aşamalardan birisi de transformasyonda kullanılacak olan doku parçalarının *Agrobacterium* solüsyonu içerisinde ne kadar süre ile ve nasıl bekletileceğinin belirlenmesidir. Bazı protokollerde bu süre 1 dak. iken bazı protokollerde ise 30 dak.'ya kadar çıkmaktadır (Luth ve Moore 1999; Dominguez vd., 2000). Yapılan bu tez çalışması kapsamında transgenik turunç bitkilerinin elde edilmesinde öncelikle 1 dak. daha sonra da süre bir süre uzatılmıştır. Ancak uygulanan süre transgenik bitki elde edilmesi açısından yeterli olmamıştır. Diğer bir ifade ile *Agrobacterium* solüsyonu içerisinde dokuların ne kadar tutulmasının yeterli olduğu tam olarak belirlenememiştir. Aynı zamanda *Agrobacterium*'un bitki dokularına tam olarak nüfuz etmesi amacıyla bazı protokollerde vacum infiltrasyonu uygulanmaktadır (de Oliveira, 2009). Ancak yapılmış olan bu tez projesi kapsamında bu yöntem uygulanmamıştır.

Turunçgillerde gen transformasyonunun başarısını etkileyen faktörlerden birisi de ko-Külüvasyonun süresidir. Bazı çalışmalarda bu süre 2 gün olurken (Çevik vd., 2012) bazı çalışmalarda ise bu süre 3 gün olarak uzatılmıştır (Dominguez vd., 2000; Boscariol vd., 2003; Khan vd., 2012). Ko-külüvasyon süresinin uzatılması transgenik bitki elde etme oranını da artırdığı gözlemlenmiştir. Yapılmış olan bu tez çalışması kapsamında ko-külüvasyon süresi 2 gün olarak ayarlanmıştır. Bu konuda yapılacak olan çalışmalar kapsamında bu sürenin uzatılması transformasyon etkinliği açısından oldukça önemlidir.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında karşılaşılan zorluklardan birisi de transgenik bitkilerin seçiminde kullanılan higromisin direnç geni için ortamda bulunacak olan konsantrasyonunun ayarlanması olmuştur. Higromisin konsantrasyonu daha önce Li vd. (2003) tarafından Valencia portakal çeşidi ile yapılan gen transformasyonu sonucunda 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ olarak kullanılmıştır. Ve higromisin kullanılarak diğer birçok bitkide yapılan çalışmalar incelendiğinde konsantrasyonun genel olarak 25-50 $\mu\text{g l}^{-1}$ ve bazı çalışmalarda da 3.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Khan vd., 2012) olarak kullanılmıştır. Ancak yapılmış olan bu tez çalışması kapsamında turunç bitkisinde genetik transformasyon amacıyla yapılan çalışmalar sırasında daha önce diğer bitkilerde kullanılan oranlarda higromisin konsantrasyonları kullanılmış ancak sürgün gelişimi elde edilememiştir. Yapılan birçok deneme sonucunda turunç bitkisi için yapılacak olan gen transformasyon çalışmalarında higromisin konsantrasyonunun 2.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ olarak ayarlanmasına karar verilmiştir. Ancak higromisin konsantrasyonunun düşük olarak tutulması transgenik olmayan sürgünlerin de gelişmesine yol açmış ve transgenik bitki olarak elde edildiği düşünülen birçok turunç bitkisinin aslında transgenik olmadığı yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Sonuç olarak gen turunç bitkisi için yapılacak olan gen transformasyon çalışmalarında higromisin antibiyotikliğinin kullanılması önerilmemektedir.

Bu çalışma kapsamında sürgün gelişim ortamında farklı konsantrasyonlar denenmesine rağmen BAP konsantrasyonunun 0.5 mg l^{-1} olmasına karar verilmiş ve çalışmalarda bu konsantrasyon kullanılmıştır. Ancak çalışmada çok fazla sayıda sürgün elde edilmemesinden dolayı sürgün geliştirme ortamında bazı değişikliklerin yapılması bundan sonra yapılacak çalışmaların verimliliği açısından önemlidir. Bu

nedenle de turunç bitkisi için yapılacak olan gen transformasyon çalışmalarında son zamanlarda Ghaderi vd. (2018) tarafından yapılan bazı uygulamaların kullanılması önerilmektedir.

