

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

ASMADA KÖK STRES TRANSKRİPTOMLARININ BELİRLENMESİNE
YÖNELİK MİKRODİZİN ANALİZLERİ

Canan Yüksel Özmen

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ali Ergül

ŞUBAT

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgileri için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Canan Yüksel Özmen

İmzası

Prof. Dr. Ali ERGÜL danışmanlığında, Canan Yüksel Özmen tarafından hazırlanan bu çalışma 19/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ali Ergül İmza:

Üye :Prof. Dr. Gökhan Söylemezoğlu İmza:

Üye :Prof. Dr. Sümer Aras İmza:

Üye : Prof. Dr. Cengiz Sancak İmza:

Üye :Prof. Dr. Sezai Ercişli İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Asmada Kök Stres Transkriptomlarının Belirlenmesine Yönelik
Mikrodizin Analizleri

Canan Yüksel Özmen

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Ali Ergül

Asma (*Vitis vinifera* L.), kurağa kısmen yüksek tolerans göstermektedir. Filoksera (*Phylloxera vastatrix radicola*) zararı, bağcılık yapılan alanlarda amerikan asma anaçlarının kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Bununla birlikte asma kurağa yüksek tolerans göstermesine karşın, birçok anacın kurağa toleransı genellikle önemli derece düşüklük göstermektedir ve bu durum kurak alanlarda bağcılıkta kalite ve verim kaybına neden olmaktadır. 110R, 140Ru, 99R gibi bazı anaçlar, kurağa daha toleranslı bulunurken, 5BB, 5C, SO4 gibi anaçların kurak toleransı yönünden *V. vinifera*' ya oranla daha zayıf olduğu bildirilmektedir. Kurağa toleranslı *Vitis vinifera* L. çeşidi ile toleransı düşük asma anacının, kök transkriptomlarını/transkriptom ifadelerini karşılaştırmak, üzümde kurağa toleransla ilişkili moleküler temellerin anlaşılmasında önemli bulgular sağlayacaktır. Bu araştırmada, esas olarak yaprak-tane transkriptlerinden geliştirilen Affymetrix *Vitis* Genome Array (Gen chip) (ver. 2.0) kullanılarak, kuraklık stresine maruz bırakılan Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) çeşidi ve Kober 5BB (*V. berlandieri* X *V. riparia*) anacının kök transkriptomları karşılaştırılmış ve 5BB anacında; ifade farklılığı olan 1925 (807 ifadesi artan ve 118 azalan), CS çeşidinde 1279 (745 ifadesi artan ve 534 azalan) adet transkript belirlenmiştir. Kuraklık stresine karşı kökte indüklenen transkriptler çeşit ve anaçta karşılaştırıldığında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir.

2015, 163 sayfa

Anahtar kelimeler: *Vitis vinifera* L., anaç, mikrodizin, kök, kuraklı

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Microarray Analyses of Root Stress Transcriptomes in Grapevine
Cultivar and Rootstock

Canan Yüksel Özmen

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Ali Ergül

Grape (*Vitis vinifera* L.), shows relatively high tolerance to drought stress. Phylloxera (*Phylloxera vastatrix radiccicola*) damage made the use of insect-resistant rootstocks necessary in many areas of grape cultivation. However, although *Vitis vinifera* shows relatively high tolerance to drought, the drought tolerance of most rootstocks is often quite low and this causes yield and quality loss in grapes grown in arid areas. However, some rootstock varieties, such as 110R, 140Ru, 99R, are more drought tolerant, whereas others, such as 5BB, 5C, and SO4 are less drought tolerant than *V. vinifera* L. Comparative analysis of root gene expression patterns of drought tolerant *V. vinifera* with drought sensitive rootstocks would provide useful information towards better understanding the molecular basis of drought tolerance in grapes. In this research, we comparative analyzed drought stress treatment root transcriptomes of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) and the rootstock Kober 5BB (*V. berlandieri* X *V. riparia*) using the Affymetrix *Vitis* Genome array ver. 2.0 generated from leaf and berry transcripts. In 5BB rootstock, 1279 (745 up and 534 down) transcripts were determined within the 1925 (807 up and 118 down) CS types with expression difference. When the transcripts induced in the root against drought stress were compared in type and rootstock, significant differences could be observed.

2015, 163 pages

Key Words: *Vitis vinifera* L., rootstock, microarray, root, drought

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimine başladığım ilk günden itibaren bilgi ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren, ve bundan sonraki akademik hayatım boyunca bilgi, destek ve yardımına aynı derecede ihtiyaç duyacağım danışman hocam Prof. Dr. Ali ERGÜL'e,

Tez İzleme Komitesi üyeleri olan Sayın Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU ve Sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS hocalarıma,

Yoğun bir çalışma temposunda olmasına rağmen, tezimin deney aşamalarında ve özellikle mikrodizin verilerin kontrolü ve yorumlanmasında özverili katkılarını esirgemeyen Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi grubunun öğrencilerine,

Her zaman ve her durumda desteklerini gördüğüm canım babam Tamer YÜKSEL ve annem Nevin YÜKSEL'e, sevgili ağabeyim Can YÜKSEL ve yengem Neslihan YÜKSEL'e gösterdikleri emek, sabır ve ilgilerinden ötürü sonsuz şükranlarımı sunarım.

Canan YÜKSEL ÖZMEN

Ankara, Şubat 2015

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
ÖNSÖZ	VI
İÇİNDEKİLER	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
SİMGELER DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. ABIYOTİK STRES	3
2.2. KURAKLIK STRESİ	3
2.2.1. KURAKLIK STRESİNİN MORFOLOJİ ÜZERİNE ETKİLERİ.....	4
2.2.2. KURAKLIĞIN YAPRAK MORFOLOJİSİ VE ANATOMİSİNE ETKİSİ.....	4
2.2.3. KURAKLIĞIN KÖK MORFOLOJİSİ VE ANATOMİSİNE ETKİSİ.....	5
2.3. KURAKLIK STRESİNİN FİZYOLOJİK ETKİLERİ	5
2.3.1. MEKANİK VE METABOLİK ETKİ.....	5
2.3.2. OKSİDATİF ETKİ (REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ).....	6
2.3.3. KURAKLIK STRESİNİN FOTOSENTEZ ÜZERİNE ETKİSİ.....	8
2.4. KURAKLIK STRESİNDE KÖKLE –YAPRAK ARASINDAKİ HÜCRESEL SINYAL İLETİMİ	9
2.4.1. ABA (ABZİSİK ASİT) SINYAL MEKANİZMASI.....	10
2.4.2. ETİLEN SINYAL MEKANİZMASI.....	13
2.4.3. pH.....	14
2.4.4. SİTOKİNİNLER.....	15
2.4.5. DİĞER KİMYASAL SİNYALLER.....	16
2.5. KURAKLIK STRESİ İLE İNDÜKLENEN GENLER	16
2.5.1. AQUAPORİNLER (SU KANAL PROTEİNLERİ).....	18
2.5.2. PROTEAZLAR.....	19
2.5.3. ŞAPERONLAR.....	20
2.5.4. LEA PROTEİNLERİ.....	20
2.5.5. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ.....	21
2.5.6. PROTEİN KİNAZLAR.....	22
2.5.7. OSMOLİTLER.....	23
2.6. BİTKİLERDE STRES TOLERANSINA YÖNELİK GEN İFADE ANALİZİ YAKLAŞIMLARI	24
2.6.1. CDNA KÜTÜPHANELERİ VE EXPRESSION SEQUENCE TAGS (EST).....	24
2.6.2. CDNA-AFLP (CDNA AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM).....	25
2.6.3. SERIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION (SAGE).....	25
2.6.4. RNA SEQ (RNA SEKANSLAMA-YENİ NESİL DİZİ ANALİZLERİ).....	25

2.6.5. MIKRODİZİN (MIKROARRAY).....	26
2.6.5.1. cDNA MIKRODİZİN.....	27
2.6.5.2. OLİGONÜKLEOTİD MIKRODİZİN.....	27
2.7. BITKİLERDE MIKRODİZİN UYGULAMALARI.....	28
2.8.ASMA ÇEŞİT (VİTİS VİNİFERA L.) VE ANAÇLARINDA KURAKLIK TOLERANSI.....	30
3. GEREKÇE VE AMAC.....	34
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
4.1. BITKİSEL MATERYAL TEMİNİ	36
4.2. DOKU KÜLTÜRÜ DENEMELERİ.....	36
4.2.1. BITKİSEL MATERYAL STERİLİZASYON AŞAMASI	37
4.2.2. ROUBELAKİS KÖKLENDİRME (RM) ORTAMI HAZIRLAMA AŞAMASI	37
4.2.3. KÖKLENMİŞ BITKİLERİN SIVI MS (MURASHİGE VE SKOOG BASAL MEDIUM) ORTAMINA AKTARIMI.....	39
4.3.DOKU KÜLTÜRÜ BITKİLERİNİN KUARTZ KUM ORTAMINA ŞAŞIRTILMASI.....	40
4.4.STRES UYGULAMALARI, FİZYOLOJİK ÖLÇÜMLER VE MIKRODİZİN DENEME DESENİ.....	41
4.4.1. STRES UYGULAMALARI.....	41
4.4.2. FİZYOLOJİK ÖLÇÜMLER	42
4.4.3. MIKRODİZİN DENEME DESENİ.....	42
4.5. RNA İZOLASYONU	43
4.6. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN PÜRİFİKASYONU	45
4.7. RNA ÖRNEKLERİNİN MİKTAR VE KALİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	45
4.8. MIKRODİZİN UYGULAMALARI	46
4.9. qRT-PCR (REAL TIME) UYGULAMALARI	53
4.10. MIKRODİZİN VERİLERİN İŞLENMESİ VE BİYİNFORMATİK ANALİZİ	55
4.10.1. KALİTE KONTROL ANALİZLERİ.....	55
4.10.2.MIKRODİZİN VERİLERİNDE BELİRLENEN YAPRAK-KÖK ORTAK TRANSKRİPTOMLARIN EST VERİLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI	56
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	57
5.1. STRES UYGULAMALARI	57
5.1.1. KURAKLIK STRESİ UYGULAMALARI	57
5.2. KURAKLIK STRESİNİN FİZYOLOJİK OLARAK (-MPa) BELİRLENMESİ	58
5.3. RNA İZOLASYONU, MİKTAR VE KALİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	59
5.4. MIKRODİZİN KALİTE KONTROL ANALİZLERİ	64
5.4.1. KALİTE KONTROL ANALİZLERİ	64
5.5. İFADESİ DEĞİŞEN TRANSKRİPT (GEN) SAYILARI, VENN DİYAGRAMLARI VE GEN ONTOLOJİ ANALİZLERİ	69
5.5.1. İFADESİ DEĞİŞEN TRANSKRİPT (GEN) SAYILARI	69
5.5.2. VENN DİYAGRAMLARI	70
5.5.3. GEN ONTOLOJİ ANALİZLERİ	71
5.6. MIKRODİZİN VERİ ANALİZLERİ.....	74
5.6.1. STRESLE İFADESİ DEĞİŞEN TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ.....	74
5.6.2. KURAKLIK STRESİ İLE İFADESİ DEĞİŞEN ŞAPERONLAR	78
5.6.3. KURAKLIK STRESİ İLE 5BB ANACINA ÖZGÜ İFADESİ EN FAZLA ARTAN/AZALAN TRANSKRİPTLER:.....	79

5.6.4. KURAKLIK STRESİ İLE CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ EN FAZLA ARTAN/AZALAN TRANSKRIPTLER:.....	81
5.6.5. KURAKLIK STRESİ İLE 5BB ANACI VE CS ÇEŞİDİNDE ORTAK İFADESİ EN FAZLA ARTAN/AZALAN TRANSKRIPTLER:.....	83
5.7. KÖK SPESİFİK TRANSKRİPTOMLARIN BELİRLENMESİ.....	85
5.8. REAL TIME PCR İLE MİKRODİZİN VERİLERİNİN VALIDASYONU	86
5.8.1. REAL TIME PCR ANALİZLERİ	86
5.8.1.1. STANDART EĞRİ (STANDART CURVE).....	86
5.8.1.2. GERÇEK ZAMANLI AMPLİFİKASYON EĞRİLERİ.....	87
5.8.1.3. ERİME EĞRİSİ (MELTING CURVE)	88
5.8.1.4. MİKRODİZİN İFADE VERİLERİNİN REAL TIME (EŞ ZAMANLI) PCR İLE VALIDASYONUNA AIT GRAFİKLER.....	89
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>91</u>
6.1. KURAKLIK STRESİNE KARŞI OLUŞAN FİZYOLOJİK CEVAP	91
6.2.KURAKLIK STRESİ İLE BELİRLENEN KÖK-YAPRAK ORTAK TRANSKRİPTOMLAR.....	93
6.2.1. FOTOSENTEZ İLİŞKİLİ ENZİMLER.....	95
6.2.2. ANTİOKSIDANLAR	96
6.2.3. AQUAPORINLER.....	97
6.2.4. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ	98
6.2.5. OSMOLİTLER	99
6.3. KÖK SPESİFİK TRANSKRİPTOMLARIN BELİRLENMESİ.....	101
<u>KAYNAKLAR</u>	<u>102</u>
EK1: GENOTİPLERE AIT İFADE FARKLILIKLARINI GÖRSELLEŞTİREN HEATMAP GRAFIĞI.....	124
EK2: EST DİZİLERİ İLE EŞLEŞME GÖSTEREN YAPRAK-KÖK TRANSKRİPTOMLARININ LİSTESİ.....	137
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>163</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1.KURAKLIK STRESİNE KARŞI BİTKİDE OLUŞAN YANITLARIN (STOMALARIN KAPANMASI, ROS OLUŞUMU, METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER VB.) ŞEMATİK GÖSTERİMİ (34).....	8
ŞEKİL 2.2. KURAKLIK STRESİNDE ABA BAĞIMLI, ABA BAĞIMSIZ VE ETİLEN SINYAL YOLAKLARI (72)	14
ŞEKİL 2.3- BİYOTİK VE ABİYOTİK STRES SINYALLERİ VE GEN İFADESİNE AIT TRANSKRİPSİYONEL MEKANİZMALAR (82)	17
ŞEKİL 2.4- KURAKLIK STRESİNE TOLERANS VE YANITTA ROL OYNAYAN GENLERİN GRUPLANDIRILMASI (82).....	18
ŞEKİL 2.5. MAPK KASKAD MODÜLÜ (125).....	23
ŞEKİL 4.1. CABERNET SAUVIGNONKALEMLERİNİN İKLİM ODASINDA YETİŞTİRİLMESİ	36
ŞEKİL 4.2. EKİM ÖNCESİ STERİLİZASYON AŞAMALARINA VE BESİ ORTAMLARINA AİT GÖRÜNTÜLER	38
ŞEKİL 4.3. CABERNET SAUVIGNON VE 5BB BİTKİLERİNİN KÖKLENDİRME ORTAMINDAKİ GÖRÜNÜMÜ (3. HAFTA)	38
ŞEKİL 4.4. SIVI MS ORTAMINDAKİ 5BB BİTKİLERİNİN GÖRÜNÜMÜ (2. GÜN).....	39
ŞEKİL 4.5. SIVI MS ORTAMINDAKİ CS BİTKİLERİNİN GÖRÜNÜMÜ (10. GÜN)	40
ŞEKİL 4.6. KUARTZ KUM ORTAMINA ŞAŞIRILAN CABERNET SAUVIGNON BİTKİLERİNİN GÖRÜNÜMÜ (3. GÜN)	40
ŞEKİL 4.7. KUARTZ KUM ORTAMINDA GELİŞMİŞ 5BB VE CABERNET SAUVIGNON BİTKİLERİNİN GÖRÜNÜMÜ (20. GÜN)	41
ŞEKİL 4.8. BİTKİLERDE YAPRAK SU POTANSİYELİ ÖLÇÜM AŞAMALARI.....	42
ŞEKİL 4.9. AGILENT TECHNOLOGIES® 2100 BIOANALYZER CİHAZI VE UYGULAMA AŞAMALARI	46
ŞEKİL 4.10. GENECHIP 3' IVT EXPRESS LABELLING ASSAY-GENEL AKIŞ ŞEMASI.....	47
ŞEKİL 5.1. CABERNET SAUVIGNON BİTKİLERİNDE KONTROL VE KURAKLIK STRESİ (7.GÜN) GÖRÜNTÜSÜ	57
ŞEKİL 5.2. 5BB BİTKİLERİNDE KONTROL VE KURAKLIK STRESİ (7.GÜN) GÖRÜNTÜSÜ	57
ŞEKİL 5.3. CABERNET SAUVIGNON (CS) ÇEŞİDİNDE YAPRAK SU POTANSİYELİNİN (-MPA) GRAFİKSEL GÖRÜNTÜSÜ.....	58
ŞEKİL 5.4. 5BB ANACINDA YAPRAK SU POTANSİYELİNİN (-MPA) GRAFİKSEL GÖRÜNTÜSÜ ..	58
ŞEKİL 5.5. CABERNET SAUVIGNON BİTKİLERİNE AİT RNA'LARIN AGAROS JEL GÖRÜNTÜSÜ	59
ŞEKİL 5.6. 5BB BİTKİLERİNE AİT RNA'LARIN AGAROS JEL GÖRÜNTÜSÜ	59

ŞEKİL 5.7. 5BB ANAÇ KONTROL BİTKİLERİNE AİT RNA'LARIN ELEKTROFEROGRAM (AGİLENT TECHNOLOGİES® 2100 BİOANALYZER)GÖRÜNTÜLERİ	62
ŞEKİL 5.8. CS KONTROL VE STRES BİTKİLERİNE AİT BAZI RNA'LARIN ELEKTROFEROGRAM (AGİLENT TECHNOLOGİES® 2100 BİOANALYZER)GÖRÜNTÜLERİ	62
ŞEKİL 5.9. RNA ANALİZ ÖRNEK GÖRÜNTÜSÜ(AGİLENT TECHNOLOGİES® 2100 BİOANALYZER).....	63
ŞEKİL 5.10. BAZI RNA ÖRNEKLERİNE AİT BİOANALYZER (AGİLENT TECHNOLOGİES® 2100 BİOANALYZER) JEL GÖRÜNTÜLERİ	63
ŞEKİL 5.11. RNA DEGREDASYON PLOT ANALİZİ	64
ŞEKİL 5.12. AFFYMETRIX TARAFINDAN ÖNGÖRÜLEN KALİTE DEĞERLENDİRME ANALİZİ (AFFYMETRIX RECOMMENDED QUALITY ASSESSMENT)	65
ŞEKİL 5.13. ÇIPLERE AİT RELATIVE LOG EXPRESSION PLOTS (RLE) ANALİZLERİ (NORMALIZED UNSCALED STANDARD ERROR PLOT VE RELATIVE LOG EXPRESSION PLOT) 66	
ŞEKİL 5.14. ÇIPLERE AİT HİYERARŞIK CLUSTER ANALİZİ.....	67
ŞEKİL 5.15. FLORESAN IŞIMA ORANLARINA GÖRE GÖRSEL ÇİP ŞEKİLLERİ (<i>PSEUDO-CHIP IMAGES</i>).....	67
ŞEKİL 5.16. ÇİP HAM VERİLERİNİN BOXPLOT ANALİZLERİ.....	68
ŞEKİL 5.17. ARRAY SETİ HISTOGRAMI	68
ŞEKİL 5.18. RMA SONRASI ARRAY SETİ BOXPLOT ANALİZİ.....	69
ŞEKİL 5.19. İFADE FARKLİLİĞİ GÖSTEREN GENLER	70
ŞEKİL 5.20. GENOTİPLERDE BELİRLENEN ORTAK TRANSKRİPTLERE AİT DAĞILIM SAYILARI..	71
ŞEKİL 5.21. İFADE FARKLİLİĞİ GÖSTEREN TRANSKRİPTLERE AİT HÜCRESEL KOMPONENET ANALİZİ.....	72
ŞEKİL 5.22. İFADE FARKLİLİĞİ GÖSTEREN TRANSKRİPTLERE AİT BİYOLOJİK PROSES ANALİZİ	73
ŞEKİL 5.23. İFADE FARKLİLİĞİ GÖSTEREN TRANSKRİPTLERE AİT MOLEKÜLER FONKSİYON ANALİZİ.....	74
ŞEKİL 5.24. KÖK EST VERİLERİ İLE ORTAK OLARAK BELİRLENEN KÖK-YAPRAK TRANSKRİPTOM (PROB) SAYILARI	85
ŞEKİL 5.25. REAL TIME PCR CİHAZINDAN ALINAN 1614820 (TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER-LIKE) PRIMERINE AİT 5BB ÖRNEKLERİNİN STANDART EĞRİ GRAFIĞI, EFFICIENCY VE SLOPE DEĞERLERİ	86
ŞEKİL 5.26. REAL TIME PCR CİHAZINDAN ALINAN 1621592 (DEHYDRINE) PRIMERINE AİT 5BB ÖRNEKLERİNİN STANDART EĞRİ GRAFIĞI, EFFICIENCY VE SLOPE DEĞERLERİ	87

ŞEKİL 5.27. 1614820 (TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER-LIKE) PRIMERİNDE STANDART VE CS ÖRNEKLERİNE AIT AMPLİFİKASYON EĞRİLERİ	87
ŞEKİL 5.28. 1616116 (GALACTINOL-SUCROSE GALACTOSYLTRANSFERASE 6-LIKE) PRIMERİNDE STANDART VE 5BB ÖRNEKLERİNE AIT AMPLİFİKASYON EĞRİLERİ	88
ŞEKİL 5.29. 1614820 (TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER-LIKE) PRIMERİNE AIT STANDART VE 5BB ÖRNEKLERİNE ERİME EĞRİSİ GRAFIĞI	88
ŞEKİL 5.30. CS GENOTİPİNDE KURAKLIK STRESİ MİKRODİZİN İFADE VERİLERİNİN REAL TIME (EŞ ZAMANLI-QRTPCR) İLE VALİDASYONU	89
ŞEKİL 5.31. 5BB GENOTİPİNDE KURAKLIK STRESİ MİKRODİZİN İFADE VERİLERİNİN REAL TIME (EŞ ZAMANLI-QRTPCR) İLE VALİDASYONU	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 2.1. KURAKLIK TOLERANSI AÇIŞINDAN ANAÇLARIN SINIFLANDIRILMASI (12) (SAMSON VE CASTERAN (1971), FREGONİ (1977) VE CARBONNEAU (1985)'E GÖRE).....	33
ÇİZELGE 4.1. STERİLİZASYON AŞAMALARI VE ZAMANLARI.....	37
ÇİZELGE 4.2. ROUBELAKİS KÖKLENDİRME ORTAMI İÇERİĞİ (MAKRO VE MİKRO ELEMENTLER, VİTAMİNLER)	37
ÇİZELGE 4.3. HOAGLAND BESİN SOLÜSYONU İÇERİĞİ.....	41
ÇİZELGE 4.4. DENEME DESENİ (GENOTİP- DOKU- ÇİP) DÜZENİ	42
ÇİZELGE 4.5. RNA İZOLASYON ÇÖZELTİSİ İÇERİĞİ.....	43
ÇİZELGE 4.6. REAL TIME-PCR PRIMER DİZİLERİ (5'-3')	54
ÇİZELGE 5.1. CABERNET SAUVIGNON GENOTİPLERİNE AIT RNA'LARIN PÜRİFİKASYON SONRASI SPEKTOFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ.....	60
ÇİZELGE 5.2. 5BB GENOTİPLERİNE AIT RNA'LARIN SPEKTOFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ (DEVAM)	61
ÇİZELGE 5.3. KURAKLIK STRESİ İLE 5BB ANACINA ÖZGÜ İFADESİ ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01).....	75
ÇİZELGE 5.4. KURAKLIK STRESİ İLE CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01).....	76
ÇİZELGE 5.5. KURAKLIK STRESİ İLE 5BB ANACI VE CS ÇEŞİDİNDE ORTAK İFADESİ ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01)	77
ÇİZELGE 5.6. KURAKLIK STRESİ İLE 5BB ANACINA ÖZGÜ İFADESİ ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) ŞAPERONLAR; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01).....	78
ÇİZELGE 5.7. KURAKLIK STRESİ İLE CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ ARTAN (2 KAT VE ÜZERİ) ŞAPERONLAR; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01)	78
ÇİZELGE 5.8. 5BB ANACINA ÖZGÜ EN FAZLA ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPTLER; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01)	79

ÇİZELGE 5.9. 5BB ANACINA ÖZGÜ EN FAZLA ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPTLER; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01) (DEVAM)	80
ÇİZELGE 5.10. CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ EN FAZLA ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPTLER; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01).....	81
ÇİZELGE 5.11. CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ EN FAZLA ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPTLER; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01) (DEVAM)	82
ÇİZELGE 5.12. 5BB ANACI VE CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ EN FAZLA ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPTLER; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01).....	83
ÇİZELGE 5.13. 5BB ANACI VE CS ÇEŞİDİNE ÖZGÜ İFADESİ EN FAZLA ARTAN VE AZALAN (2 KAT VE ÜZERİ) TRANSKRİPTLER; PROB SET KODLARI, PROBE SET ADI, İFADE KATSAYISI VE İFADE DURUMU (P<0.01) (DEVAM)	84

SİMGELER DİZİNİ

ABA	Absisik asit
ANOVA	Analysis of variance
bp	Baz çifti
cDNA-AFLP	cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism
dk	dakika
DNTP	Deoksi nükleotit tri fosfat
ERE	Etilen duyarlı element
ERFs	Etilen duyarlı faktörlerin
EST	Ekspress Sequence Tags
FDR	False Discovery Rate
g	Gram
<i>g</i>	Gravity
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
L	Litre
LIMMA	Linear Models for Microarray Data
LiCl	Lityum klorür
M	Molar
MeV	Multi Experiment Viewer
Mg	Milligram
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
MS	Murashie and Skog Basal Medium
NCED	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase enzimi
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilenglikol
PLEXdb	Plant Expression Database- http://plexdb.org
PM	Perfect match

pmol	Pikomol
RMA	Robust Multi-array Average
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Real Time PCR
SAGE	Gen ifadesinin Seri Analizi
TE Buffer	Tris EDTA Buffer
Z	Zeatin
ZEP	Zeaxanthin epoxidase enzimi
ZR	Zeatin ribosit

1. GİRİŞ

Bitkide büyüme ve gelişmeyi engelleyerek ürün kalitesi ve veriminde azalmalar meydana getiren faktörler genel anlamda bitkide stres oluşturmaktadır. Bu yönüyle değişik abiyotik ve biyotik stres etmenleri bitkisel üretimi sınırlandıran temel sorunların başında gelmektedir. Stres etmenlerinin üstesinden gelebilmek amaçlı bitkinin mücadelesi ise stres toleransı olarak bilinmektedir. Bitkinin stres toleransı, stres zararına karşı adaptasyon derecesini ve bitkilerin farklı ekolojilerde optimum yetiştirme koşullarını belirleyen temel faktör olarak da belirtilebilmektedir.

Bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri ise kuraklık stresidir (1–3) Son yıllarda küresel ısınmaya paralel artış gösteren kuraklık stresi, bitkide kuruma (aşırı su kaybı) ve su noksanlığı olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir (4). Kuraklık koşullarında bitkide morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Genel olarak stresle oluşan turgor kaybı ve ozmotik potansiyelin azalması sonucu; eriyebilir maddelerde ve vakuolden yapraklara su eşliğinde taşınan ozmotik maddelerin miktarında artış meydana gelmektedir (5,6). Ozmotik uyum olarakta bilinen bu süreçte hormonal düzeyde birçok değişiklik gerçekleşmekte özellikle sitokin ve gibberelik asit miktarlarında azalma ABA miktarında ise artış gözlenmektedir (7). Kuraklık koşullarında su kaybını azaltmak için stomalar kapanarak CO₂ girişi durmakta ve fotosentez engellenmesi gerçekleşmektedir. Fotosentetik bozulmalar sonucu ise reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşmakta ve bunlara karşı antioksidan savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Kuraklığın şiddeti ve süresi artış gösterdikçe ise ROS'ların uzaklaştırılmasında etkin rol oynayan prolin birikimi ise hızlanmaktadır (8).

Su noksanlığına karşı oluşturulan tepkiler ise; türe, çeşide, su kaybı süresi ve şiddetine, bitkinin gelişme ve büyümedurumuna göre farklılık göstermektedir. Bitkinin kuraklık stresine cevabı ise birkaç saniye (bir proteinin fosforilasyon derecesinde meydana gelen bir değişiklik gibi) ya da saatler (farklı stres genlerine ait proteinlerin üretilmesindeki değişiklikler gibi) içinde gerçekleşebilmekte (9).

Günümüzde kuraklık toleransında rol oynayan fizyolojik (osmotik, stoma ilişkili, fotosentez, hormonal değişim), biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlı pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu araştırmalardan, stres cevabı olarak bir genotipe ait ilgilenilen dokulardaki genler ile bunlara ait ifadelerin (artan/azalan)

belirlenmesi ise büyük önem taşımaktadır. Genler ve genlere ait ürünlerin biyolojik fonksiyonlarını toplu halde belirlemeye yönelik ise son yıllarda fonksiyonel genomik (transkriptomiks, proteomiks, metabolomiks) araştırmaları ön plana çıkmaktadır.İlgili bitki genomuna ait transkriptlerin çip üzerinde sabitlenmesi teknolojisine dayanan mikrodizin (oligonükleotid-mikroarray, gen çip) tekniği, binlerce genin ifadesinin ve birbirleriyle olan etkileşimlerinin kısa sürede belirlenmesine olanak sağlamaktadır.

Bitki türlerinin yetiştiriciliği açısından sahip olduğu ekolojik koşullar ile dünya tarımında önemli bir yeri bulunan Türkiye özellikle iklim ve toprak yapısından dolayı bağcılık için dünyada en elverişli alanları içermektedir. Asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra köklü bir bağcılık kültürüne de sahip olan ülkemiz, asma gen kaynaklarının çeşitliliği gerek yerli gerekse yabancı asma populasyonları açısından zenginlik göstermektedir.

Atmosferik koşullar, fiziki coğrafya faktörleri ve iklim koşulları nedeni ile Türkiye'nin birçok bölgesinde etkili olan kuraklığa karşı asma kısmen yüksek, (10,11) tolerans göstermekle birlikte, esas olarak anaç kök sistemi bağcılıkta kurağa (toprak su noksanlığına) toleransı belirlemektedir (12). Ancak anaç toleransı özellikle anaç genotipinin kök yapısına (morfolojisine, anatomisine), kuraklık şiddeti ve süresine bağlı olarak değişmekte anacın düşük toleransında elde edilen ürün kalitesinde veriminde kayıplar meydana gelmektedir.

Mevcut asma anacı gen kaynakları arasında kuraklık stresine toleranslı genotiplerin azlığı ve klasik ıslah yöntemleri ile özellikle toleranslı kök yapısına sahip anaçların elde edilmesindeki zorluklar, kökü kurağa yüksek tolerans gösteren anaçların eldesinde kullanılacak genlerin belirlenmesine yönelik biyoteknolojik yaklaşımları ön plana çıkarmaktadır.

Anaçlarda kök kuraklık (su noksanlığı) stresi cevabına yönelik yapılan ve bilgilerimiz dahilinde literatür bazında ilk olan bu tez çalışmasında; kurağa dayanıklı üzüm çeşidi (Cabernet Sauvignon) ve kurağa hassas asma anacına (5BB) ait kuraklık stresi uygulanmış köklerde gen profilleri mikrodizin analizi ile karşılaştırılmıştır. Kuraklıkla ilişkili stres genleri ile bu genlere ait ifade düzeyi tespit edilirken, türler arası tolerans mekanizmasında rol oynayan ve anaç köklerindeki kuraklıkla ilişkili genler belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Abiyotik Stres

Bitkilerin maruz kaldıkları çevresel faktörler bitkilerde, kalite ve verimlilik üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Bitki gelişiminde, bitkinin ihtiyaç duyduğu optimum çevre koşullarının sağlanamaması halinde, bitkide stres oluşmaktadır. Elverişsiz herhangi bir çevre faktörüne karşı, bitkinin hayatta kalma yeteneği ise 'stres direnci veya stres toleransı' olarak bilinmektedir (5).

Bitkilerin maruz kaldıkları stres etmenleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (5). Biyotik etmenler; enfeksiyon oluşturan mikroorganizmalar (mantar, bakteri, virüs) ve böcekler, abiyotik etmenler ise su, sıcaklık, radyasyon, çeşitli kimyasallar, manyetik yada elektriksel alanlar gibi çevresel etmenleri içermektedir (13).

Abiyotik ve biyotik stres etmenleri ile bitkinin zararlanma derecesi, bitki türüne, türün çevreye adaptasyonuna ve tolerans derecesine bağlı olarak değişmekte ve bu etmenler değişik bitkilerin, değişik ekolojilerde en iyi şekilde yetişmelerini belirleyen temel faktörler içerisinde yer almaktadır (9). Bitkilerin ortalama veriminin %50'den fazla azalmasına neden olan abiyotik stres, dünyadaki tarımsal ürün kaybının en önemli nedenini oluşturmaktadır (14).

2.2. Kuraklık Stresi

Bitkiler gelişim dönemleri boyunca besin maddelerini kökleri ile topraktan suda çözülmüş halde almaktadır. Besin maddeleri su ile taşınarak köklere ulaşmakta ve topraktaki organik madde döngüsü sağlanmakta, bitki ısı dengesi korunmaktadır. Kökler aracılığı ile topraktan alınan suyun önemli bir oranı yapraklarından transpirasyon ile atılmaktadır. Az bir oranı ise bitkisel dokularda tutularak, önemli moleküler bileşiklerin oluşumunda kullanılmaktadır. Normal koşullarda, topraktaki su kök yüzey alanı ile temas geçerek, kök tarafından emilmekte ve suyun gövdeye geçiş süreci başlamaktadır (9). Kök yüzey alanı, epiderma hücrelerinden oluşan kök tüyleri ile artmakta, böylece su emiliminde artış gözlenmektedir.

Nem azalması, sıcaklık artışı, artan kuru hava gibi çevresel değişimler (terleme), bitkide transpirasyonu arttırarak topraktaki suyu azaltmakta ve kuraklık stresine sebebiyet vermektedir. Bitkilerde transpirasyonla kaybolan su miktarı, köklerle alınan su miktarından fazla olduğunda, iletim boruları içerisinde negatif basınç oluşarak tüm organlardaki su potansiyeli dengeleri bozulmaktadır. Su potansiyelindeki değişiklikler, kuraklık stresini başlatmakta ve bitkide metabolik, mekanik ve oksidatif olmak üzere birçok değişiklik meydana gelmektedir (15). Kuraklık stresi ile gelişim yavaşlamakta, stresin şiddeti ve süresindeki artışa bağlı olarak gelişim tamamen durmakta, ürün ve verimde önemli kayıplar meydana gelmektedir. Kuraklık stresinin bitkide etkileri esas olarak morfoloji, fizyolojik ve fotosentez ile ilişkili olarak 3 başlık altında incelenmektedir.

2.2.1. Kuraklık Stresinin Morfoloji Üzerine Etkileri

Kuraklık stresinin bitki morfolojisi üzerine etkisi özellikle yaprak ve köklerde görülmektedir.

2.2.2. Kuraklığın Yaprak Morfolojisi ve Anatomisine Etkisi

Yapraklar bitkide kuraklığa karşı oldukça hassas organlardır ve kısa dönem kuraklık şartlarında bile, yaprak gelişimi yavaşlamakta, solgunluk oluşumu gözlenmektedir. Kuraklık koşullarında stomalar kapanarak karbondioksit absorpsiyonu azalmakta ve stoma dışındaki bazı hücrel faktörlere (elektron taşınımı, fotofosforilasyon) bağlı olarak fotosentez hızı yavaşlamakta ve bitki gelişimi engellenmektedir. Fotosentez hızındaki azalmalara ek olarak, uzun dönem kuraklıkla birlikte bitki, su kaybını en aza indirmek için yaprak yüzey alanının azaltılmasına gitmekte dolayısıyla yapraklarda dökülmeler meydana getirmektedir.

Kuraklık stresinde gözlemlenen diğer bir morfolojik değişim ise; yaprak üst yüzeyinde meydana gelen tüy oluşumudur. Bu tüyler, kapladıkları hücrelerin sıcaklıklarını 1-2°C azaltarak transpirasyon hızını düşürmektedir. Bazı bitki türlerinde ise, mumsu madde (kutikula) üretimi gerçekleşmektedir (16). Kutikula oluşumu ile güneş ışınları yansıtılarak, sıcaklığın etkileri aza indirilmekte ve transpirasyon hızı azaltılmaktadır. Otsu bitkilerde ise, terleme hızında azalmanın olması için özellikle yaprak transpirasyon yapan alanlarda (yapraklarda kıvrılmalar vb.) azalış olmaktadır (15).

2.2.3. Kuraklığın Kök Morfolojisi ve Anatomisine Etkisi

Kuraklık koşulları altında köklerde gerçekleşen morfolojik değişimlere bakıldığında ise; topraktaki suyun daha hızlı emilimi için gelişim hızlanmakta ve genel olarak bitkide kökün gövdeye oranında artış gözlenmektedir. Ancak kuraklık koşullarında yapılan araştırmalarda, kök:gövde oranı arasındaki bu ilişkinin her bitki türünde sabit olarak gözlemlenmediğini göstermiştir (17). Bu durum ise farklı kök sistemlerindeki su alma mekanizmalarının farklı olmasıyla açıklanmaktadır. Bazı türlerde ise kök kalın bir doku tabakası ile kaplanmakta, bu tabaka iç tarafta kalan canlı kök hücrelerini toprak kuruluşuna karşı korumaktadır (18). Bazı türlerin köklerinde ise apoplastik bariyerlerde gelişim gözlenmektedir. Bu bariyerler, hücre duvarının iç kısımlarındaki suberin tabakalarını, sklerenkima hücrelerindeki lignin ve ekzodermis hücrelerindeki kasparyan bandını içerecek şekilde yapılanmaktadır (19). Bu gelişimlerin köklerden toprağa su kaybını azaltmak amaçlı hücrel bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (20). Bununla birlikte mısır, pirinç gibi bazı bitkilerde kuraklığa tepki olarak, apoplastik bariyerlere ilave, aerenkima gelişimi de gözlemlenebilmektedir (21),(22). Morfolojik değişimlere ek olarak, kuraklık şartlarında gözlemlenen temel fizyolojik durum ise, bitkide kök dışındaki organlardan köklere çözünür karbonhidratlar taşınarak ozmotik basıncın dolayısı ile köklerdeki su emme kuvvetlerinin artmasıdır.

2.3. Kuraklık Stresinin Fizyolojik Etkileri

2.3.1. Mekanik ve Metabolik Etki

Kuraklıkla birlikte meydana gelen su noksanlığı, turgor basıncı düşürürken bitkide mekanik etkiyi tetiklemektedir. Su noksanlığı hücre membran yapısında değişimler meydana getirmekte (4) ve buna bağlı olarak hücre hacimsel olarak küçülmektedir (5). Plazma membranı hücre duvarından ayrılarak, plazmoliz (bitki hücresinin izotonik ortamdan kendisinden daha yoğun bir başka bir deyişle çözünmüş madde yoğunluğu fazla olan ortama konulduğunda hücredeki küçük moleküllerin enerji harcamaksızın çok yoğun hücre ortamından, az yoğun ortama geçişi) meydana gelmektedir. Hücre öz suyunundaki konsantrasyonun artmasıyla, membranda yırtılmalar meydana gelmektedir. Yırtılmalar sonucu zarlar üzerine yerleşik halde bulunan hidrolitik enzimler serbest hale geçerek, sitoplazmanın otolizine neden olmakta ve kalıcı hasar oluşturabilmekte böylece hücre gelişiminde yavaşlama meydana getirmektedir (5).

Hücre membranında meydana gelen değişimlerin temelini lipid bileşimindeki ve proteinlerdeki değişimler oluşturmaktadır (15). Normal koşullarda, membrandaki lipidlerinin dizilimi ve membranın permeabilitesi (geçirgenliği) sulu ortam sonucu oluşmaktadır (fosfolipid kuyruklarının su tarafından itilmesi). Su kaybı ile fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yakınlaşmakta, lipid permeabilitesi bozularak membran jel fazı halini almaktadır (18). Hücrede lipid tabakasında meydana gelen bu değişim membran bütünlüğünü etkileyerek membran seçiciliğinde sorunlar oluşturmaktadır (15),(5). Ayrıca membrana bağlı enzimlerin aktivasyonu azalmakta ve membran kinetik aktivitesini kaybederek hareketi kısıtlanmaktadır.

Strese bağlı oluşan osmotik basınçtaki değişimden dolayı hücredeki mevcut proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin etkileşimleri de azalmaktadır.

2.3.2. Oksidatif Etki (Reaktif Oksijen Türleri)

Bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS), metabolizmanın yan ürünleri olarak yada enzimler vasıtasıyla solunum veya fotosentez sırasında üretilmektedirler (5),(23). Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron eksilmesi veya atom veya moleküle bir elektron eklenmesi ile Bu nedenle hücrede enzim inhibisyonları ve protein denatürasyonları hızlanarak hücre büyük ölçüde zarar görmekte (24) ve artan RNAaz aktivitesine bağlı olarak DNA, RNA degradasyonları (parçalanmaları) başlamaktadır (25). ROS'lar, elektron alma ve elektron verme özelliklerinden dolayı bitkide indirgeyici ve/veya yükseltgeyici olarak davranmaktadırlar.

Normal gelişim koşulları altında bitkide reaktif oksijen ara ürünlerinin üretimi düşük seviyede olmaktadır. Başta kuraklık olmak üzere, tuz stresi, sıcaklık gibi birçok abiyotik stres koşulu altında, reaktif oksijen üretimi artarak hücrede detoksifikasyon dengesinin bozulmasına yol açmaktadır (26). Hücredeki meydana gelen artış ile bitkide oksidatif stres meydana gelmekte ve böylece lipidlerin peroksidasyonu, proteinlerin oksidasyonu, nükleik asit hasarı, enzim inhibisyonu, programlanmış hücre ölümü (apoptozis) aktivasyonu gibi bir çok olay tetiklenebilmektedir (27).

Reaktif oksijen türleri normal koşullarda, başta kloroplastlarda (fotosentez reaksiyonları) olmak üzere, plastitlerde, peroksizomlarda ve mitokondrilerde (sitrik asit döngüsü) oluşum göstermektedirler (26). Hücrelerde bilinen başlıca ROS'lar; oksijen (O₂), süperoksit

anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot)' dir. Bazı bitkilerde plazma ve ER membranlarında da reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir (26).

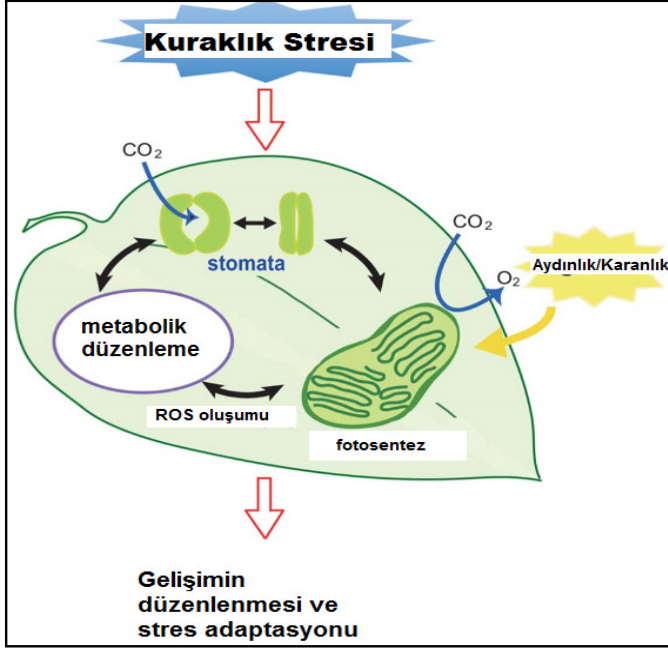
Fotosentezle ilgili olarak kloroplastlarda fotosistem I'in ve fotosistem II'nin indirgen bölgesi olmak üzere iki oluşum bölgesi bulunmaktadır. Kuraklık stresi ile birlikte, $NADP^+$ (fotosentezdeki e^- akseptörü) kısıtlı hale gelmekte ve ferrodoksin $NADP^+$ yerine oksijen redüklenerek, fotosistem I'in elektronlarının O_2 'ye transferi sonucunda reaktif O_2^- üretilmekte ve ROS miktarında artışa neden olmaktadır (Mehler reaksiyonu) (28). Bir çok türde kuraklık stresi altında O_2^- artışı, lipid peroksidasyonuna zarar vererek membranların bütünüyle parçalanmasına neden olmaktadır (29). Oluşan O_2 radikali tek başına yüksek aktivite göstermeyip, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) oluşumuna temel oluşturabilmektedir (29). Meydana gelen bu durum oksidatif stres hasarında artışa yol açabilmektedir (27).

Oluşan ROS'lara karşı bitkide savunma amaçlı antioksidan molekülleri artış göstermektedir. Bu moleküller; enzimatik antioksidantlar (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR)), enzimatik olmayan antioksidantlar (askorbat, α -tokoferol, β -karoten) olarak bilinmektedirler (30) (Şekil 2.1.).

Abiyotik ve biyotik stres koşulları altında, birçok bitkide antioksidan moleküllerindeki ifade değişimleri ve aktiviteleri tanımlanmıştır (25). Buna karşın kuraklık stresi ile meydana gelen oksidatif stresi en aza indirmek için, antioksidantların ya tamamı aktive olmakta yada bir kısmı devreye girmektedir (30),(31).

Yapılan araştırmalarda birçok bitki türünde ve aynı bitki türünün farklı çeşitlerin de bile kuraklık şiddeti ve süresine bağlı olarak antioksidan miktarı ve aktivitesinin değişkenlik gösterdiği açıklanmaktadır (31). Sofo ve ark. tarafından zeytinde yapılan araştırmada, zorlu kuraklık şartlarında bitkiye ait kök ve yapraklarda SOD, APX, CAT ve POD enzimatik antioksidan aktivitelerinde artış gözlemlenirken, bu antioksidanlardan özellikle APX aktivitesinin özellikle yapraklarda belirgin olarak arttığını saptanmıştır (32). Yapraklardaki APX artışı ile ROS'lara karşı kloroplastların korunduğu ve yüksek elektron aktarım oranlarının bu şekilde engellendiği kanıtlanmaktadır.

Enzimatik olmayan antioksidanlar ise, glutatyon, askorbat, karotenoid, α -tokoferol ve çeşitli fenolik bileşikleri içermektedir. Bu antioksidanlar enzimatik olan antioksidanların tersine, kuraklık şiddeti, süresi ve hatta bitki türüne göre herhangi bir değişim göstermemektedir (33).



Şekil 2.1. Kuraklık stresine karşı bitkide oluşan yanıtların (stomaların kapanması, ROS oluşumu, metabolik değişiklikler vb.) şematik gösterimi (34).

2.3.3. Kuraklık Stresinin Fotosentez Üzerine Etkisi

Kuraklık stresi koşullarında, fotosentezde meydana gelen gerileme temelde iki şekilde olmaktadır. Bunlardan ilki; orta düzeydeki kuraklık koşulları altında stomaların kapanması ile meydana gelen stoma kaynaklı sınırlamalardır. Strese bağlı olarak, su kaybının önlenmesi amaçlı stomalar kapanmakta ve bu nedenle CO₂ absorpsiyonu azalmaktadır (35). Stomaların kapanmasını sağlayan temel nedenler; hidrolik sinyaller (yaprak-su potansiyeli, hücre turgoru) ve kimyasal sinyaller (absisik asit)'dir. Bunlardan özellikle köklerden salgılanan absisik asit (ABA) stomalardaki bekçi hücrelerindeki ABA reseptörlerine bağlanarak stomaların kapanmasını sağlamaktadır (26). Günümüzde kuraklık stresi ile bitkide meydana gelen hidrolik ve kimyasal sinyallerin birbirleri ile ilişkili olduğuna yönelik farkı bitkilerde yapılan birçok araştırma yer almaktadır (36). Fotosentez stoma kaynaklı olmayan sınırlamalar nedeni ile de azalma göstermektedir. Stomalarda kuraklık ile birlikte bazı enzimlerin aktivasyonunda azalma meydana gelmekte

ve buna bağlı olarak CO₂ fiksasyonu (Kalvin dongüsü) zarar gormektedir. Normal koşullarda stomalarda CO₂'yi fikse eden ve indirgeyerek organik bileşiklere donüşmesini sağlayan rübuloz bifosfat karboksilaz enzimi (RuBPCase) kuraklık stresinin devam etmesi veya şiddetinin artması ile birlikte biyokimyasal aktivitesinin bozulması sonucu fotosentezde duraklamalara yol açmaktadır. Ayrıca uzun donem kuraklıkta mezofil hücrelerinin hücre duvarının difüzyon direnci artmakta ve böylece mezofil hücrelerine CO₂ girişi önlenmektedir (18). Yapılan bir araştırmada, bitkide yaprak su içeriği özellikle %70 oranının altına düştüğünde, stomalarda kapanma gerçekleştiği ve fotosentezle ilişkili enzim aktivitelerinde azalma meydana geldiğini ve bu nedenlerle ilişkili olarak fotosentezde azalma olduğu belirlenmiştir (37),(38) aynı şekilde kuraklık stresi ile fotosentezde görevli enzimlerin engellenmesi sonucu fotosentezin azaldığını açıklamışlardır.

Stoma kaynaklı olan ve olmayan faktorlerle fotosentezde meydana gelen değişimler, kuraklık stresinin şiddetine ve bitki tür, çeşit özelliğine bağlı olarak değişebilmektedir (24). Özellikle orta şiddetli kuraklık stresi altında yaprakta stoma sayısının arttığı, şiddetli kuraklık stresi altında ise stoma sayısı ve boyutunda önemli derecede azalmalar meydana geldiğini açıklanmış ayrıca stoma geçirgenliğinin de bitkide su kullanımı ve CO₂ asimilasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (24).

Kloroplastlarda yapılan çalışmalarda, kuraklıkla birlikte, fotosentezde merkezi role sahip fotosistem I' in ve fotosistem II' nin etkilendiği ve özellikle fotosistem II' de reaksiyon merkezini oluşturan D1 ve D2 proteinlerinin zarar gordüğünü belirlenmiştir. Normalde belirli bir kuraklık şiddetine kadar D1 protein seviyesi sabit kalmasını sağlayan onarım sistemi, yüksek kuraklık koşullarında görev yapamamakta ve D1 proteinin degradasyonuna yol açmaktadır. Bu durum ilerki aşamalarda D2 proteinin degradasyonuna ve son olarak fotosistem II'nin parçalanmasına neden olmaktadır (15).

2.4. Kuraklık Stresinde Kökle –Yaprak Arasındaki Hücresel Sinyal İletimi

Bitkiler abiyotik, biyotik stres koşullarında, cevap olarak bitki kontrol mekanizması ve sinyal iletimini kullanmaktadırlar. Stres sinyallerinin bazıları bitki iletim sisteminden sorumlu ksilem ve floem tarafından sağlanmaktadır. Oluşan strese karşı bitkide meydana gelen cevaba, bitki yaşı, stres zamanı (gerçekleştiği donem), günlük ritim (circadian clock), bitkinin daha önce aynı stresle karşılaşıp karşılaşmaması gibi bazı etmenlerin etkisi bulunmaktadır. Bitkinin kuraklık stresine adaptasyonunda hem hidrolik hem de kimyasal

sinyaller önem taşımaktadır. Özellikle toprakta su kaybı arttıkça, kök kaynaklı sinyaller ksilem-yapraklar boyunca iletilmekte ve bu durum yaprak gelişimin azalmasına sebep olmaktadır. Başta absisik asit (ABA) olmak üzere, pH, sitokinler, etilen, malik asit ve diğer tanımlanmamış bazı kimyasal faktörlerin, kuraklık koşulunda, kökle ilişkili olarak sinyal yollarında rol aldığı yapılan araştırmalarla açıklanmaya çalışılmıştır.

Kökün abiyotik stres altındaki değişimleri (toprak su içeriği, toprak oksijen içeriği gibi) algıladığı ve kimyasal hidrolik sinyaller oluşturduğu bilinmektedir (39). Kimyasal sinyaller hidrolik sinyallerden farklılık göstermekte ancak her ikisi de kuraklık şartlarında, stoma geçirgenliğini ve yaprak gelişimini azalttığı için önemli görevler taşımaktadır. Kimyasal sinyaller muhtemelen stresin erken evrelerinde, hidrolik sinyallerin üretilmesinden önce meydana gelmekte ve şiddetli kuraklık şartlarında yaprak-su potansiyeli eksildiğinde ve yapraklar solduğunda önemini yitirmektedir (40).

Köklerde gerçekleşen kimyasal sinyaller tam olarak halen çözülememesine rağmen (41), bitki gelişim ve solunumunda etkin bir rol oynayan ABA ve etilen gibi diğer faktörler de kimyasal sinyaller açısından önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.2.)

2.4.1. ABA (Absisik Asit) Sinyal Mekanizması

Absisik asit (ABA), bitkide doğal olarak sentezlenen ve bitki gelişmesinin düzenlenmesinde görev alan büyüme inhibitörüdür (42),(43). Kapalı kimyasal formülü $C_{15}H_{20}O_4$ ve molekül ağırlığı 264.32g/mol olan ABA, seskuiterpen yapısındadır. Kimyasal yapısında asimetrik karbon atomu bulduran ABA, optik (enantiomer) ve geometrik izomerizim özelliğine sahiptir (44).

ABA, tohum ve tomurcuk dormansisi, yaşlanma (senesens), embiryo gelişimi, meyve gelişimi, meyve olgunlaşması, tohum çimlenmesi, çiçeklenme, iyon-su taşınımı ve kök geotropizması gibi birçok fizyolojik olayda görev almaktadır (42). Normal şartlar altında bitki hücrelerinde ABA miktarı düşük oranlardadır ve bu orandaki ABA bitkinin normal gelişimi için kullanılmaktadır (45). Ayrıca ABA, metabolik aktivite sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerinin (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali) bitkisel dokularda artmasını tetiklenmekte ve böylece bitkide antioksidant savunma sisteminin uyarılması gerçekleştirilmektedir (46),(47).

Stres hormonu olarak da bilinen ABA'nın (48), bitkide strese karşı oluşturulan yanıtta düzenleyici olarak aktif rol oynadığı ve başta kuraklık ve tuz stresi olmak üzere (49);(50) abiyotik stres koşulları altında bitkide meydana gelen moleküler değişimlere bağlı olarak arttığı fizyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Özellikle kuraklık stresi ile birlikte oluşan düşük su potansiyeli altında kökte sentezi gerçekleştirilen ABA, kökler tarafından ksileme aktarılarak stoma hücrelerine taşınmakta (51)ve buradaki ABA reseptörüne bağlanarak stomaların kapanmasına ve ilgili bir birçok genin uyarılmasına neden olmaktadır (52),(53). ABA, stomalardaki bekçi (guard) hücrelerdeki Ca^{+2} iyonunda artışa sebep olmakta ve artış stomaların kapanmasında etkin rol oynamaktadır (54). ABA'nın strese karşı yanıtında, birçok fosfolipid türevli hücre içi mesajcılar (fosfolipaz C, fosfolipaz D gibi) rol oynamaktadır. Bu hücre içi mesajcılarının aktivasyonu ile ikincil mesajcılar (fosfatidik asit) oluşmaktadır (55),(56).

ABA'nın kökte üretimi ve yapraklara transport mekanizması ve buna bağlı olarak stomal iletkenlikteki rolü birçok araştırmalarda açıklanmıştır. Bazı araştırmalarda, bioassay yaklaşımı kullanılarak ABA'nın transpirasyonu (terlemeyi) azalttığı gösterilmeye çalışılmıştır. Günümüzde ABA'nın bekçi hücre kapanmasında doğrudan rol oynadığı bilinmektedir. Birçok bitki türünde köklerdeki ABA oranı, toprak nemliliği ve köklerdeki su içeriği ile ilişki olarak değişmektedir (57).

Kuraklık altında tütünde (*Nicotiana plumbaginifolia*) yapılan çalışmalarda ABA'nın tamamen kökten geldiği açıklanmıştır (58). Kökteki sentez yeri ile ilgili kesin bulgular olmamasına karşın, *Bezelye (Pisum sativum)* ve *Asya gün çiçeği (Commenlina comunis)* yürütülen araştırmalar ABA sentezinin sadece kök uçlarında gerçekleştiğini açıklarken bazı çalışmalar ise kök ucuna 3 cm uzaklık ile kök ucu arasında bir yerde gerçekleştiğini açıklamışlardır (57).

ABA'nın kökle sürgün arasındaki baskın rolü, kuraklık stresindeki bitkilerde ksilem öz suyunda ölçülen ABA konsantrasyonunun, yaprakta bulunan ekzojen ABA (stomaların kapanmasında gerekli) konsantrasyonlara göre daha düşük bulunduğu da kanıtlanmıştır. Ayrıca; ABA biyosentezi ile ilişkili enzimlerin (aldehid oksidaz gibi) lokasyonları üzerinde çalışılmış ancak bu çalışmalar kuraklık stresinden daha çok, farklı nitrojen miktarları altındaki ABA üretimi üzerinde yoğunlaşmıştır (59). ABA'nın stomasal kontrolündeki

rolünü destekleyen birçok çalışma ve yaklaşım bulunmasına rağmen, ksilem öz suyunda bulunan bazı maddelerin (jasmonik asit), kuraklık nedenli stoma kapanmalarında ABA ile uyumlu olarak rol aldığı açıklanmıştır (60).

Kuraklık stresi altında stoma kapanmasında etkin rol oynayan ABA tamamen kökten kaynaklı olmayıp, bazı türlerde (domates, ayçiçeği gibi) yapraklarda da üretilebilmektedir (53). Ksilem öz suyunda bulunan ABA konsantrasyonunun yapraklardaki egzojen (dış kaynaklı) ABA konsantrasyonuna göre çok daha düşük seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir (49). Kuraklık süresinde ve şiddetindeki artışa bağlı olarak yaşlı yapraklarda da hidrolik iletim bozuklukları meydana gelmekte, bu yapraklarda da az miktarda da olsa ABA sentezi gerçekleşmekte ve ksileme aktarılmaktadır. Hem kökten hem de yaşlı yapraklardan ksileme aktarılan ABA sayesinde bitkideki genç yapraklarda daha şiddetli stomal inhibisyon oluşmaktadır (51). Arabidopsis' te yapılan çalışmada ABA sinyal yolağı ile ilişkili protein fosfatazlar (*ABI1* ve *ABI2*) ve transkripsiyon faktörleri (*ABI3-5*) izole edilmiştir (61).

ABA biyosentezi kök ve yapraklarda zeaxanthin epoxidase (*ZEP*) enzimi ile başlamaktadır. Sentezdeki anahtar düzenleyici basamak ise 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) enziminin katalizasyonudur (53),(62). *NCED* enzimi plastidlerde öncül epoksi karatenoid molekülünü zeaksantine (xanthoxin) çevirmektedir ve sonrasında iki sitozolik enzim tarafından, absisik aldehit eşliğinde zeaksantin ABA'ya dönüşmektedir. Domates, mısır gibi bitkilerde *NCED* genine yönelik yapılan çalışmalarda *NCED* promotörünün kuraklık stresi ile birlikte hem kök hem yapraklarda etkilendiği gözlemlenmiştir (62). ABA biyosentezinin son aşamasında ise, ABA; absisik aldehit oksidaz enzimi (*AAO3*) ile katalize olmaktadır (44). Bu enzimin kontrolü transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel seviyelerde olmakta ancak bu düzenlenmeye ait kesin fonksiyonlar ve translasyonel düzenlenmeler halen belirsizdir (14).

Yapılan araştırmalarda, bitkiye dışardan ABA uygulaması yapıldığında cevap vermeyen fakat kuraklık stresiyle indüklenen birçok gen bildirilmiştir. Bu durum kuraklık stresine karşı ABA-bağımsız sinyal yolağının da bulunduğunu kanıtlamaktadır (63).

ABA bağımlı ve ABA bağımsız olmak üzere kuraklık stresinde rol oynayan her iki sinyal yolağının birbirleri ile etkileşim halinde olduğu kanıtlanmıştır (64),(65). Bu sinyal

yalaklarıyla ilişkili genlere ait promotörlerde aynı anda DRE ve ABRE elementlerinin bulunabildiği ve bazı genlerin (*rd29A* gibi) kuraklık stresinin ilk saatlerinde ABA bağımsız sinyal yolağında görev alırken, gen ifadesinin sonraki evrelerinde ABA bağımlı olarak görev aldığı kanıtlanmıştır (66).

2.4.2. Etilen Sinyal Mekanizması

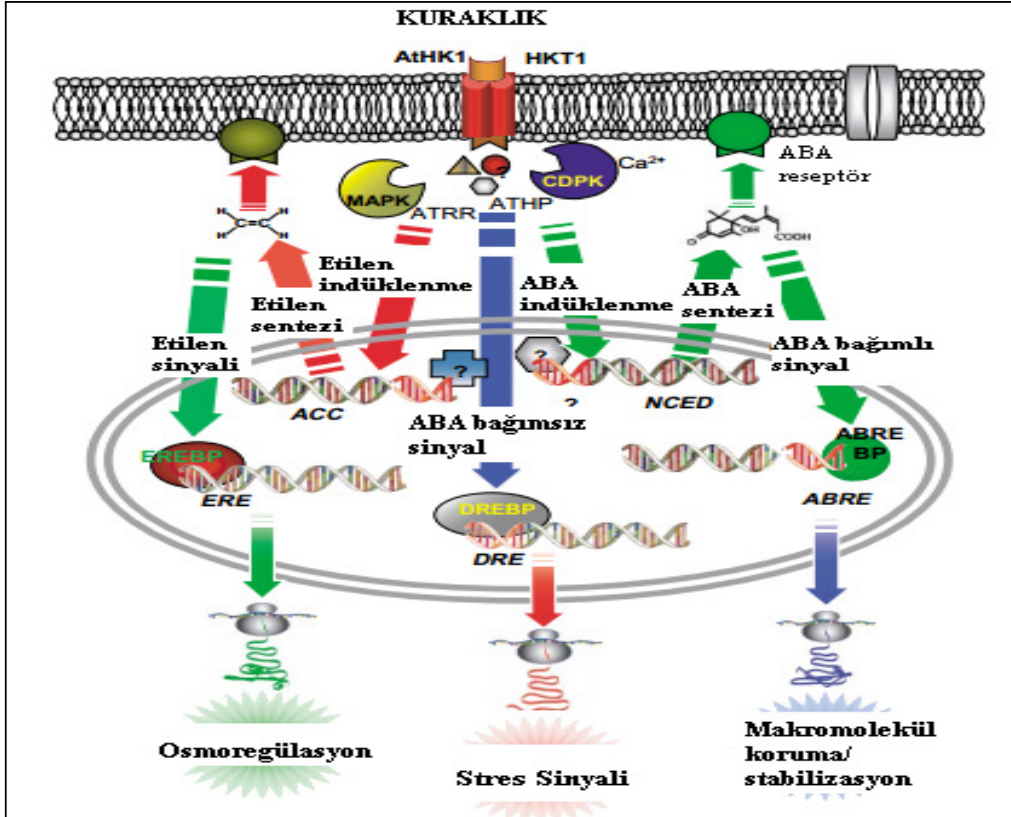
Bitkilerde olgunlaşma hormonu olarak bilinen etilen havadan biraz hafif ve yağda iyi çözünme özelliğine sahip bir gaz olması nedeni ile diğer bitkisel hormonlara göre farklılık göstermektedir. Etilen hormonu; tohum çimlenmesi, yaprak kopması, meyve kopması, meyve olgunlaşması gibi bitki yaşamının bir çok aşamasında rol oynamakla birlikte, düşük/yüksek sıcaklık, kuraklık ve bazı kimyasallar gibi stres şartlarına karşı bitkisel tepkide de görev aldığı tespit edilmiştir (67).

Hücrede etilen sentez kapasitesi değişkenlik göstermekle birlikte hemen hemen her hücrede sentez süreklilik göstermektedir. Sentezlenen etilenin hücrede birçok öncü maddesi olmakla birlikte temel öncü maddesi olarak metionin bitkide kolayca etilene çevrilebilmektedir. Döngü ile açığa çıkan CH_3S grubunun bitkilerce tutulmasıyla tekrar metionine dönüştürülmekte ve bu döngü mekanizması sayesinde hücrede methionin seviyesi azalsa bile etilen miktarı sabit oranda tutulabilmektedir.

Etilen döngüsüne kısaca bakılacak olursa; ara madde olan S-adenosylmethionine (SAM) fermente yolu ile methylthioadenosize (MTA) şekline dönüşmekte ve hidrolize olarak önce methylthioribozu (MTA) sonrasında ise methionini oluşturmaktadır. SAM'in CH_3S grubundan MTA meydana gelirken, geri kalan kısım ise ACC (1-aminosiklopropan-1 karboksilik asit) dönüşmektedir. ACC etilenin öncül maddesi olup, ACC sentaz enzimi eşliğinde, oksijenli ortamda etileni oluşturmaktadır (67).

Köklenmeyi arttıran oksin ve köklenmeyi engelleyen sitokin hormonlarına ilave olarak etileninde adventif kök oluşumunda da görev alabileceğine dair farklı görüşler bulunmaktadır (68). Bir grup araştırmacı etilenin sitokininleri indirgeyerek bloke edip köklenmeyi teşvik ettiğini açıklarken, diğer bir grup araştırmacı ise etilenin mevcut oksin miktarını azaltarak köklenmeyi engellediğini bildirmişlerdir (68).

Önceleri kuraklık stresine karşı etilenin rolü tartışmalı iken (69), son yıllarda yapılan çalışmalarda ABA'nın etilen etkisi ile bitki organ gelişimini etkilediği bildirilmektedir. Temel olarak kuraklık şartlarında öncül etilen, 1-aminosiklopropan-1 karboksilik asidin (ACC) ksilem öz suyuna geçerek, yapraklardaki etilen döngüsünün artmasına neden olduğu açıklanmıştır (70). Mısırdaki yapılan diğer bir çalışmada ise, kuraklık stresinde, mısır yapraklarındaki etilen döngüsü ile yaprak gelişimindeki azalma arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır (71).



Şekil 2.2. Kuraklık stresinde ABA bağımlı, ABA bağımsız ve Etilen sinyal yolları (72)

2.4.3. pH

Kuraklıkla birlikte ksilem öz suyunda genel olarak gözlemlenen pH değişimlerinin, kökle sürgün arasında önemli bir içerik olabileceği düşünülmektedir. Bir çok bitki türünde (*Helianthus annuus*= Ayçiçeği, *Phaseolus coccineus*= Bombay fasulyesi gibi) (52) kuraklıkla beraber ksilem öz suyundaki pH, alkaline dönüşmekte ve bu durum stomada kapanmaya öncülük ederek bitki gelişimini azaltmaktadır. Kuraklık altında, pH'ın potansiyel etkileri özetlenecek olursa; doğrudan yaprak-su oranına etki ederek, stomalardaki bekçi hücrelerdeki turgorun ve yapraktaki ABA konsantrasyonunun

değişimine sebep olabilmektedir. Bu durum bekçi hücrelerine ait plazma membranına doğrudan etki ederek, iyon akışının değişmesine sebep olmaktadır.

Kuraklık şartlarında, ABA ve pH'ın birlikte stoma kapanmasına etkisi, türler arasında ve hatta aynı türe ait çeşitler, genotipler arasında bile değişiklik göstermektedir. *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis) ve *Commelina communis* (gün çiçeği) ile yapılan çalışmada, artan pH ile *C. communis*' da stomal açılmalarda %27 oranında artış gözlemlenirken, *Arabidopsis thaliana*' da herhangi bir etki meydana gelmemiştir (73). Diğer bir çalışmada ise; toprakta kuraklık arttıkça *Helianthus annuus* ve *C. communis*'e ait ksilem özsuyuna ait pH'da önemli bir değişim olmazken, domateste ksilem özsuğu pH'sında artış gözlemlenmiştir (74).

Kuraklıkla meydana gelen pH değişiminin kesin olmamakla birlikte topraktaki nitrat değişimi ile ilişki olabileceği de düşünülmektedir. Toprak kurudukça fizikokimyasal değişimler nedeni ile besin elverişliliği azalmaktadır. Nitrat kullanımının azaldığı şartlarda, organik asit üretiminin değişimi ile değişen nitrat redüktaz aktivitesi kökleri etkileyerek, ksilem özsuyunda pH değişikliklerine neden olmaktadır (73).

2.4.4. Sitokininler

Genel olarak kökte üretilen (75) ve bu nedenle kökle sürgün arasında sinyal iletiminde etkin rol oynadığı düşünülen diğer önemli etmen sitokininlerdir. Kök kaynaklı sitokininler, besin eksikliği ile meydana gelen tepki ile ilişki halindedirler (76). Üzümde ksilem özsuyundaki sitokinin miktarı ve bu miktarın kuraklık koşullarındaki değişimlerini inceleyen bir çalışmada, bitkilerde yaygın olarak bulunan sitokininler olan zeatin (Z) ve zeatin ribosit (ZR) miktarlarında %50 oranında azalma gözlemlenmiştir (77).

Mısırdaki yapılan diğer bir çalışmada ise, kuraklıkla ksilem saptaki meydana gelen sitokinin değişimi incelenmiş ve özellikle zeatin (Z) ve zeatin ribosit (ZR) miktarlarında önceki çalışmaya benzer olarak azalış gözlemlenmiş, ancak şaşırtıcı şekilde, aromatik sitokininin 6-benzilaminopürin (BAP) (aromatic cytokinin 6-benzylaminopurine) miktarında artış gözlemlenmiştir (78).

Ksilem öz suyundaki ABA ile sitokinin oranı stres sinyal iletiminde önem taşımaktadır. Ancak sitokinin yapısı halen tam olarak aydınlatılmadığı için, stres sinyal iletimindeki sitokinin içerikleri ve değişimleri net olarak belirlenmemektedir.

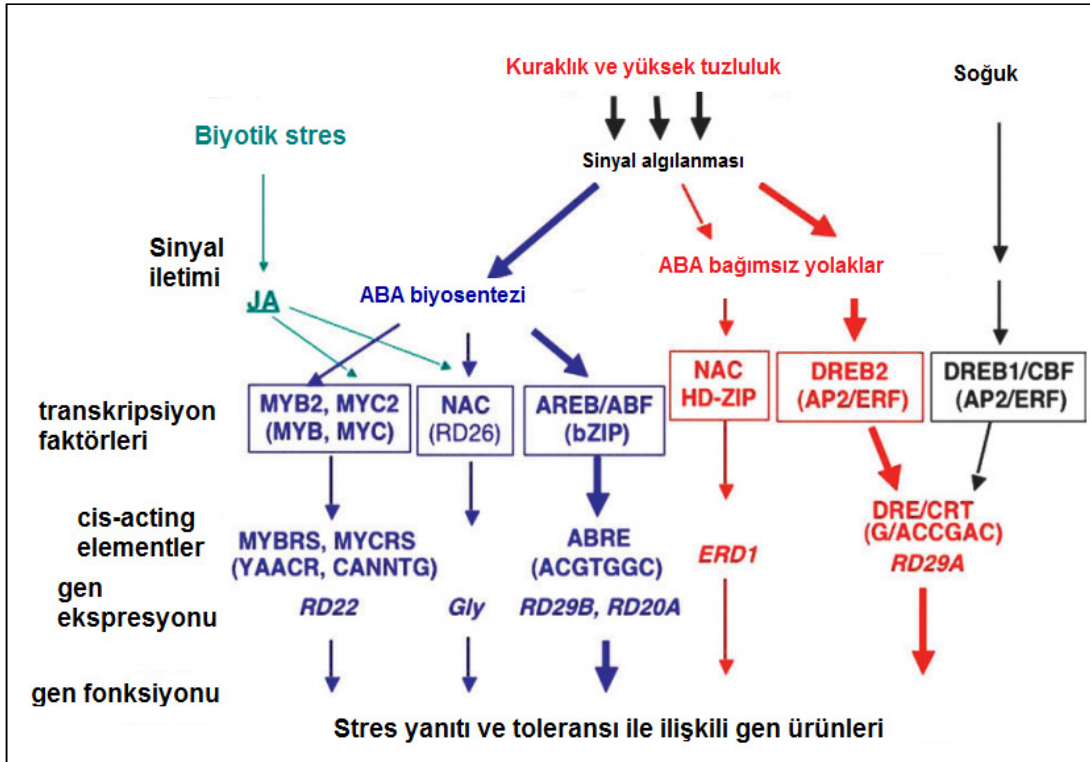
2.4.5. Diğer Kimyasal Sinyaller

Potansiyel sinyal molekülü olan MikroRNA (miRNA)'ların ksilem öz suyundaki fonksiyonel görevi tam olarak bilinmemekle birlikte, *Arabidopsis thaliana*' da kuraklık uygulaması sonunda spesifik miRNA (mir-169g) varlığı kanıtlanmış ve bitkide floem boyunca sistematik olarak hareket ettiği belirtilmiştir (79). Stres sinyal iletiminde miRNA' lara ilave hormon, inorganik iyon, aminoasit, şeker ve organik asit gibi birçok içerik ksilem öz suyunda tanımlanmıştır (80). Bunlar arasında özellikle organik asitler yoğun olarak ksilem öz suyunda bulunmakta ve organik asitlerden malat (malate) asitin stomal kapanma ile ilişkili olduğu ve bunu destekler nitelikte, *Fraxinus excelsior* bitkisinde de 0.5-3mM malat uygulamasında yapraklarda stomal açılmaların engellendiği belirtilmektedir (81).

2.5. Kuraklık Stresi İle İndüklenen Genler

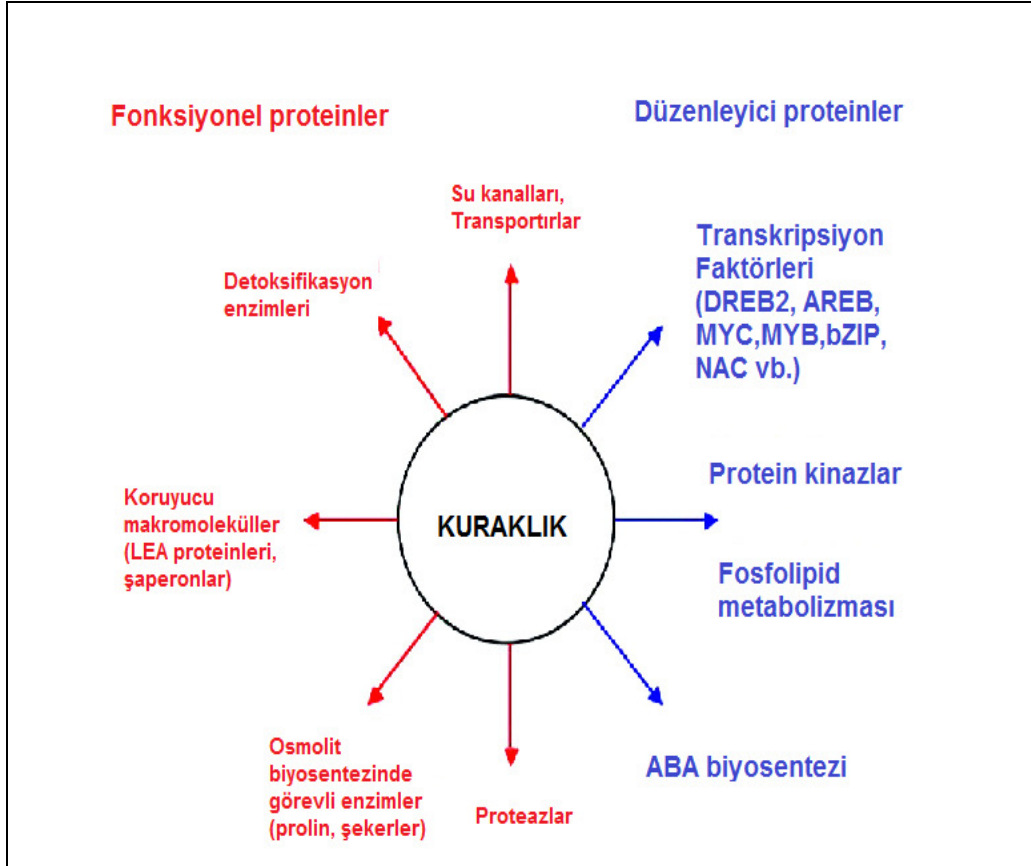
Abiyotik strese bağlı sinyal iletim yolağı temelde sinyalin algılanması ile başlamakta ve bir çok gen aktive olmaktadır. Stresin çeşidine ve ilişkili yollarına bağlı olarak farklı bir çok transkripsiyon faktörü eşliğinde, strese yanıt ve toleransında görev alan birçok genin ifadesi gerçekleşmektedir (Şekil 2.3.).

Kuraklık stresinde, kuraklık ilişkili genlerden bazıları stresine oldukça hızlı cevap verirken; bazı genler ise, ABA birikiminden sonra, yavaş yavaş indüklenmektedir. Stresle meydana gelen su kaybı ABA üretimini tetiklemekte ve sentezlenen ABA, çeşitli genlerin indüklenmesini uyarmaktadır (63). Kuraklık stresine karşı oluşturulan cevapta rol oynayan genler erken cevap genleri ve geç cevap genleri olmak üzere iki tiptir. Bunlardan erken cevap genleri hızlı (dakikalar içinde) olarak indüklenir ve gerekli tüm sinyal içerikleri önceden mevcut olduğu için yeni bir protein sentezine gerek duymazlar. Erken cevap genleri genellikle geç cevap genlerinin aktivasyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin sentezinde rol oynamaktadırlar. Geç cevap genleri ise yavaş (saatler içinde) indüklenmektedir ve ifadeleri genellikle sürekli dir.



Şekil 2.3. Biyotik ve abiyotik stres sinyalleri ve gen ifadesine ait transkripsiyonel mekanizmalar (82)

Kuraklık stresinde rol oynayan genlerin büyük bir kısmını geç cevap genleri oluşturmaktadır (65). Hem erken hem de geç cevap genleri kuraklık stresi altında sadece önemli metabolik fonksiyonlarda görev almakla kalmaz aynı zamanda strese bağlı sinyal iletiminde yer alan genlerin düzenlenmesinde de görev almaktadırlar. Sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alan ve strese cevapta etkin rol oynayan genlerin düzenlenmesinde görev alan proteinlerin başlıcaları; protein kinazlar, fosfolipaz C, transkripsiyon faktörleridir (83) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Kuraklık stresine tolerans ve yanıtta rol oynayan genlerin gruplandırılması (82)

2.5.1. Aquaporinler (Su Kanal Proteinleri)

Membran proteinleri sınıfına giren aquaporin proteinleri, bitkide hem optimal koşullar altında su iletiminde hemde stres koşulları altında önemli rol oynamaktadır (84). Aquaporinler üç ekstraselüler ve iki intraselüler halka ile ilişkili domainler içeren altı membran içermektedir. Genellikle, tetramer olarak bulunup, her monomer fonksiyon olarak bağımsız davranabilen gözenekler olarak oluşabilmektedir (85). Aquaporinler bitkilerde çoklu izoformlar olarak bulunabilmektedir (*Arabidopsis thaliana*, 35 aquaporin izoformu içermektedir). Aquaporinler bitkide; plazma membran iç proteinleri, tonoplast iç proteinleri, nodulin-26 benzeri iç proteinler, küçük ve temel iç proteinler ve karakterize edilmemiş iç proteinler (sadece dikotiledonlarda) olmak üzere beş alt sınıfta toplanmaktadır (86). Bu alt sınıflardan özellikle plazma membran iç proteinleri ve tonoplast iç proteinlerinin kuraklık koşullarında kökte su taşınımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (87). Tonoplast iç proteinleri, ağırlıklı olarak vakuol membranlarında bulunurken, plazma membran iç proteinleri ise genellikle plazma membranlarında bulunmakta (88) ve özellikle köklerde yoğun olarak yer almaktadır (86). Aquaporin

genlerinin düzenlenmesinin hidrolik iletkenlik ve solunum oranı ile ilişkide olduğu düşünülmektedir (89). Özellikle kuraklık şartları altında, aquaporin ifadesinde meydana gelen artışın, hidrolik iletkenlik ve solunumla bağlantılı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (90). Ancak yapılan çalışmalar, kuraklık altında farklı çeşitlerde aquaporin ifadesi ile stomasal kontrol arasında uyumlu herhangi bir ilişki olmadığı açıklanmaktadır. Buna göre; üzümde yapılan bir çalışmada, plazma membran iç proteinlerinin kuraklık stresi ile Chardonnay çeşidinde gen ifadesi artış gösterirken, Grenache üzüm çeşidinde herhangi değişim göstermemiştir (89). Stres koşulları altında aquaporin ifadesindeki artış yada azalış, iki sınıf aquaporin varlığına dayandırılan hipotez ile açıklanmaktadır. Bunlardan birinci sınıf aquaporinler bazı gazların ve non-elektrolitlerin membran boyunca hareketine izin verirken, stres ilişkili değişimlerde rol oynamazlar. İkinci sınıf aquaporinler ise stres koşullarında özellikle ifade olmakta veya düzenlenmektedirler (91). Yapılan bir çok çalışmada, aquaporin ifade profilinin aynı gen için farklı organlarda farklılık gösterdiği bildirilmiştir (92).

2.5.2. Proteazlar

Tüm canlılarda yüksek çeşitlilik gösteren proteazlar peptit bağlarının yıkımını katalize etmektedirler. Bu nedenle sprotelik enzimler yada peptidazlar olarak da adlandırılabilen proteazlar, kataliz mekanizmalarına göre (aspartik proteazlar, threonin proteazlar, sistein proteazlar gibi) sınıflandırılmaktadırlar (93).

Proteazların metabolik ve düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğu kanıtlanmakla birlikte (94) birçok bitkideki spesifik fonksiyonları halen bilinmemektedir (93). Birçoğu, bitkide başta tohum çimlenmesi olmak üzere, kloroplast biyogenezinde, hormon sinyal mekanizmalarında, çiçek gelişimi ve polen-pistil interaksyonu olmak üzere birçok kritik gelişim proseslerinde rol oynamaktadır. Ayrıca bitki proteazları patojenlere karşı savunmada da görev almaktadırlar (95).