Turunçgillerde gen transformasyon çalışmalarında karşılaşılan diğer bir sorun da köklenme oranının oldukça düşük olmasıdır ve bu çalışma kapsamında köklendirme ortamında ise 0.5 mg l^{-1} NAA kullanılmıştır. Genel olarak bu aşama çalışma açısından başarılı olsa da çok fazla sürgün elde edilmemesinden dolayı transgenik olarak düşünülen çok sayıda köklü bitki elde edilememiştir. Turunçgillerde köklenme ortamında karşılaşılan sorunları gidermek amacıyla elde edilen transgenik sürgünlerin, anaçlar üzerine mikro-aşılama yöntemiyle aşılması oldukça sık kullanılan bir yöntemdir.

Turunçgillerde yapılan gen transformasyon çalışmalarında kullanılan ortamın ve eklenen hormon ve antibiyotik oranlarının turunçgil tür ve çeşitlerinin transformasyon verimliliğini etkilediği yapılan bu çalışma ile gösterilmiştir. Genetik transformasyon yapılan çalışmalarda kullanılan eksplant ve süspansiyonların hazırlanmasının güçlüğü buna ek olarak elde edilen transgenik bitkilerin yetiştirilmesinde zorluklar ve genel olarak turunçgillerde geliştirilen gen transformasyon protokolünün uzun sürmesi turunçgillerde gen transformasyonunun başarı düzeyini etkilemektedir. Ayrıca turunçgillerde *in vitro* ortamda köklenme sırasında karşılaşılan problemlerden dolayı transgenik sürgünlerin sürgün ucu aşılama tekniğiyle *in vitro* ortamda veya serada yetiştirilen anaçlar üzerine aşılama önerilmektedir.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında da Şahin-Çevik vd. (2010, 2017) tarafından Rangpur laym bitkisinden kuraklık stresi sırasında aktivitesinin arttığı ve kısmi baz dizilimi belirlenen iki NAC geninden birinin seçimi yapılmış ve seçilmiş olan bu genin öncelikle tüm gen olarak izolasyonu ve ardından da karakterizasyonu yapılmıştır. Sonra Akdeniz Bölgesi ülkelerinde ve ülkemizde de turunçgil yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan turunç anacının kuraklık stresine karşı dayanımını arttırmak amacıyla Rangpur laym bitkisinden izolasyonu ve karakterizasyonu yapılan *CINAC* geninin Luth ve Moore (1999) tarafından turunçgillerde geliştirilen ve turunçgil epikotil parçalarının *Agrobacterium* aracılığı

ile gen transformasyonunu sağlayan yöntem kullanılarak turunç anacına aktarılmasına yönelik olarak çalışmalar yapılmıştır. Yapılmış olan bu çalışmalar sonucunda transformasyon sonrasında elde edilen 43 adet sürgüne GUS ve PCR testleri yapılmıştır. Ancak GUS veya PCR pozitif olarak herhangi bir transgenik bitki elde edilememiştir.



KAYNAKLAR

- Almeida, W. A. B. D., Mourão Filho, F. D. A. A., Mendes, B. M. J., Pavan, A., Rodriguez, A. P. M., 2003. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. *Scientia Agricola*, 60(1), 23-29.
- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Lemaux, P. G., 2016. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510-1520.
- Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.
- Barampuram, S. and Zhang, Z.J., 2011. Recent advances in plant transformation. *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols*, 1-35.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., & Sharma, K. K., 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant cell reports*, 27(3), 411-424.
- Biçen, B., 2008. Bazı Turunçgil Anaçlarında Farklı Eksplant Kaynağı ve Besi Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi s: 87. *Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. Yüksek Lisans Tezi. S, 104.*
- Blackman, P.G., Davies, W.J., 1985. Root-to-shoot communication in maize plants of the effects of soil drying, *J. Exp. Bot.* 36, 39–48.
- Blum, A., 1986. Breeding Crop Varieties for Stress Environment, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2: 199-237.
- Bond, J. E., & Roose, M. L., 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Reports*, 18(3-4), 229-234.
- Bota, J., Medrano, H., & Flexas, J., 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New phytologist*, 162(3), 671-681.
- Bowler, C., Montagu, M. V., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*, 43(1), 83-116.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Zhang, C., 2011. High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell*, 23(3), 873-894.