Kuraklık stresi ile proteaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler ve ifade artışları buğday (96), *Arabidopsis thaliana* (97) ve baklagiller (98) olmak üzere birçok bitkide kanıtlanmıştır. Kuraklıkla meydana gelen bu artışın özellikle, sistein (99), aspartik (100) ve serin (101) proteaz çeşitlerinde meydana geldiği açıklanmıştır. Halen kuraklıkla ilişkili spesifik rolü kesin olarak tanımlanamayan birçok proteaz bulunmasına rağmen, kuraklığa

karşı proteazların özellikle, bazı enzim ve hücre sinyali ile ilgili, kısa ömürlü proteinlerin degradasyonları süresince metabolizmanın yeniden düzenlenmesinde, özellikle proteinlerde meydana gelen katlanma bozukluğundan dolayı oluşan oksidatif hasarın düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (93).

2.5.3.Şaperonlar

Şaperonlar ısı şoku proteinleri (Hsps) arasında sınıflandırılmaktadır. Hücrede özgün birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde rol oynayan şaperonlar bitki hücresinde özellikle sitozollerde, endoplazmik retikulumda, mitokondri ve kloroplastlarda yoğun olarak bulunmaktadır. Aminoasit dizi homolojilerine, fonksiyon ve moleküler ağırlıklarına göre 5 temel gruba sahip (küçük Hsp ailesi, Hsp60 ailesi, Hsp70 ailesi, Hsp90 ailesi, Hsp100/Clp ailesi) şaperonlar genellikle birbirleri ve diğer proteinlerle iş birliği halindedirler (102). Normal koşullarda bitkide protein homeostasinin (dengesinin) sağlanmasında görev alırken, stres koşulları altında ısı şok transkripsiyon faktörlerince tetiklenerek, farklı fonksiyonlarda yer alabilmektedirler (103).

Yapılan çalışmalarda, tütün ve *Arabidopsis thaliana* gibi bitkilerde kuraklık stresinin bazı Hsps gen ifade değişimine etkisi analiz edilmiş (104,105), en çok ifade değişiminin ise kuraklık stresinin sıcaklık stresi ile birlikte uygulandığı buğdayda gerçekleştiği ispatlanmıştır (106). Karpuzda yapılan çalışmada immunoblot ve PCR analizleri sonucunda kuraklıkla ifadesi artan 23 genden 15'nin (%65) Hsps'lere ait olduğu bildirilmiştir (107) .

2.5.4.LEA Proteinleri

Tohum gelişiminde gerekli hücrel proteinlerin büyük bir kısmını oluşturan LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteinleri hidrofilik özellikte olup, belli amino asitler bakımından (Triptofan, Sistein) yoksundurlar (108). Küçük moleküler ağırlığına sahip (10-30 kDa) LEA proteinleri bitkide kuraklık stresi ile meydana gelen su kaybını aza indirmek ve hücrel fonksiyonların dengelenmesi için, oksijen türlerinin yok edilmesi, iyon geçişinin ayarlanması (109), çeşitli enzim ve lipidlerin korunması (66) ve membran stabilitesinin sürekliliği (72) gibi pek çok metabolik olayda görev almaktadırlar.

2.5.5. Transkripsiyon Faktörleri

Hem hücre dışından hem de hücre içinden sinyal basamaklarının tetiklenmesini sağlayan ABA beraberinde cis-trans olarak aktive olan transkripsiyon faktörlerinin, ifadesini etkilemektedir (110).

Kuraklık koşullarında ifadesi artan birçok genin promotörü korunmuş ABA duyarlı element-AREB: Abscisic Acid-Responsive Element Binding Protein içermektedir (111). *Arabidopsis thaliana*' da bazı AREB transkripsiyon faktörleri (AREB 1-3) klonlanmış ve bunların kurak ve tuz stresi eşliğinde artan osmotik potansiyele bağlı olarak ifadesinin arttığı belirtilmiştir (111). Aynı şekilde tütün ve *Arabidopsis thaliana*' da klonlanmış bazı etilen duyarlı faktörlerin (ERFs) (112) ERE (ethylene-responsive element: etilen duyarlı element) ile ilişkisinde, bazı korunmuş bölgelerin (GCC-box) varlığı tespit edilmiştir (113).

ABA bağımsız sinyal yolağında rol alan genlerin promotörü, korunmuş dehidrasyon duyarlı element (DRE-dehydration responsive element) içermektedirler. Bu elementler genellikle ortak TACCGACAT dizisi içermekte ve ABA bağımsız sinyal yolağında gen düzenlenmesi ve sinyal interaksyonunda rol oynamaktadır. *Arabidopsis thaliana*' da yapılan araştırmada, DRE proteini ile ilişkili 2 transkripsiyon faktörü (*dreb1* ve *dreb2*) klonlanarak, karakterize edilmiş ve bu genlerin farklı abiyotik streslerde DRE ile ilişkili farklı proteinleri kodladıkları bildirilmiştir (64). Bu transkripsiyon faktörleri ile yapılan diğer çalışmalarda da *dreb1*' in düşük sıcaklıkla oluşan streste (114), *dreb2*' nin ise kuraklık stresinde (115) indüklendiği açıklanmıştır. DRE ilişkili transkripsiyon faktörlerine ait izoformlar ise bitkide farklı dokularda farklı özgünlük gösterebilmektedir. Örneğin *dreb2* izoformlarından *dreb2A* tuz stresine karşı sadece köklerde ifade olurken, *dreb2B* ise kuraklık stresine karşı hem gövde hem de köklerde ifadesi gerçekleşmektedir (116).

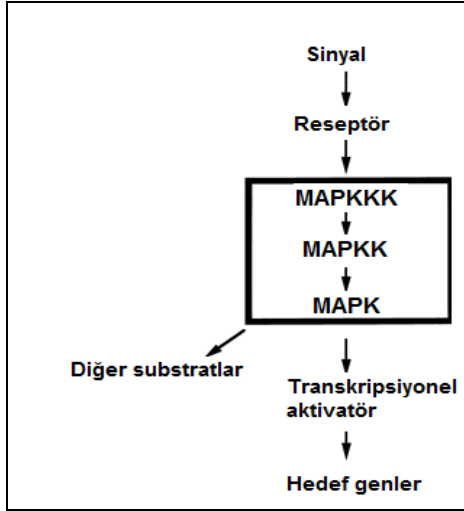
Transkripsiyon faktörlerinden özellikle bZIP ve AP2/EREBP faktörleri bitkide birçok gen tarafından kodlanmakta ve bitkide bir çok biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler bu faktörlerin yardımı ile düzenlenmektedir. Bu faktörlerden AP2/EREBP proteinleri bitkiye özgü olup DNA' ya bağlanarak görev yapmakta ve AP2 bölgesi yaklaşık 70 aminoasitten oluşmuş korunmuş bölgeye sahiptir (117).

2.5.6. Protein Kinazlar

Bitkilerin abiyotik strese karşı verdikleri cevaplar, bitkisel hormonların sentez seviyeleri ile de yakından ilişkilidir. Hormonların strese karşı seviyeleri fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonlarında rol alan protein kinazlar ile düzenlenebilmektedir. Protein kinazlar fosfat vericisi olarak ATP kullanarak fosforilasyon reaksiyonlarını tamamlamakta fosforlanmış proteinler ise fosforlanmamış şekillerine göre daha fazla veya daha az aktif olabilmektedir. Protein kinazların varlığı ilk kez Çin kabağı yapraklarına sitokin hormonu uygulanması (118) sonrası tanımlanmış olup, *Arabidopsis thaliana* genomunda 1000' nin üzerinde protein kinaz tanımlanmıştır (119).

Protein kinazların aktivasyonu fosfatazların modülasyonu ve fosforegülatör mekanizmanın dönüşümü eşliğinde gelişmektedir. Fosfatazlar substratlarına göre, fosfoproteinler (serin/treonin) veya fosfotirozinler (protein/tirozin fosfatazlar) olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Mayalarda özellikle tirozin spesifik fosfatazlar MAPK ((mitojen-aktive eden (MAP) kinazlar) sinyal yolağında önemli rol oynamaktadır (120). Protein kinaz ailesinin önemli üyesi olan MAPKs; kuraklık, tuzluluk, sıcaklık gibi aktive olan iletim yolunda etkin rol oynamaktadırla (121,122). Bitkilerde MAP kaskatları, MAPKKK (MAPK3), MAPKK (MAPK2) ve MAPK olmak üzere 3 farklı kinazdan meydana gelmektedir. Abiyotik strese bağlı olarak sinyal algılanmasından sonra reseptör moleküllerinin meydana getirdiği sinyaller ile MAPK3 aktivasyonu meydana gelmektedir. MAPK3'ler serin/treonin kinazlar olup, korunmuş S/T-X3-5-S/T motiflerinde bulunan 2 serin/treonin ile fosforilasyon sonucu MAPK2 aktive olmaktadır. MAPK2'lerdeki treonin ve tirozin eşliğinde ise MAPK'lar fosforile olmaktadır. Aktive olmuş MAPK'lar abiyotik stres yolaklarında rol alan transkripsiyon faktörleri, hücre iskeleti proteinleri gibi birçok substratın fosforilasyonunda görev almaktadırlar (Şekil 2.5.).

Yapılan çalışmalarda kuraklıkta temel sinyal iletiminde rol alan ABA'nın MAP kinaz yolları ile ilişkide olduğu kanıtlanmıştır (123). İlk olarak mayalarda analiz edilen diğer bir protein kinaz ailesi SNF1/AMP-aktive protein kinazların bazı üyelerinin bitkilerde dehidrasyona ve ABA'ya cevap olarak indüklendiği açıklanmıştır (97). Aynı şekilde kurağa toleranslı olan ve olmayan buğday çeşitlerinde yapılan şok kuraklık araştırmalarında, kuraklığın erken evrelerinde MAPK4 seviyesinde belirgin artış olduğu gözlemlenmiştir (124).



Şekil 2.5. MAPK kaskad modülü (125)

2.5.7. Osmolitler

Kuraklık stresi ile bitkiler, hücredeki su potansiyelinde meydana gelen düşüğe cevap olarak, hücrede organik ve inorganik çözümler bazı maddelerin birikimini gerçekleştirmektedir (126). Osmolit koruyucular olarak da bilinen bu maddeler hücrede genellikle sitoplazmada birikmekte vakuolde ise hemen hemen hiç bulunmamaktadır (127). Sentezlenen osmolitler kararlı yapılarından dolayı zor metabolize olmaktadır ve hücrede yüksek konsantrasyonlarda birikmeleri halinde bile hücre fonksiyonlarına engel olmamakta tam tersine mevcut stabilitenin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (128). Yapılan araştırmalarda, osmotik potansiyel düzenlenmesinde bitki yaşının etkin rol oynadığı belirtilmektedir. Özellikle çiçeklenme öncesinde bitkide osmotik düzenleme yavaş gerçekleşmekte, çiçeklenme döneminden sonra hız kazanmaktadır (18).

Kuraklık stresinde oluşan osmolitlerin çoğunlukla kaynağı karbonhidratlardır(18). Özellikle prolin, betainler, dimetilsülfoniopropionat, polyoller (mannitol, sorbitol, pinitol), trehaloz ve fruktanlar bitkide sentezlenen osmolitlerin başlıcalarıdır (27). Bunlardan prolin, hücrede osmotik düzenlemede aktif rol alan ve dehidrasyon sürecinde mevcut proteinlerin korunmasını sağlayan önemli bir amino asittir (129). Oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol oynayan prolinler aynı zamanda subüçer yapıların korunmasına da yardımcı olmaktadır (130). Üzümde yapılan araştırmada, kuraklık ve tuz stresi uygulanan Cabernet Sauvignon çeşidinde prolin miktarındaki artışın kuraklık stresinde, tuz stresine oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (131).

Diğer bir osmolit olan Glisin Betain' nin ise strese karşı hücrel su dengesinin korunmasında görev aldığı düşünülmektedir (129). Ayrıca tuz stresi ve sıcaklık stresinde enzim ve protein yapılarının korunmasında glisin betain'nin diğer osmotitlere göre daha etkili olduğu açıklanmaktadır (127).

Bitkide büyüme ve gelişme gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alan spermidin, spermin gibi poliaminlerin yine osmolit koruyucu olarak stres koşullarında da rol oynadığı öne sürülmektedir (97). Kuraklık stresine karşı oluşturulan osmolitler, prolin-5-karboksilat redüktaz, kolin monooksidaz, prolin-5-karboksilat sentetaz gibi spesifik enzimlerin aktif rolü ile sentezlenmektedir (9).

Stres koşullarına yönelik pek çok fizyolojik çalışmada yapısal olmayan karbonhidratların (sukroz, heksoz ve şeker alkoller) farklı bitkilerde çeşitli derecelerde biriktiği görülmüştür. Bu karbonhidratlardan, özellikle trehalozun kuraklık stresinde üzüm tohum ve kabuğunda yüksek oranda birikim gösterdiği bildirilmiştir (132). ROS' rinin uzaklaşmasında görev alan alkol şeker özelliğindeki mannitolünde kuraklık stresi altında biriktiği ve abiyotik strese karşı direnci artırdığı bildirilmiştir (25).

2.6. Bitkilerde Stres Toleransına Yönelik Gen İfade Analizi Yaklaşımları

Fonksiyonel genomun temelini oluşturan transkriptomiks, mRNA profili doğrultusunda gen ifade analizlerini içermektedir. Gen ifade analizleri analiz edilen gen sayısına bağlı olarak tek gen ve tüm genom transkriptleri analizleri olarak iki ana kategoride toplanabilmektedir. Tüm genomu ait transkriptlerin profillenmesi genomu ait hem fiziksel hem de fonksiyonel anotasyon bilgileri içermesinden dolayı yüksek avantaja sahiptir (133).

Transkript profillerinin belirlenmesine yönelik DNA mikrodizin, Gen ifadesinin Seri Analizi (SAGE), EST (Expressed Sequence Tags), cDNA kütüphaneleri, cDNA-AFLP gibi teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.6.1. cDNA Kütüphaneleri ve Expression Sequence Tags (EST)

Revers transkriptaz enzimi kullanılarak mRNA'dan elde edilen cDNA (komplementer DNA) sadece ifade olan DNA dizisini içermektedir. Bu dizilerle oluşturulan kütüphaneler

yeni genlerin keşfi, gen polimorfizmi ve gen ifadesi çalışmalarında kullanılmaktadır (134,135).

EST (Expression sequence tags)' ler ise 200-500 bp uzunluğunda cDNA parçaları olup, 5' EST'ler cDNA'nın başlangıç dizilerinden elde edilirken, 3' EST'ler sona yakın dizilerden oluşmaktadır. 5'EST'ler genellikle türler arasında korunmuş dizilerdir ve gen aileleri içerisinde az farklılık göstermektedir. EST' ler çoğunlukla bilinen yada bilinmeyen genlere ait genlerin belirlenmesi ve genlere ait ifade analizlerinde kullanılmaktadır (23,136).

2.6.2. cDNA-AFLP (cDNA Amplified Fragment Length Polymorphism)

cDNA AFLP yöntemi bitkilerde farklı çevre koşullarında ilgili genlerin ifade değişimleri analizinde yaygın biçimde kullanılmaktadır (137). Yöntem basamakları; cDNA sentezi, cDNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi, uygun adaptörlerin bağlanması, PCR reaksiyonu ve poliakrilamid jel elektroforezine dayanmaktadır.

2.6.3. Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)

1995 yılında geliştirilen SAGE tekniği, ilgili transkriptin miktarı ve çeşidi hakkında detaylı bilgi vermektedir (138). Yöntem genel olarak; mRNA saflaştırılması, cDNA'ların oluşturulması, izolasyonu ve PCR ile çoğaltımı basamaklarından oluşmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan cDNA ve oligonükleotid array'lar SAGE temelli tekniklerdir. Tekniğin bitkilerde kullanımı yaygın olmamakla birlikte, *Arabidopsis thaliana*' da farklı doku ve organlarda gen ifadesi çalışmalarında kullanılmıştır (139).

2.6.4. RNA Seq (RNA Sekanslama-Yeni Nesil Dizi Analizleri)

RNA Seq yöntemi yeni sekanslama teknolojileri platformu ile yürütülmekte olup, bu teknolojilere genel anlamda Yeni Nesil Dizi Analizleri (Next-Generation Sequencing) denilmektedir. Normal Sanger sekanslama (di-deoksi metodu) yöntemine göre oldukça pahalı olan bu yöntemin uygulandığı; Roche-454, Illumina, SOLID (Applied Biosystems) ve en yeni yayınlanan Helicos-HeliScope olmak üzere 4 adet ticari olarak ulaşılabilir sekanslama teknolojisi mevcuttur.

RNA-Seq yönteminde genel olarak total RNA, cDNA kütüphanelerine dönüştürülür, cDNA fragmentlerine bağlanan adaptörler (bir yandan veya çift taraftan) ile her bir molekül PCR amplifikasyonu yada amplifikasyon olmadan yüksek işlem hacmine sahip yeni nesil sekanslama teknolojileri ile sekanslanmaktadır (140). Sekanslama sonrası elde edilen okumalar referans genoma yada transkripte hizalanırlar yada transkripsiyonel yapı istenilen her gene ait ifade seviyeleri içeren genom ölçeklendirme transkripsiyonel haritası oluşturmak için kullanılmaktadır. RNA-Seq yöntemi hibridizasyon temelli yöntemlerden farklı olarak ilgili transkript tanımlanmasında mevcut genomik sekanslara bağlı değildir ve ifade analizleri bakımından geniş bir aralığa sahiptir. Buna karşın, RNA-Seq analizleri de büyük veriler ve bu verilere ait saklanma, işleme ve düzenleme gibi konularını içeren birçok informatik zorlukla karşı karşıyadır (141).

2.6.5. Mikrodizin (Mikroarray)

1995 yılında genlerin ifade düzeylerini belirlemek amaçlı geliştirilen mikrodizin yöntemi, transkript profillemesine yönelik kullanılan teknolojilerin başında gelmektedir (142). Gen array, DNA çip, bio çip gibi terimlerle de ifade edilebilen mikrodizin yöntemi temelde Northern ve Southern blot tekniklerine dayanmakta olup nükleik asit hibridizasyonuna dayanmaktadır. Yöntemde kullanılan çip (array) ilgili organizmaya ait düzgün sıralı nükleik asit örneklerinin sıralanması (sentetik proplar) ile meydana gelmekte ve bilinen/bilinmeyen RNA örneklerinin baz eşleşmesi özelliğine göre uygun hibridizasyon ortamı sağlanmaktadır. Otomasyona dayalı bir sistem olan mikrodizin yöntemi ile kısa sürede çeşitli genlerin ifade analizleri yada gen polimorfizlerinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır.

Mikrodizin tekniği sayesinde özellikle belirlenen gen ifade verileri farklı istatistiksel analizlerde kullanılarak, genlerin benzerliklerine göre gruplandırılmasında kullanılmakta bu gruplanma sayesinde ilgili hücrede işleyiş mekanizmaları belirlenebilirken, bilinmeyen genler hakkında da bilgi sahibi olunmaktadır (143). Ayrıca mikrodizin sonucu elde edilen ifade verileri protein analizleri ile de karşılaştırılarak ilgili proteine ait hücresel fonksiyonun kontrolünün transkripsiyon yada translasyon düzeyinde olup olmadığı belirlenebilmektedir (144).

Mikrodizin teknolojisi araştırmalarında çalışma amacına göre cDNA (komplementer DNA) ve oligonükleotit olmak üzere iki çeşit mikrodizin platformu gen ifadesi analizlerinde kullanılabilir (136).

2.6.5.1. cDNA Mikrodizin

Başta Arabidopsis thaliana olmak üzere pirinç, mısır, ilek, petunia gibi bir çok bitkide geliştirilmiş olan cDNA mikrodizinler; PCR reaksiyonu ile çoğaltılan cDNA örneklerine ait 300-5000 bazlık problemlerin cam slaytlar üzerine robotik olarak basılmasıyla hazırlanmaktadır. Hedef seçimi başlangıç materyalin miktarına ve problemlerin mikrodizin cam slaytlarındaki düzenlenmesine göre gerçekleştirilmektedir (136). Maliyet bakımından bakımından büyük avantajı sahip olan cDNA mikrodizinlerde özellikle 300 bp'den uzun cDNA'ların kullanımı nokta mutasyonları ve küçük çaplı delesyonlar hibridizasyon sonucu etkilenmeyerek dezavantaj oluşturabilir (136).

2.6.5.2. Oligonükleotid Mikrodizin

Oligonükleotid mikrodizin tekniğinde, oligonükleotidler (EST'ler) nceden sentezlenerek oligoip üzerine sabitlenerek ile üretilmektedir. Oligonükleotidler olarak 25 (Affymetrix Gene Chip gibi) ve 70 (Agilent cam slayt gibi) nükleotidlik diziler kullanılmaktadır. Genellikle 25 bp' dan düşük oligonkleotidlerde prob bağlanma etkinliği azalmakta, 70 nkleotidten daha uzun olanlarda ise sinyalde düşük artış gözlemlenmektedir. Bu tekniğin en büyük avantajı ise, oligonükleotidler her seferinde yeniden sentezlendiği için herhangi bir kontaminasyon riski bulunmamaktadır. Ayrıca yüksek stabilite ve özgünlük sağlarlar ve genomun daha yüksek seviyede taranmasına olanak vermektedirler (145).

Ticari olarak Affymetrix™ şirketi (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) firması tarafından geliştirilen oligonükleotid mikrodizin platformunda, array üzerinde proba bağlanmış floresan işaretili moleküller lazer ile uyarılmakta ve hibridizasyon sonrasında oluşan bu uyarılmalarla meydana gelen işımlar tarayıcı yardımı ile tespit edilmektedir.

Mikrodizin uygulamaları sonucunda elde edilen verilerin genişliği ve kompleksliği istatistiksel analizlerde bazı zorluklar yaratmaktadır. Bu nedenle veriler biyoinformatik programlara dayalı yaklaşımlarla birçok basamaktan geçirilerek analiz edilmekte ve yorumlanmaktadır. Elde edilen veriler istatistiksel analiz öncesi arka plan çıkarılması,

normalizasyon, özetleme gibi ön işlemlerden geçirilerek standardizasyon yapılmaktadır. Normalizasyon aşaması deneme dizaynına bağlı olarak arka plan düzenlenmeleri yapılmış farklı mikrodizin çiplerine ait verilerin birbiri ile uyumlu olması ve birbirleri ile karşılaştırılabilmeleri amaçlı yapılmaktadır.

Affymetrix tarafından geliştirilen çiplerde, özgün olmayan hibridizasyonun modellenmesi amaçlı, herbir eşleşmiş probun (perfect match) bir uyumsuz probu (mismatch) da mikrodizin üzerine sentezlenmektedir. Uyumsuz problemler her probun (25bp) 13. bazlarında farklılık gösterecek şekilde tasarlanmaktadır. Ön işleme analizinde yaygın olarak kullanılan RMA (Robust Microarray Analysis) programı analizinde sadece PM (perfect match) problemleri kullanılmakta ve bu problemlerin normal dağılıma sahip bir hata (arka plan gürültüsü) ile üstel dağılımlı bir sinyal bileşeni olduğu varsayılmaktadır (146).

MAS 5.0 analizinde ise her çip 16 eşit dikdörtgen alana ayrılarak her alandaki en düşük ışıklı problemler (tüm problemlerin %2'si) ortalama problemlerin ışık değeri bu alanlara özgü arkaplan değeri olarak kabul etmektedir. Her bir probdan, bölünen alanların merkezlerine olan uzaklığı ile ters orantılı olarak bir arkaplan sinyali çıkarılır, ve bu işlem hem PM (perfect match) hem de MM (mismatch) problemlerinin kontrolü için gerçekleştirilmektedir (145).

2.7. Bitkilerde Mikrodizin Uygulamaları

Bitkide birçok türde DNA dizilerinin belirlenmiş olması mikrodizin tekniği sayesinde bu dizilere sahip genlerin hücresel fonksiyonlarını araştırmalara olanak sağlamaktadır. Farklı gelişim evresinde, farklı çevresel koşullarda veya farklı stres etmeleri karşısında, farklı genotiplere ait dokulardaki birçok bitki geni mikrodizin analizi ile fonksiyonlarına göre gruplandırılabilir (147). Ayrıca polimorfik varyasyonların araştırılması, mutasyonel analizler, transkripsiyonel düzenlenme ve alternatif splicing mekanizmalarının aydınlatılması gibi konularında da mikrodizin tekniği kullanılabilir. Genellikle mikrodizin çalışmaları yoğun olarak model bitki *Arabidopsis thaliana*' da gerçekleştirilse de, mısır, pirinç, buğday, patates, soya fasulyesi gibi önemli tarım ürünlerinde de birçok ifade analizi çalışmaları yer almaktadır (148).

Bitkide 1997 yılında yapılan ilk mikrodizin uygulamasında *Arabidopsis thaliana*' da 48 cDNA dizisini içeren çipler kullanılarak kök ve yaprak gen ifade profilleri belirlenmiştir

(142). 1997' den beri mikrodizin tekniği bitkilerde başta abiyotik (149,150) ve biyotik stres (151) olmak üzere, meyve olgunlaşması (152), tohum gelişimi (153), sirkadian saat (154) ve ışıkla ilişkili transkriptlerin belirlenmesinde (144) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kuraklık stresine karşı savunmada yer alan ve LEA proteinleri, detoksifikasyon enzimleri, şaperonlar, su kanal proteinleri, aquaporinler gibi proteinlerin üretiminde görev alan genlerin belirlenmesi, kuraklıkla ilgili sinyal iletim mekanizmalarının açıklanmasında bilindiği üzere büyük önem taşımaktadır. Mikrodizin teknolojisi ile kuraklık stresi ile ilişkili moleküler mekanizmalar aydınlatılabilmekte ve kuraklık altında indüklenen genler belirlenebilmekte ayrıca kuraklık toleransının artırılmasına yönelik genetik manipülasyonların yapılmasına zemin hazırlanabilmektedir.

Aquaporinlerin belirlenmesine yönelik 35 *Arabidopsis* bitkisinin yaprak, kök ve çiçekleri kullanılarak yapılan cDNA mikrodizin analizi sonucu aquaporin izoformlarının yaprağa sipesifik olmadığı açıklanmıştır. Ayrıca kuraklık stresi ile yapraklarda plazma membran iç proteinlerinin *AtPIP1;4* ve *AtPIP2;5* proteinleri dışında genellikle ifadesinde azalış olduğu, *AtPIP 2;6* proteinin ise kuraklık stresi ile büyük bir değişim göstermediği belirlenmiştir (148). Osmotik strese bağlı temel sinyal reaksiyonlarında rol alan protein fosforilasyonu/defosforilasyonu ile ilgili araştırmada ise, SRK2 protein kinaz geni *Arabidopsis* 2 Oligo Microarray (Agilent) platformu kullanılarak belirlenmiştir (148). Yine *Arabidopsis*' de yapılan araştırmada kuraklıkla ilgili ifadesi artan 130 transkript analiz edilmiş ve bu genlerin sinyal yollarında, detoksifikasyon ve hücre sel cevabın oluşturulmasında görev aldıkları bildirilmiştir (14).

Post polinizasyonun erken evrelerinde kuraklık stresine yönelik diğer bir araştırmada ise, *Zea Mays* (mısır) mikrodizin analizi sonucu plasenta, endosperm transkriptom profillerinin farklılık gösterdiği plasentada özellikle HSPs, şaperonlar ve temel iç proteinler başta olmak üzere 79 transkriptin ifadesi artarken, endospermde 56 transkriptin ifadesinde azalış olduğu ve sadece 9 transkriptin her iki dokuda ortak olarak gözlemlendiği açıklanmıştır (148).

Phaseolus vulgaris (n=64) ve *P. acutifolius* (n=488) bitkilerinde kuraklığa karşı 5.200 cDNA *Phaseolus* spp. kütüphanesi ile yapılan araştırmada; her iki türde sadece 25 transkript ortak bulunmuş olup *Phaseolus vulgaris*' de stres yanıtından sorumlu bir çok

transkript belirlenirken, diğler türde ise yoğun olarak tanımlanmamış yeni transkriptlerin varlığı gözlemlenmiştir (155).

2.8. Asma Çeşit (*Vitis Vinifera* L.) Ve Anaçlarında Kuraklık Toleransı

Asma (*Vitis vinifera* L.) sistematikte *Rhamnales* takımında yer almaktadır. Bu takıma ait üç familya (*Rhamnaceae*, *Leeaceae* ve *Vitaceae*) bulunmakta ancak bu familyadan yalnızca *Vitaceae* familyasına ait bitkiler, bilinen anlamda asmaları tanımlamaktadır.

Vitaceae familyasına ait 12 cins ve yaklaşık 700 tür *Vitis* cinsine aittir. *Vitis* cinsini diğler 11 cinsten ayıran en önemli özellikler olarak, taç yapraklarının üstte birleşerek çiçeği bir şapka şeklinde kapatması ve tozlanma döneminde alttan ayrılarak düşmesi gibi olaylar sayılabilmektedir. *Vitis* cinsi, kromozom sayısı $2n=38$ olan *Euvitis* ve $2n=40$ olan *Muscadinia* olmak üzere iki alt cins içermektedir (156).

Dünyada genel olarak 10-20°C izotermlerine karşılık gelen 30-50°C kuzey ve güney enlemleri arasındaki ılıman iklim kuşağı üzerinde ve birlikte yıllık ortalama sıcaklığın 9 °C'nin, en sıcak ay ortalamasının 18°C'nin, en soğuk ay ortalamasının 0°C üzerinde olan bölgelerde bağcılık yapılmaktadır. Bununla birlikte yıllık ortalama sıcaklığın 9°C'nin, en sıcak ay ortalamasının 18°C'nin, en soğuk ay ortalamasının 0°C üzerinde olan bölgelerde bağcılık yapılabilmekte, yıllık ortalama sıcaklığı 11-16°C arasında olan alanların ise, bağcılık için en elverişli alanlar olduğu kabul edilmektedir (157).

Bağcılık için en elverişli iklim kuşağı üzerinde yer alan ülkemiz, asmanın gen merkezlerinin kesiştiği ve ilk kez kültüre alındığı coğrafyanın merkezindeki konumundan dolayı, çok eski ve köklü bir bağcılık kültürü ile zengin bir asma gen potansiyeline sahiptir (156).

Asma, elverişsiz toprak koşullarına karşı uyum kabiliyeti yüksek bir kültür bitkisi olup, ekolojik isteklerinin eksiksiz karşılandığı durumlarda ise ürün kalitesi ve verimde yüksek performans göstermektedir (157). Toprak özelliği olarak, tınlı veya kumlu-tınlı, biraz çakıllı ve orta düzeyde kalkerli topraklar kuvvetli kök sistemi olan asmalar için ideal bağ toprakları olduğu kabul edilmektedir (156). Asma köklerinin gelişmesi için elverişli toprak hacmi, toprak derinliği olarak adlandırılmakta olup, köklerin 70cm veya daha derin bir

alandaki gelişmesine uygun olan topraklar derin toprak, 30cm'den daha az geliştiği topraklar ise sıg topraklar olarak tanımlanmaktadır (12).

Yapılan araştırmalar *Vitis vinifera* L.'nin gelişmiş kök sistemi sayesinde kurağa kısmen yüksek tolerans gösterdiği (10,11) ve özellikle yaprak su potansiyelinin -0,9 MPa'nın altına düştüğu kuraklık koşullarında (158) ürün miktarı ve veriminde azalmalar meydana getirdiği belirtilmektedir.

Özellikle yıllık yağışın yaklaşık 300-600 mm arasında olan alanlarda kurağa dayanıklı *V. vinifera* çeşitleri yetiştirilebilmekte ancak yıllık yağışın 900 mm'nin üzerine çıkan alanlarda ise oluşan mantar hastalıklarından dolayı bağcılık kısıtlanmaktadır (156).

Asma yaprak ve kökleri ile beslenen ve kökeni Kuzey Amerika olan filoksera böceği (*Phylloxera vastatrix radicecola*) yıllardan beri bağcılık sorunlarının başında gelmektedir. *Vitis vinifera* L. türleri ve Amerikan asma türleri filoksera zararlısının kök ve yaprak formuna farklı dayanıklılık göstermektedir. Amerikan asma türleri filokseranın kök formuna dayanıklı iken, *Vitis vinifera* L. türlerinin yaprak formuna dayanıklıdır (159). Bu durum bağcılıkta Amerikan asma anaçlarının kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Kuraklık stresinde anaç çeşit karşılaştırılmasında ise, anaçların kurak dayanıklılıklarının önemli derece düşük olduğu bildirilmektedir (156). Asma anaçlarının kurağa dayanma kabiliyeti bir genotip özelliği olup, bağcılıkta adaptasyon üzerine etkili olmaktadır. Amerikan asma anaçları aşısız olarak yetiştirildiklerinde genellikle kurağa karşı daha dayanıklıdır. Ancak aşılama sonrasında *V. vinifera* çeşitlerine ait yaprak dokusu farklı olduğunu dolayısıyla evtranspirasyonla su kaybı arttığı için aşılama sonrası kuraklığa dayanıklılık azalmaktadır.

Asma genellikle kurak-yarı kurak iklime iyi adaptasyon göstermekte ve kuraklık stresi şartlarında farklı dayanma kuraktan kaçınma mekanizmaları göstermektedirler (160). Asma anaçlarındaki genotip çeşitliliğ ise iklim değişiklikleri ile meydana gelen kuraklık stresine karşı asmanın adaptasyonda önemli rol oynamaktadır (161). Bağcılıkta anaç-kalem arasındaki ilişkilerin son derece karmaşık olduğu bilinmekle birlikte, yapılan bazı araştırmalarda, farklı anaçların topraktan su alma ve alınan suyu kaleme transferi gibi olaylarda değişken kapasitelere sahip olduğu bildirilmektedir (162). Anaçtan kaleme su transferinin etkinlik derecesi temel olarak; anaçlarda farklılık gösteren ksilem damarlarının anatomisiyle, başka bir deyişle bu damarlarda gerçekteşen su iletkenliğinin kontrolü ile

ilişkilidir. Diğer bitkilerle karşılaştırıldığında daha büyük ksilem damarlarına sahip olan asmada; anaçların sahip olduğu kök yoğunluğu ve kök gelişim derinliği de anaç-kalem arasında su transferinde önemli rol oynamakta ve bu etkenler çevresel koşullardan hızlıca etkilenmektedir (163).

Asmada kök sistemi etkinliği doğrudan su alınımını etkilediği için kuraklık araştırmalarında önemli bir yer tutmakta özellikle kök derinliği ve kök yoğunluğu hem anaç hem de kültür çeşitlerinde yoğun olarak çalışılmaktadır (164,165). Derin kök sistemleri kuraklık koşullarına karşı daha iyi koruma sağlamakta olup kurak tolerant asma anaçlarında kurak hassas anaçlara göre daha fazla yeni kök oluşumlarının gözlemlendiği açıklanmaktadır (12).

Kuraklık toleransında anaç karşılaştırılması yapıldığında, melezlenmelerinde özellikle *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia* içeren hibritlerin kuraklık direncinin *Vitis rupestris* ve *Vitis amurensis* içeren hibritlere oranla daha yüksek olduğu açıklanmıştır (166).

Çizelge 2.1.' de farklı araştırmalarda bildirildiği gibi özellikle 110R (*V. rupestris* X *V. berlandieri*), 140Ru (*V. rupestris* X *V. berlandieri*), 99R (*V. rupestris* X *V. berlandieri*) anaçları kurağa daha toleranslı olarak gözlemlenirken, 5BB (*V. riparia* X *V. berlandieri*), *Rupestris du Lot* (*V. rupestris*) ve 333EM (*V. berlandieri* X *V. vinifera*) gibi anaçların kuraklık toleransı yönünden zayıf olduğu bildirilmiştir (12).

Çizelge 2.1. Kuraklık toleransı açısından anaçların sınıflandırılması (12) (Samson ve Casteran (1971), Fregoni (1977) ve Carbonneau (1985)'e göre)

Anaç adı	Melezleme Kombinasyonu (Ana X Baba)	Samson ve Castéran (1971)	Fregoni (1977)	Carbonneau (1989)
110R	<i>V. rupestris</i> × <i>V. berlandieri</i>	İyi	Yüksek Toleranslı	Yüksek dayanıklı
140Ru	<i>V. rupestris</i> × <i>V. berlandieri</i>	Orta	Yüksek Toleranslı	Yüksek dayanıklı
44-53M	<i>V. riparia</i> × <i>V. cordifolia</i> - <i>V. rupestris</i>	İyi	Yüksek Toleranslı	Yüksek dayanıklı
1103P	<i>V. rupestris</i> × <i>V. berlandieri</i>	İyi	Yüksek Toleranslı	Toleranslı
SO4	<i>V. riparia</i> × <i>V. berlandieri</i>	Zayıf	Düşük Toleranslı	Toleranslı
99R	<i>V. rupestris</i> × <i>V. berlandieri</i>	Orta	Orta Toleranslı	Toleranslı
3309C	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>	İyi	Düşük Toleranslı	Hassas
420A MGt	<i>V. riparia</i> × <i>V. berlandieri</i>	Zayıf	Düşük Toleranslı	Hassas
Fercal	<i>V. berlandieri</i> × <i>Vinifera</i>	Orta	-	Hassas
5BB	<i>V. riparia</i> × <i>V. berlandieri</i>	Kötü	Düşük Toleranslı	Hassas
161-49C	<i>V. riparia</i> × <i>V. berlandieri</i>	Zayıf	Orta Toleranslı	Hassas
41B MGt	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. vinifera</i>	Orta	Yüksek Toleranslı 1	Hassas
Rupestris du Lot	<i>V. rupestris</i>	Kötü	Düşük Toleranslı	Hassas
101-14mt	<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i>	Kötü	Düşük Toleranslı	Çok hassas
Riparia Gloire de Montpellier	<i>V. riparia</i>	Kötü	Düşük Toleranslı	Çok hassas
333EM	<i>V. berlandieri</i> × <i>V. vinifera</i>	İyi	Orta Toleranslı	Çok hassas

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Dünya genelinde önemli derecede iklim değişikliği yaşanmakta olup, ülkemizde içinde bulunduğu bu durum ciddi derecede kuraklık tehlikesinin sinyallerini vermektedir. Bunun en önemli ispatı olarak son yıllarda ülkemizde sıkça kurak periyotlar yaşanmaktadır. Bu nedenle kurak dönemlerde ve kurak alanlarda kuraklığa dayanıklı bitkilerin kullanılması kuraklığa karşı alınacak önlemlerin başında gelmektedir. Kurağa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine yönelik izlenen temel yöntem pek çok morfolojik ve fizyolojik kriterler dikkate alınarak bitki çeşitleri arasında seleksiyon yapılmasıdır. Ancak kalıcı çözüm olarak kurağa dayanıklı bitki çeşitlerinin seçiminde bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarına ve bu mekanizmalarla ilişkili gen ve gen adaylarına ait verilerin eldesi önem taşımaktadır.

Olumsuz toprak koşullarından kaynaklanan kuraklık stresine karşı geliştirilen bitki toleransı, diğer bitki organlarının yanında kök dayanıklılığı ile de bağlantılı haldedir. Kök anatomisi ve fizyolojisi dayanıklılıkta önemli rol oynamakta ayrıca kök mekanizmalarının her bitki türünde ortaya çıkarılması hem gonotip seçimi hem de kuraklık stresi ile ilişkili gen bölgelerinin ve diğer moleküllerin (protein vb.) belirlenmesinde son derece önem taşımaktadır. Bu nedenle son yıllarda kuraklık stresine yönelik gerçekleştirilen araştırmalarda kök toleransına da yönlenildiği gözlemlenmektedir (167–170).

Üzümün (*Vitis vinifera*) sofralık, kurutmalık (kuru üzüm, pekmez vb), meyve suyu olarak çok yönlü değerlendirilebilmesi nedeni ile dünyada ve ülkemizde bağcılık ekonomik önemini geçmiş yıllardan günümüze kadar korumuştur. Bilindiği üzere dünya genelinde bağcılık amerikan asma anaçları üzerine aşılı *Vitis vinifera* L. bağcılığı şeklinde yapılmaktadır. Bağcılıkta temel sorun olarak gözlemlenen filoksera (*Phylloxera vastatrix radicola*) böceğine karşı dayanıklılık gösteren asma anaçlarının kuraklık stresine karşı toleransı *Vitis vinifera* L.'ye göre düşük seviyededir. Asma anaçları arasında karşılaştırma yapıldığına ise yaygın olarak kullanılan *V. riparia* X *V.berlandieri* melezi Teleki 5BB anacı kurağa karşı 'hashas anaç' olarak bilinmektedir (12,171).

Farklı *Vitis* türlerinin kuraklık stresine karşı tolerans mekanizmalarının değerlendirilmesi ve anaçlarda tolerans mekanizmalarının belirlenmesine yönelik izlenecek metodoloji ise dayanıklı *V. vinifera* çeşitleri (Cabernet Sauvignon gibi) ile toleransı düşük anaçların (5BB gibi) stres toleransından sorumlu genlerinin transkriptom düzeyinde toplu karşılaştırmaktır.

Bu amaca yönelik çalışmalarda kuraklık toleransından sorumlu organlarının yani köklerin hedef doku olarak kullanılması ise başarının etkinliğini arttıracaktır.

Kuraklık stresi ile ilgili asma kök transkriptomlarının mikrodizin profillemesi incelendiği bu tezde;

- *Vitis vinifera* L. türünde kuraklığa tolerans sağlayan ancak amerikan asma anaçlarında bulunmayan veya ifade düzeyi az olan kök gen adayları ile ve kök-yaprak ortak gen adaylarının, 14.000 yaprak transkriptomunu içeren *Vitis vinifera* Gene Çip'ine kök örneklerinin uygulanması ile belirlenmesi,
- Diğer taraftan kullanılan çip platformunda yer almayan, dünya EST-veri tabanlarındaki kök spesifik gen bölgelerinin çalışma sonucunda bulunan kök-yaprak ortak çip transkriptleri ile karşılaştırılması köke özgü veri bilgilerine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Başlatılan biyoteknolojik yaklaşımlar ile; esas olarak genom düzeyinde anaç-çeşit kök transkriptleri karşılaştırılarak çeşit-anaç toleransındaki gene dayalı farklılıklar ortaya konmuştur. Kökte kurağa dayanıklılıktan sorumlu kök-yaprak ortak transkriptlerinin belirlenmesi ve literatürde köke spesifik bilinen gen bölgelerinin daha da netleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu bulgular özellikle anaçta doğrudan veya dolaylı olarak (tüm genom dizileme, RNA, miRNA, Chip-seq dizileme çalışmaları vb.) tüm gen dizilerinin, gen kontrol bölgelerinin belirlenmesine, klonlanmasına yönelik yürütülecek araştırmalarda önemli bulgu sağlayacaktır. Bağcılık açısından düşünüldüğünde ise ifadesi yüksek/düşük bazı gen bölgeleri kuraklığı toleransta seleksiyon biyo-markırları olarak kullanılacağı gibi, bu gen adayları kuraklık tolerant transgenik anaç geliştirmede ve gen modifikasyonlarında (gen susturma vb.) ilk bulguları oluşturacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Bitkisel Materyal Temini

Tezde kullanılacak bitkisel materyal temini T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nden sağlanmıştır. Kuraklık stresi uygulaması için, Cabernet Sauvignon çeşidi (tolerant genotip), 5BB anacına (hassas genotip) ait kalemlerden köklü fidanlar Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarı' ndaki iklim odasında elde edilmiştir. Yeterli ve sağlıklı sürgün ve yaprak gelişimi gözlendikten sonra genotiplerden homojen bitkisel materyal sağlamak amacı ile doku kültürü denemelerine başlanılmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Cabernet Sauvignon kalemlerinin iklim odasında yetiştirilmesi

4.2. Doku Kültürü Denemeleri

Köklendirme çalışmaları, MS (Murashie and Skog, Sigma, M5519-50L) besi ortamından modifiye edilen Roubelakis köklendirme ortamı (RM: Rooting Medium) (172) ile aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Bitkisel Materyal Sterilizasyon Aşaması

Yeterli büyüme gösteren fidanlardan yazlık sürgünler kesilmiş ve bunlardan “yaprak sapı-gelişme dönemindeki aktif tomurcuk/kışık göz-boğum ve boğum” arasını içeren bitki parçaları 2-4cm uzunluğuda kısaltılıp hazırlanmış ve sterilizasyon aşamasına sokulmuştur. Uygulanan sterilizasyon aşamaları ve uygulama zamanları Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sterilizasyon aşamaları ve zamanları

Uygulama	Zaman
ETOH (%70)	1 dk
Çamaşır Suyu (1/10)	18 dk
ddH ₂ O (otoklavlı)	Yıkama-dökme
ddH ₂ O (otoklavlı)	1 dk
ddH ₂ O (otoklavlı)	18 dk

4.2.2. Roubelakis Köklendirme (RM) Ortamı Hazırlama Aşaması

Her 2 türün (Cabernet Sauvignon, 5BB) genotiplerine ait bitki parçalarının (2-4 cm) köklendirme denemeleri için hazırlanan Roubelakis besi ortamına ait içerik ve miktarlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

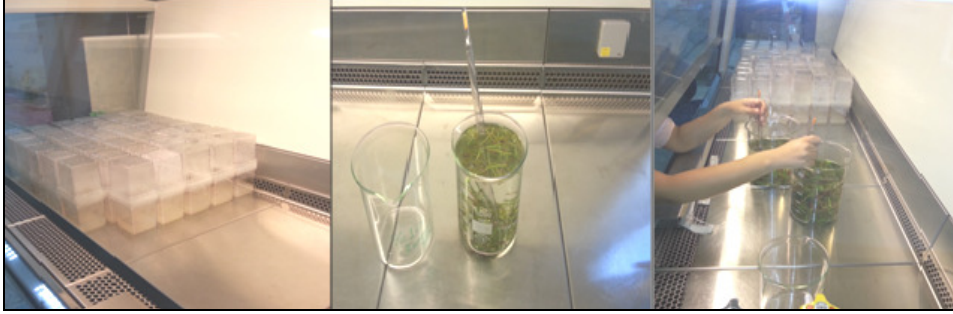
Çizelge 4.2. Roubelakis köklendirme ortamı içeriği (Makro ve Mikro elementler, Vitaminler)

Makro elementler	(mg/lt)	Mikro elementler	(mg/lt)	Vitaminler	(mg/lt)
NH ₄ NO ₃	500	MnSO ₄ .7H ₂ O	5	Biotin	0.1
KNO ₃	100	H ₃ BO ₃	1	Nicotinik acid	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	200	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1	Pridoxin	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	180	KI	0.5	Thiamine	5
KH ₂ PO ₄	100	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01	Panthothenic asid	5
-	-	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	Myo-İnositol	100
-	-	EDTA	40	-	

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O: 4.29g/100ml, Sucrose: 2%(w/v), Agar: 0.7%(w/v), pH 6.4

Besi ortamı hazırlığı için önce Sukroz (20gr/lt) ve ardından Çizelge 4.2’deki sırası ile makro, mikro elementler (1ml/lt) ve vitaminler (1ml/lt) otoklavlı ddH₂O içeren 2lt’lik beherlerde karıştırılmıştır. Karışıma en son demir (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O) (0.042gr/lt) ilave edilmiştir. Toplam hacim ddH₂O ile tamamlandıktan pH’sı 6.4’e (HCl ile) ayarlanmıştır. Uygun pH ortamı sağlandıktan sonra karışıma katılaştırıcı olarak agar (Plant Agar) (7gr/lt) ilave edilmiş ortam sterilizasyon için 120°C’de 20 dk otoklavlanmıştır.

Otoklav sonrası, besi ortamı, daha önceden otoklavlanmış magentalara 100 ml olarak paylaştırılmış ve önceden sterilizasyonu sağlanmış laminar kabin altına yerleştirilerek donmaları beklenmiştir. Katılaştan besi ortamlarına sterilize edilen bitki explantları (parçaları) 3'lü (3 bitki /magenta) gruplar halinde dikilmiştir. (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Ekim öncesi sterilizasyon aşamalarına ve besi ortamlarına ait görüntüler



Şekil 4.3. Cabernet Sauvignon ve 5BB bitkilerinin köklendirme ortamındaki görünümü (3. hafta)

Magentalara ekim sonrasında 2 türe genotipe ait explantlar, optimum koşulları içeren doku kültürü odasında yaklaşık 4-6 hafta (24-26 °C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık) köklenme için bekletilmiştir (Şekil 4.3.).

4.2.3. Köklenmiş Bitkilerin Sıvı MS (Murashige ve Skoog Basal Medium) Ortamına Aktarımı

Roubelakis besi ortamında köklenenen bitkiler, daha fazla kök büyüme gelişmesi için sıvı Murashige and Skoog Basal Medium (MS) (Sigma, M5519-50L) besi ortamına (4.4gr/lit; Sukroz 20gr/lit) aktarılmıştır. MS ortamı ve sukroz karışımı otoklavlı ddH₂O ile hazırlanmış pH 6,4'e ayarlanarak sıvı MS ortamı elde edilmiştir. 50ml ortam magentalara paylaştırılarak 120°C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası sıvı MS ortam içeren magentalar daha önceden sterilizasyonu gerçekleştirilmiş laminar kabin içerisine yerleştirilmiştir. Pens yardımı ile laminar flow içerisinde RM ortamından alınan genotipler sıvı MS ortamına aktarılmıştır. Genotiplerin gelişimi için doku kültürü odasında, yaklaşık 2 hafta (24°C'de 16/8 saat aydınlık/karanlık) için bekletilmeye alınmıştır (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Sıvı MS ortamındaki 5BB bitkilerinin görünümü (2. gün)



Şekil 4.5. Sıvı MS ortamındaki CS bitkilerinin görünümü (10. gün)

4.3. Doku Kültürü Bitkilerinin Kuartz Kum Ortamına Şaşırtılması

Doku kültüründe yeterli köklenme ve gelişim gösteren Cabernet Sauvignon ve 5BB bitkileri, iklim odasında uygun stres koşullarının sağlanması için 120°C'de 20 dk otoklavlanmış steril kum ortamına aktarılmıştır. Aktarım sırasında ise, magentalardan alınan bitkilerin kökleri buldukları besi ortamı içeriğindeki şekerin oluşturabileceği kontaminasyon riskine karşı distile su ile yıkanmıştır. Kökleri yıkanan bitkiler kuartz kuma şaşırtılarak saf su ile ilk sulamaları yapılmış ve şaşırtmadan sonra doku kültürü bitkilerinin dış koşullara alıştırılması için üzeri plastik örtü ile kapatılmıştır (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Kuartz kum ortamına şaşırtılan Cabernet Sauvignon bitkilerinin görünümü (3. gün)

Şaşırtma sonrasında ilk 3 haftalık süreçte ise bitkilerin üzerindeki örtü kademeli olarak (ilk hafta 10 dk, sonraki haftalarda 20 dk ve son hafta tüm gün) kaldırılarak dış ortama alışmaları sağlanmıştır. Bu süreçte bitkiler hergün aynı saatte ve aynı miktarda, içeriği

Çizelge 4. 3' de sunulan Hoagland besin solüsyonu (1:10 oranında) ile sulanarak 5-6 hafta süre ile gelişimleri sağlanmıştır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Kuartz kum ortamında gelişmiş 5BB ve Cabernet Sauvignon bitkilerinin görünümü (20. gün)

Çizelge 4.3. Hoagland besin solüsyonu içeriği

Makro Elementler (10X)	(g/lt)	Mikro Elementler (1X)	(g/lt)
K ₂ SO ₄	15.7	H ₃ BO ₃	0.124
KH ₂ PO ₄	2.7	MnSO ₄	0.066
MgSO ₄ .7H ₂ O	24	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.100
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	47.23	NH ₄ Mo	0.048
KCl	0.0746	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.155
Her 10X için:10L Makro besin solüsyonuna 50ml mikro besin solüsyonu ve her 1X için 1L makro ve mikro besin solüsyonu için kullanılmadan önce 1ml Fe EDTA eklenir (FeEDTA (1000X) - 365g/lt).			

4.4. Stres Uygulamaları, Fizyolojik Ölçümler ve Mikrodizin Deneme Deseni

4.4.1. Stres Uygulamaları

Kuraklık stresi uygulamaları; su noksanlığı (sulamama) şeklinde uygulanmış ve bitkilerin strese girdiği zaman aralığı (7. gün), 7 gün süreyle yaprak su potansiyelindeki ölçümler göz önüne alınarak denemlerle belirlenmiştir. Tezde yürütülen mikrodizin analizlerine yönelik stres uygulamalarında ise, 7 gün boyunca stres uygulanan bitkiler sulanmazken, kontrol bitkileri hergün 1:10 Hoagland besin solüsyonu ile aynı saat ve aynı oranda solüsyonla sulama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Stres uygulamalarının sonu olan 7. günde ise, hem kontrol hem de stres uygulanmış bitkilerin fizyolojik ölçümleri (yaprak su potansiyeli, MPa) yapılmış, kökler sıvı azotta dondurulduktan sonra, RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de saklanmıştır.

4.4.2. Fizyolojik Ölçümler

Yaprak su potansiyeli ölçümleri, olgun yaprakların yaprak sapları dikkatli bir şekilde kesilip basınç bombası (Pressure chamber-model 600, Wescor, Inc.) aletine yerleştirildikten sonra hem stres uygulanan hem de kontrol bitkileri için 7. gün sonunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Bitkilerde yaprak su potansiyeli ölçüm aşamaları

4.4.3. Mikrodizin Deneme Deseni

Çip uygulama deseni Çizelge 4.4’de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan her iki tür içinde (5BB ve Cabernet Sauvignon) kontrol ve stres uygulamalarında mikrodizinler 3 biyolojik tekrarlı (her biyolojik tekrarda 3’er bitki olacak şekilde) olarak gerçekleştirilmiştir. Esas stres zamanı olan 7. gün ve kontrollerine ek olarak 0. günde de örnekleme yapılmıştır.

Çizelge 4.4. Deneme deseni (Genotip- doku- çip) düzeni

Cabernet Sauvignon Kök			5BB Kök		
UYGULAMA	Zaman Aralığı		UYGULAMA	Zaman Aralığı	
	0.gün	7.gün		0.gün	7.gün
Kontrol 1.1	CS kontrol		Kontrol 1.1	5BB kontrol	
Kontrol 1.2	CS kontrol		Kontrol 1.2	5BB kontrol	
Kontrol 1.3	CS kontrol		Kontrol 1.3	5BB kontrol	
Kontrol 1.4		CS kontrol	Kontrol 1.4		5BB kontrol
Kontrol 1.5		CS kontrol	Kontrol 1.5		5BB kontrol
Kontrol 1.6		CS kontrol	Kontrol 1.6		5BB kontrol
Stres 1.1		CS stres	Stres 1.1		5BB stres
Stres 1.2		CS stres	Stres 1.2		5BB stres
Stres 1.3		CS stres	Stres 1.3		5BB stres

4.5. RNA izolasyonu

Kurak stresi uygulamaları gerçekleştirilen her iki türe ait genotiplerin köklerinden RNA izolasyonu aşağıda açıklandığı şekilde (173) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Kullanılan RNA izolasyon çözeltisine ait içerik ve miktarlar Çizelge 4.5’de verilmektedir.

Çizelge 4.5. RNA izolasyon çözeltisi içeriği

Homojenizasyon Buffer		
200 mM Tris Base-pH 8.5		
% 1.5 (ağırlık/hacim) lithium dodecylsulfate		
300 mM LiCl		
10 mM sodium EDTA		
% 1 (ağırlık/hacim) sodium deoxycholate		
% 1 (hacim/hacim) NP_40 (AKA tergitol NP-40)		
*DEPC su ile hazırlanan solüsyon otoklavlanır.		
*Her 50 ml çözelti (1 örnek) için aşağıdaki maddeler bir kat veya iki kat kullanılır		
Miktar (g) 1 kat için	Miktar (g) 2 kat için	
0.0211g	0.0422g	1 mM aurintricarboxylic acid
0.0771g	0.1542g	10 mM dithiothreitol (AKA DTT)
0.019g	0.038g	5 mM thiourea
1g	2g	% 2 (wt/vol) PVPP
Tüm cam malzemeler ve havanlar 180°C’de 6 saat sterilize edilmiştir sterilize edilmiştir.		
Tüm solüsyonlar 120°C’de 20dk otoklavlanmıştır.		

***Diğer Kullanılan Solüsyonlar:** 3.3M Sodyum Asetat, saf Ethanol, isopropanol, 10M LiCl, 5MPotasyum Asetat, DEPC ile muamele edilmiş su

RNA izolasyon metot aşamaları:

Birinci gün

1. 3-4 g bitki dokusu sıvı azot ile ezilir, 50 ml falkon tüp içine alınır.
2. Üzerine 50 ml homojenizasyon buffer eklenir ve iyice karışması sağlanır.
3. Homojenat 250 ml beher içine aktarılır ve en az 2 saat -20°C’de bekletilir, ve daha sonra -80°C’ye transfer edilerek ve gece boyu bekletilir.

İkinci gün

4. -80°C’de gece boyu bekletilen homojenat, 37°C su banyosunda eriyene kadar bekletilir.
5. Eriyen homojenat iki adet 50 ml tüpe transfer edilir.
6. 5000xg’de 4°C’de 20 dk santrifuj edilir ve süpernatant temiz tüpe alınır (tercihen 1-2 tabaka otoklavlanmış miracloth veya 4 kat peynir bezi ile filtre edilir).
7. 1/30 oranında 3.3 M sodium acetate süpernatanta eklenir ve karıştırılır (0.106 M son konsantrasyon).

8. % 10 hacim/hacim %100 EtOH eklenir ve ters-düz edilerek karıştırılır. 10dk buzda bekletilir.
9. 5000xg de 4°C'de 20 dk santrifuj edilir. Süpernatant temiz 50 ml tüpe alınır.
10. 1/9 oranında 3.3 M sodium acetate eklenir (0.33 M son konsantrasyon).
11. 1/2 oranında isopropanol eklenir.
12. -20°C'de 2 saat bırakılır (tercihen geceboyu bekletilir).

Üçüncü gün

13. 5000xg'de 4°C'de 30 dk santrifuj edilir.
14. Süpernatant atılır, pellet pipetaj yapılarak 3ml TE Buffer içinde çözdürülür.
15. Örnekler 30 dk buz üzerinde bekletilir.
16. 5000xg'de 4°C'de 30 dk santrifuj edilir. Süpernatant temiz tüpe (14 ml) alınır (Aynı örnek için iki farklı tüpe çalışılıyorsa veya başlangıçta çalışmalar küçük hacimli tüplerle başlanmışsa bu aşamada hacimler birleştirilir).
17. Süpernatant 1/4 oranında 10 M LiCl ile karıştırılır (2.5 M son konsantrasyon) ve gece boyu buz üzerinde bekletilir.

Dördüncü gün

18. Gece boyu buz üzerinde bekletilen örnekler 10000xg de 4°C'de 30 dk santrifuj edilir.
19. Süpernatant atılır, pellet pipetaj ile 1.5ml TE Buffer içinde çözdürülür (İki örnek birleştirilmişse 3 ml).
20. 1.5 hacim 5 M (pH ayarı yapılmamış) potasium acetate eklenir.
21. 3 saat buzda bekletilir.
22. 10000xg de 4°C'de 30 dk santrifuj edilir.
23. Süpernatant atılır, pellet 1 ml (İki örnek birleştirilmişse 2ml) TE Buffer içinde çözdürülür ve buzda 1 saat bekletilir.
24. 1 ml fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenip vortexlenir. 10000xg'de 15 dk santrifuj edilir. Üst faz yeni tüpe alınır. Aynı hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenip, vortexlenerek aynı şekilde santrifuj edilir ve üst faz temiz tüpe alınır.
25. 1/9 oranında 3.3 M sodium acetate ve 2 hacim EtOH eklenir.
26. En az 2 saat -20°C de bekletilir (tercihen gece boyu bekletilir).

Beşinci gün

27. 10000xg de 4°C'de 30 dk santrifuj edilir. Pellet RNA' dır.
28. Pellet 500µl (İki örnek birleştirilmişse 1 ml) saf EtOH ile yıkanır.
29. 10000xg de 4°C'de 30 dk santrifuj edilir.

30. Alkol uzaklaştırılır ve pellet yaklaşık 1 saat kurumaya bırakılır. 500µl DEPC ile muamele edilmiş suda çözdürülür.
31. 65°C su banyosunda 8 dk pelletin tamamen çözünmesi için bekletilir. Sonra ependorf tüpe (1.5ml) transfer edilir.

4.6. İzole Edilen RNA'ların Pürifikasyonu

İzole edilen RNA'lar *Rneasy Mini* kit (Qiagen, Cat No:74104)ile aşağıda yer alan metota göre pürifiye edilmiştir.

1. 10µl β -mercaptoethanol 1 ml RLT ile karıştırılır.
2. 50-70 µg RNA alınır ve Rnase free su ile hacim 100 µl'ye tamamlanır.
3. Üzerine 350 µl RLT eklenir ve pipetle karıştırılır.
4. Üzerine 250 µl saf EtOH eklenir ve pipetle karıştırılır.
5. Yaklaşık 700 µl karışım 2 ml tüp içerisine yerleştirilen pembe RNeasy kolonuna aktarılır.
6. 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilir (alt süzüntü atılır).
7. Kolona 500 µl RPE eklenir, 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj edilir (alt süzüntü atılır)- yıkama aşaması.
8. Kolona 500 µl RPE eklenir, 2 dk maksimum hızda santrifüj edilir ve alt süzüntü atılır.
9. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alınır ve maksimum hızda 1 dk santrifüj edilir.
10. Kolon 1.5 ml tüpe yerleştirilir, üzerine 30-50µl RNase free su kolon membranına eklenir ve 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilir (10. aşama iki defa uygulanır).

4.7. RNA Örneklerinin Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Agaroz jelve spektrofotometrik olarak; izole edilen RNA'lar pürifikasyon öncesi ve pürifikasyon sonrasında %1.2'lik agaroz jelle yüklenerek 1,5 saat yürütülmüştür. Ayrıca kalite ve miktar tayini için spektrofotometrik ölçümleri (ND-1000) yapılmıştır.

Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer cihazı ile; Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı ile ilgili protokollerbaz alınarak analiz edilmiştir. Bu aşamalarda, Agilent Technologies® Bioanalyzer RNA 1000 Kiti (Agilent Technologies, ABD) ve kite ait çip ve solüsyonları kullanılmıştır. Örneklerle ait RNA'lar ve markır çip için Bioanalyzer protokolüne uygun olarak hazırlanan çipler Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer cihazına yüklenmiştir.

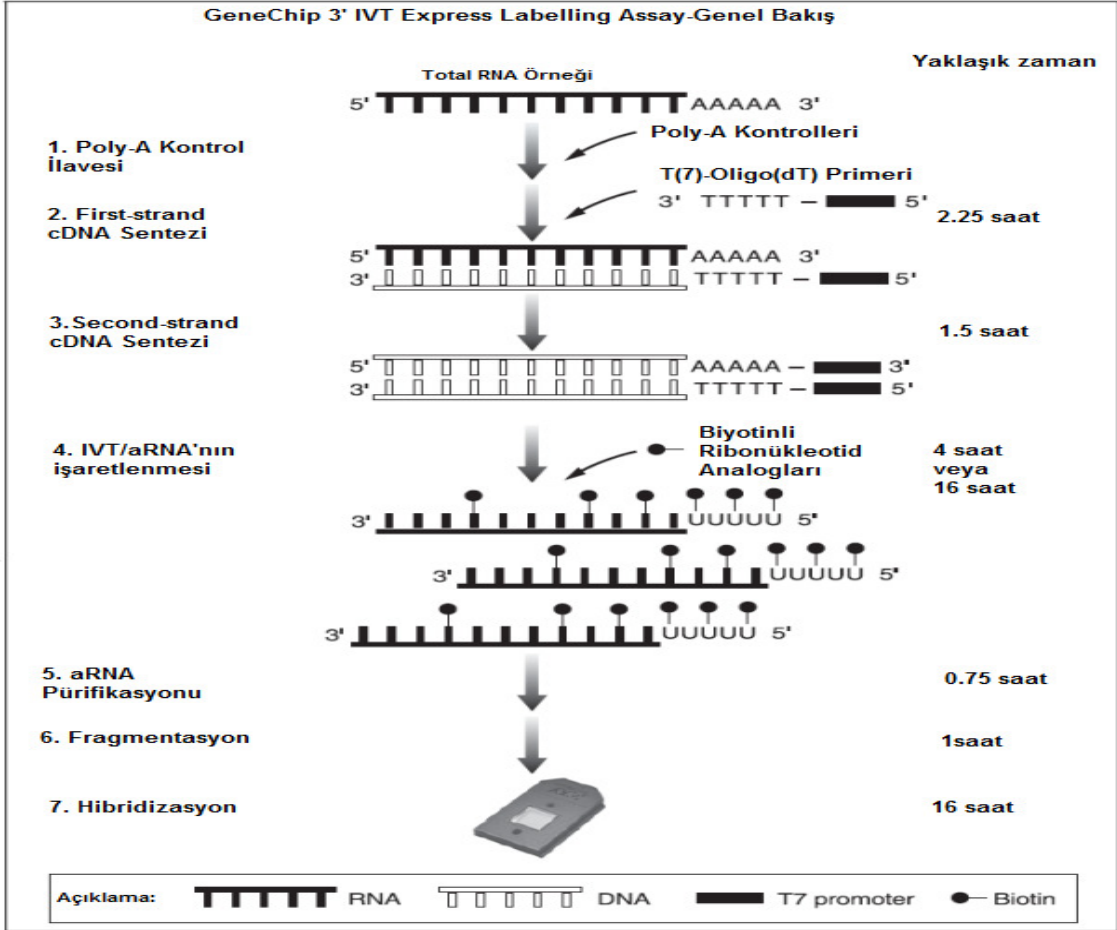
Alette yrtlen rnekler, Agilent Technologies® 2100 Expert Software (B.02.02 versiyonu) programı eşliğinde analiz edilmiş (şekil 4.9.), her bir RNA'ya ait elektroferogramlar değerlendirmiştir.



şekil 4.9. Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer cihazı ve uygulama aşamaları

4.8. Mikrodizin Uygulamaları

Mikrodizin uygulamaları Affymetrix GeneChip® teknolojisini kullanarak üretici firmanın protokolleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (www.affymetrix.com). Protokole göre, güncellenen IVT Express Labelling Kiti ile ip işlemleri her bir aşaması aşağıda detaylı verildiği şekilde (şekil 4.10.) uygulanmıştır.



Şekil 4.10. GeneChip 3' IVT express labelling assay-genel akış şeması

aRNA amplifikasyon protokolü

Poly-A RNA kontrollerinin hazırlanması

Poly-A kontrol seti, tüm ökaryotik hedef işaretleme sürecini izlemek için ekzogen pozitif kontrol sağlamak amacıyla özel olarak tasarlanmıştır. Her ökaryotik GeneChip® prob array, ökaryotik örneklerde olmayan (*lys, phe, thr ve dap vb*) pek çok *B. subtilis* geninin prob setini içerir. Bu poly-A RNA kontrolleri in vitro olarak sentezlenir ve *B. subtilis* genlerinin poliadenilat transkriptleri aşamalı olarak birbiri ile karışmayacak şekilde karıştırılır. Poly-A kontrol stokları, Poly-A Control Dil Buffer ile seyreltilir ve RNA örneklerine aşağıda özetlendiği gibi son konsantrasyona ulaşacak şekilde direkt olarak eklenir.

Poly-A RNA Spike	Son konsantrasyon
Lys	1:100,000
Phe	1:50,000
Thr	1:25,000

Dap 1:6,667
Başlangıç materyali olarak 50, 100, 250 veya 500 ng RNA kullanılır. Başlangıç miktarı dikkate alınarak spike in kontrollerinin uygun son konsantrasyona ulaşması için aşağıda açıklandığı şekilde seri dilüsyonları gerçekleştirilir.

Başlangıç RNA miktarına göre seri dilüsyonlar:

Total RNA miktarı	1. Dilüsyon	2. Dilüsyon	3. Dilüsyon	4. Dilüsyon	4.Dilüsyonun miktarı
50 ng	1:20	1:50	1:50	1:20	2 µl
100 ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 µl
250 ng	1:20	1:50	1:50	1:4	2 µl
500 ng	1:20	1:50	1:50	1:2	2 µl

Tezde kullanılan 100 ng total RNA için Poli-a RNA dilüsyonunun hazırlanması:

- 38 µl Poly-A Control Dil Buffer'ına, Poly-A RNA kontrol Stok'dan 2 µl eklenir (1:20). İyice karıştırılır ve kısaca santrifüj edilir.
- 98 µl Poly-A Control Dil Buffer'ına, ilk dilüsyondan 2 µl eklenir (1:50). İyice karıştırılır ve kısaca santrifüj edilir.
- 98 µl Poly-A Control Dil Buffer'ına, ikinci dilüsyondan 2 µl eklenir (1:50). İyice karıştırılır ve kısaca santrifüj edilir.
- 18 µl Poly-A Control Dil Buffer'ına, üçüncü dilüsyondan 2 µl eklenir (1:10). İyice karıştırılır ve kısaca santrifüj edilir.
- Dördüncü dilüsyondan 2 µl, 100ng total RNA'ya eklenir.

Total RNA/Poly-A kontrol karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
Total RNA örneği (50-500ng)	Değişken
Seyreltilmiş poly-A RNA Kontrolleri (4. dilüsyon)	2 µl
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam Hacim	5 µl

First strand cDNA sentezi için revers transkripsiyon

First Strand Master karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
First-Strand Buffer Mix	4 µl
First-Strand Enzim Mix	1 µl
Toplam Hacim	5 µl

Hazırlanan 5µl first-strand master karışımı, 500 rpm’de vortekslenir ve kısaca (~ 5 saniye) santrifüj edilerek, Total RNA/Poly-a Kontrol karışımına eklenir son hacim 10 µl’ye tamamlanır. Termal cycler’da (Biorad marka) 42°C’de 2 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra örnekler kısaca (~5 saniye) santrifüj edilerek buza alınır ve hemen Second-Strand cDNA sentezi aşamasına geçilir.

Second strand cDNA sentezi

Second strand karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
Nükleaz içermeyen su	13 µl
Second-Strand Buffer Mix	5 µl
Second -Strand Enzim Mix	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Hazırlanan 20µl Second Strand Master karışımı, nazik bir şekilde vortekslenir ve kısaca (~ 5 saniye) santrifüj edilerek, 10µl cDNA örneğine eklenir. İyice karışana kadar 500 rpm’de vortekslenir ve kısaca (~5 saniye) santrifüj edilerek termal cycler’da (Biorad marka) 16 °C’de 1 saat ve 65 °C’de 10 dk inkübe edilir. İnkübasyondan sonra örnekler kısaca (~ 5 saniye) santrifüj edilerek buza alınır ve hemen IVT (In Vitro Transkripsiyon) aşamasına geçilir veya -20 °C’de saklanabilir.

İşaretli aRNA’nın in-vitro transkripsiyonu

IVT karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
IVT Biotin Label	4 µl
IVT Labelling Buffer	20 µl
IVT Enzyme Mix	6 µl
Toplam Hacim	30 µl

Hazırlanan 30µl IVT Master karışımı, 500 rpm’de vortekslenir ve kısaca (~5 saniye) santrifüj edilerek, çift zincirli cDNA örneğine eklenir. İyice karışana kadar 500 rpm’de vortekslenir ve kısaca (~5 saniye) santrifüj edilerek termal cycler’da 40 °C’de başlangıç miktarı dikkate alınarak 4-16 sa inkübe edilir. 50 - 250 ng başlangıç RNA miktarı için 16 saat, 100 ile 500ng başlangıç RNA miktarı için 4 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında aRNA kısa süreliğine buza alınır ve hemen aRNA pürifikasyonu aşamasına geçilir veya - 20 °C’de (1 gece süre ile) saklanır.

aRNA pürifikasyonu

aRNA pürifikasyonuna başlamadan önce 50µl (her 50 µl için %10 fazlası eklenir) aRNA Elütation Solusyonu ısı bloğunda 50-60 °C'de en az 10 dk ön ısıtmaya tabi tutulur.

1. aRNA binding karışımının hazırlanması

İçerik	Hacim
RNA Binding Beads*	10 µl
RNA Binding Buffer	50 µl

*RNA Binding Beads karışımı hazırlanmadan önce homojen bir hal alana kadar iyice vortekslenir. Hazırlanan aRNA Binding karışımı homojen bir hal alana kadar iyice vortekslenir.

2. aRNA örnekleri U-bottom platelere transfer edilir ve hazırlanan 60 µl aRNA Binding karışımı örneklere eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır.
3. %100'lük 120 µl etanol örneğe eklenir ve pipetaj yapılarak karıştırılır. 500 rpm'de 3 dk vortekslenir.
4. Plate, manyetik standı yerleştirilir ve 5 dk beklenir. Bu süre içinde aRNA örneklerinin bağlı olduğu manyetik beadler manyetik stand tarafından tutulur. Manyetik beadler tamamen tutulduktan sonra karışım transparant bir hal alır ve RNA Binding Beadler manyetik standı mıknatısa karşı pellet formuna dönüşür. Manyetik beadleri bozmadan dikkatli bir şekilde supernatant atılır ve plate manyetik standıdan çıkartılır.
5. 100µl aRNA wash solüsyonu eklenir ve 800 rpm'de 1 dk vortekslenir. Plate manyetik standı yerleştirilir ve 5 dk beklenir. 5 dk sonunda süpernatant atılır ve bu aşama 2. kez tekrarlanır.
6. Beadlerden alkolü uzaklaştırmak için plate 1200 rpm'de 1 dk vortekslenerek beadler kurutulur.
7. 50 µl önceden ısıtılmış (50-60°C) aRNA Elution solusyonu örneğe eklenir. 3 dk vortekslenir. RNA binding beadslerin tamamen çözündüğünden emin olduktan sonra plate manyetik standı yerleştirilir ve 5 dk beklenir.
8. 5 dk sonunda elue edilmiş aRNA içeren süpernatant temiz tüpe transfer edilir.

İşaretli aRNA'nın fragmentasyonu

Çip formatına göre aRNA fragmentasyon reaksiyonu:

İçerik	100 Format(Midi)
aRNA	12 µg (1 - 23.6 µl)
5x Fragmentasyon buffer	6.4 µl
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam Hacim	30 µl

Reaksiyon termal cycler'da (Biorad marka) 94°C'de 35 dk inkübe edilir. İnkübasyondan sonra hemen buza konulur. Kontrol amaçlı %1'lik agaroz jelde yürütülür. Fragmente edilen aRNA, hibridizasyon aşamasına kadar -20 °C'de (uzun süreli saklamalar için -80 °C'de) tutulur.

Hedef hibridizasyonu

Fragmente edilen aRNA örnekleri array formatına uygun miktarda alınarak hibridizasyon kokteyli hazırlanır.

1. Hibridizasyon kokteylinin hazırlanması (Tek Prob array'i için)

İçerik	Array Formatı 100 format(midi)	Son Konsantrasyon
Fragmente edilmiş ve işaretlenmiş Arna	12 µg	0.05 µg/ µl
Kontrol Oligonükleotid B2 kontrol (3nM)	3.3 µl	50pmol
20X Ökaryotik Hibridizasyonkontroller (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	10 µl	1.5, 5, 25 ve 10pM
2X Hibridizasyon mix	100 µl	1X
DMSO	20 µl	10%
Nükleaz içermeyen su	40 µl	
Toplam hacim	200 µl	

2. Kullanmadan hemen önce prob array oda sıcaklığına getirilir.
3. Hibridizasyon kokteyli 99°C'de 5 dk ısı bloğunda ısıtılır.
4. Bu esnada prob array uygun hacimde (100 format için-130µl) Prehibridizasyon karışımı ile septalardan doldurulur ve hibridizasyon fırınında 45°C'de 10 dk 60rpm'de dönerek inkübe edilir.
5. 99°C'de ısıtılan hibridizasyon kokteyli 45°C'de ısı bloğuna transfer edilir ve 5 dk bekletilir.
6. 5 dakikanın sonunda hibridizasyon kokteyli maksimum rpm de 5 dk santrifüj edilir.
7. Prob array kartuşundan Prehibridizasyon karışımı çekilir ve uygun hacimdeki (100 format için -130 µl) hibridizasyon kokteyli doldurulur.

8. Prob array'i hibridizasyon fırınına yerleştirilir, 45 °C'de 60 rpm'de 16 saat hibridize edilir.

Prob array yıkama ve boyama

16 saatlik hibridizasyon süreci sonunda, array'den hibridizasyon kokteyli çekilerek yerine Wash Buffer (A) doldurulur. Aşağıda içeriği verilen boyama maddeleri kullanılarak boyama işlemleri ve Wash Buffer (A) ve Wash Buffer (B) ile yıkama işlemleri gerçekleştirilir. Yıkama bitiminde array taranarak görüntü alınır.

Boyama maddelerinin hazırlanması

SAPE solüsyon karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim	Son konsantrasyon
2X Stain Buffer	600.0 µl	1X
50 mg/mL BSA	48.0 µl	2 mg/ml
1 mg/mL Streptavidin Phycoerythrin (SAPE)	12.0 µl	10 µg/ml
Nükleaz içermeyen su	540.0 µl	—
Toplam Hacim	1200 µl	

*İyice karıştırılır ve her biri 1 ve 3 boyları için kullanılmak üzere 600µl' lik iki miktara bölünür.

Antikor solüsyon karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim	Son konsantrasyon
2X Stain Buffer	300.0 µl	1X
50 mg/mL BSA	24.0 µl	2 mg/ml
10 mg/mL Keçi IgG stok	6.0 µl	0.1 mg/ml
0.5 mg/mL biotinli antikor	3.6 µl	3 µg/ml
Nükleaz içermeyen su	266.4 µl	—
Toplam	600 µl	

4.9. qRT-PCR (Real Time) Uygulamaları

Mikrodizin verilerinin validasyonu için kullanılan Real time PCR (RT-PCR) metodu iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk basamak için First Strand cDNA sentez kiti (Roche) ile aşağıda işlem basamakları verildiği şekilde cDNA sentezi yapılmıştır.

RNA-Primer karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
RNA (2 µg)	Değişken
Random Hekzamer Pirmer (50pmol/µl)	1 µl
Su (PCR grade)	Değişken
Toplam	13 µl

Termal cycler'da (Biorad marka) 65°C'de 10dk denatüre edilip hemen buza alınan karışıma aşağıda verildiği şekilde hazırlanan Revers Transkripsiyon karışımı eklenerek, belirtilen reaksiyon koşullarında revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim	Reaksiyon Koşulları
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction buffer (5X)	4 µl	
RNase İnhibitör (40 u/µl)	0.5 µl	25 °C 10 dk
DNTP mix (10 mM)	2 µl	55 °C 10 dk
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzimi (20 u/µl)	0.5 µl	85 °C 5 dk
Toplam	7 µl	

cDNA sentezi sonrası Nanodrop ND-1000 spektrofotometre ile elde edilen cDNA miktarı ölçülerek miktar tayini yapılmıştır. RT-PCR aşamasını takip eden ikinci aşamada ise SYBR Green I (Roche) master kiti kullanılarak aşağıda işlem basamakları verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

İçerik	Hacim
cDNA	3 µl
Su (PCR grade)	0.8 µl
Primer (F+R) (10pmol)	0.6 µl
Light Cyler Fast Start DNA Master SYBR Green I	5 µl
Toplam	10 µl

Hedef gene ait CT/CP değerlerinin normalizasyonu için eIF4 α kontrol geni kullanılmıştır. Validasyon için seçilen primerlere ve kontrol (house keeping) genine ait dizi bilgileri Çizelge 4.6’ da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Real time-PCR primer dizileri (5’-3’)

Gen	Probe ID	Geri Primer	İleri Primer
Dehydrine	1621592_s_at	tccccacatgcataccag	gccgcttccatactcagttcc
Galactinol-sucrose galactosyltransferase 6-like	1616116_at	ggcgtaccatgcatctg	ggcatcactgacgtagatgg
Tonoplast dicarboxylate transporter-like	1614820_at	tcttcgtttgtcccaaaaaca	ttgctggaattgctgcatta
Beta-amylase 1, chloroplastic-like	1610646_s_at	actcggccactggtcag	acctagcttgagcttccagtgc
Thioredoxin-like 1-1, chloroplastic-like		aaggagagtgcaccttgg	ttgatttcttcccctggtt
Beta-1,3-glucanase	1620063_at	cagcgcgtgagtaaacagcat	gggcagcttggttacaagaa
EIF4 α	-	catgaacctcacaccgaga	gatgtgatccaacaggcaciaa

Her bir primere ait örnekleri içeren cDNA’lar ile SYBR Green I (Roche) Master Kit içerikleri karışımı alete ait 384’lük platalere yerleştirilerek plate 1500 rpm’ de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında Roche Light Cycler Sealing foil ile plate kaplanarak Roche Light Cycler 480 aletinde her bir primer için optimize edilen sıcaklıklar seçilerek örnekler koşturulmuştur.

Real Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla kontrol cDNA’ lardan 6 logaritmik konsantrasyon olmak üzere; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmış ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında Real Time PCRaetine ait analiz programı ile her bir primer için ayrı ayrı standart eğriler (en az 1 logaritmik konsantrasyonun eğri üzerinden geçen, efficiency değeri 1.7 ile 2 arasında ve slope değeri ise -3.3’ e yakın olacak şekilde) çizilmiştir.

4.10. Mikrodizin Verilerin İşlenmesi ve Biyoinformatik Analizi

4.10.1. Kalite Kontrol Analizleri

“*Vitis vinifera* (Grape) Genome Array” çipleri her biri 3 biyolojik tekrar olmak üzere her iki türde, tek stres koşulu (kuraklık) ve iki zaman aralığı için (0.gün ve 7. gün) toplam 18 çipte tasarlanmıştır. Tüm çip analizleri R (versiyon R.3.1.1 – <http://cran.r-project.org/>), MeV, Microsoft Excel ve SPSS programları kullanılarak tamamlanmıştır.

Mikrodizin analizleri sonucunda çip hibridizasyonları her tekrarda hemen hemen aynı düzeyde bulunmuştur. 18 çipte ham PM (perfect match) dağılımlarında herhangi bir problemle karşılaşılmaıştır. Her bir prob setinin 3’ ve 5’ ucu arasındaki RNA degradasyon durumu ve RNA örneklerinin işlemler süresince bütünlüğünü koruduğu RNA degradasyon plot analizleriyle belirlenmiştir.

Farklı şekilde ifade olmuş mRNA seviyelerinin hesaplandığı ve buna uygun olarak da gruplar arası ifade farklılıklarının görsel olarak tespit edilebildiği hiyerarşik gruplandırma grafikleri (Hiarchical Cluster - Heatmap) oluşturulmuştur.

İfadesi değişen prob setlerinin tanımlanmış veya tahmini gen bilgileri, aksesyon numaraları ve dizi bilgileri ile aynı genin farklı bitkilerdeki benzerlikleri NetAffyx™ analiz merkezi (Affymetrix) ve PLEXdb (Plant Expression Database-<http://plexdb.org>) kullanılarak tespit edilmiştir.