- Cao, H., Wang, L., Nawaz, M. A., Niu, M., Sun, J., Xie, J., Bie, Z., 2017. Ectopic expression of pumpkin nac transcription factor cmnacl improves multiple abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 8, 2052.
- Cenci, A., Guignon, V., Roux, N., Rouard, M., 2014. Genomic analysis of NAC transcription factors in banana (*Musa acuminata*) and definition of NAC orthologous groups for monocots and dicots. *Plant molecular biology*, 85(1-2), 63-80.
- Century, K., Reuber, T. L., Ratcliffe, O. J., 2008. Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factor-based agricultural biotechnology products. *Plant physiology*, 147(1), 20-29.
- Chavez-Vela, N. A., Chavez-Ortiz, L. I., Perez-Molphe Balch, E., 2003. Genetic transformation of sour orange using *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrociencia*.
- Christey, M. C., 2001. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 687-700.
- Collinge, M., Boller, T., 2001. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant molecular biology*, 46(5), 521-529.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K., 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1), 163.
- Cruz de Carvalho, M. H., 2008. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, 3(3), 156-165.
- Çevik, B., Lee, R. F., Niblett, C. L., 2006. Genetic transformation of *Citrus paradisi* with antisense and untranslatable RNA-dependent RNA polymerase genes of *Citrus tristeza closterovirus*. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 30(3), 173-182.
- Çırak C., Esendal E., 2003. Soyada Kuraklık Stresi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 21(2): 231-237.
- Çırak, C., Esendal, E., 2006. Soyada kuraklık stresi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2), 231-237.
- Davies, F. S., Albrigo, L. G., 1994. Environmental constraints on growth, development and physiology of citrus. *Citrus*. FS Davies and LG Albrigo. CAB International Wallingford, UK, 51-82.
- Davies, W.J., Wilkinson, S., Loveys, B., 2002. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture, *The New Phytol.* 153, 449–460.

- De Carvalho, M. H. C., Laffray, D., Louguet, P., 1998. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 40(3), 197-207
- de Oliveira, M. L. P., Febres, V. J., Costa, M. G. C., Moore, G. A., Otoni, W. C., 2009. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 28(3), 387.
- de Oliveira, T.M., Cidade, L.C., Gesteira, A.S., Coelho Filho, M.A., Soares Filho W.S., Costa, M.G.C., 2011. Analysis of the NAC transcription factor gene family in citrus reveals a novel member involved in multiple abiotic stress responses. *Tree Genet. Genomes* 7, 1123–1134.
- Desikan, R., Cheung, M. K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. T., Neill, S. J. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of experimental botany*, 55(395), 205-212.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J., Neill, S., 2004 ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells, *J. Exp. Bot.* 55, 205–212.
- Ernst, H.A., Olsen, A.N., Skriver, K., Larsen, S., Lo Leggio, L., 2004. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep.* 5,297– 303.
- Fan, J., Gao, X., Yang, Y. W., Deng, W., & Li, Z. G., 2007. Molecular cloning and characterization of a NAC-like gene in “navel” orange fruit response to postharvest stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 25(3-4), 145-153.
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W., Xiong, L., 2008. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 280(6), 547-563.
- Fang, L., Su, L., Sun, X., Li, X., Sun, M., Karungo, S. K., Xin, H., 2016. Expression of *Vitis amurensis* NAC26 in *Arabidopsis* enhances drought tolerance by modulating jasmonic acid synthesis. *Journal of experimental botany*, 67(9), 2829-2845.
- FAO., 2003. 08.02.2014. <http://www.fao.org>.
- FAO., 2011. 11.09.14. <http://www.fao.org>.
- FAO., 2016. 12.07.2018. <http://www.fao.org>.
- Ferguson, L.F., Sacovich, N., And. Roose, M., 1990. California Citrus Rootstocks, University of California Publication, 21477, University of California, California.

- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia plantarum*, 119(3), 355-364.
- Fujita, M., Fujita, Y., Maruyama, K., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*, 39(6), 863-876.
- Ghaderi, I., Sohani, M. M., Mahmoudi, A., 2018. Efficient genetic transformation of sour orange, *Citrus aurantium* L. using *Agrobacterium tumefaciens* containing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Plant Gene*, 14, 7-11.
- Giardi, M. T., Cona, A., Geiken, B., Kučera, T., Masojidek, J., Mattoo, A. K., 1996. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of photosystem II. *Planta*, 199(1), 118-125.
- Gill, S. S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gimeno, J., Gadea, J., Forment, J., Pérez-Valle, J., Santiago, J., Martínez-Godoy, M. A., Talón, M., 2009. Shared and novel molecular responses of mandarin to drought. *Plant molecular biology*, 70(4), 403-420.
- Gmitter, F. G., Hu, X. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Economic Botany*, 44(2), 267-277.
- Gmitter Jr, F. G., Grosser, J. W., Moore, G. A. 1992. *Citrus*.
- Gong X1, Zhao L1, Song X1, Lin Z1, Gu B1, Yan J1, Zhang S1, Tao S2, Huang X3., 2019. Genome-wide analyses and expression patterns under abiotic stress of NAC transcription factors in white pear (*Pyrus bretschneideri*). *BMC Plant Biol.* 25;19(1):161. doi: 10.1186/s12870-019-1760-8.
- Göksoy, A. T., Turan, Z. M., 1991. Kuraklığın bitki fizyolojisi ve morfolojisi üzerine etkileri. *UÜ ZF Dergisi*, 8, 149-190.
- Grigorova, B., Vaseva, I. I., Demirevska, K., & Feller, U., 2011. Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress. *Acta physiologiae plantarum*, 33(5), 2041-2049.
- Gusta, L. V., Chen, T. H. H., 1987. The physiology of water and temperature stress. *Wheat and wheat improvement*, (wheatandwheatim), 115-150.
- Halford, N. G., 2012. *Genetically modified crops*. World Scientific.
- Hao, Y. J., Wei, W., Song, Q. X., Chen, H. W., Zhang, Y. Q., Wang, F., Ma, B., 2011. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *The Plant Journal*, 68(2), 302-313.

- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E., 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* 53, 27–37.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Lydiate, D., 2003. Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant molecular biology*, 53(3), 383-397.
- Hidaka, T., Omura, M., Ugaki, M., Tomiyama, M., Kato, A., Ohsima, M., Motoyoshi, F., 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. *Japanese Journal of Breeding*, 40(2), 199-207.
- Hidaka, T., Omura, M., 1993. Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62(2), 371-376.
- Hirayama, T., Shinozaki, K., 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*, 61(6), 1041-1052.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L., 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and sal tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), 12987-12992.
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., Xiong, L., 2008. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and sal tolerance in rice. *Plant molecular biology*, 67(1-2), 169-181.
- Hu, R., Qi, G., Kong, Y., Kong, D., Gao, Q., Zhou, G., 2010. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. *BMC plant biology*, 10(1), 145.
- Huang, G. T., Ma, S. L., Bai, L. P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Guo, Z. F. 2012. Signal transduction during cold, sal, and drought stresses in plants. *Molecular biology reports*, 39(2), 969-987.
- Huang, Q., Wang, Y., Li, B., Chang, J., Chen, M., Li, K., He, G., 2015. TaNAC29, a NAC transcription factor from wheat, enhances sal and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMC plant biology*, 15(1), 268.
- Ingram, J., Bartels, D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.
- Jenks, M. A., Hasegawa, P. M., 2008. *Plant abiotic stress*. John Wiley & Sons.

- Jensen, M.K., Skriver, K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., 2010. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem. J.* 426, 183–196.
- Jeong, J. S., Kim, Y. S., Baek, K. H., Jung, H., Ha, S. H., Do Choi, Y., Kim, J. K., 2010. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant physiology*, 153(1), 185-197.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekci, Y., 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740.
- Karaba, A., Dixit, S., Greco, R., Aharoni, A., Trijatmiko, K. R., Marsch-Martinez, N., Pereira, A., 2007. Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and sal tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15270-15275.
- Karpinska, B., Wingsle, G., Karpinski, S., 2000. Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB life*, 50(1), 21-26.
- Kawaura, K., Mochida, K., Ogihara, Y., 2008. Genome-wide analysis for identification of sal-responsive genes in common wheat. *Functional & integrative genomics*, 8(3), 277-286.
- Khan, E. U., Fu, X. Z., Liu, J. H., 2012. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf segments as explants in Valencia sweet orange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(2), 383-390.
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., & Zhu, J., 2012. Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1993. “Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLP A, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L.”, *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1214–1220.
- Kobayashi, S., Uchimiya, H., 1989. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *The Japanese journal of genetics*, 64(2), 91-97.
- Kumar, V., Sharma, A., Narasimha Prasad, B. C., Bhaskar Gururaj, H., Aswathanarayana Ravishankar, G., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(4), 0-0.