R programı kullanılarak 18 çipin ham intensiti değerleri, ilk olarak RMA (Robust Multi-array Average) ile ön işleme tabi tutulmuştur. R-AffyExpress ekspresyon farklılık analiz paketi ile her 3 biyolojik tekrar çip için en az 2 tanesinde ekspresyon değeri 6’ ten küçük olanlar filtrelendikten sonra çipte yer alan 16.602 probtan 10.569 tanesi elenerek 6033 prob ile analizlere devam edilmiştir.

6033 proba, stres uygulaması ile zaman arasındaki etkileşim (interaksiyon) dikkate alınarak, farklı zaman periyotlarında stres uygulamasının etkisi sonucu oluşan ifade farklılık analizi için R-AffyExpress (Bu paket program ile affymetrix gen ifade analizlerinde farklı ifade olan genlerin tanımlamaları ve kalite kontrolleri yapılmaktadır) paketinde yer alan LIMMA (Linear Models for Microarray Data) ve FDR (False Discovery

Rate) metotları kullanılarak ifade oranındaki kat artışları/azalışları (fold change) değeri “2” den büyük ve p değeri değeri “0.01” den küçük olan problemler seçilmiş ve 5BB için 1925 probun CS için ise 1279 probun (ortak olarak 818 prob) 2 kat (2-fold)’dan daha fazla ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu prob seti MeV (Multi Experiment Viewer) programı ile hierarchical cluster ve heat map uygulaması yapılmıştır. İfade farklılığına sahip problemlerin Venn diyagramları; stres/zaman dikkate alınarak Microsoft Excel’de hazırlanmıştır.

Affymetrix tarafından yayınlanmış olan en son anotasyon dosyası (annotation dosyası link:<http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=grape>, Tarih: 30.10.2012) kullanılarak her iki genotip için de ifade farklılığı olan 818 prob için “Moleküler Fonksiyon” bakımından 579, “Biyolojik Yolaklar” bakımından 547 ve “Hücresel komponent” açısından 498 proba ait gen ontoloji sınıflandırması yapılmıştır.

4.10.2. Mikrodizin Verilerinde Belirlenen Yaprak–Kök Ortak Transkriptomların EST Verileri İle Karşılaştırılması

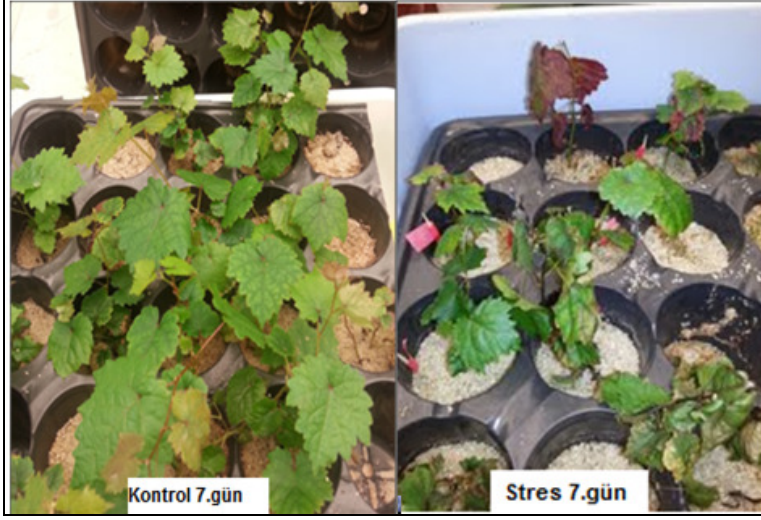
Tez sonucunda; ifade düzeyi 2 ve 2’den fazla olan yaprak- kök ortak transkriptomları (prob), NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=grape+ergul>) bulunan yaklaşık 16.452 kök EST’leri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma için Affymetrix internet sitesinden (<https://www.affymetrix.com/user/login.jsp?toURL=/analysis/netaffx/blast.affx>) ortak transkriptomları içeren problemlerin dizi bilgileri indirilmiştir. Mevcut EST dizi bilgileri ile excelin formülasyon araçları kullanılarak karşılaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Stres Uygulamaları

5.1.1. Kuraklık Stresi Uygulamaları

Sulamama şeklinde uygulanan kuraklık stresi sonunda yaprak-su potansiyeli azalmış ve çeşit ve anaç stres bitkilerinde solgunluk gözlemlenmiştir.



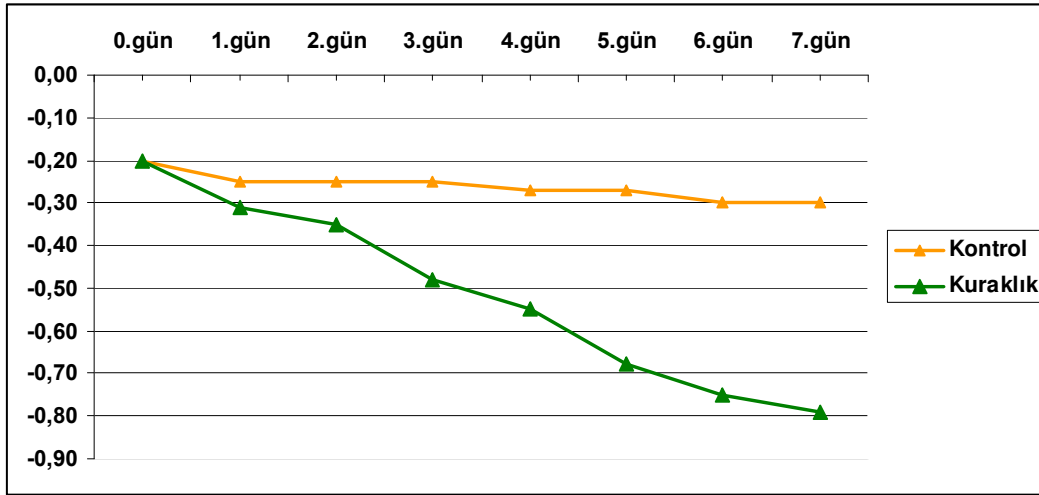
Şekil 5.1. Cabernet Sauvignon bitkilerinde kontrol ve kuraklık stresi (7.gün) görüntüsü



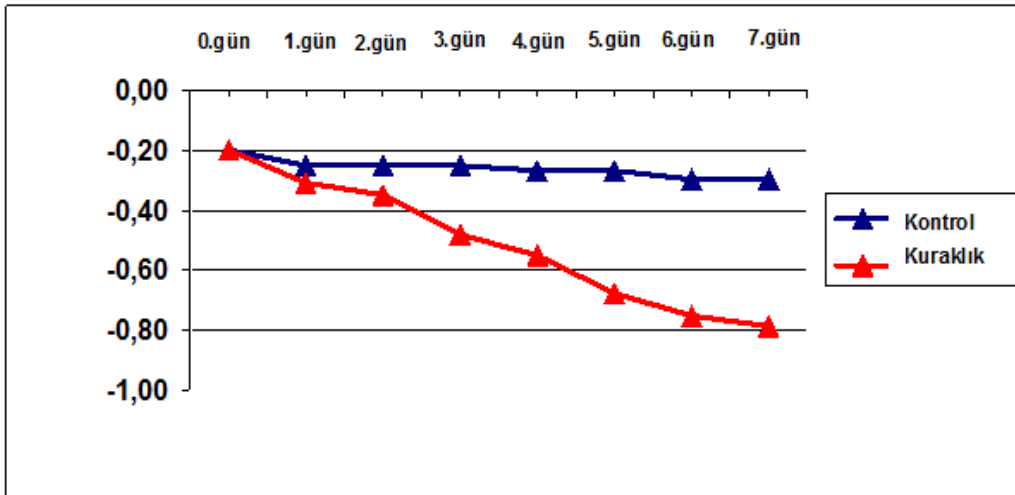
Şekil 5.2. 5BB bitkilerinde kontrol ve kuraklık stresi (7.gün) görüntüsü

5.2. Kuraklık Stresinin Fizyolojik Olarak (-MPa) Belirlenmesi

Örnek toplama zamanının belirlendiği 7. güne (0-7 gün) kadar stres uygulaması ön denemelerde; yaprak su potansiyeli ölçüm değerleri (MPa), kuraklık stresi uygulanan bitkilerde kontrole göre önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Uygulama süresince kuraklık stresinde CS (Şekil 5.3.) ve 5BB bitkilerinde (Şekil 5.4.) MPa değerleri sırasıyla; -0.3 ile -0.8 MPa, -0.25 ile -0.95 MPa arasında kontrol bitkilerinin değerleri ise sırasıyla -0.2 ile -0.35 MPa ve -0.2 ile -0.3 MPa arasında değişmiştir.



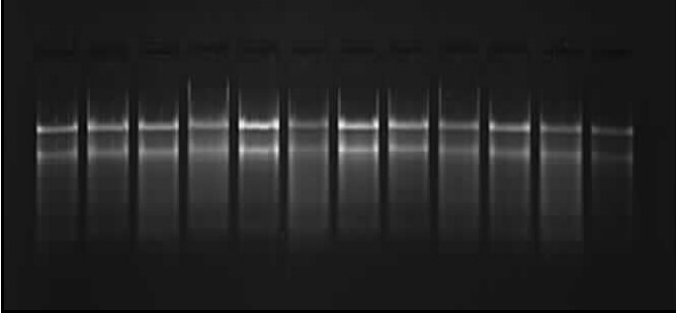
Şekil 5.3. Cabernet Sauvignon (CS) çeşidinde yaprak su potansiyelinin (-MPa) grafiksel görüntüsü



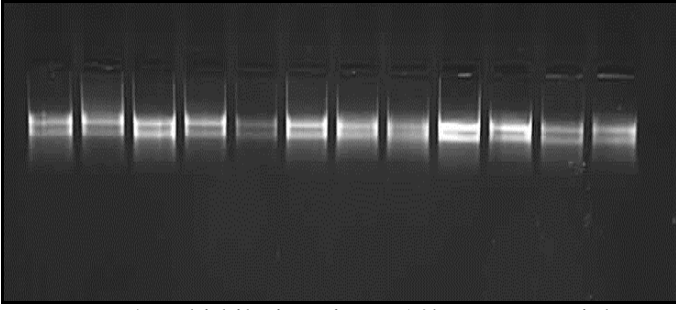
Şekil 5.4. 5BB anacında yaprak su potansiyelinin (-MPa) grafiksel görüntüsü

5.3. RNA izolasyonu, Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

İzole edilen RNA örnekleri % 1.2'lik agaroz jelde yürütülerek (Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.) kontrol edilmiş sonrasında pürifikasyonları yapılarak, Nanodrop ND-1000 cihazı ile spektrofotometre ölçümleri (Çizelge 5.1.) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.5. Cabernet Sauvignon bitkilerine ait RNA'ların agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.6. 5BB bitkilerine ait RNA'ların agaroz jel görüntüsü

Spektrofotometrik ölçümlere ait değerler Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2' de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Cabernet Sauvignon genotiplerine ait RNA'ların pürifikasyon sonrası spektrofotometrik ölçümleri

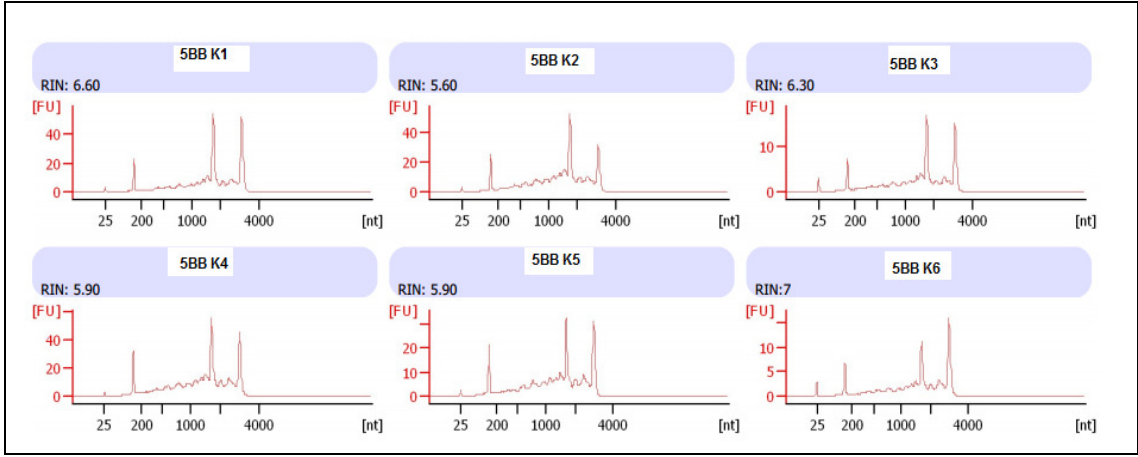
Cabernet Sauvignon-Kök RNA					
RNA No	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
1	922,63	23,066	10,357	2,23	2,36
	921,89	23,047	10,363	2,22	2,36
	908,13	22,703	10,238	2,22	2,36
2	885,52	22,138	9,87	2,24	2,35
	876,03	21,901	9,842	2,23	2,34
	880,73	22,018	9,86	2,23	2,36
3	922,63	23,066	10,357	2,23	2,36
	921,89	23,047	10,363	2,22	2,36
	908,13	22,703	10,238	2,22	2,36
4	885,52	22,138	9,87	2,24	2,35
	876,03	21,901	9,842	2,23	2,34
	880,73	22,018	9,86	2,23	2,36
5	912,85	22,821	10,205	2,24	2,37
	928,24	23,206	10,435	2,22	2,36
	944,29	23,607	10,652	2,22	2,28
6	984,78	24,619	11,018	2,23	2,28
	899,87	22,497	10,039	2,24	2,28
	910,37	22,759	10,166	2,24	2,28
7	970,93	24,273	10,866	2,23	1,36
	945,39	24,135	10,532	2,22	1,28
	970,23	24,256	10,884	2,23	1,35
8	821,57	20,539	9,251	2,22	2,33
	811,63	20,291	9,105	2,23	2,32
	813,31	20,333	9,154	2,22	2,31
9	1060,02	26,501	12,359	2,14	2,32
	1048,4	26,21	12,191	2,15	2,34
	1035,93	25,898	12,003	2,16	2,34

Çizelge 5.2. 5BB genotiplerine ait RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri (devam)

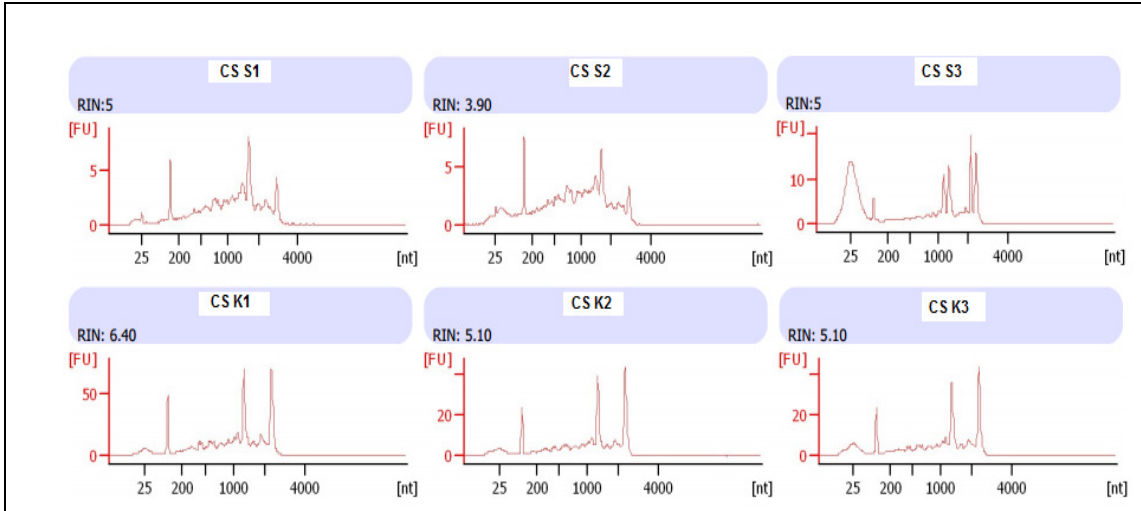
5BB-Kök RNA					
RNA No	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
10	885,52	22,138	9,87	2,24	2,35
	876,03	21,901	9,842	2,23	2,34
	880,73	22,018	9,86	2,23	2,36
11	1108,16	25,704	11,22	2,22	1,85
	1105,25	25,631	11,187	2,22	1,86
	1102,06	25,551	11,154	2,21	1,83
12	631,52	40,788	18,118	2,22	2,33
	629,06	40,727	18,102	2,21	2,34
	622,83	40,571	18,981	2,23	2,34
13	710,68	41,767	18,201	2,17	2,38
	710,68	41,767	18,165	2,18	2,38
	709,47	41,737	18,163	2,17	2,38
14	853,65	42,325	18,563	2,23	2,34
	858,26	42,456	18,671	2,22	2,3
	855,46	42,387	18,581	2,23	2,33
15	982,8	49,57	23,15	2,14	2,35
	964,43	49,111	22,827	2,15	2,37
	966,04	49,151	22,957	2,14	2,35
16	921,63	48,041	22,377	2,15	2,36
	941,30	48,532	22,691	2,14	2,36
	935,45	48,386	22,645	2,14	2,34
17	790,91	40,773	18,196	2,15	2,29
	790,09	40,752	18,212	2,14	2,29
	781,93	40,548	18,158	2,13	2,27
18	710,68	41,767	18,201	2,17	2,38
	710,68	41,767	18,165	2,18	2,38
	709,47	41,737	18,163	2,17	2,38

Elde edilen jel görüntüleri ve spektrofotometrik veriler mikrodizinalizlerinde kullanılacak miktar ve saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca RNA 260/230 değerlerinin 2.5 oranına yakınlığı protein vs. açısından saf olduğunu göstermektedir.

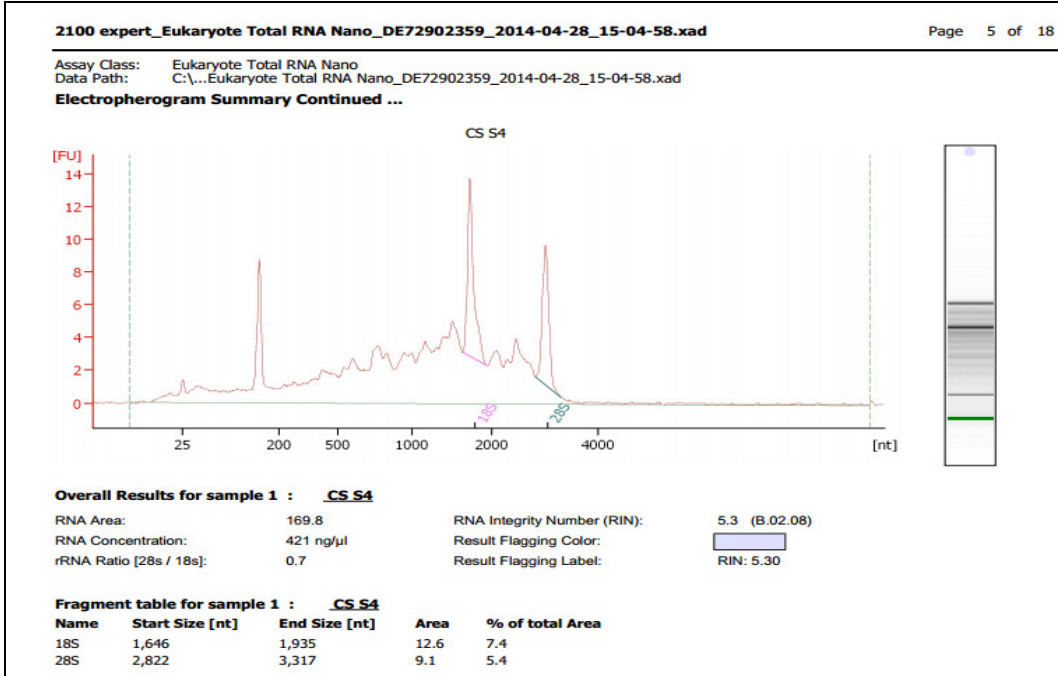
Mikrodizin analizi öncesi RNA örneklerinin kalite kontrolleri, ayrıca Agilent Technologies® 2100 Bioanalizer cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve bazı örnekler için Bioanalizer görüntüleri Şekil 5.7., Şekil 5.8, Şekil 5.9, Şekil 5.10'da sunulmuştur.



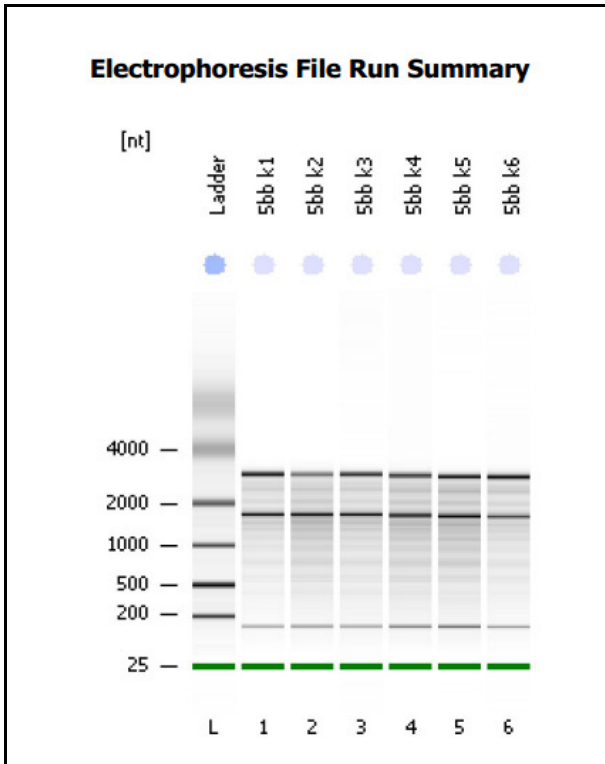
Şekil 5.7. 5BB anaç kontrol bitkilerine ait RNA'ların elektroferogram (Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer)görüntüleri



Şekil 5.8. CS kontrol ve stres bitkilerine ait bazı RNA'ların elektroferogram (Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer)görüntüleri



Şekil 5.9. RNA analiz örnek görüntüsü(Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer)

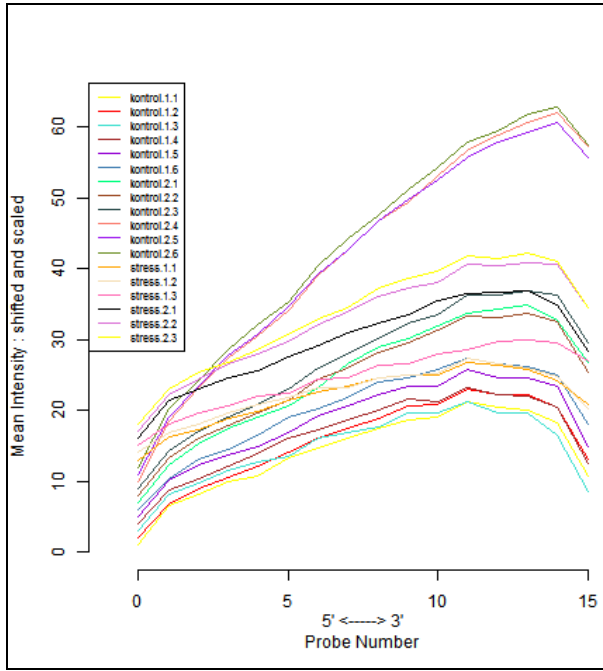


Şekil 5.10. Bazı RNA örneklerine ait Bioanalyzer (Agilent Technologies® 2100 Bioanalyzer) jel görüntüleri

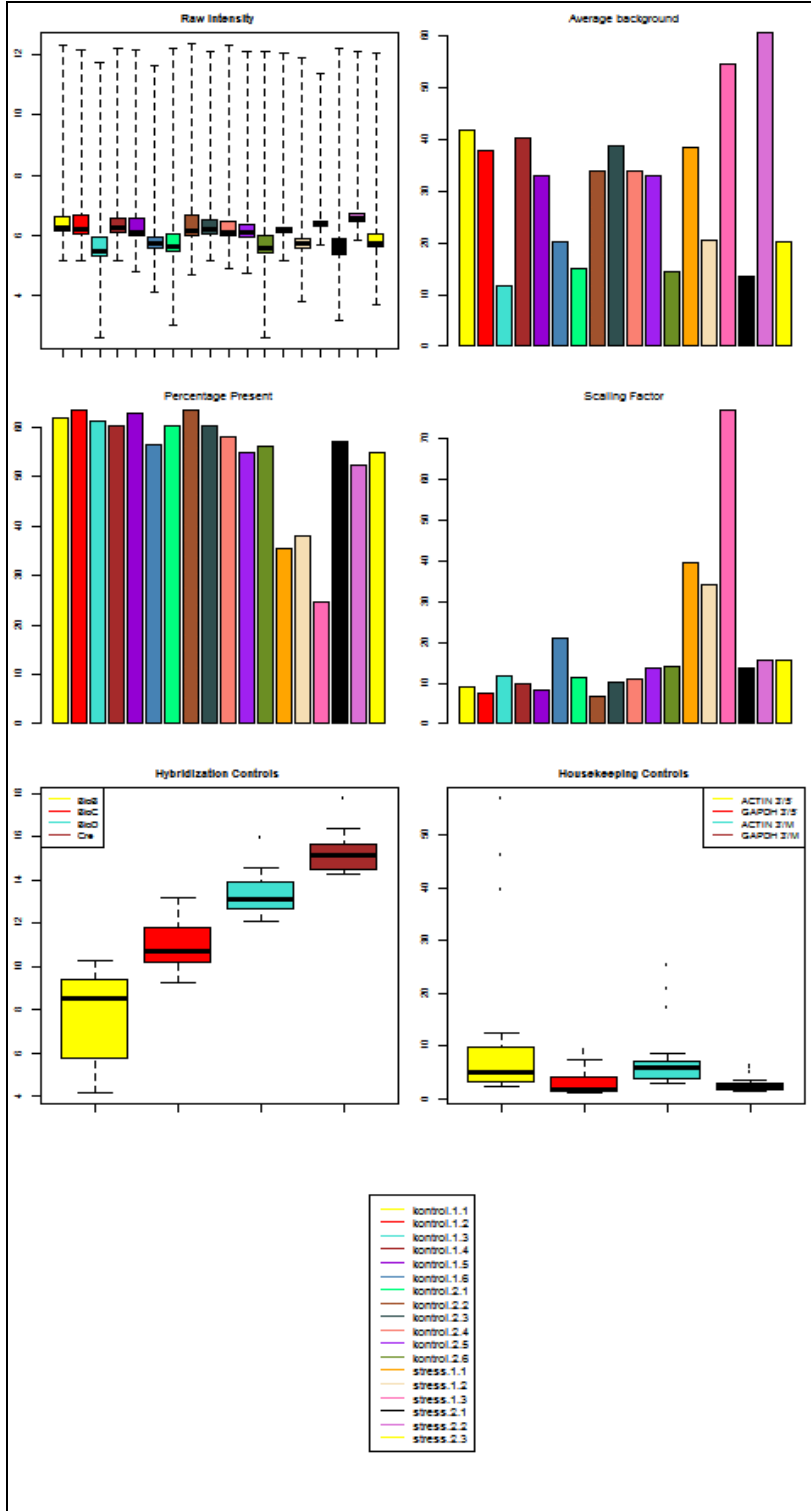
5.4. Mikrodizin Kalite Kontrol Analizleri

5.4.1. Kalite Kontrol Analizleri

Mikrodizin analizleri sonucunda çip hibridizasyonları genel olarak %50 civarında bulunmuştur. 18 çipin ham PM (perfect match) dağılımlarında herhangi bir problemle karşılaşılmamıştır. Her bir prob setinin 3' ve 5' ucu arasındaki RNA degradasyon durumu olmadığı ve RNA örneklerinin işlemler süresince bütünlüğünü koruduğu RNA degradasyon plot analizleriyle de kanıtlanmıştır (Şekil 5.11).

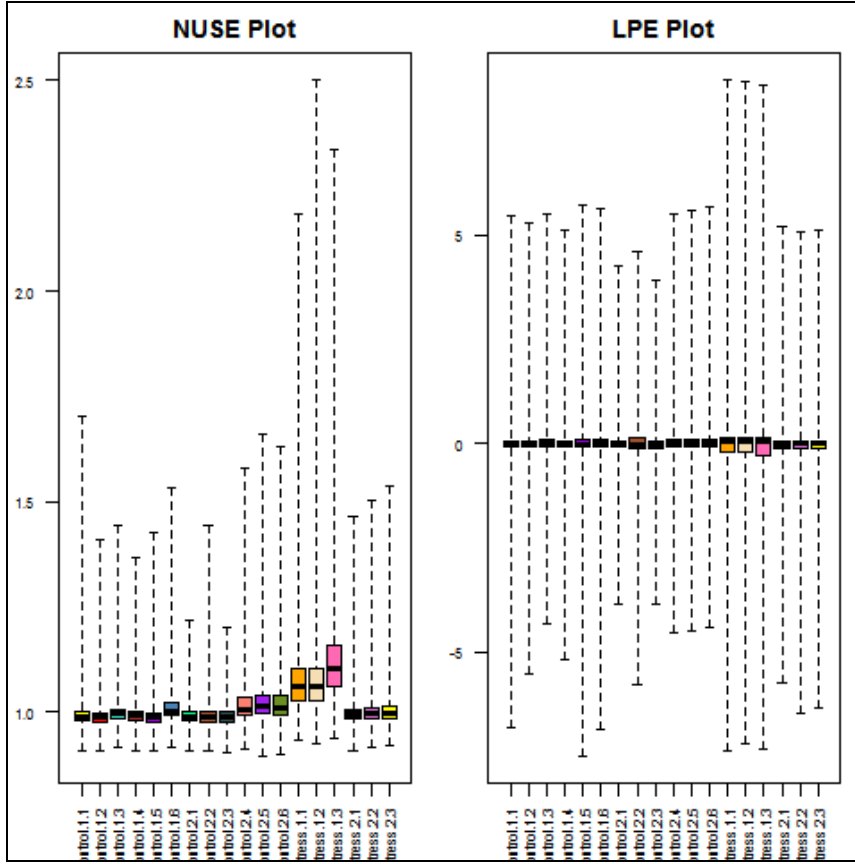


Şekil 5.11. RNA degradasyon plot analizi



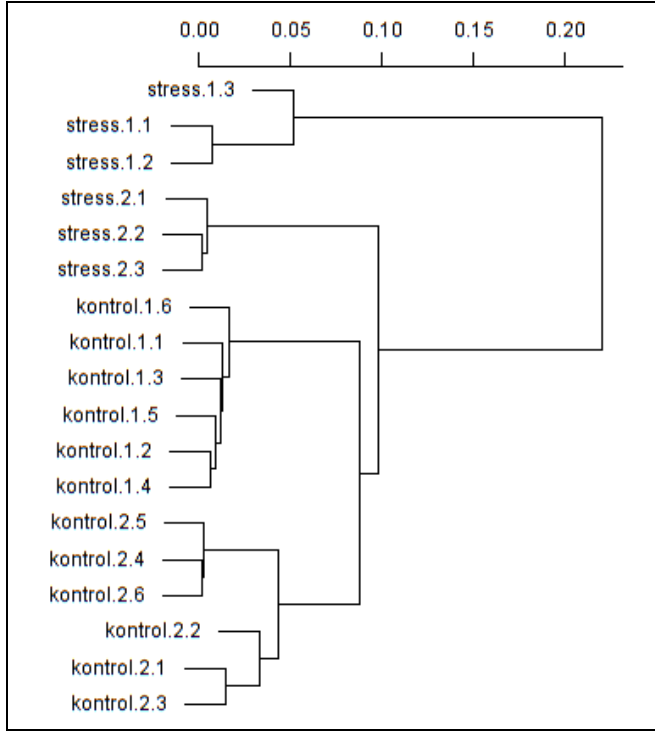
Şekil 5.12. Affymetrix Tarafından Öngörülen Kalite Değerlendirme Analizi (Affymetrix recommended Quality Assessment)

Ayrıca array verilerinin ön kalite analizlerinden “Relative Log Expression Plos (RLE)” analizleride gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.13.).

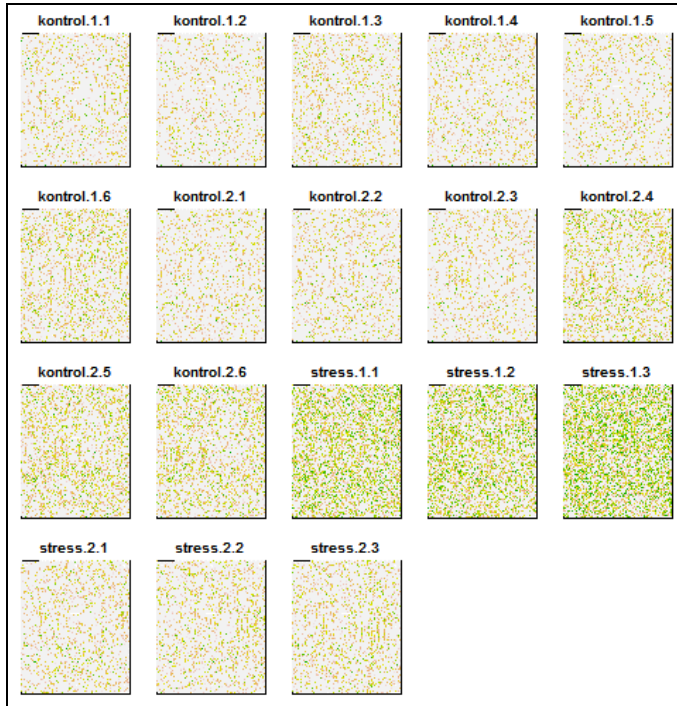


Şekil 5.13. Çiplere ait Relatif İfade Plot (RLE) analizleri (Normalized Unscaled Standard Error Plot ve Relative Log Expression Plot)

RLE kalite analizleri sonucunda her çipin prob set ifadesi için oluşturulan box plotların yaklaşık aynı alanlarda ve merkez çizgilerinin “0” noktasında olma gerekliliği sağlanmıştır. Ayrıca çiplere ait replikalar arasındaki uyumu gösteren cluster analizi sonucunda da tekrarların kendi içlerinde birbiri ile yüksek uyum gösterdiği ve farklı tekrarlara göre net ayrım sağlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.14.).



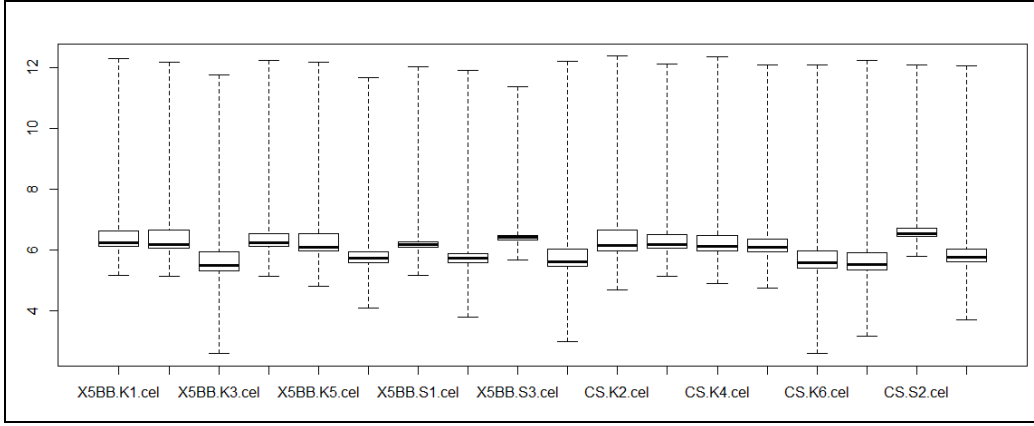
Şekil 5.14. Çiplere ait hiyerarşik sınıflandırma (cluster) analizi



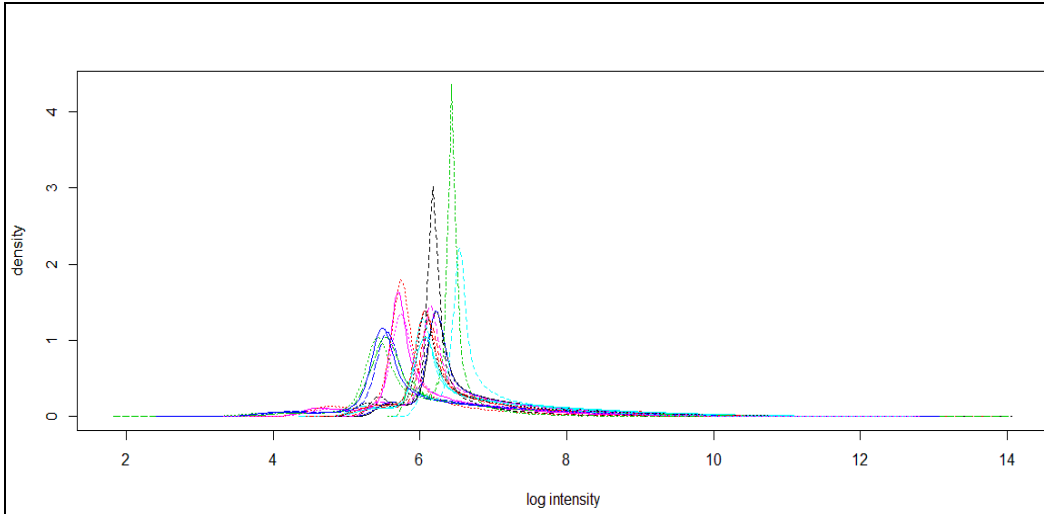
Şekil 5.15. Floresan ışımaya oranlarına göre görsel çip şekilleri (*Pseudo-chip Images*)

Floresan ışına oranlarına göre çiplere ait görsel çip şekilleri analizi sonucu özellikle 5BB stres çiplerine (stres 1.1, 1.2, 1.3) ait görsellerde ışına oranlarının fazla olduğu gözlemlenmekte bu durum 5BB anacının kuraklık stresi sonucu CS genotiplerine (stres 2.1, 2.2, 2.3) ve tüm kontrollere (kontrol 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 ve kontrol 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6) ait çiplere göre yüksek derece etkilendiğini kanıtlamaktadır (Şekil 5.15.).

Ham çip verileri, kalite parametreleri için boxplot (Şekil 5.16.) ve array seti histogramı analizlerine tabi tutulmuş (Şekil 5.17.) ve gerekli kalite parametrelerine ulaşılmıştır.



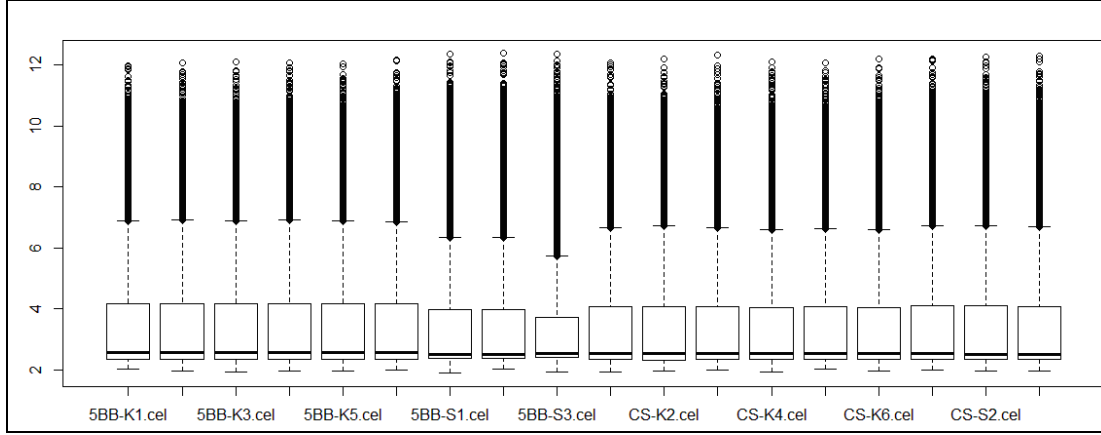
Şekil 5.16. Çip ham verilerinin boxplot analizleri



Şekil 5.17. Array seti histogramı

Ham çip verileri için yapılan boxplot analizlerinde ve histogramlarında prob sinyal yoğunlukları birbirine yakın bulunmuş ve ekstrem olarak değişen bir sinyal yoğunluğuna rastlanmamıştır.

Ön işleme ve filtreleme için RMA normalizasyonu kullanılarak ekspresyon (ifade) değeri 4' ten daha büyük en az 2 çip olması koşuluyla filtreleme veri setleri analizleri de gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.18. RMA sonrası array seti Boxplot analizi

RMA normalizasyonu sonrasında tüm çiplerin prob ifade değerleri homojen ve benzer bulunmuş ön işleme ve filtreleme işlemlerinde bir sorunla karşılaşılmamıştır. Filtreleme sonucu kalan 6033 probdan en az bir genotip için ifade farklılığı gösteren 2386 prob için ifade değerlerine göre heatmap (hiyerarsik gruplandırma grafiği), Mev4 programı ile görselleştirilmiştir (Ek 1.)

5.5. İfadesi Değişen Transkript (Gen) Sayıları, Venn Diyagramları ve Gen Ontoloji Analizleri

5.5.1. İfadesi Değişen Transkript (Gen) Sayıları

Analiz sonucu 5BB anacında bulunan 1925 transkriptten; 1118'inin ifadesi azalmış, 807'inin ise ifadesi artmıştır. CS çeşidinde ise 5BB anacından daha az olarak toplam 1279 transkript belirlenmiş, bunlardan 534 transkriptin ifadesi azalış gösterirken, 745'inin ifadesi artmıştır.

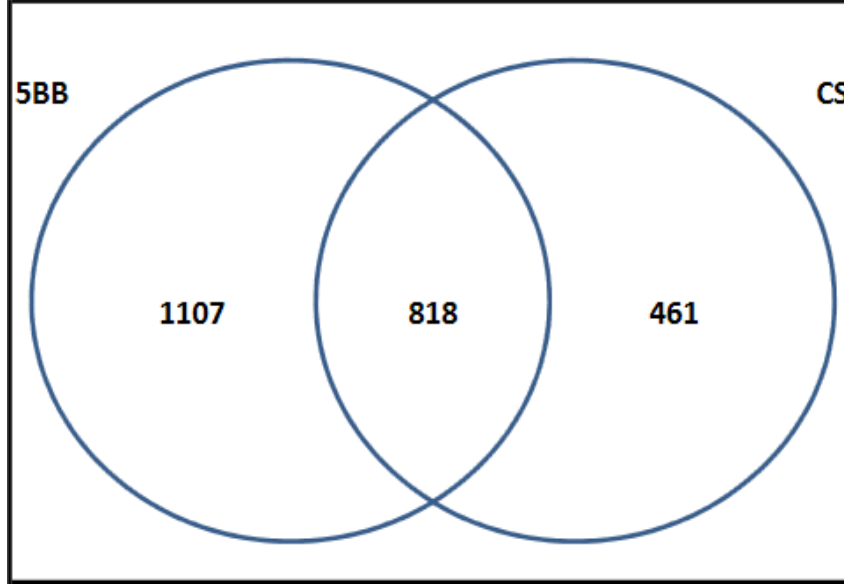
Kuraklık stresi ile mikrodizin analizleri sonucu her iki genotipte ifade değişimi gösteren transkript sayılarına ilişkin bilgiler, Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Kuraklık stresi sonucu oluşan ifade farklılık analizi ile ifadesi değişen transkript sayıları

Genotip	İfade Farklılığı Gösteren Transkript	İfadesi Artan Transkript	İfadesi Azalan Transkript
5BB	1925	807	1118
CS	1279	745	534
Ortak genler	818	369	326
5BB' de azalan, CS' de artan	107		
CS' de azalan 5BB' de artan	16		

5.5.2. Venn Diyagramları

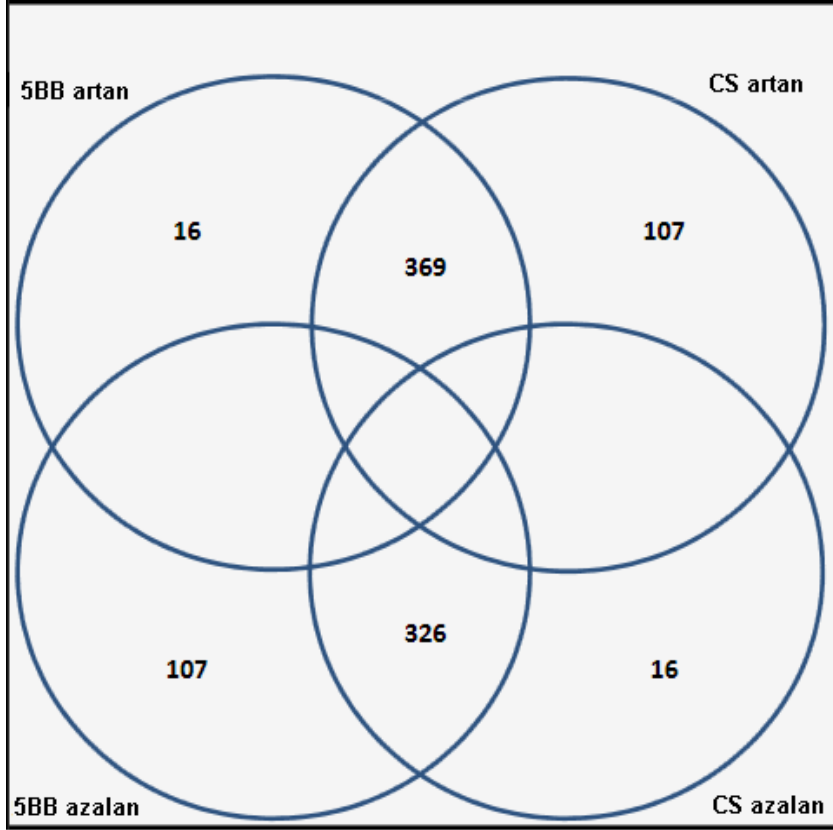
5BB ve CS genotipleri için; hem 5BB hem CS genotiplerinde ortak ifade farklılıklarını gösteren venn diyagramı Şekil 5.19' da gösterilmiştir.



Şekil 5.19. İfade farklılığı gösteren genler

Kuraklık stresi sonucu, genotipler bazında karşılaştırıldığında; her iki genotipte ortak ifade olan transkript sayısı 818 olarak bulunurken, sadece 5BB anacında ifade olan transkript sayısı 1107, sadece CS çeşidinde ifade olan transkript sayısı ise 461 olarak bulunmuştur.

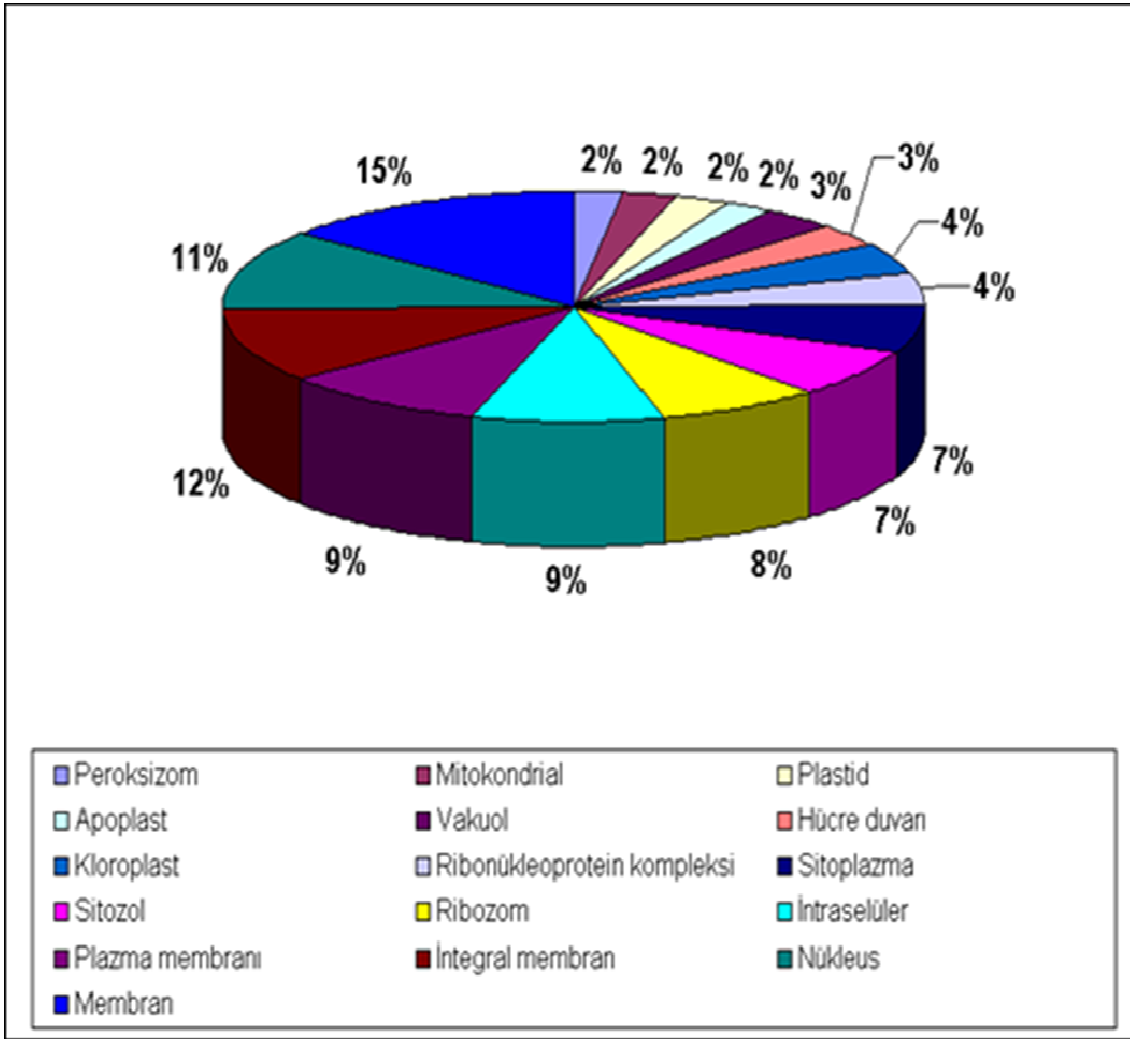
Kuraklık stresi sonucu her iki genotipte yer alan ortak genlerin ifade dağılımlarına bakıldığında ise; 5BB anacına özgü artan transkript sayısı 16, azalan transkript sayısı ise 107 olarak bulunmuştur. CS çeşidine özgü artan transkript sayısı 107, azalan transkript sayısı ise 16 olarak bulunmuştur. Her iki genotipte ifadesi artan ortak 369 transkript, ifadesi azalan ortak 326 transkript belirlenmiştir (Şekil 5.20.).



Şekil 5.20. Genotiplerde belirlenen ortak transkriptlere ait dağılım sayıları

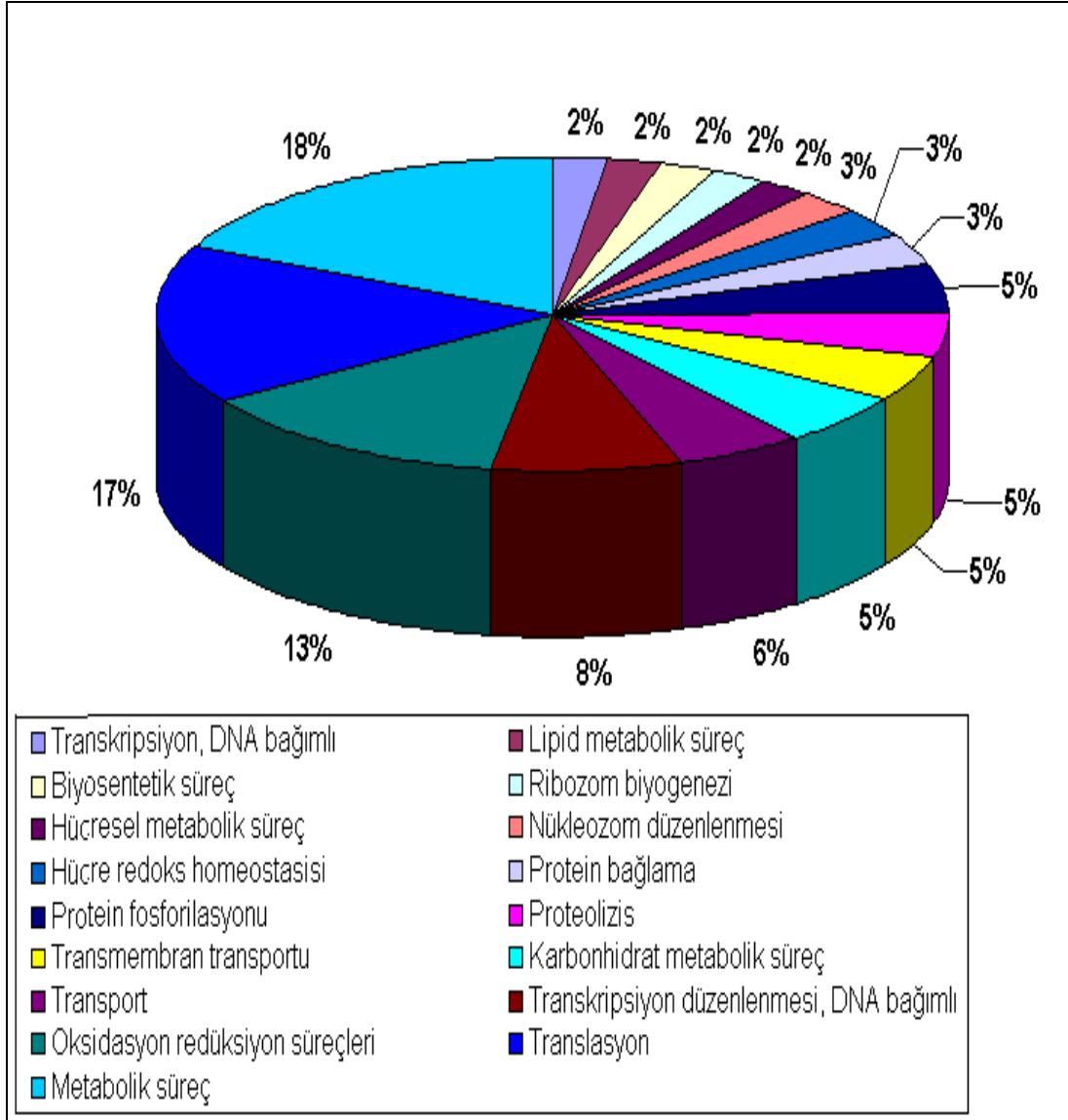
5.5.3. Gen Ontoloji Analizleri

Kuraklık stresi sonucu her iki genotipte ifade farklılığı kontrole göre anlamlı olarak belirlenen transkriptlerin hücresel komponent (cellular component), moleküler fonksiyon (molecular function) ve biyolojik proses (biological process) analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücresel komponent analizlerinde transkriptlerin yüksek oranlarda; membran (%15) integral membran (%12) ve nükleus (%11) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.21.).



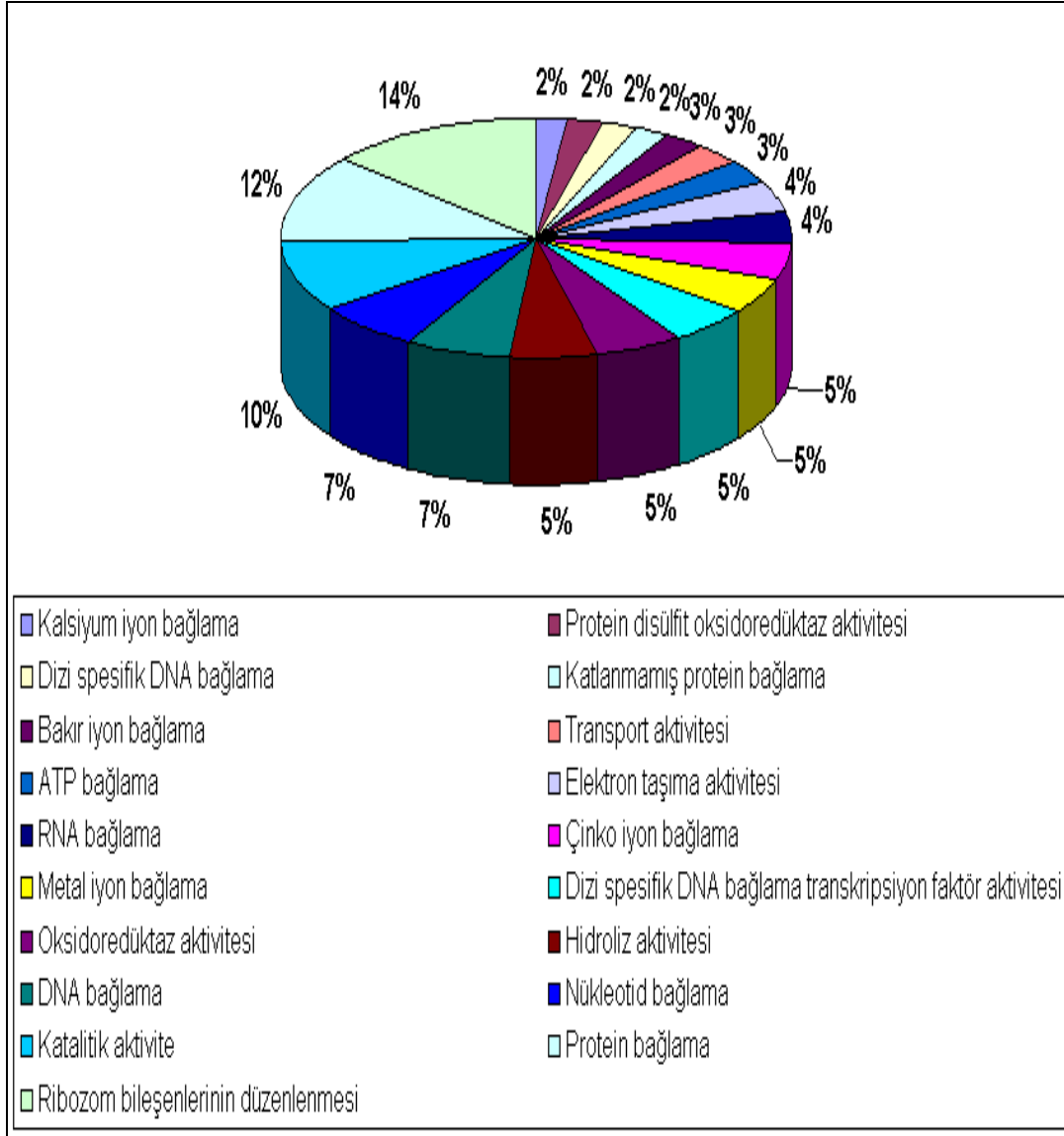
Şekil 5.21. İfade farklılığı gösteren transkriptlere ait hücresel komponent analizi

İfadesi değişen transkriptlerin biyolojik proses analizlerinde; yüzdeleri en yüksek olan transkriptlerin %18'i metabolik süreç, %17'sinin translasyon ve %13'ünün oksidasyon-redüksiyon süreçleri ile ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 5.22.).



Şekil 5.22. İfade farklılığı gösteren transkriptlere ait biyolojik proses analizi

Moleküler fonksiyon analizlerinde; ifadesi değişen transkriptlerin; %14'ünün ribozom bileşenlerinin düzenlenmesi, %12'sinin katlanmamış proteinlerin bağlanmasında ve %10'nun ise katalitik aktivite ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.23.).



Şekil 5.23. İfade farklılığı gösteren transkriptlere ait moleküler fonksiyon analizi

5.6. Mikrodizin Veri Analizleri

5.6.1. Stresle İfadesi Değişen Transkripsiyon Faktörleri

Mikrodizin analizi sonucunda, 5BB anacına özgü ifadesi değişen 45 adet (14 ifadesi artan ve 31 ifadesi azalan), CS çeşidine özgü 39 adet (32 ifadesi artan ve 7 ifadesi azalan) transkripsiyon faktörü belirlenmiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinden, 14 adedi (11 ifadesi artan ve 3 ifadesi azalan) ise hem 5BB anacında hem de CS çeşidinde ortak olarak indüklenmiştir. 5BB anacına özgü ifadesi artan ve azalan transkripsiyon faktörleri Çizelge 5.3' de, CS çeşidine özgü ifadesi artan ve azalan transkripsiyon faktörleri ise Çizelge 5.4'

de, 5BB anacı ve CS çeşidinde ortak olarak ifadesi artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkripsiyon faktörleri de Çizelge 5.5' de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Kuraklık stresi ile 5BB anacına özgü ifadesi artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkripsiyon faktörleri; prob set kodları, probe set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01)

Probe Set (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1607133_at	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1	72,76	Artan
1622778_at	WRKY-type DNA binding protein 1	68,47	Artan
1619311_at	pathogenesis-related genes transcriptional activator PTI5-like	48,53	Artan
1614299_at	MADS-box transcription factor 6-like	5,48	Artan
1610775_s_at	probable WRKY transcription factor 57-like	4,48	Artan
1606975_at	ethylene-responsive transcription factor 4-like	3,95	Artan
1610064_at	probable WRKY transcription factor 33-like	3,90	Artan
1608924_at	transcription elongation factor 1 homolog	2,90	Artan
1622519_at	transcription factor MYB1R1-like	2,49	Artan
1609636_at	probable WRKY transcription factor 33-like	2,46	Artan
1621074_s_at	transcription elongation factor 1 homolog-like	2,27	Artan
1608315_at	ethylene-responsive transcription factor ERF010-like	2,24	Artan
1620319_s_at	R2R3 Myb14 transcription factor	2,24	Artan
1622559_at	bZIP transcription factor 60-like	2,20	Artan
Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1609442_at	transcription factor bHLH147-like	33,59	Azalan
1607148_s_at	homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like	29,29	Azalan
1618039_at	homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like	27,28	Azalan
1621863_at	transcription factor TCP7-like	14,60	Azalan
1610882_s_at	transcription factor bHLH68-like	12,82	Azalan
1621556_s_at	homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like	11,75	Azalan
1619453_s_at	homeobox-leucine zipper protein HAT5-like	11,63	Azalan
1615011_at	homeobox-leucine zipper protein HAT5-like	11,27	Azalan
1617042_at	transcription factor TCP20-like	9,14	Azalan
1616455_s_at	putative transcription factor	8,88	Azalan
1609021_at	transcription factor MYB59-like	8,40	Azalan
1618771_s_at	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1-like	7,67	Azalan
1612649_s_at	probable WRKY transcription factor 7-like	7,44	Azalan
1622116_at	transcription factor bHLH144-like	6,42	Azalan
1613177_at	calmodulin-binding transcription activator 5-like	5,80	Azalan
1622333_at	probable WRKY transcription factor 23-like	5,57	Azalan
1621314_s_at	ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like /// ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like	5,40	Azalan
1616846_at	transcription factor bHLH145-like	5,21	Azalan
1611650_at	probable WRKY transcription factor 7-like	4,34	Azalan
1613486_at	transcription factor MYB1R1-like	3,99	Azalan
1606543_at	transcription factor bHLH3-like	3,48	Azalan
1606502_at	transcription initiation factor IIB-2-like	3,02	Azalan
1618356_a_at	transcription initiation factor IIB-2-like /// transcription initiation factor IIB-2-like	2,83	Azalan

1612563_s_at	transcription factor BTF3-like	2,53	Azalan
1615298_s_at	nuclear transcription factor Y subunit A-1-like	2,40	Azalan
1619927_s_at	ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like	2,39	Azalan
1609004_s_at	bifunctional enolase 2/transcriptional activator-like	2,24	Azalan

5BB anacında ifadesi artan 14 transkript genel olarak bitkilerde gelişim süreçlerinin düzenlenmesinde ve strese önemli rol oynayan MYB ve WRKY transkripsiyon faktörlerini içermektedir. Bu MYB transkripsiyon faktörlerinden, R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1 (1607133_at) 72 kat ile 5BB' de ifadesi en çok artan transkript olarak gözlemlenmiş bunu 68 kat ile WRKY-type DNA binding protein 1 transkripti izlemiştir. WRKY transkripsiyon faktörleri bilindiği üzere düzenleyiciler olarak senes kontrolü, strese cevap ve ABA ilişkili olaylarda etkin rol oynayan bitki spesifik büyük gen ailesidir. 5BB anacında 14 ifade artışı gösteren transkriptlerden kuraklık stresi ilişkili 4 adet WRKY tespit edilmiştir. bHLH gen ailesinden transcription factor bHLH147-like (1609442_at) ise 33 kat ile ifadesi ile 5BB anacında en fazla azalan transkript olmuş, bunu ATHB (members of a small family of HD-Zip protein), HAT (histone acetyltransferase), TCP ve IIB transkripsiyon faktörleri izlemiştir.

Çizelge 5.4. Kuraklık stresi ile CS çeşidine özgü ifadesi artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkripsiyon faktörleri; prob set kodları, probe set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu ($p < 0.01$)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1619573_at	zinc finger protein ZAT10-like	28,97	Artan
1607133_at	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1	19,89	Artan
1610064_at	probable WRKY transcription factor 33-like	13,51	Artan
1616198_at	ethylene-responsive transcription factor 4-like	10,77	Artan
1609107_at	zinc finger protein ZAT10-like	9,21	Artan
1609629_at	ethylene-responsive transcription factor ERF113-like	8,91	Artan
1618661_s_at	ethylene-responsive transcription factor 5-like	7,14	Artan
1609636_at	probable WRKY transcription factor 33-like	6,47	Artan
1618771_s_at	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor TEM1-like	5,58	Artan
1622333_at	probable WRKY transcription factor 23-like	5,37	Artan
1609812_at	zinc finger CCCH domain-containing protein 66-like	5,11	Artan
1621178_at	transformation/transcription domain-associated protein	5,09	Artan
1613832_at	transcription factor MYB44-like	5,01	Artan
1619311_at	pathogenesis-related genes transcriptional activator PTI5-like	4,65	Artan
1610775_s_at	probable WRKY transcription factor 57-like	4,59	Artan
1613096_at	zinc finger CCCH domain-containing protein 29-like	4,22	Artan
1614332_s_at	zinc finger protein ZAT11-like	4,22	Artan
1608315_at	ethylene-responsive transcription factor ERF010-like	4,18	Artan
1606975_at	ethylene-responsive transcription factor 4-like	3,59	Artan

1606659_s_at	probable WRKY transcription factor 65-like	3,46	Artan
1613186_at	zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 4-like	3,30	Artan
1618978_at	zinc finger RING-type protein-like	3,28	Artan
1620319_s_at	R2R3 Myb14 transcription factor	3,17	Artan
1621626_at	zinc finger protein CONSTANS-LIKE 5-like	3,04	Artan
1621565_s_at	RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1-like	3,00	Artan
1613486_at	transcription factor MYB1R1-like	2,64	Artan
1615800_at	heat stress transcription factor A-4b-like	2,59	Artan
1622386_at	ethylene-responsive transcription factor 3-like	2,28	Artan
1619927_s_at	ethylene-responsive transcription factor RAP2-4-like	2,08	Artan
1619453_s_at	homeobox-leucine zipper protein HAT5-like	3,17	Artan
1615011_at	homeobox-leucine zipper protein HAT5-like	2,11	Artan
1618607_s_at	zinc transporter 2-like	2,00	Artan
Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1616094_at	MYBPA1 protein	5,62	Azalan
1622245_at	transcription factor bHLH104-like	3,25	Azalan
1607148_s_at	homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like	2,44	Azalan
1612563_s_at	transcription factor BTF3-like	2,26	Azalan
1612079_at	zinc finger CCCH domain-containing protein 11-like	2,20	Azalan
1621023_at	transcription elongation factor B polypeptide 1-like	2,07	Azalan
1612832_at	enhancer of yellow 2 transcription factor homolog	2,01	Azalan

CS çeşidinde ise; 5BB anacından farklı olarak ifadesi artan transkriptlerin genel olarak, ethylene-responsive transcription factor, zinc finger protein ZAT ve zinc finger CCCH domain-containing protein' ler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bunlardan zinc finger protein ZAT10-like (kat sayı 28) ve R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1 transkripti (kat sayı 19) CS' çeşidinde en fazla artış gösteren transkripsiyon faktörleri olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.5. Kuraklık stresi ile 5BB anacı ve CS çeşidinde ortak ifadesi artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkripsiyon faktörleri; prob set kodları, probe set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı CS	İfade Katsayısı 5BB	İfade Durumu
1607133_at	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1	19,89	72,76	Artan
1610064_at	probable WRKY transcription factor 33-like	13,51	3,90	Artan
1609636_at	probable WRKY transcription factor 33-like	6,47	2,46	Artan
1619311_at	pathogenesis-related genes transcriptional activator PTI5-like	4,65	48,53	Artan
1610775_s_at	probable WRKY transcription factor 57-like	4,59	4,48	Artan

1606975_at	ethylene-responsive transcription factor 4-like	3,59	3,95	Artan
1619573_at	zinc finger protein ZAT10-like	28,97	5,36	Artan
1609107_at	zinc finger protein ZAT10-like	9,21	16,48	Artan
1614332_s_at	zinc finger protein ZAT11-like	4,22	61,77	Artan
1621565_s_at	RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1-like	3,00	4,91	Artan
1622778_at	WRKY-type DNA binding protein 1	5,80	68,47	Artan
Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı CS	İfade Katsayısı 5BB	İfade Durumu
1622245_at	transcription factor bHLH104-like	3,25	2,05	Azalan
1612563_s_at	transcription factor BTF3-like	2,26	2,53	Azalan
1607148_s_at	homeobox-leucine zipper protein ATHB-6-like	2,44	29,29	Azalan

5.6.2. Kuraklık Stresi İle İfadesi Değişen Şaperonlar

Mikrodizin analizi sonucunda, 5BB anacına özgü ifadesi değişen 10 adet (7 ifadesi artan ve 3 ifadesi azalan), CS çeşidine özgü ise ifadesi artan 4 adet şaperon belirlenmiştir (Çizelge 5.6. ve Çizelge 5.7.). Analiz sonucu CS çeşidine özgü ifadesi azalan şaperon bulunmamıştır.

Çizelge 5.6. Kuraklık stresi ile 5BB anacına özgü ifadesi artan ve azalan (2 kat ve üzeri) şaperonlar; prob set kodları, probe set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu ($p < 0.01$)

Probe Set (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1611080_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	27,3	Artan
1621230_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	9,4	Artan
1615587_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	8,6	Artan
1611662_at	mitochondrial chaperone BCS1-like	8,1	Artan
1612044_s_at	mitochondrial chaperone BCS1-like	6,9	Artan
1612175_s_at	chaperone protein dnaJ 8, chloroplastic-like	3,7	Artan
1613463_a_at	chaperone protein DnaJ-like	2,4	Artan
Probe Set (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1607666_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	3,8	Azalan
1622712_s_at	chaperone protein dnaJ 10-like	2,9	Azalan
1606705_at	chaperone protein dnaJ 10-like	2,4	Azalan

Çizelge 5.7. Kuraklık stresi ile CS çeşidine özgü ifadesi artan (2 kat ve üzeri) şaperonlar; prob set kodları, probe set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu ($p < 0.01$)

Probe Set (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1611080_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	6,4	Artan
1615587_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	5,8	Artan
1606705_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	5,4	Artan
1621230_at	chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic-like	3,9	Artan

5.6.3. Kuraklık Stresi ile 5BB Anacına Özgü İfadesi En Fazla Artan/Azalan Transkriptler:

Kuraklık stresi uygulamaları sonucu 807'si artan ve 1118'si azalış gösteren 5BB anacına özgün toplam 1925 transkript belirlenmiştir. Bu transkriptlerin kat sayıları karşılaştırıldığında; ifade artışlarındaki kat sayı oranları, ifade azalış oranlarına göre daha büyük bulunmuştur. ifadesi en çok artan transkript 361 kat ile dehidrin (1621592_s_at) olarak belirlenirken; protease inhibitör (1609875_at), alpha-amylase/subtilisin inhibitör-like (1616317_at), methionine gamma-lyase-like (1611875_at) sırası ile ifadesi en çok artan transkriptler olarak belirlenmiştir. İfadesi en çok azalan transkriptler ise, genel olarak aquaporin (1615722_s_at, 1619703_at, 1606669_s_at), proline (1606530_s_at, 1607766_at), putative lipid transfer (1621879_at, 1608571_s_at) ve substilin (1619687_at, 1612873_at) ile ilişkili transkriptler olarak belirlenmiştir. Kat sayı oranlarına göre 5BB anacına özgün en fazla artan ve azalan transkriptler Çizelge 5.8.' de verilmiştir.

Çizelge 5.8. 5BB anacına özgü en fazla artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkriptler; prob set kodları, prob set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1621592_s_at	dehidrin	361,74	Artan
1611682_at	uncharacterized LOC100852414	239,16	Artan
1615648_at	---	237,75	Artan
1609875_at	protease inhibitor-like	206,64	Artan
1616317_at	alpha-amylase/subtilisin inhibitor-like	204,50	Artan
1607552_at	uncharacterized LOC100254827	143,74	Artan
1620305_at	polygalacturonase-like	137,81	Artan
1611875_at	methionine gamma-lyase-like	125,88	Artan
1617466_at	L-allo-threonine aldolase-like	123,16	Artan
1614441_at	protein SRG1-like	121,61	Artan
1616064_at	---	120,51	Artan
1614008_at	polygalacturonase-like	118,82	Artan
1618333_at	homocysteine S-methyltransferase 2-like	115,20	Artan
1617250_at	---	114,26	Artan
1614862_at	tropinone reductase homolog At1g07440-like	108,81	Artan
1616116_at	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6-like	104,42	Artan
1613461_s_at	class IV chitinase	87,93	Artan
1611666_s_at	protease inhibitor	84,54	Artan
1615147_at	uncharacterized LOC100248294	79,91	Artan
1622131_at	uncharacterized LOC100260227	79,14	Artan
1622372_s_at	uncharacterized LOC100261242	76,18	Artan
1622549_at	NADP-dependent alkenal double bond reductase P2-like	75,98	Artan
1607133_at	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1	72,76	Artan

1608229_s_at	glycogenin-2-like	69,64	Artan
1616487_at	calcium-binding protein CML37-like	68,87	Artan
1622778_at	WRKY-type DNA binding protein 1	68,47	Artan
1607606_at	uncharacterized LOC100257132	66,88	Artan
1611091_s_at	MYBPA1 protein	64,64	Artan
1614332_s_at	zinc finger protein ZAT11-like	61,77	Artan
1612145_at	---	61,27	Artan
1617116_s_at	uncharacterized LOC100254827	60,94	Artan

Çizelge 5.9. 5BB anacına özgü en fazla artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkriptler; prob set kodları, prob set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01) (devam)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1617745_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	180,96	Azalan
1622607_at	aquaporin TIP1-1-like	170,82	Azalan
1614168_at	uncharacterized LOC100853270	155,27	Azalan
1609652_s_at	glucomannan 4-beta-mannosyltransferase 2-like	116,47	Azalan
1612244_s_at	aquaporin PIP2;2	99,13	Azalan
1609063_at	BURP domain-containing protein 3-like	98,56	Azalan
1619613_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	95,64	Azalan
1614387_s_at	aquaporin TIP1-1-like	92,23	Azalan
1615722_s_at	aquaporin-like	83,81	Azalan
1607541_at	uncharacterized LOC100257913	83,40	Azalan
1606530_s_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like /// 14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	81,09	Azalan
1621879_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	76,10	Azalan
1607766_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	73,84	Azalan
1619687_at	subtilisin-like protease-like	73,37	Azalan
1619703_at	aquaporin-like	70,61	Azalan
1608571_s_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	65,00	Azalan
1622361_s_at	kynurenine formamidase-like	64,80	Azalan
1612873_at	subtilisin-like protease-like	62,83	Azalan
1613467_at	pistil-specific extensin-like protein-like	62,19	Azalan
1606669_s_at	aquaporin-like	60,39	Azalan
1619394_at	aspartic proteinase nepenthesin-1-like	57,72	Azalan
1613980_at	subtilisin-like protease	57,06	Azalan
1615919_s_at	high-affinity nitrate transporter 3.2-like	56,57	Azalan
1609391_s_at	blue copper protein-like	56,40	Azalan
1615808_s_at	aquaporin-like	52,09	Azalan
1607449_s_at	proline-rich protein 1	51,08	Azalan
1612504_s_at	uncharacterized LOC100252904	50,81	Azalan
1616405_at	UDP-glucuronate 4-epimerase 6-like	47,46	Azalan
1614916_at	aquaporin PIP2	45,13	Azalan
1620583_s_at	protein E6-like	44,22	Azalan
1612329_at	---	43,3	Azalan
1611390_a_at	auxin-responsive protein IAA14-like	42,03	Azalan
1612030_at	organ-specific protein S2-like	41,18	Azalan

5.6.4. Kuraklık Stresi ile CS Çeşidine Özgü İfadesi En Fazla Artan/Azalan Transkriptler:

Çizelge 5.10. CS çeşidine özgü ifadesi en fazla artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkriptler; prob set kodları, prob set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1622651_at	polyphenol oxidase, chloroplastic-like	42,31	Artan
1615147_at	uncharacterized LOC100248294	31,38	Artan
1616698_at	aconitase 2, mitochondrial	31,25	Artan
1612465_at	beta-galactosidase-like	31,10	Artan
1619993_at	uncharacterized LOC100257837	29,98	Artan
1617466_at	L-allo-threonine aldolase-like	29,66	Artan
1606794_at	thaumatin-like protein	29,16	Artan
1619573_at	zinc finger protein ZAT10-like	28,97	Artan
1616116_at	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6-like	25,83	Artan
1620063_at	beta-1,3-glucanase	25,12	Artan
1613461_s_at	class IV chitinase	22,20	Artan
1620702_a_at	phosphate metabolism protein 8-like	22,05	Artan
1612844_s_at	uncharacterized LOC100242640	20,87	Artan
1607133_at	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1	19,90	Artan
1620390_s_at	thaumatin-like protein /// thaumatin-like protein	19,90	Artan
1610011_s_at	---	19,85	Artan
1616045_a_at	proline-rich cell wall protein-like	19,44	Artan
1621592_s_at	dehydrin	19,18	Artan
1622147_at	aconitase 2, mitochondrial	19,03	Artan
1607620_at	NAC domain-containing protein 29-like	18,62	Artan
1610880_s_at	probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1-like	18,39	Artan
1620065_at	probable sulfate transporter 3.5-like	18,18	Artan
1615375_at	bidirectional sugar transporter SWEET10-like	17,63	Artan
1621397_at	aspartate aminotransferase, chloroplastic-like	16,84	Artan
1619916_s_at	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like	16,44	Artan
1614820_at	tonoplast dicarboxylate transporter-like	15,53	Artan
1613770_s_at	protein TIFY 10A-like	14,94	Artan
1607889_a_at	UDP-glucuronic acid decarboxylase 1-like	14,68	Artan
1620173_at	alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog 2, mitochondrial-like	14,49	Artan
1612997_a_at	uncharacterized LOC100242640	14,34	Artan
1622598_at	probable CCR4-associated factor 1 homolog 9-like	14,08	Artan

Çizelge 5.11. CS çeşidine özgü ifadesi en fazla artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkriptler; prob set kodları, prob set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01) (devam)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı	İfade Durumu
1617745_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	81,79	Azalan
1612030_at	organ-specific protein S2-like	59,83	Azalan
1607766_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	56,96	Azalan
1608571_s_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	43,62	Azalan
1608800_s_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	37,05	Azalan
1621879_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	32,11	Azalan
1612462_at	snakin-1-like	28,08	Azalan
1610096_at	histone H4-like	25,10	Azalan
1607732_at	chalcone synthase	23,88	Azalan
1617019_at	chalcone synthase	23,72	Azalan
1620332_at	histone H3.2-like	23,69	Azalan
1616409_at	delta(24)-sterol reductase-like	20,12	Azalan
1619328_s_at	uncharacterized LOC100267455	19,77	Azalan
1619662_at	uncharacterized LOC100262648	19,06	Azalan
1610607_at	gibberellin-regulated protein 4-like	16,98	Azalan
1622656_at	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like	16,69	Azalan
1613827_s_at	fasciclin-like arabinogalactan protein 2-like	16,19	Azalan
1611487_at	sterol 14-demethylase-like	15,55	Azalan
1620424_at	chalcone--flavonone isomerase-like	15,51	Azalan
1611090_s_at	uncharacterized LOC100247918	15,31	Azalan
1619394_at	aspartic proteinase nepenthesin-1-like	14,53	Azalan
1607739_at	flavanone 3-hydroxylase	14,41	Azalan
1613041_at	histone H4-like	14,08	Azalan
1613467_at	pistil-specific extensin-like protein-like	13,40	Azalan
1621101_s_at	chalcone--flavonone isomerase-like	13,19	Azalan
1617563_s_at	uncharacterized LOC100852574	12,85	Azalan
1609765_s_at	leucoanthocyanidin dioxygenase	12,46	Azalan
1614718_at	uncharacterized LOC100264520	11,01	Azalan

5.6.5. Kuraklık Stresi ile 5BB Anacı ve CS Çeşidinde Ortak İfadesi En Fazla Artan/Azalan Transkriptler:

Çizelge 5.12. 5BB anacı ve CS çeşidine özgü ifadesi en fazla artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkriptler; prob set kodları, prob set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01)