- Kuşvuran, Ş. 2010. Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleransın fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Laffray, D., Louguet, P., 1990. Stomatal responses and drought resistance. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 137(1), 47-60.
- Lake, J.A., Woodward, F.I., Quick, W.P., 2002. Long-distance CO₂ signalling in plants, *J. Exp. Bot.* 53,183–193.
- Levitt, J., 1980. *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. Academic Press.
- Liu, G., Li, X., Jin, S., Liu, X., Zhu, L., Nie, Y., Zhang, X., 2014. Overexpression of rice NAC gene SNAC1 improves drought and sal tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton. *PLoS One*, 9(1), e86895.
- Liu, J.K., Zhu, A., 1998. Calcium sensor homolog required for plant sal tolerance, *Science* 280 1943–1945.
- Liu, Y. Z., Baig, M. N. R., Fan, R., Ye, J. L., Cao, Y. C., Deng, X. X., 2009. Identification and expression pattern of a novel NAM, ATAF, and CUC-like gene from *Citrus sinensis* Osbeck. *Plant molecular biology reporter*, 27(3), 292.
- Liu, X., Hong, L., Li, X. Y., Yao, Y. A. O., Hu, B., Li, L. 2011. Improved drought and sal tolerance in transgenic *Arabidopsis*, overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(3), 443-450.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Loreto, F., Tricoli, D., Di Marco, G., 1995. On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in leaves of the C₄ plant *Sorghum bicolor* exposed to water stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition, *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 885–892.
- Lu, C., Zhang, J., 1999. Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany*, 50(336), 1199-1206.
- Lu, M., Ying, S., Zhang, D. F., Shi, Y. S., Song, Y. C., Wang, T. Y., Li, Y. 2012. A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis*. *Plant cell reports*, 31(9), 1701-1711.

- Luscombe, N. M., Thornton, J. M., 2002. Protein–DNA interactions: amino acid conservation and the effects of mutations on binding specificity. *Journal of molecular biology*, 320(5), 991-1009.
- Luth, D., Moore, G., 1999. Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant cell, tissue and organ culture*, 57(3), 219-222.
- Lv X, Lan S, Guy KM, Yang J, Zhang M, Hu Z., 2016. Global Expressions Landscape of NAC Transcription Factor Family and Their Responses to Abiotic Stresses in *Citrullus lanatus*. *Sci Rep*. 2016 Aug 5;6:30574. doi: 10.1038/srep30574.
- Ma, J., Wang, F., Li, M. Y., Jiang, Q., Tan, G. F., Xiong, A. S., 2014. Genome wide analysis of the NAC transcription factor family in Chinese cabbage to elucidate responses to temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 165, 82-90.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- Maheswari, M., Yadav, S. K., Shanker, A. K., Kumar, M. A., Venkateswarlu, B., 2012. Overview of plant stresses: Mechanisms, adaptations and research pursuit. In *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* (pp. 1-18). Springer, Dordrecht.
- Mani, S., Van de Cotte, B., Van Montagu, M., Verbruggen, N., 2002. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128(1), 73-83.
- Mansfield, T. A., Hetherington, A. M., Atkinson, C. J., 1990. Some current aspects of stomatal physiology. *Annual review of plant biology*, 41(1), 55-75.
- Mao, X., Zhang, H., Qian, X., Li, A., Zhao, G., Jing, R., 2012. TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 63(8), 2933-2946
- Mao, X., Chen, S., Li, A., Zhai, C., Jing, R., 2014. Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 9(1), e84359.
- Mao, H., Yu, L., Han, R., Li, Z., Liu, H., 2016. ZmNAC55, a maize stress-responsive NAC transcription factor, confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 55-66.
- Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A., Ram, A. F., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current genetics*, 48(1), 1-17.
- Mittler, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.

- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., Kimura, K., 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and experimental botany*, 53(2), 205-214.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86-96.
- Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Bespalhok Filho, J. C., Kobayashi, A. K., Pileggi, M., Júnior, R. P. L., Vieira, L. G. E. 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, 167(6), 1375-1381.
- Møller, I. M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology*, 52(1), 561-591.
- Muller, J. E., Whitsitt, M. S., 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant growth regulation*, 20(2), 119-124.
- Nakashima, K., Kiyosue T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1997. A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J*, 12, 851–861.
- Nakashima, K., Tran, L. S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todak, a, D., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Functional analysis of a NAC type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51(4), 617-630.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2012. “NAC transcription factors in plant abiotic stress responses”, *Biochim Biophys Acta*, 1819(2), 97-103.
- Naot, D., Ben-Hayyim, G., Eshdat, Y., Holland, D., 1995. Drought, heat and sal stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis *Lea5* gene. *Plant molecular biology*, 27(3), 619-622.
- Nuruzzaman, M., Manimekalai, R., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kondoh, H., Ooka, H., Kikuchi, S., 2010. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene* 465, 30–44.
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A.M., Kikuchi, S., 2013. Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in microbiology*.
- Oh, S. K., Lee, S., Yu, S. H., Choi, D., 2005. Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with

- incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta*, 222(5), 876-887.
- Ohnishi, T., Sugahara, S., Yamada, T., Kikuchi, K., Yoshiba, Y., Hirano, H.Y., Tsutsumi, N., 2005. "OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice", *Genes Genet Syst*, 80, 135–139.
- Olsen A.N., Ernst H.A., Leggio L.L., Skriver K. 2005. "NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse", *Trends Plant Sci*, 10, 79–87.
- Orbović, V., Grosser, J. W., 2006. Citrus. In *Agrobacterium Protocols Volume 2* (pp. 177-189). Humana Press.
- Orbović, V., Dutt, M., Grosser, J. W., 2011. Seasonal effects of seed age on regeneration potential and transformation success rate in three citrus cultivars. *Scientia horticulurae*, 127(3), 262-266.
- Perez-Molphe-Balch, E., Ochoa-Alejo, N., 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. *Plant Cell Reports*, 17(8), 591-596.
- Pinheiro GL, Marques CS, Costa MD, Reis PA, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EP., 2009). Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene* 444, 10–23.
- Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S., Prasad, M., 2012. "NAC proteins: regulation and role in stress tolerance", *Trends Plant Sci*, 17, 369–381.
- Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S., Prasad, M., 2012. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. National Institute of Plant Genome Research, Aruna Asaf Ali Marg, New Delhi-110067, India 2 Department of Biotechnology, Faculty of Science, Jamia Hamdard, New Delhi-110062, 369-381, India.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Mandal, S. N., Parida, S. K., Prasad, M., 2013. Comprehensive genome-wide survey, genomic constitution and expression profiling of the NAC transcription factor family in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PloS one*, 8(5), e64594.
- Ramanjulu, S., Bartels, D., 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants, *Plant Cell Environ.* 25, 141–151.
- Ratnayaka, H.H., Molin, W.T., Sterling, T.M., 2003. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought, *J. Exp. Bot.* 54, 2293–2305.
- Redondo-Gómez, S., 2013. Abiotic and biotic stress tolerance in plants. In *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 1-20). Springer India.

- Ren, T., Qu, F., Morris, T. J., 2000. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *The Plant Cell*, 12(10), 1917-1925.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, Z.C., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.L., 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290, 2105–2110.
- Rushton, P. J., Bokowiec, M. T., Han, S., Zhang, H., Brannock, J. F., Chen, X., Timko, M. P., 2008. Tobacco transcription factors: novel insights into transcriptional regulation in the Solanaceae. *Plant physiology*, 147(1), 280-295.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., Shen, Q. J., 2010. WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15(5), 247-258.
- Sablowski, R. W., Meyerowitz, E. M., 1998. A homolog of No Apical Meristem is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell*, 92(1), 93-103.
- Safitri, F. A., Ubaidillah, M., Kim, K. M., 2016. Efficiency of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using vacuum infiltration in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biotechnology*, 43(1), 66-75.
- Sakamoto, A., Murata, N., 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 163-171.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Rodrigo, M. J., Lafuente, M. T., Granell, A., Zacarias, L., 2004. Dehydrin from citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1950-1957.
- Sauter, A., Dietz, K. J., Hartung, W., 2002. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 223-228.
- Seo, J. S., Sohn, H. B., Noh, K., Jung, C., An, J. H., Donovan, C. M., Kim, H. M., 2012. Expression of the Arabidopsis AtMYB44 gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean. *Molecular Breeding*, 29(3), 601-608.
- Shang H1, Li W, Zou C, Yuan Y., 2013. Analyses of the NAC transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* Ulbr.: chromosomal location, structure, phylogeny, and expression patterns. *J Integr Plant Biol*. Jul;55(7):663-76. doi: 10.1111/jipb.12085.

- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Shiriga, K., Sharma, R., Kumar, K., Yadav, S. K., Hossain, F., Thirunavukkarasu, N., 2014. Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene*, 2, 407-417.
- Singh, K. B., Foley, R. C., Oñate-Sánchez, L., 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New phytologist*, 125(1), 27-58.
- Su, H., Zhang, S., Yin, Y., Zhu, D., & Han, L. (2015). Genome-wide analysis of NAM-ATAF1, 2-CUC2 transcription factor family in *Solanum lycopersicum*. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 24(2), 176-183.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., Mittler, R., 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.
- Şahin-Çevik, M., Çevik, B., Topkaya-Kütük, B., Yazıcı, K., 2017. Identification of drought-induced genes from the leaves of Rangpur lime (*Citrus limon* (L) Osbeck). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(6), 636-645.
- Takada, S., Hibara, K. I., Ishida, T., Tasaka, M., 2001. The Cup-Shaped Cotyledon1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 128(7), 1127-1135.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Kidokoro, S., Ito, Y., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nakashima, K., 2010. “The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice”, *Mol Genet Genomics*, 284, 173–183.
- Tang, Y., Liu, M., Gao, S., Zhang, Z., Zhao, X., Zhao, C., Chen, X., 2012. Molecular characterization of novel TaNAC genes in wheat and overexpression of TaNAC2a confers drought tolerance in tobacco. *Physiologia plantarum*, 144(3), 210-224.
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell*, 16(9), 2481-2498.
- Tran, L. S. P., Nishiyama, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2010. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM crops*, 1(1), 32-39.

- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)., 2017 05.02.2018. www.tuik.gov.tr
- Tuzcu, Ö., 1998. Turunçgiller Lisans Ders Notları. Ç.Ü Ziraat Fakülesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana.
- Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
- Türkeş, M. (2007). Küresel iklim değişikliği nedir. Temel Kavramlar, Nedenleri, Gözlenen ve Öngörülen Değişiklikler. I. Türkiye İklim Değişikliği Kongresi (TİKDEK), 11-13
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Current opinion in biotechnology*, 17(2), 113-122.
- Vardi, A., Bleichman, S., Aviv, D., 1990. Genetic transformation of Citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Science*, 69(2), 199-206.
- Verma, S., Nizam, S., Verma, P. K., 2013. Biotic and abiotic stress signaling in plants. In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 1* (pp. 25-49). Springer, New York, NY.
- Vinocur, B., Alman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
- Wang, W., Vinocur, B., Alman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, N., Zheng, Y., Xin, H., Fang, L., Li, S. 2013. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Vitis vinifera*. *Plant cell reports*, 32(1), 61-75.
- Wang, G., Zhang, S., Ma, X., Wang, Y., Kong, F., Meng, Q., 2016. A stress associated NAC transcription factor (SINAC35) from tomato plays a positive role in biotic and abiotic stresses. *Physiologia plantarum*, 158(1), 45-64.
- Wang, H., Wang, H., Shao, H., Tang, X., 2016. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Frontiers in plant science*, 7, 67.
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2002. ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants, *Plant Cell Environ.* 25, 195–210.