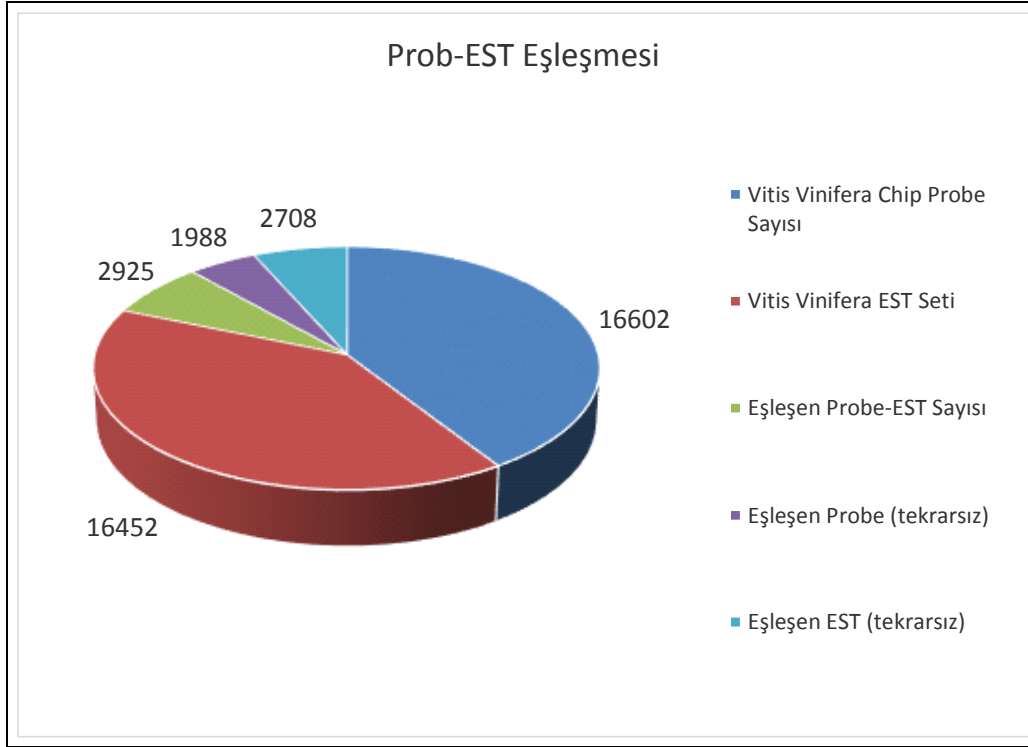
Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı 5BB	İfade Katsayısı CS	İfade Durumu
1617745_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	180,96	81,78	Azalan
1622607_at	organ-specific protein S2-like	170,82	59,82	Azalan
1614168_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	155,27	56,95	Azalan
1609652_s_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	116,47	43,61	Azalan
1614387_s_at	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	92,23	37,04	Azalan
1606530_s_at	putative lipid-transfer protein DIR1-like	81,09	32,10	Azalan
1621879_at	snakin-1-like	76,10	28,08	Azalan
1607766_at	histone H4-like	73,84	25,10	Azalan
1608571_s_at	chalcone synthase	65,00	23,88	Azalan
1613467_at	chalcone synthase	62,19	23,71	Azalan
1619394_at	histone H3.2-like	57,72	23,68	Azalan
1615919_s_at	delta(24)-sterol reductase-like	56,57	20,12	Azalan
1609391_s_at	uncharacterized LOC100267455	56,40	19,76	Azalan
1612329_at	uncharacterized LOC100262648	52,30	19,05	Azalan
1611390_a_at	gibberellin-regulated protein 4-like	43,33	16,97	Azalan
1612030_at	glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like	42,03	16,69	Azalan
1613827_s_at	fasciclin-like arabinogalactan protein 2-like	41,18	16,18	Azalan
1622464_at	sterol 14-demethylase-like	38,55	15,54	Azalan
1618657_at	chalcone--flavonone isomerase-like	37,28	15,50	Azalan
1606684_s_at	uncharacterized LOC100247918	36,63	15,31	Azalan
1608586_at	aspartic proteinase nepenthesin-1-like	34,95	14,53	Azalan
1611241_at	flavanone 3-hydroxylase	34,83	14,40	Azalan
1612406_at	pistil-specific extensin-like protein-like	32,27	13,40	Azalan
1614412_s_at	chalcone--flavonone isomerase-like	32,05	13,19	Azalan
1612791_at	uncharacterized LOC100852574	31,97	12,84	Azalan
1607148_s_at	leucoanthocyanidin dioxygenase	30,30	12,45	Azalan
1622444_at	uncharacterized LOC100264520	29,29	11,01	Azalan
1611081_a_at	24-methylenesterol C-methyltransferase 2-like	27,41	10,94	Azalan

Çizelge 5.13. 5BB anacı ve CS çeşidine özgü ifadesi en fazla artan ve azalan (2 kat ve üzeri) transkriptler; prob set kodları, probe set adı, ifade katsayısı ve ifade durumu (p<0.01) (devam)

Probe Set Kodu (ID)	Probe Set Adı	İfade Katsayısı 5BB	İfade Katsayısı CS	İfade Durumu
1621592_s_at	dehydrin	361,74	19,18	Artan
1611682_at	uncharacterized LOC100852414	239,16	4,00	Artan
1609875_at	protease inhibitor-like /// protease inhibitor	206,64	2,37	Artan
1611875_at	methionine gamma-lyase-like	125,88	11,50	Artan
1617466_at	L-allo-threonine aldolase-like	123,16	29,66	Artan
1614441_at	protein SRG1-like	121,61	9,92	Artan
1618333_at	homocysteine S-methyltransferase 2-like	115,20	4,65	Artan
1614862_at	tropinone reductase homolog At1g07440-like /// tropinone reductase homolog At1g07440-like	108,81	8,46	Artan
1616116_at	probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 6-like	104,42	25,82	Artan
1613461_s_at	class IV chitinase	87,93	22,20	Artan
1615147_at	uncharacterized LOC100248294	79,91	31,38	Artan
1622131_at	uncharacterized LOC100260227	79,14	11,46	Artan
1622372_s_at	uncharacterized LOC100261242	76,18	8,01	Artan
1607133_at	R2R3 transcription factor MYB108-like protein 1	72,76	19,89	Artan
1608229_s_at	glycogenin-2-like	69,64	13,43	Artan
1616487_at	calcium-binding protein CML37-like	68,87	2,20	Artan
1622778_at	WRKY-type DNA binding protein 1	68,47	5,80	Artan
1607606_at	uncharacterized LOC100257132	66,88	4,93	Artan
1614332_s_at	zinc finger protein ZAT11-like	61,77	4,22	Artan
1610059_at	L-allo-threonine aldolase-like	59,60	7,22	Artan
1609321_at	peroxidase 12-like	59,23	6,82	Artan
1611548_s_at	uncharacterized LOC100248610	59,13	3,52	Artan
1607620_at	NAC domain-containing protein 29-like	58,17	18,61	Artan
1620101_at	E3 ubiquitin-protein ligase BAH1-like	57,77	5,98	Artan
1608381_at	uncharacterized LOC100244058	57,25	6,24	Artan

5.7. Kök Spesifik Transkriptomların Belirlenmesi

Karşılaştırma sonucunda EST ile kök-yaprak ortak transkriptomlarında eşleşme gösteren toplam prob sayısı 2925 olarak belirlenmiştir. Bu rakam tekrar gösteren problemlerin çıkarılması ve tekrar gösteren EST dizilerinin çıkarılması ile sırasıyla 1988 ve 2708'e düşmüştür (Şekil 5.24.) Eşleşme gösteren tekrarlı/tekrarsız EST-kök-yaprak ortak transkriptomlarına ait dizi ve prob bilgileri Ek 2' de verilmiştir.



Şekil 5.24. Kök EST verileri ile ortak olarak belirlenen kök-yaprak transkriptom (prob) sayıları

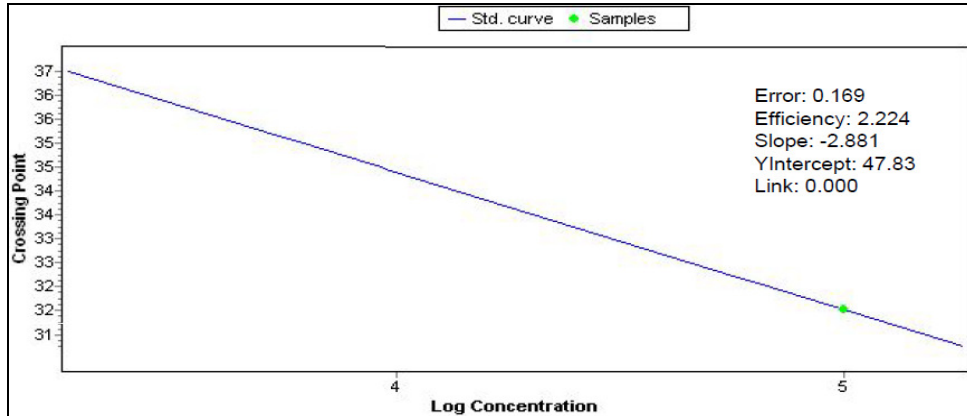
5.8. Real Time PCR ile Mikrodizin Verilerinin Validasyonu

Mikrodizin analizleri sonucu elde edilen verilerin validasyonu için; ifadesi artan transkriptlerden; Probable galactinol-sucrose, (galactosyltransferase 6-like). Tonoplast dicarboxylate transporter-like, Beta-amylase 1- chloroplastic-like, Beta-1,3-glucanase ve Dehydrine (dehidrin) seçilerek Real Time PCR ile valide (doğrulanması) edilmiştir. Mikrodizin sonuçlarına göre seçilen bu genlerin ifade düzeyleri, ilgili stres koşulundaki kontrole göre farklı bulunmuştur ($p < 0.05$ ANOVA-BH). İfadeleri artan ve azalan transkriptlerin Real Time PCR ile validasyon sonuçları ise istatistiki olarak anlamlı ve mikrodizin sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Genlerin ifade artışları her iki analizde de paralellik göstermiştir.

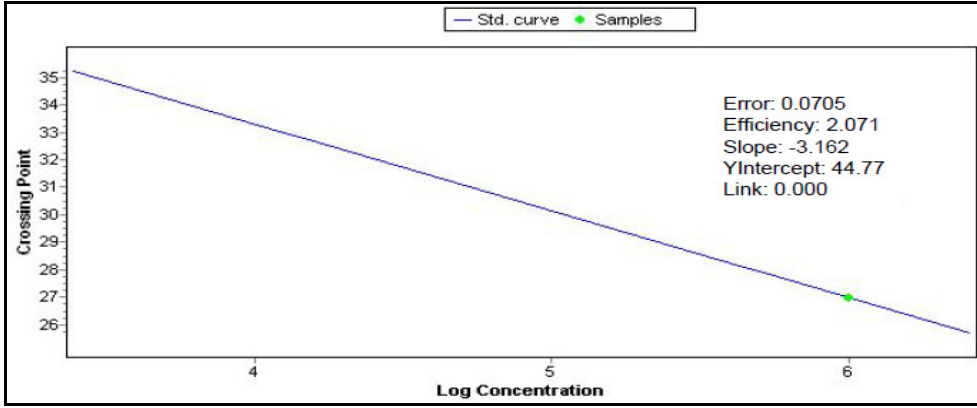
5.8.1. Real Time PCR Analizleri

5.8.1.1. Standart Eğri (Standart Curve)

Kullanılan primerlere ait bazı standart eğri grafikleri Şekil 5.25 ve Şekil 5.26' de verilmiştir. Çizilen standart eğri grafiklerinin etkinlik (efficiency) değerleri yaklaşık 2 ve slope değerleri ise -3.3'e yakın bulunmuştur. İlgili primerler için Real Time PCR reaksiyon koşullarının ve standart eğrilerin uygun olduğu belirlenmiştir.



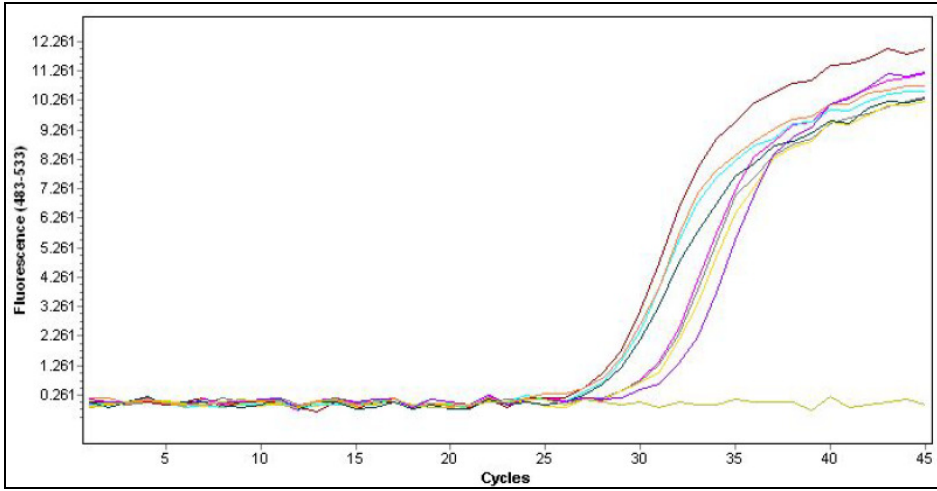
Şekil 5.25. Real Time PCR cihazından alınan 1614820 (Tonoplast dicarboxylate transporter-like) primerine ait 5BB örneklerinin standart eğri grafiği, efficiency ve slope değerleri



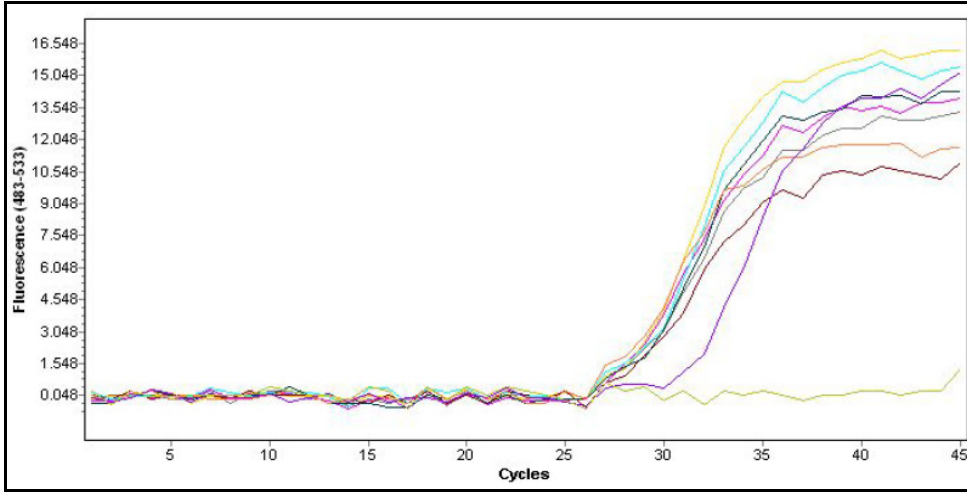
Şekil 5.26. Real Time PCR cihazından alınan 1621592 (Dehydrine) primerine ait 5BB örneklerinin standart eğri grafiği, efficiency ve slope değerleri

5.8.1.2. Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri

1614820 (Tonoplast dicarboxylate transporter-like) ve 1616116 (Galactinol-sucrose galactosyltransferase 6-like) primerlerinde standart ve çalışılan örneklere ait örnek amplifikasyon eğrileri Şekil 5.27. ve Şekil 5.28’de sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri 20-35. döngüler arasında elde edilmiş ve analizlerle bu Ct değerlerinin anlamlı değerler olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.



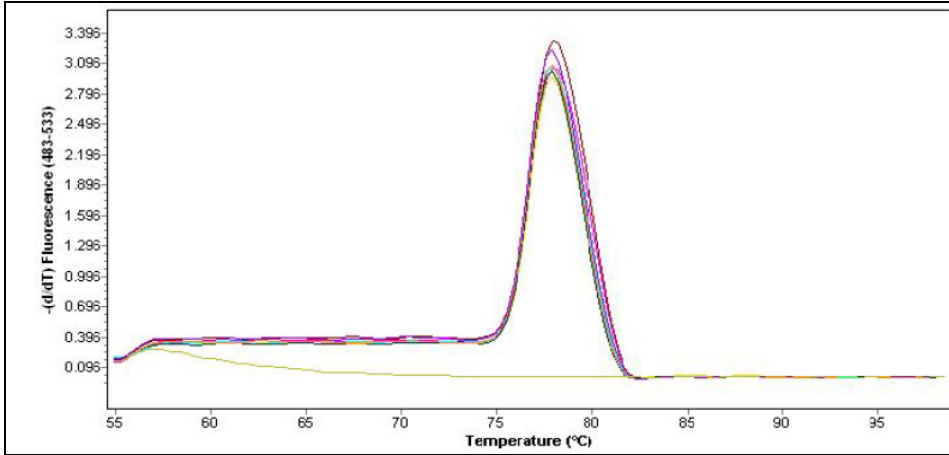
Şekil 5.27. 1614820 (Tonoplast dicarboxylate transporter-like) primerinde standart ve CS örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 5.28. 1616116 (Galactinol-sucrose galactosyltransferase 6-like) primerinde standart ve 5BB örneklerine ait amplifikasyon eğrileri

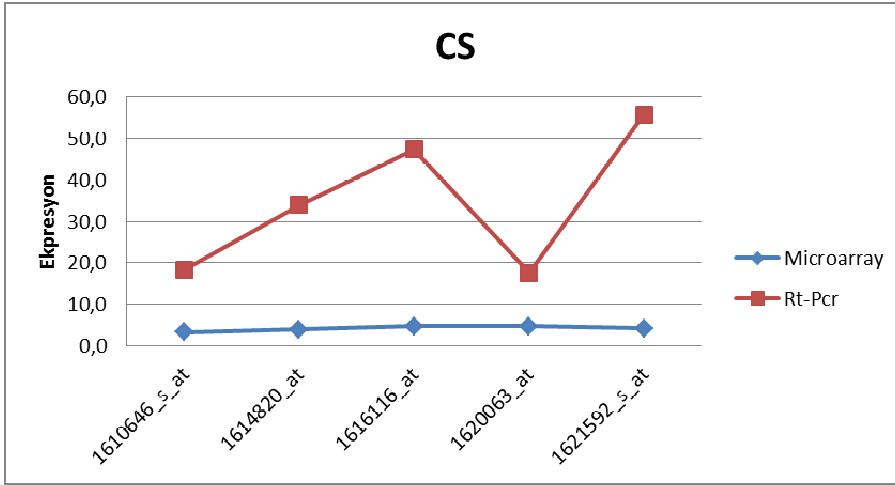
5.8.1.3. Erime Eğrisi (Melting Curve)

Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde erime eğrisi (melting curve) analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.29.). Erime eğrisi analizlerinde üst üste çakışan tek pik görüntüleri elde edilmiş ve dimer varlığı saptanmamıştır.

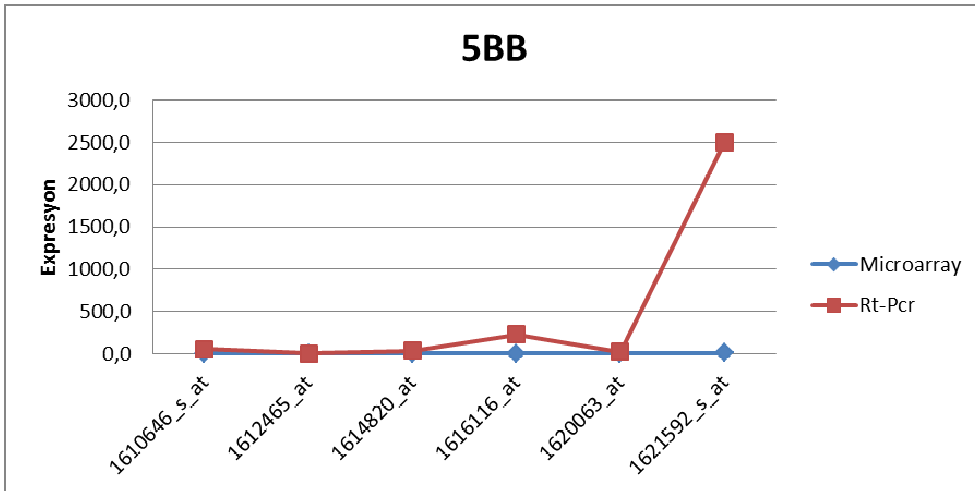


Şekil 5.29. 1614820 (Tonoplast dicarboxylate transporter-like) primerine ait standart ve 5BB örneklerine erime eğrisi grafiği

5.8.1.4. Mikrodizin İfade Verilerinin Real Time (Eş Zamanlı) PCR İle Validasyonuna Ait Grafikler



Şekil 5.30. CS genotipinde kuraklık stresi mikrodizin ifade verilerinin Real time (eş zamanlı-qRTPCR) ile validasyonu



Şekil 5.31. 5BB genotipinde kuraklık stresi mikrodizin ifade verilerinin Real time (eş zamanlı-qRTPCR) ile validasyonu

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Genom, proteom, transkriptom ve metabolom gibi biyolojik oluşumları kapsayan omiks teknolojileri özellikle 2000'li yıllardan itibaren hız kazanmış olup, referans genom dizisi tamamlanan üzüm (*V. vinifera*) (174) aynı zamanda birçok omiks çalışmalarında ön planda yer almaktadır. Üzümde abiyotik stresle ilgili transkriptom ve proteom çalışmalarına bakıldığında; sürgün, yaprak (131,175,176) tane (132,177) ile ilgili araştırmaların yoğun olarak yapılırken, kökle ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamaktadır. Bu nedenle uzun dönem kuraklık stresinin, kuraklığa hassas anaç ve dayanıklı çeşite ait köklerde transkriptomik düzeyde karşılaştırılması ile gerçekleştirilen bu tez çalışmasının sonuçları, üzüm anaç/çesit kök transkriptom çalışması ile tartışılmamıştır. Tartışmada farklı bitkilerde yapılan kuraklık stresi ilişkili kök transkriptom çalışmaları ve kuraklık stresi ile ilişkili üzüm yaprak transkriptomları araştırma bulguları hedef alınmıştır.

6.1. Kuraklık Stresine Karşı Oluşan Fizyolojik Cevap

Bilindiği gibi kuraklık koşullarında köklerde topraktaki suyun daha hızlı emilimi ile gelişim hız kazanmakta ve bu nedenle bitkide kök uzaması meydana gelmektedir (178). Vijayalakshmi ve Nagarajan (1994) tarafından pirinçte yapılan bir çalışmada kuraklığa toleransı yüksek olan genotiplerde daha fazla kök oluşumu gözlemlenmiş ve hassas olan genotiplere göre kök yayılımının daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışması sonucunda da bu araştırmayı destekler nitelikte CS genotipinde de kök uzunluğunun 5BB anacına göre görsel anlamda daha fazla ve yoğun olduğu gözlemlenmiştir.

Normal şartlarda bitkilerde transpirasyonla meydana gelen su kaybı topraktaki yeterli su miktarına göre telafi edilebilmektedir. Ancak kuraklık stresinde bilindiği üzere en temel bulgu topraktaki su potansiyelinin azalmasına bağlı olarak bitkide meydana gelen su stresidir. Bu nedenle bitkide kuraklık stresine bağlı fizyolojik değişimler yapraklardaki su potansiyelinin kök ve topraktaki su potansiyellerinin altına düştüğü zaman meydana gelmektedir (161). Dolayısıyla yaprak su kaybının (yaprak su potansiyelinin) belirlenmesi ile tolerant genotip seçiminde önemli bir kriterdir (157).

Bitki tür ve çeşidine bağlı olarak değişmekle birlikte düşük su potansiyeli ile (yaklaşık -0.3 MPa ile -0.8 MPa) yapraktaki hücrelerin turgor basıncı düşmekte ve hücrede absisik asit birikimi başlatılarak stomalar kapanmaktadır (175). Uzun kuraklık stresi dönemlerinde ise;

yapraklardaki su potansiyeli değeri yaklaşık -1.0 MPa ile - 2.0 MPa değerlerine ulaşmakta olup, solunum ve CO₂ asimilasyonu gibi olaylar durma noktasına yaklaşmaktadır (156). Birçok bitkide yapılan stres çalışmalarında düzenli sulanan kontrol bitkilerinde yaprak su potansiyelinin değeri yaklaşık -0.3MPa olarak bulunurken, kuraklık stresi uygulamalarında ise bu değerin yaklaşık -2.0 MPa' a kadar ulaştığı gözlemlenmiştir (157). Son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda sulanmış asmalarda (kontrol) eşik değeri ortalama -0.8 MPa altı olarak değerlendirilirken, ortalama -1.2 MPa değerinde üzümün kuraklık stresine girdiği, - 1.5 MPa değerinde ise aşırı stres koşulları altında olduğu varsayılmaktadır (131,175). Bununla birlikte tam sulama yapılan bağlarda ise gün ortasında ölçülen - 1.0 MPa yaprak su potansiyeli değeri stressiz eşik değeri olarak kabul edilmekte olup -1.2 MPa ile -1.4 MPa (14 bar) arasında olması ise orta derecede stresi, -1.6MPa ve daha büyük negatif değerlerin ise yüksek derece stresi temsil ettiği belirtilmiştir (157).Tez çalışması sonucu elde edilen fizyolojik ölçüm sonuçlarında; CS çeşidi ile 5BB anacında kuraklık stresi yaprak su potansiyeli değerleri sırasıyla ortalama -0.7MPa, ve -0.95MPa olarak belirlenmiştir. Bu durum CS çeşidinin, kurağa hassas 5BB anacına göre mevcut su durumunu koruyarak kurağı tolere edebildiğini göstermektedir. Tez sonucunda bulunan MPa değerleri, CS çeşit ve 5BB anacında, aynı materyallerle yürütölen diğer tez çalışmasına benzer şekilde 7 gün kuraklık stresi uygulaması sonucu bulunan MPa değerleri ile de (CS çeşidinde ortalama -1.5MPa ve 5BB anacında -0.9MPa) benzerlik göstermektedir (23). Cabernet Sauvignon üzüm çeşidine 16 gün kuraklık stresinin uygulandığı başka bir çalışmada ise CS çeşidine benzer şekilde 8. gün ile 16. gün arasında yaprak su potansiyeli değerleri -0.75 MPa ile -1.00 MPa arasında bulunmuştur (131).

Bu çalışmada kuraklık stresi ile 5BB ve CS arasında morfolojik kök farklılıkları ve fizyolojik ölçüm sonuçları literatürlerde belirtilen kuraklık stresindeki anaç-çeşit farklılığını doğrular niteliktedir. Ayrıca asma anaçlarının kuraklık stresine karşı toleranslılıklarının değerlendirildiği ve farklı araştırma sonuçlarını içeren derlemede özellikle Rupestris du Lot, 101-14Mt, Riparia Gloire de Montpellier ve 5BB anaçlarının kuraklığa hassas olduğu belirlenmiştir (12). Bu araştırma sonucunda elde edilen fizyolojik bulgularda 5BB anacının çeşitle karşılaştırıldığında hassas, yine anaç genotipleri içerisinde de hassas bir genotip olduğu gösterilmiştir.

6.2. Kuraklık Stresi İle Belirlenen Kök-Yaprak Ortak Transkriptomlar

Yaklaşık 16.000 transkript içeren üzüm yaprak çipinde hem 5BB anacı ve hem de CS çeşidinde ifadesi değişen toplam 3204 transkript belirlenmiş ve bu sayı 16.000'e oranlandığında yaklaşık %20 oranına denk gelmektedir. Bu oran, kuraklığa yanıtta yaklaşık %20 oranında gen ifadesi değişimi gösteren *A.thaliana* (179), kavak (180);(169), üzüm (131,175) gibi farklı bitkileri içeren mikrodizin çalışmalarına paralellik göstermektedir. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) köklerinde kuraklık stresi ilişkili transkriptom analizi yapılan ve 2445 transkript bulunan çalışma sonucuna da yüksek ölçüde benzerlik göstermektedir (181). Kuraklık stresi ile ilgili pamuk yaprak ve köklerinde yapılan başka bir mikrodizin çalışmasında; yaprakta ifade değişimi gösteren toplam 1491 transkript belirlenirken, kökte ise sadece 852 transkript belirlenmiştir. Kökte transkript sayısının az olması ise, yaprak ve kök arasında farklı fonksiyonlara ait mekanizmaların (hücre sinyali, lipid metabolizması, karbon metabolizması vb.) rol oynaması ve mikrodizin çipi üzerindeki kök spesifik EST'lerin eksikliğine dayandırılmıştır (182).

Kuraklık stresine karşı kökte indüklenen transkriptler çeşit ve anaç arasında karşılaştırıldığında önemli ve büyük farklılıklar gözlemlenmiştir. Analiz sonucu 5BB anacında bulunan 1925 transkriptten; 1118'inin ifadesi azalmış, 807'inin ise ifadesi artmıştır. CS çeşidinde ise 5BB anacından daha az olarak toplam 1279 transkript belirlenmiş, bunlardan 534 transkriptin ifadesi azalış gösterirken, 745'inin ifadesi artmıştır. Hem 5BB' de hem CS' de ifadesi değişen toplam 818 ortak transkript bulunmuş olup bu sayı yaklaşık olarak ifadesi değişen tüm transkriptlerin 1/4' üne denk gelmektedir. Tez çalışması ile aynı süre (7 gün) hem kuraklık hem de tuzluluk stresine tabi tutulan 5BB, 41B anaçları ve CS çeşidine ait yapraklarda mikrodizin analizleri gerçekleştirilen benzer çalışma sonucunda ise (23); 3 genotip arasında hem kuraklık hem tuzluluk stresi ile yaprakta değişim gösteren transkript sayısı en fazla 5BB (3342 transkript) anacında tespit edilerek 5BB anacının her iki stress koşulu altında en fazla etkilenen anaç olduğu açıklanmıştır. Aynı çalışmada; sadece kuraklık stresi sonucu ifadesi değişen toplam 5986 transkript belirlenmiş ve bu transkriptlerin, 2675'inin CS' de 2140'nın ise 5BB anacına ait olduğu açıklanmıştır (23).

Yaprakta belirlenen bu transkript sayılarının çeşit ve anaçta birbirine yakın çıkması, anaç-çeşit farklılığını net olarak ortaya koyamazken, tez çalışması sonucu köklerde belirlenen

transkript sayıları 5BB anacının CS çeşidine göre kuraklık stresi ile daha fazla etkilendiğini ve buna bağlı olarak daha çok genin tetiklendiğini kanıtlamıştır. Bu bulgu ile, anaçta kuraklığa toleransın yapraktan daha çok kök kökenli gen/sinyal mekanizmalarına dayandırılabilceği olgusunu desteklemektedir.

İfade değişimi gösteren transkript katsayılarına bakıldığında ise; 5BB anacında 2 ile 361 kat arasında ifade değişim gerçekleşmiş olup, transkriptlere ait kat sayı değişimleri genel olarak 10 ile 40 kat arasında yoğunlaşmıştır. CS çeşidinde ise bu değer 2 ile 81 kat arasında bulunmuş başka bir deyişle CS çeşidindeki kat sayı değişimlerinin 5BB anacına göre önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bulunan transkriptlerde ifade değişim kat sayılarının da transkript sayılarına benzer şekilde anaç ile çeşit arasında belirgin farklılık göstermesi, 5BB anacının kuraklık stresinden daha fazla etkilendiği ve metabolik olarak birçok genin strese cevapta daha yüksek oranda tetiklendiğini kanıtlayan diğer bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kuraklık stresi sonucu 5BB anacında ifadesi en çok artış gösteren transkript 361 kat ifadesi ile dehidrin (1621592_s_at) olmuştur. Dehidrin geni normal koşullarda hücrede sürekli olarak sentezlenmekte olup (183) farklı bitkilerde (kavak, gibi) dehidrin genlerinin kuraklık sonucu osmotik stresin artmasına bağlı olarak ifade seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (184). Dehidrin genlerinin özellikle kuraklık stresi ile meydana gelen dehidrasyon sırasında proteinlerin agregasyon (toplanma) ya da inaktivasyonunu önleyecek şaperonlar olarak görev yaptığı ve hücre membran bütünlüğünün korunmasını sağlamaya yardımcı olduğu düşünülmektedir (22). Kuraklık stresine cevapta 5BB anacında yoğun dehidrin transkript ifade artışına karşın, CS çeşidinde ise dehidrin transkript ifade profili önemli ölçüde farklılık göstermiş ve sadece 19 kat sayısı ile ifadesi artışı göstermiştir. Birbirine yüksek ölçüde benzeyen DHN1a ve DHN1b genlerinin yabani ve kültür asmasında farklı çevresel koşullarda, farklı dokulardaki ifade değişimleri araştırılan bir çalışmada; farklı çeşit DHN1'e ait bazı işlenmemiş transkriptlerin (DHN1-S ve DHN1-U) soğuk, kurak ve ABA uygulaması ile yapraklardaki birikiminin arttığı, bazı DHN1'lerin ise sadece kısa dönem gerçekleştirilen uygulamalarda hem *V.vinifera*'da ve hem de *V. riparia*'da arttığı bildirilmiştir (185).

CS çeşidinde ise kuraklık stresine cevapta en fazla ifadesi artan transkript yaklaşık 42 kat sayı değeri ile polifenol oksidaz (polyphenol oxidase, chloroplastic-like-1622651_at)

olarak belirlenmiştir. ROS'lerine karşı oluşan antioksidanlar arasında yaygın olarak bulunan bakır içerikli enzimlerden olan Polifenol oksidaz enziminin domateste baskılanması (suppression) ile kuraklığa toleransın arttığı bildirilmiştir (186).

Kuraklık stresi ile hem 5BB anacı hem de CS çeşidinde en fazla ifadesi azalan transkriptler lipid proteinler (putative lipid-transfer protein DIR1-like) olarak belirlenmiştir. 5BB anacında yaklaşık 180 kat sayı azalan lipid proteini CS çeşidinde ise anaçtan farklı olarak yaklaşık 32 kat olarak azalış göstermiştir. Analiz sonucu köklerde farklı lipid proteinlerinin hem çeşit hem anaçta ortak olarak farklı katsayılarla ifadelerinde azalış olduğu gözlemlenmiştir. Lipid transfer proteinler; CS çeşidinde uzun dönem kuraklık stresi sonucu yapraklarda kuraklığa erken cevap evrelerinden itibaren ifadelerinde hızlı artış göstermelerine rağmen (131), kökte aynı çeşit ve 5BB anacında azalma göstermişlerdir. Normalde lipid transfer proteinlerinin stres altındaki fonksiyonları net olmamasına rağmen, özellikle patojen kaynaklı meydana gelen stres altında epiderm (yaprak üst zarı) biçimlendirilmesinde ve uzun dönem stres altında ise savunma sinyalinde görev aldığı düşünülmektedir (187).

6.2.1. Fotosentez İlişkili Enzimler

RuBisCo bilindiği üzere fotosentezin anahtar düzenleyicilerindedir(188). Uzun dönem kuraklık stresi (16 gün) uygulanmış Cabernet Sauvignon ile yapılan mikrodizin analizleri sonucu kuraklığa bağlı 4. günden itibaren erken verilen cevap olarak yaprakta yoğun Rubisco Aktivase enzimi ilgili transkriptlerde artış gözlemlenmiştir (131). Normal koşullarda kloroplastlarda CO₂' yi fikse eden ve indirgeme reaksiyonları ile organik bileşiklere dönüşmesini sağlayan Rubisco enzimi ile ilişkili transkriptler (1612634_at-ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic-like) tez çalışması sonucunda anaç ve çeşit köklerinde düşük katsayılarla azalan ifade değişimi göstermişlerdir. Bu düşüş katsayısında çeşit ve anaç arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Kuraklık stresi altında RubisCo aktivitesi ifadesindeki azalma, sıkı bağlanma (tight-binding) inhibitörlerin varlığı ile ilişkilendirilmiş olup, bu inhibitörler RuBisCo aktivaz ve ATP hidrolizi ile uzaklaştırılmaktadır (189). 7 gün kuraklık stresi uygulaması sonucu yapılan mikrodizin analizleri sonucunda da benzer şekilde 5BB anaç ve CS çeşidi yapraklarında da Rubisco transkriptlerinde ifade azalması gerçekleşmiştir (23). Normalde yapraklardaki kloroplastlarda fotosentez amaçlı yoğun olarak bulunan ve

köklerdeki durumu halen tartışılan Rubisco enziminin farklı gelişim evrelerine ait pirinç köklerindeki mRNA seviyelerinde önemli değişimler belirlenmiştir (190) bu durum tez sonucuna paralel köklerde az da olsa rubisco enzimi varlığını kanıtlar niteliktedir.

6.2.2. Antioksidanlar

Bilindiği üzere Hidrojen peroxide (H_2O_2) ve superoksit kuraklık stresi altında oluşan reaktif oksijen türlerinin başında gelmektedir. ROS'lerinin meydana getirdiği oksidatif hasarı en aza indirmek için bitkide geliştirilen stratejiler ile sentezlenen katalaz (catalase) ve ascorbat peroksidaz (ascorbate peroxidase) enzimleri hidrojen peroksidi; superoksit dismutaz (superoxide dismutase) superoksidi ortadan kaldırmaktadır. Bunlara ilave olarak sitozolik glutatyon redüktaz (glutathione reductase) hidrojen peroxidin (H_2O_2) detoksifikasyonunda temel görev almaktadır (191). Mikrodizin analizleri sonucunda köklerde; peroxidase 42-like (1613132_s_at), peroxidase 42-like (1608586_at), peroxidase 15-like (1610538_at), peroxidase 3-like (1607942_at), peroxidase 4 (1621431_at), catalase isozyyme 1-like (1610871_s_at), 12-oxophytodienoate reductase 2-like (1607601_at) gibi antioksidanlar hem çeşit ve hem anaç da farklı katsayılarla ifade değişimleri göstermiştir. Kuraklıkla ilişkili kökte transkriptom analizi yapan benzer araştırmalarda (168,169,192) ROS'lara karşı genellikle antioksidan transkriptlerinde ifade artışı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ise farklı bir şekilde hem çeşit hem anaçda özellikle peroksidaz, redüktaz ve katalaz gibi antioksidant enzimlerle ilişkili transkriptlerde genellikle ifade azalışı gözlemlenmiştir. ROS' lara karşı üretilen bu koruyucu enzim aktivitelerinin yapraklara göre köklerde daha az olduğu bildirilen bir çalışmada (193); toprak kökenli kuraklığa karşı yapraklarda kıvrılma ve stoma düzenlenmesi ile mekanizmalarla su transpirasyonu azaltılabilirken, köklerin su stresine doğrudan maruz kaldığı için yapraklara göre daha fazla ve hızlı zarar gördüğü açıklanmıştır. Bu nedene gerçekleşen hücre membranlarındaki bozulmalar sonucu koruyucu enzimlerin azalış gösterdiğini buna karşın, lipid peroksidasyon (lipid peroxidation) üretiminde artış gözlemlendiği açıklanmıştır. Bu çalışma sonucunda anaç ve çeşitte, lipid peroksidasyonun temel ürünü olarak bilinen; malondialdehit ile ilişkili herhangi bir transkript değişimine rastlanmamış, bu durum kökte lipid peroksidasyon ürünlerinin farklı enzimlerin aktiviteleri ile engellenebileceğini düşündürmektedir (193).

Anaç ve çeşitte ortak olarak ifade değişimi gösteren diğer bir antioksidan olan Glutasyon S-transferaz (Glutathione S-transferaz) ile ilişkili toplam yaklaşık 15 transkript bulunmuş olup, bunlardan yaklaşık 11 tanesi sadece 5BB anacında belirlenmiştir. Kuraklık stresi ile özellikle köklerde Glutasyon S-transferaz aktivitesinin yoğun olarak gözlemlendiği önceki benzer çalışmalarda (192,194) belirtilmiş olup, bu enzimin kök meristem bölgelerinde hücre bölünmesini hızlandırarak, kök uzaması ve kök şekillenmesinde görev aldığı açıklanmıştır (195).

6.2.3. Aquaporinler

Normal koşullarda kök yüzeyindeki aquaporinlerin sentezi gün saatleri, fotoperiyot ve stres koşullarına göre değişkenlik göstermektedir (196). Bitkide su stresi altında aquaporinlerin fonksiyon ve rolleri henüz tam olarak bilinmemekle birlikte (197) bitkide oluşan su eksikliğinde temel olarak fosforilasyonu düzenlediği bildirilmektedir (91). Bu çalışma sonucunda 5BB anacı ve CS çeşidinin her ikisinde de ifadesi değişen (artan/azalan) yaklaşık 28 aquaporin transkripti belirlenmiş ve 5BB anacında tüm aquaporin transkriptlerinde (23 adet) ifade azalışı gözlemlenirken CS aquaporinlerinde ise 3'ünde ifade artışı 2' sinde ifade azalışı görülen toplam 5 transkript analiz edilmiştir. Bulunan bu transkriptlerin çoğunluğu; 110 Richter anacında yapılan kuraklık araştırması sonucuna (92) benzer şekilde PIP ve TIP çeşit aquaporinleri olduğu gözlemlenmiştir. Farklı bitki köklerinde kuraklık stresi ile yapılan pek çok çalışmada (198–200) farklı çeşit aquaporinlerin ifadesinde farklı seviyelerde artış yâda azalış gözlemlenmiştir ve tez sonuçlarına benzer olup, net bir gruplandırma yapılamamıştır. 110 Richter anacında yaprak ve kökte yapılan çalışmada; bulunan yaklaşık 8 aquaporinde ifade seviyelerinde farklılıklar gözlemlenmiş ve özellikle kökte ifade artışının sebebi olarak ise meydana gelen su noksanlığını gidermeye yardımcı olmak amaçlı gerçekleştiği açıklanmıştır (12). Benzer şekilde 4 farklı üzüm anacı köklerinde de VvPIP1;1 ve VvTIP2;1 aquaporinleri yüksek seviyede ifade olmuştur (201). Kuraklık, tuz ve ABA uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana*' da farklı dokularda 13 PIP çeşit aquaporinlerin fonksiyonları araştırılan ve PIP genlerinin farklı doku tiplerinde farklı seviyelerde ifade olduğu açıklanan diğer bir çalışmada ise, kuraklık stresi altında köklerde bazı PIP çeşit aquaporinlerin ifadesinde azalış gözlemlenmiş ve bu durumun, azalan membran geçirgenliğine ve hücresel su muhafazasının desteklenmesine sebep olduğu açıklanmıştır (202). Yine benzer şekilde kuraklık stresi uygulanan loblolly pine (*P. taeda* L.) (181), *Nicotiana glauc* (91) ve kavak

(*Populus euphratica*) (203) köklerinde de aquaporin ilişkili transkriptlerde yoğun ifade azalışı gözlemlenmiştir. Köklerin stres koşullarındaki su geçirgenlikleri kısa bir sürede (2-3 gün) çok hızlı değişim gösterebilme yeteneğindedir. Son dönemde yapılan çalışmalar bu hızlı değişimlerin nedenini hücre zarı geçirgenliğine ve aquaporinlere bağlanmakla birlikte (86) kuraklık stresi altında ifade değişimleri netlik kazanmamıştır.