- Wray, G. A., Hahn, M. W., Abouheif, E., Balhoff, J. P., Pizer, M., Rockman, M. V., Romano, L. A., 2003. The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Molecular biology and evolution*, 20(9), 1377-1419.
- Wu J, Wang L, Wang S., 2016. Comprehensive analysis and discovery of drought-related NAC transcription factors in common bean. *BMC Plant Biol.* 2016 Sep 7;16(1):193. doi: 10.1186/s12870-016-0882-5.
- Xia, N., Zhang, G., Liu, X. Y., Deng, L., Cai, G. L., Zhang, Y., Kang, Z. S., 2010. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular biology reports*, 37(8), 3703-3712.
- Xu, Z. Y., Kim, S. Y., Kim, D. H., Dong, T., Park, Y., Jin, J. B., Hwang, I., 2013. The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *The Plant Cell*, tpc-113.
- Xue, G. P., Way, H. M., Richardson, T., Drenth, J., Joyce, P. A., McIntyre, C. L., 2011. Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Molecular Plant*, 4(4), 697-712.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., Shinozaki, K., 1992. "Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein", *Plant Cell Physiol*, 33, 217–224.
- Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., Demura, K., 2010. Vnd-Interacting2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 1249–1263.
- Yang, Y., Zhu, K., Wu, J., Liu, L., Sun, G., He, Y., Yu, D., 2016. Identification and characterization of a novel NAC-like gene in chrysanthemum (*Dendranthema lavandulifolium*). *Plant cell reports*, 35(8), 1783-1798.
- Yanık, B., 2012. Gen İfadesinin Düzenlenmesi. Harvey, R, (Eds). Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Hücre ve Moleküler Biyoloji 107-117, Nobel Tıp Kitabevleri, 236, Nobel Matbaacılık, Hadımköy-İstanbul.
- Yao, DX, Zhang, XY., Zhao, XH., Liu, CL., Wang, CJ., Zhang, ZH., Wei, Q., Wang, QH., Yan, H., Li, FG., Su, Z., 2011. Transcriptome analysis reveals salt-stress-regulated biological processes and key pathways in roots of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genomics* 98, 47–55.
- Yeşiloğlu, T., Yıldırım, B., Tuzcu, Ö., Kamiloğlu, U.M., İncesu, M., 2011. Turunçgil Yetiştiriciliği. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.

Zhang, L., Zhang, L., Xia, C., Zhao, G., Jia, J., Kong, X., 2016. The novel wheat transcription factor TaNAC47 enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants. *Frontiers in plant science*, 6, 1174.

Zhao, X., Yang, X., Pei, S., He, G., Wang, X., Tang, Q., Zhou, G., 2016. The *Miscanthus* NAC transcription factor MINAC9 enhances abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Gene*, 586(1), 158-169.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine Doğuş Sivri
Adres Bilgileri : Yenice Mah. 2529 Sok. No:2
ISPARTA
Doğum Yeri ve Yılı : Eğirdir 1985
E-mail : dogussivri@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Isparta Milli Piyango Anadolu Lisesi (1999-2003)
Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü (2004-2008)
Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı (2008-2011)

Diğer çalışmalar

1. Eriş, R., Ulusoy, S., Sivri, E.D., 2010. Gül Yağı ve Absolutünün *Chromobacterium violaceum* Suşunda Viyolasin Üretimine Etkisinin Araştırılması. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Denizli, 1053.
2. Sivri, E.D., Ulusoy, S., Eriş, R., 2010. Uçucu Yağ Örneklerinin Antibakteriyel Özelliklerinin Araştırılması. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Denizli, 915.
3. Sivri, E.D., Çevik, B., Şahin-Çevik, M. 2017. Isolation of Drought Responsive NAC Gene From *Rangpur Lime*, International Green Biotechnology Congress, İstanbul.
4. Çevik, B., Şahin-Çevik, M., Sivri, E.D., Sönmez, E., Kıvrak, H. 2014. Domates Kloroz Virüsü (TOCV)'nün Domates Bitkisinde Enfeksiyon ve Hastalık Oluşturma Sürecinin Aşılama ve Real-time RT-PCR Yöntemleriyle Araştırılması. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 3-5 Şubat Antalya.
5. Çevik, B., Şahin-Çevik M., and Sivri, E.D. 2016. Identification of Genes Repressed in Response to Tomato chlorosis virus Infection in Tomato. The first Annual Meeting of COST Action FA1405 on Crop-Arthropod-Microorganism (CAMo) Interactions, Malaga Spain 10-12 Şubat 2016.
6. Şahin Çevik M., Gönülkırılmaz B., Sivri E.D., Çevik B., "The role of NAC transcription factors in response to drought stress ", III. International Plant Breeding Congress, Girne, Kuzey Kıbrıs Türk Cum.

Yüksek Lisans Tezi

Çeşitli Uçucu Yağ Örneklerinin *Erwinia carotovora* ATCC 39048 Suşunda Ekzoenzim ve Antibiyotik Üretimi Üzerine Etkisinin Araştırılması