6.2.4. Transkripsiyon Faktörleri

Tez çalışması sonucunda transkripsiyon faktörleri ile ilişkili transkriptler ilginç ve net bir şekilde anaç ve çeşitte farklı gen ailelerine ait olarak bulunmuştur. 5BB anacında ifadesi değişen transkripsiyon faktörleri ile ilişkili transkriptlerin tamamı; MYB, WRKY ve bHLHATHB (members of a small family of HD-Zip protein), HAT (histone acetyltransferase), TCP ve IIB transkripsiyon faktörleri gen ailelerinde yer almıştır. Bu gen ailelerinden özellikle; WRKY ve bHLH gen ailesi kurağa yüksek dayanıklılık gösteren izogenik pirinç hatlarına ait köklerde yapılan transkriptom analizlerinde de yüksek miktarda ifade olmasına rağmen (168) bu faktörlerden bHLH gen ailesi 5BB anacında ifadesi en fazla azalan transkript olarak belirlenmiştir. 5BB köklerinde ifadesi en çok artan MYB transkripsiyon faktörüne ait transkriptler (1607133_at) benzer şekilde 5BB anacı yapraklarında da en fazla artışı göstermiştir (23). Nohut (*Cicer arietinum*) bitkisi köklerinde yapılan çalışmada (170) ise kuraklık stresi ile MYB gen ailesi transkripsiyon faktörlerine ait transkriptlerde hem ifade artışı hem de ifade azalışı gözlemlenmiş ve bu durum ABA bağımlı sinyal yolağı ile ilişkili olan MYB transkripsiyon faktörlerine ait ifadenin kökteki farklı bölgelerde sınırlandırılmasına ve bu nedenle ABA sinyalinin kökteki her bölgede aynı anda meydana gelmemesine dayandırılmıştır. Tez sonucunda 5BB anacı ve CS çeşidinde de bu çalışmaya benzer şekilde ifade farklılıkları gözlemlenmiştir.

CS çeşidine bakılacak olduğunda ise; transkripsiyon faktörlerinin ise daha çok ethylene-responsive transcription factor, zinc finger protein ZAT ve zinc finger CCCH domain-containing protein' ler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bunlardan en fazla artış gösteren zinc finger protein ZAT10-like transkripti (1619573_at), pamukta yapılan bir çalışmada (192) kurağa dayanıklı çeşitte oldukça yüksek miktarlara belirlenmiş ve bu genin kuraklığa toleransda kök tüyü oluşumunda görev aldığı belirtilmiştir.

NAC domain ailesinin kuraklık stresinde CS çeşidi yapraklarında, 12. günde yüksek seviyede ifade olduğu görülmüş olmasına karşın (131) tez çalışmasında CS köklerinde ifade artışı düşük düzeyde ifade olmuştur.

Ozmotik stres denemelerinde CBF/DREB transkripsiyon faktörlerinin strese karşı erken cevap verip (dakika süresinde) artış gösterdiği ve strese toleransın artırılmasını sağladığı bildirilmektedir (115). Bu çalışmada her iki genotipte de CBF/DREB transkripsiyon faktörleriyle ilişkili bir ifade farklılığına rastlanmamıştır. (131) Cramer ve ark. (2007) yaptığı çalışmada da benzer şekilde bu transkripsiyon faktörlerinde 16. güne kadar artış gerçekleşmemiş olup, kayda değer bir artışın 16. günde olduğu belirtilmiştir.

6.2.5. Osmolitler

Kuraklık stresiyile oluşan ozmotik stres hücresele düzensizliklere neden olmakta, hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde ise amino asitler (prolin), diğer aminler (glycine-betaine bazı şeker ve şeker alkolleri (mannitol ve trehalose) gibi osmoprotektanlar etkin rol oynamaktadır. Bu metabolitler normal koşullar altında hücresele metabolizmaya yönelik aktivite göstermezken, ozmotik stres koşulları altında yüksek miktarlarda sitoplazmada birikmeye başlamaktadır (204). Hücre yapısında ve turgor basıncının düzenlenmesinde rol alan bu metabolitlerin en önemlileri; prolin, glisin betain, poliaminler ve mannitol olarak bilinmektedir (205). Tez çalışmasında anaç ve çeşitte bu metabolitlere ait transkript analizleri sonucunda da belirgin olarak katsayı ve ifade farklılıkları gözlemlenmiştir.

Önemli osmoprotektanlardan olan prolin ifadesine bakıldığında ise; 5BB anacında toplam 12, CS çeşidinde ise toplam 6 prolin ilişkili transkript gözlemlenmiştir. Her iki genotipte de aynı transkript dışındaki (1617293_s_at) tüm prolin ilişkili transkriptlerin ifadesi azalmıştır. İfadesi azalan bu transkriptler 5BB anacında yoğun olarak 20-95 arasında CS çeşidinde ise 5BB anacına göre daha düşük katsayılarla (2-19) görülmüştür. CS çeşidi yapraklarında ise kökten farklı olarak prolin ifadesinde artış gözlemlenmiş aynı çalışmada 5BB ve 41B anacında ise kökteki duruma benzer şekilde ifade azalışı gerçekleşmiştir (23). Asma yapraklarında en bol bulunan serbest aminoasit olan (206) prolinler bitkinin özellikle kuraklık ve tuzluluk toleransını artırmaktadır (207,208). Prolinin hücrede aşırı birikmesi sonucu toksik etki oluşturmasını engellemek için biriken aşırı prolinin uzaklaştırılmasını sağlayan prolin dehidrogenaz (1617293_s_at) enziminin (209) ifadesi ise hem 5BB anacı

hem de CS çeşidinde artmıştır. CS çeşidi yapraklarında da uzun dönem (16 gün) kuraklık stresinde bu enzimin ifadesinde artış meydana geldiği bildirilmektedir (131).

Bir organik molekül olan poliaminlerle ilişkili olarak bulunan 2 poliamin oksidaz enzimi transkriptlerinden biri (1610247_a_at), her 2 genotipte benzer kat sayı değerlerinde artış göstermiştir. Diğer transkript ise (1622587_at) sadece 5BB anacında ve (23) Bakır (2012)'nin CS ve 5BB yapraklarında bulunduğu sonuca benzer şekilde kökte de ifadesi artmıştır.

Bazı bitkiler geçiçi anaerobik koşullarda gelişimlerini sağlayabilmek amaçlı bazı proteinleri sentezleme yeteğine sahiptir. Bu proteinlerin başında ise alkol fermentasyonu ile ilişkili gelen alkol dehidrogenaz enzimi gelmektedir. Tez çalışmasında 7 gün kuraklık sonucu hem çeşit ve hem anaçda kuraklığa karşı yanıtta alkol dehidrogenaz enzimi (1614086_at) ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Tez sonucuna paralel olarak farklı bitkilerde de yapılan kuraklık çalışmalarında da; *A. thaliana* (150), *Nicotiana tabacum* (210), *Phaseolus* sp. (155) and *Populus* sp. (211) alkol dehidrogenaz enzimi ifadesinde benzer şekilde artış gerçekleşmiştir. Bazı araştırmalar kuraklık stresinde yaprak ile kök dokuları arasındaki farklılıkların özellikle expansin, selüloz sentaz (cellulose synthase) ve ksiloglukan (xyloglucans) gibi genlere dayandırıldığını bildirmektedir (212). Bunlardan özellikle expansin geni strese cevapta hücre duvarının genişlemesinde görev alan bir enzim olup benzer kuraklık transkriptom çalışmasında kuraklığın erken evrelerinden itibaren köklerde ifade artışı göstermiştir (192). Tez sonuçlarında expansin ilişkili transkript CS çeşidinde yaklaşık 7 kat ile ifade artışı gösterirken 5BB anacında aynı transkript ifadesinde yaklaşık 8 kat ifade azalışı meydana gelmiştir. Bu farklılık; expansin geninin dayanıklı olarak belirtilen CS çeşidinde hassas 5BB anacından farklı olarak turgor basıncının kolaylaştırılması ve iyonik dengenin kurulmasında etkin role sahip olmasına dayandırılabilir.

6.3. Kök Spesifik Transkriptomların Belirlenmesi

Tez sonucunda; ifade düzeyi 2 ve 2'den fazla olan yaprak kök ortak transkriptomları, NCBL tabanında bulunan ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve Nevada Üniversitesi Reno Biyokimya Bölümünün ortaklaşa çalışması ile tespit edilen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=grape+ergul>) yaklaşık 16.452 kök EST'leri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda yaklaşık tekrarsız 2000 EST dizisi yaprak-kök transkriptomlarıyla eşleşme göstermiştir (Ek 2.). Dolayısıyla bulunan bu EST'lerin kök spesifik olmadığı gözlemlenmiştir. Tez açısından, tez sonucu olan bu veri köke spesifik gen bölgelerinin daha da netleştirilmesi açısından ilk bulgu niteliği taşımaktadır.

Özetlenecek olduğunda, dünyanın en önemli şaraplık üzüm çeşitlerinden olan Cabernet Sauvignon ile 5BB asma anacına ait köklerde kuraklık stresinin transkriptomik düzeyde incelendiği ve mevcut kök EST'lerinin tez sonuçlarında bulunan yaprak-kök ortak transkriptomlarla karşılaştırıldığı bu tez çalışması literatürde bir ilk olma özelliği ve önemi taşımaktadır.

Yedi gün boyunca sulamama şeklinde kuraklık stresine maruz bırakılan çeşit ve anaçta meydana gelen kuraklık stresinin fizyolojik etkisini belirlemek amaçlı gerçekleştirilen yaprak su potansiyeli ölçümlerinde (-MPa) Cabernet Sauvignon çeşidinin kuraklık stresine toleransının 5BB anacına göre daha yüksek bulunmuştur.

Mikrodizin analizlerinde ise; 5BB anacında kuraklık stresinde etkilenen kök-yaprak transkript sayısı CS çeşidine göre daha yüksek bulunmuştur. Özellikle transkripsiyon faktörleri, bazı hormon ve metabolit sentezinde rol oynayan enzimler, antioksidanlar, aquaporinlerle ilişkili bu transkriptler CS çeşidi ve 5BB anacı arasında önemli farklılıklar göstermişlerdir. Tez sonuçları aynı genotiplerde aynı süre kuraklık stresi uygulanan yaprak transkriptom verileri ile diğer araştırmalara oranla daha yoğun olarak karşılaştırılmış ve önemli farklılıklar ortaya konulmuştur. Ayrıca aynı çalışmada yaprak transkriptom analizi (23), sonucu bulunan anaç hassaslığı (5BB) bu tez çalışması ile de köklerdeki transkriptom profilleri ile de kanıtlanmış olmaktadır. Başka bir deyişle 5BB anacının hem kök hem yapraktaki mikrodizin analizleri sonucunda tespit edilen hashas anaç özelliği benzer profil sergilemiştir. Ayrıca mevcut kök EST'leri ile yaprak-kök ortak transkriptomları karşılaştırılması sonucu bazı kök EST'lerinin köke spesifik olmadığı yaprakta da bulunduğu açıklanmıştır.

KAYNAKLAR

- 1 Gong H, Zhu X, Chen K, Wang S, Zhang C. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci.* 2005;**169**(2):313–321.
2. Martínez JP, Silva H, Ledent JF, Pinto M. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur. J. Agron.* 2007;**26**(1):30–38.
- 3 Sankar B, Jaleel CA, Manivannan P, Kishorekumar a, Somasundaram R, Panneerselvam R. Relative efficacy of water use in five varieties of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. under water-limited conditions. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2008;**62**(1):125–9.
- 4 Kalefetoğlu Tuğçe. Nohut (*Cicer arietinum*) Çeşit ve Hatlarının Kuraklık Stresine Karşı Dyanklılığının Karakterizasyonu. 2006:143.
- 5 Kalefetoğlu T, Ekmekçi Y. The effects of drought on plants and tolerance mechanism. *G.Ü. Fen Bilim. Derg.* 2005;**18**(4):723–740.
- 6 Nasri M, Zahedi H, Reza H, Moghadam T. Investigation of Water Stress on Macro Elements in Rapeseed Genotypes Leaf (*Brassica napus*) Farshad Ghooshchi and 3 Farzad Paknejad Department of Agriculture , Islamic Azad University , Varamin Branch , Iran Department of Agriculture , Islamic Azad Univ. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 2008;**3**(4):669–672.
- 7 Aharoni N, Blumenfeld A, Richmond AE. Hormonal Activity in Detached Lettuce Leaves as Affected by Leaf Water Content1 tors present in the chromatogram strips . -. *Plant Physiol.* 1977;**59**:1169–1173.
- 8 Stoyanov Z. Effects Of Water Stress On Leaf Water Relations Of Young Bean Plants. *J. Cent. Eur. Agric.* 2005;**6**(1):5–14.
- 9 Bray E. Plant Response to Water-deficit Stress. *Encycl. Life Sci.* 2001:1–5.
- 10 Esteban A, Villanueva J., Lissarrague J. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agric.* 2001;**81**:409–420.

- 11 Kennedy J a, Matthews M a, Waterhouse AL. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 2000;**55**(1):77–85.
- 12 Serra I, Strever a., Myburgh P a., Deloire a. Review: the interaction between rootstocks and cultivars (*Vitis vinifera* L.) to enhance drought tolerance in grapevine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2014;**20**(1):1–14.
- 13 Lichtenthaler HK. Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *J. Plant Physiol.* 1996;**148**(1-2):4–14.
- 14 Bray EA. Abscisic acid regulation of gene expression during water- deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. *Plant Cell Enviroment* 2002;**25**:153–161.
- 15 Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005;**444**(2):139–58.
- 16 Jordan WR, Shouse PJ, Blum A, Miller FR, Monk RL. Environmental Physiology of Sorghum. II. Epicuticular Wax Load and Cuticular Transpiration. *Crop Sci.* 1984;**24**(6):1168–1173.
- 17 Zollinger N, Kjelgren R, Cerny-Koenig T, Kopp K, Koenig R. Drought responses of six ornamental herbaceous perennials. *Sci. Hortic. (Amsterdam).* 2006;**109**(3):267–274.
- 18 Çırak C, Esendal E. Soyada Kuraklık Stresi. *OMÜ. Ziraat Fakültesi Derg.* 2006;**21**(2):231–237.
- 19 Ranathunge K, Schreiber L. Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *J. Exp. Bot.* 2011;**62**(6):1961–74.
- 20 Taleısnık E, Peyrano G, Cqrdoba A, Arias C. Water Retention Capacity in Root Segments Differing in the Degree of Exodermis Development. *Ann. Bot.* 1999;**83**:19–27.
- 21 Zhu J, Brown KM, Lynch JP. Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (*Zea mays* L.). *Plant. Cell Environ.* 2010;**33**(5):740–9.

- 22 Yang Y, He M, Zhu Z, Li S, Xu Y, Zhang C, Singer SD, Wang Y. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biol.* 2012;**12**(1):140.
- 23 Bakır M. Asma Çeşit ve Anaçlarında Kuraklık ve Tuz Stresi Toleransına Yönelik Mikrodizin Analizleri ve Stres İle İlgili Transkriptomların Tespiti. 2012:168.
- 24 Xu Z, Zhou G. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *J. Exp. Bot.* 2008;**59**(12):3317–25.
- 25 Ahmad P, Umar S, Sharma S. Mechanism of Free Radical Scavenging and Role of Phytohormones in Plants Under Abiotic Stresses. In: Ashraf M, Ozturk M, Ahmad MSA, eds. *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010:99–118.
- 26 Dat J, Vandenameele S, Vranova E, Montagu M Van, Inze D, Breusegem F Van. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000;**57**:779–795.
- 27 Smirnov BYN. Tansley Review No . 52 The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 1993;**125**:27–58.
- 28 Tambussi EA, Bartoli CG, Guamet JJ, Araus L. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 2000;**108**:398–404.
- 29 Quantistica M, Pinzino C, Sgherri CL., Navari- Izzo F. Lipid Composition and Protein Dynamics in Thylakoids of Two Wheat Cultivars Differently Sensitive to Drought '. *Plant Physiol.* 1995;**108**:191–197.
- 30 Ramachandra Reddy a., Chaitanya KV, Jutur PP, Sumithra K. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 2004;**52**(1):33–42.
- 31 Alexieva V, Ivanov S, Sergiev I, Karanov E. Interaction between stresses. *Bulg. J. Plant Physiology* 2003;**3**(2):1–17.

- 32 Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Funct. Plant Biol.* 2005;**32**(1):45.
- 33 Munne-Bosch S, Jubany-Mari T, Alegre L. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell Environ.* 2001;**24**(12):1319–1327.
- 34 Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP. Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 2014;**5**:1–8.
- 35 Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* 2002;**47**:239–247.
- 36 Comstock JP. Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *J. Exp. Bot.* 2002;**53**(367):195–200.
- 37 Wingler a., Quick WP, Bungard R a., Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC. The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell Environ.* 1999;**22**(4):361–373.
- 38 Ashraf M, Arfan M, Shahbaz M, Ahmad A, Jamil A. Gas exchange characteristics and water relations in some elite okra cultivars under water deficit. *Photosynthetica* 2002;**40**(4):615–620.
- 39 Wilkinson S, Davies WJ. ABA-based chemical signalling□: the co-ordination of. *Plant Cell Environment* 2002;**25**:195–210.
- 40 Davies WJ, Wilkinson S, Loveys B. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytol.* 2002;**153**(3):449–460.
- 41 Thompson AJ, Mulholland BJ, Jackson AC, McKee JMT, Hilton HW, Symonds RC, Sonneveld T, Burbidge A, Stevenson P, Taylor IB. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant. Cell Environ.* 2007;**30**(1):67–78.

- 42 Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Tyagi A, Meena RC. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Sci.* 2005;**169**(3):559–570.
- 43 Neill SJ, Burnett EC. Regulation of gene expression during water deficit stress. *Plant Growth Regul.* 1999;**29**:23–33.
- 44 Seo M. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 2002;**7**(1):41–48.
- 45 Jiang M, Zhang J. Effect of Abscisic Acid on Active Oxygen Species , Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings. *Plant Cell Physiol.* 2001;**42**(11):1265–1273.
- 46 Jiang M, Zhang J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* 2002;**215**(6):1022–30.
- 47 Ming-yi J, Jian-hua Z. Abscisic Acid and Antioxidant Defense in Plant Cells. *Acta Bot. Sin.* 2004;**46**(1):1–9.
- 48 Gonai T, Kawahara S, Tougou M, Satoh S, Hashiba T, Hirai N, Kawaide H, Kamiya Y, Yoshioka T. Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *J. Exp. Bot.* 2004;**55**(394):111–8.
- 49 Munns R, King RW. Abscisic Acid Is Not the Only Stomatal Inhibitor in the Transpiration Stream of Wheat Plants. *Plant Physiol.* 1988;**88**(3):703–708.
- 50 Thomas JC, Mcelwain EF, Bohnert HJ. Convergent Induction of Osmotic Stress-Responses '. *Plant Physiol.* 1992;**100**:416–423.
- 51 Zhang A, Jiang M, Zhang J, Tan M, Hu X. Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense and Acts Downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants. *Plant Physiol.* 2006;**141**:475–487.

- 52 Hartung W, Wilkinson S, Davies WJ, I LB, Platz JVS. Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J. Exp. Bot.* 1998;**49**:361–367.
- 53 Taylor IB, Burbidge A, Thompson AJ. Control of abscisic acid synthesis. *J. Exp. Bot.* 2000;**51**(350):1563–1574.
- 54 Allen GJ, Chu SP, Harrington CL, Schumacher K, Hoffmann T, Tang YY, Grill E, Schroeder JJ. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 2001;411(June):1053–1057.
- 55 Sanchez J-P, Chua N-H. Arabidopsis PLC1 Is Required for Secondary Responses to Abscisic Acid Signals. *Plant Cell* 2001;**13**(5):1143.
- 56 Ritchie SM, Swanson SJ, Gilroy S. From common signalling components to cell specific responses: insights from the cereal aleurone. *Physiol. Plant.* 2002;115(3):342–351.
- 57 Lu C, Zhang J. Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J. Exp. Bot.* 1999;**50**(336):1199–1206.
- 58 Borel C, Frey a., Marion-Poll a., Tardieu F, Simonneau T. Does engineering abscisic acid biosynthesis in *Nicotiana plumbaginifolia* modify stomatal response to drought? *Plant, Cell Environ.* 2001;**24**(5):477–489.
- 59 Barabas NK, Omarov R, Erdei L, Lips SH. Distribution of the Mo-enzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots as affected by nitrogen. *Plant Sci.* 2000;**155**:49–58.
- 60 Mahouachi J, Arbona V, Gómez-Cadenas A. Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regul.* 2007;**53**(1):43–51.
- 61 Leon-Kloosterziel KM, Gil AM, Rujs GJ, Jacobsen SE, Olszewski N, Zeevaart J a. D, Koornneef M. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *Plant J.* 1996;**10**(4):655–661.

- 62 Qin X, Zeevaart JAD. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;**96**(26):15354–15361.
- 63 Shinozaki K, KAZUKU S. Molecular responses to drought and cold stress. *Plant Biotechnol. J.* 1996;**7**:161–167.
- 64 Knight H, Knight MR. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 2001;**6**(6):262–267.
- 65 Xiong L, Zhu J. Review Abiotic stress signal transduction in plants□: Molecular and genetic. *Physiol. Plant.* 2001;**112**:152–166.
- 66 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature□: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000;**3**:217–223.
- 67 Yıldız K, Yılmaz H. Adventif Kök Oluşumu Üzerine Etilenin Etkisi. *Derim* 1995;**18**(1):39–45.
- 68 Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ. Root Formation in Ethylene-Insensitive Plants. *Plant Physiol.* 1999;**121**:53–59.
- 69 Cao W-H, Liu J, He X-J, Mu R-L, Zhou H-L, Chen S-Y, Zhang J-S. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiol.* 2007;**143**(2):707–19.
- 70 Sobeih WY, Dodd IC, Bacon M a, Grierson D, Davies WJ. Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *J. Exp. Bot.* 2004;**55**(407):2353–63.
- 71 Voisin A-S, Reidy B, Parent B, Rolland G, Redondo E, Gerentes D, Tardieu F, Muller B. Are ABA, ethylene or their interaction involved in the response of leaf growth to soil water deficit? An analysis using naturally occurring variation or genetic transformation of ABA production in maize. *Plant. Cell Environ.* 2006;**29**(9):1829–40.
- 72 Chaves M. ., Maroco JP, Pereira JS. Review□: Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 2003;**30**:239–264.

- 73 Prokic L, Jovanovic Z, McAinsh MR, Vucinic Z, Stikic R. Species-dependent changes in stomatal sensitivity to abscisic acid mediated by external pH. *J. Exp. Bot.* 2006;**57**(3):675–83.
- 74 Jia W, Davies WJ. Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals. *Plant Physiol.* 2007;**143**(1):68–77.
- 75 Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006;**57**:431–49.
- 76 Schachtman DP, Shin R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2007;**58**:47–69.
- 77 Stoll M, Loveys B, Dry P. Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *J. Exp. Bot.* 2000;**51**(350):1627–1634.
- 78 Alvarez S, Marsh EL, Schroeder SG, Schachtman DP. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant. Cell Environ.* 2008;**31**(3):325–40.
- 79 Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;**354**(2):585–90.
- 80 Bahrin A, Jensen CR, Asch F, Mogensen VO. Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition, and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 2002;**53**(367):251–263.
- 81 Lindsey K, Casson S, Chilley P. Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends Plant Sci.* 2002;**7**(2):78–83.
- 82 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 2007;**58**(2):221–7.
- 83 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* 1997;**115**:327–334.

- 84 Ehlert C, Maurel C, Tardieu F, Simonneau T. Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. *Plant Physiol.* 2009;**150**(2):1093–104.
- 85 Luu D, Maurel C, Moléculaire P, Inra AC, Umr UM, Viala P, Montpellier F-. Aquaporins in a challenging environment□: molecular gears for adjusting plant water status NIP TIP. *Plant Cell Enviroment* 2005;**28**:85–96.
- 86 Javot H, Maurel C. The Role of Aquaporins in Root Water Uptake. *Ann. Bot.* 2002;**90**:301–313.
- 87 Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol. Cell* 2005;**97**:749–64.
- 88 Wallace IS, Roberts DM. Homology Modeling of Representative Subfamilies of Arabidopsis Major Intrinsic Proteins . Classification Based on the Aromatic / Arginine Selectivity Filter. *Plant Physiol.* 2004;**135**:1059–1068.
- 89 Vandeleur RK, Mayo G, Shelden MC, Gilliam M, Kaiser BN, Tyerman SD. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol.* 2009;**149**(1):445–60.
- 90 Sade D, Sade N, Shriki O, Lerner S, Gebremedhin A, Karavani A, Brotman Y, Osorio S, Fernie AR, Willmitzer L, Czosnek H, Moshelion M. Water Balance, Hormone Homeostasis, and Sugar Signaling Are All Involved in Tomato Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Plant Physiol.* 2014;**165**(4):1684–1697.
- 91 Mahdieh M, Mostajeran A, Horie T, Katsuhara M. Drought Stress Alters Water Relations and Expression of PIP -Type Aquaporin Genes in *Nicotiana tabacum* Plants. *Plant Cell Physiol.* 2008;**49**(5):801–813.
- 92 Galmes J, Pou A, Alsina MM, Tomas M, Medrano, Hipolito, Flexas jaume. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis sp.*): relationship with ecophysiological status. *Planta* 2007;**226**:671–681.

- 93 Zhang Y, Zhao Z, Xue Y. Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009;**60**:21–42.
- 94 Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases †. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* 1998;**62**:597–635.
- 95 Salas CE, Badillo-corona JA, Ramírez-sotelo G, Oliver-salvador C. Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants. *Biomed Res. International* 2014:1–9.
- 96 Simova- Stoilova L, Demirevska K, Petrova T, Tsenov N, Feller U. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environment* 2008;**12**:529–536.
- 97 Bartels D, Sunkar R. Drought and Salt Tolerance in Plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 2005;**24**(1):23–58.
- 98 Hieng B, Ugrinovi K, Šuštar-vozli J, Kidri M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L . cultivars differing in sensitivity. *J. Plant Physiol.* 2004;**161**:519–530.
- 99 Esteban-García B, Garrido-Cárdenas JA, Alonso DL, García-Maroto F. A distinct subfamily of papain-like cystein proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. *J. Plant Physiol.* 2010;**167**:1101–8.
- 100 Timotijević GS, Milisavljević MD, Radović SR, Konstantinović MM, Maksimović VR. Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. *J. Plant Physiol.* 2010;**167**:61–8.
- 101 Dramé KN, Clavel D, Repellin A, Passaquet C, Zuily-Fodil Y. Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. *Plant Physiol. Biochem.* 2007;**45**:236–43.
- 102 Leidhold C, Voos W. Chaperones and proteases--guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;**1113**:72–86.
- 103 Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004;**9**(5):244–52.

- 104 Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 2002;**130**:1143–1151.
- 105 Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiol.* 2004;**134**:1683–1696.
- 106 Grigorova B, Vaseva II, Demirevska K, Feller U. Expression of selected heat shock proteins after individually applied and combined drought and heat stress. *Acta Physiol. Plant.* 2011;**33**:2041–2049.
- 107 Akashi K, Yoshida K, Kuwano M, Kajikawa M, Yoshimura K, Hoshiyasu S, Inagaki N, Yokota A. Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. *Planta* 2011;**233**:947–60.
- 108 Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias A a. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 2008;**148**:6–24.
- 109 Close TJ. Dehydrins□: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* 1997;**100**:291–296.
- 110 Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling. *Trends Plant Sci.* 2000;**5**(6):241–246.
- 111 Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;**97**(21):11632–7.
- 112 Solano R, Stepanova A, Chao Q, Ecker JR. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* 1998;**12**:3703–3714.
- 113 Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-takagi M. Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box – Mediated Gene Expression. *Plant Cell* 2000;**12**(March):393–404.

- 114 Stockinger E, Gilmour SJ, Thomashow MF. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat \square DRE , a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Plant Biol.* 1997;**9**:1035–1040.
- 115 Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-shinozaki K. Two Transcription Factors , DREB1 and DREB2 , with an EREBP / AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low- Temperature-Responsive Gene Expression , Respectively , in Arabidopsis. *Plant Cell* 1998;**10**:1391–1406.
- 116 Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S. Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* 2000;**42**:657–665.
- 117 Okamoto JK, Szeto W, Lotys-prass C, Jofuku KD. Photo and Hormonal Control of Meristem Identity in the Arabidopsis Flower Mutants *apetala2* and *apetala 1*. *Plant Cell* 1997;**9**:37–47.
- 118 Ralph BRK, Mccombs PJA, Tener G, Wojcik SJ. Evidence for Modification of Protein Phosphorylation by Cytokinins. *Biochem. J.* 1972;**130**:901–911.
- 119 The Arabidopsis Genome initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 2000;**408**:796–815.
- 120 Shiozaki K, Russell P. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J.* 1995;**14**(3):492–502.
- 121 Hirt H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 1997;**2**(1):1360–1385.
- 122 Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci.* 2005;**10**(7):339–46.

- 123 Knetsch MLW, Wang M, Snaar-jagalska E, Heimovaara-dijkstrab S. Abscisic Acid Induces Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Barley Aleurone Protoplasts. *Plant Cell* 1996;**8**:1061–1067.
- 124 Keskin BC. Bitkilerde Sinyal İletimi. *Türk Bilim. Derlemeler Derg.* 2012;**5**(1):53–73.
- 125 Banuett F. Signalling in the Yeasts□: An Informational Cascade with Links to the Filamentous Fungi. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* 1998;**62**(2):249–274.
- 126 Sánchez F., de Andrés E., Tenorio J., Ayerbe L. Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *F. Crop. Res.* 2004;**86**(1):81–90.
- 127 Moghaieb R. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. *Plant Sci.* 2004;**166**(5):1345–1349.
- 128 Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002;**53**:225–245.
- 129 Rontein D, Basset G, Hanson AD. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.* 2002;**4**(1):49–56.
- 130 Mani S, Cotte B Van De, Montagu M Van, Verbruggen N. Altered Levels of Proline Dehydrogenase Cause Hypersensitivity to Proline and Its Analogs in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiol.* 2002;**128**:73–83.
- 131 Cramer GR, Ergül A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall E a R, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, Quilici D, Schlauch K a, Schooley D a, Cushman JC. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* 2007;**7**(2):111–34.
- 132 Grimplet J, Wheatley MD, Jouira H Ben, Deluc LG, Cramer GR, Cushman JC. Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics* 2009;**9**(9):2503–28.

- 133 Donson J, Fang Y, Espiritu-santo G, Xing W, Salazar A, Armendarez V, Volkmuth W. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol. Biol.* 2002;**48**:75–97.
- 134 Mekhedov S, de Ilarduya OM, Ohlrogge J. Toward a Functional Catalog of the Plant Genome . A Survey of Genes for Lipid Biosynthesis 1. *Plant Physiol.* 2000;122:389–401.
- 135 Zhu T. Global analysis of gene expression using GeneChip microarrays. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003;**6**(5):418–425.
- 136 Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JKC, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM, Giovannoni J. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J.* 2004;**39**(5):697–714.
- 137 Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 1996;**9**(5):745–753.
- 138 Velculescu EV, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science (80-.).* 1995;**270**(5235):484–487.
- 139 Gibbings JG, Cook BP, Dufault MR, Madden SL, Khuri S, Turnbull CJ, Dunwell JM. Global transcript analysis of rice leaf and seed using SAGE technology. *Plant Biotechnol. J.* 2003;**1**(4):271–85.
- 140 Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 2010;**10**(1):57–63.
- 141 Egan AN, Schlueter J, Spooner DM. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot.* 2012;**99**(2):175–85.
- 142 Mark S, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science (80-.).* 2009;**270**(5235):467–470.

- 143 Aharoni A, Vorst O. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol. Biol.* 2001;**48**:99–118.
- 144 Kuhn E. From Library Screening to Microarray Technology: Strategies to Determine Gene Expression Profiles and to Identify Differentially Regulated Genes in Plants. *Ann. Bot.* 2001;**87**(2):139–155.
- 145 Kumar a., Goel G, Fehrenbach E, Puniya a. K, Singh K. Microarrays: The Technology, Analysis and Application. *Eng. Life Sci.* 2005;**5**(3):215–222.
- 146 Irizarry RA, Hobbs B, Beazer-barclay YD, Antonellis KJ, Scherf UWE, Speed TP. Exploration , normalization , and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;**4**(2):249–264.
- 147 Schaffer R, Landgraf J, Pérez-Amador M, Wisman E. Monitoring genome-wide expression in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000;**11**(2):162–167.
- 148 Öktem HA, Eyidoğan F, Selçuk F, Öz MT, Teixeira da Silva J, Yücel M. Revealing Response of Plants to Biotic and Abiotic Stresses with Microarray Technology. *Genes, genomes and genomics* 2008;**2**(1):14–48.
- 149 Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant Cell* 2001;**13**:61–72.
- 150 Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi- K. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought , cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 2002;**31**(3):279–292.
- 151 Gibly A, Bonshtien A, Balaji V, Debbie P, Martin GB, Sessa G. Identification and Expression Profiling of Tomato Genes Differentially Regulated During a Resistance Response to *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 2004;**17**(11):1212–1222.

- 152 Schwab W, Aharoni A, Raab T, Pe AG. Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria × ananassa*). *Phytochemistry* 2001;**56**:407–415.
- 153 Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. Gibberellin Biosynthesis and Response during Arabidopsis Seed Germination. *Plant Cell* 2003;**15**:1591–1604.
- 154 Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E. Microarray Analysis of Diurnal and Circadian-Regulated Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 2001;**13**:113–123.
- 155 Micheletto S, Rodriguez-Uribe L, Hernandez R, Richins RD, Curry J, O’Connell M a. Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. *Plant Sci.* 2007;**173**(5):510–520.
- 156 Uzun İ. *Bağcılık.*; 2003:1–77.
- 157 Çakır A. Bağcılıkta Abiyotik Stres Koşullarına Yönelik Melezlemelerden Kuraklık ve Tuz Stresine Toleranslı Ümitvar Tiplerin Elde Edilmesi. 2011:1–363.
- 158 Grimes DW, Williams LE. Irrigation Effects on Plant Water Relations and Productivity of Thompson Seedless Grapevines. *Crop Sci.* 1990;**30**(2):255.
- 159 García RAA, Revilla E. *The Current Status of Wild Grapevine Populations (Vitis vinifera ssp sylvestris) in the Mediterranean Basin.*; 2013:1–22.
- 160 Chaves MM, Zarrouk O, Francisco R, Costa JM, Santos T, Regalado a P, Rodrigues ML, Lopes CM. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Ann. Bot.* 2010;**105**(5):661–76.
- 161 Gambetta GA, Manuck CM, Drucker ST, Shaghasi T, Fort K, Mathews MA, Walker MA, McElrone AJ. The relationship between root hydraulics and scion In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in vigour DNA across *Vitis* rootstocks□: what role do root aquaporins play□? *J. Exp. Bot.* 2012;**63**(18):6445–6455.

- 162 Soar CJ, Dry PR, Loveys BR. Scion photosynthesis and leaf gas exchange in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: Mediation of rootstock effects via xylem sap ABA. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2006;**12**(2):82–96.
- 163 Koundouras S, Tsialtas IT, Zioziou E, Nikolaou N. Rootstock effects on the adaptive strategies of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet–Sauvignon) under contrasting water status: Leaf physiological and structural responses. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2008;**128**(1-2):86–96.
- 164 Southey J. Root Distribution of Different Grapevine Rootstocks on a Relatively Saline Soil. *South African J. Enol. Vitic.* 1992;**13**(1):1–9.
- 165 Smart D, Schwass E, Lakso A, Morano L. “ Grapevine rooting patterns□: A comprehensive analysis and review .” *Vitic. Enol.* 2006;**57**(1):89–104.
- 166 Pavloušek P. Evaluation of drought tolerance of new grapevine rootstock hybrids. *J. Environ. Biol.* 2011;**32**:543–549.
- 167 Jiang Y, Yang B, Harris NS, Deyholos MK. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *J. Exp. Bot.* 2007;**58**(13):3591–3607.
- 168 Moumeni A, Satoh K, Kondoh H, Asano T, Hosaka A, Venuprasad R, Serraj R, Kumar A, Leung H, Kikuchi S. Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. *BMC Plant Biol.* 2011;**11**(1):174.
- 169 Cohen D, Bogeat-Triboulot M-B, Tisserant E, Balzergue S, Martin-Magniette M-L, Lelandais G, Ningre N, Renou J-P, Tamby J-P, Le Thiec D, Hummel I. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 2010;**11**:630.
- 170 Molina C, Rotter B, Horres R, Udupa SM, Besser B, Bellarmino L, Baum M, Matsumura H, Terauchi R, Kahl G, Winter P. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics* 2008;**9**:553.

171 Dargie T, Dor A, Manuel A, Molly C. Responses of grapevine rootstocks to drought stress. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* 2014;**6**(1):1–6.

172 Roubelakis-Angelakis KA, Zivanovitch SB. A New Culture Medium for in Vitro Rhizogenesis of Grapevine (*Vitis* spp .) Genotypes. *Hortic. Sci.* 1991;**26**(12):1551–1553.

173 Tattersall EAR, Ergul A, Alkayal F, Deluc L, Cushman JC, Cramer GR. Comparison of Methods for Isolating High-Quality RNA from Leaves of Grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* 2005;**56**(4):400–407.

174 Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright D a, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett J a, Sterck L, Vandepoele K, Grandi SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* 2007;**2**(12):1–18.

175 Vincent D, Ergül A, Bohlman MC, Tattersall E a R, Tillett RL, Wheatley MD, Woolsey R, Quilici DR, Joets J, Schlauch K, Schooley D a, Cushman JC, Cramer GR. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *J. Exp. Bot.* 2007;**58**(7):1873–92.

176 Cramer GR. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2010;**16**:86–93.

177 Grimplet J, Wheatley MD, Jouria H Ben, Deluc LG, Cramer GR, Cushman JC. Proteomic and Selected Metabolite Analysis of Grape Berry tissues under well watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics* 2014;**9**(9):2503–2528.

178 Vijayalakshmi C, Nagarajan M. Effect of Rooting Pattern On Rice Productivity Under Different Water Regimes. *J. Agron. Crop Sci.* 1994;**173**(2):113–117.

- 179 Wilkins O, Bräutigam K, Campbell MM. Time of day shapes Arabidopsis drought transcriptomes. *Plant J.* 2010;**63**(5):715–27.
- 180 Wilkins O, Waldron L, Nahal H, Provart NJ, Campbell MM. Genotype and time of day shape the Populus drought response. *Plant J.* 2009;**60**(4):703–15.
- 181 Lorenz WW, Alba R, Yu Y-S, Bordeaux JM, Simões M, Dean JFD. Microarray analysis and scale-free gene networks identify candidate regulators in drought-stressed roots of loblolly pine (*P. taeda* L.). *BMC Genomics* 2011;**12**:264.
- 182 Payton P, Kottapalli KR, Kebede H, Mahan JR, Wright RJ, Allen RD. Examining the drought stress transcriptome in cotton leaf and root tissue. *Biotechnol. Lett.* 2011;**33**(4):821–8.
- 183 Mundy J, Chua N. Abscisic acid and water-tress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 1988;**7**(8):2279–2286.
- 184 Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in Populus species that differ in their water stress response. *Physiol. Plant.* 1997;**99**(1):153–159.
- 185 Xiao H, Nassuth A. Stress- and development-induced expression of spliced and unspliced transcripts from two highly similar dehydrin 1 genes in *V. riparia* and *V. vinifera*. *Plant Cell Rep.* 2006;**25**(9):968–77.
- 186 Thipyapong P, Melkonian J, Wolfe DW, Steffens JC. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.* 2004;**167**:693–703.
- 187 Blein J, Coutos-th P, Marion D, Ponchet M. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci.* 2002;**7**(7):293–296.
- 188 Parry MAJ. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 2003;**54**(386):1321–1333.
- 189 Parry MAJ. Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. *Ann. Bot.* 2002;**89**(7):833–839.

- 190 Suzuki Y, Nakabayashi K, Yoshizawa R, Mae T, Makino A. Differences in expression of the RBCS multigene family and rubisco protein content in various rice plant tissues at different growth stages. *Plant Cell Physiol.* 2009;**50**(10):1851–5.
- 191 Ranjan A, Nigam D, Asif MH, Singh R, Ranjan S, Mantri S, Pandey N, Trivedi I, Rai KM, Jena SN, Koul B, Tuli R, Pathre U V, Sawant S V. Genome wide expression profiling of two accession of *G. herbaceum* L. in response to drought. *BMC Genomics* 2012;**13**(1):94.
- 192 Ranjan A, Pandey N, Lakhwani D, Dubey NK, Pathre U V, Sawant S V. Comparative transcriptomic analysis of roots of contrasting *Gossypium herbaceum* genotypes revealing adaptation to drought. *BMC Genomics* 2012;**13**(1):680.
- 193 Ge T, Sui F-G, Bai L, Lu Y, Zhou G. Effects of Water Stress on the Protective Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Roots and Leaves of Summer Maize. *Agric. Sci. China* 2006;**5**(4):291–298.
- 194 Gallé Á, Csiszár J, Secenji M, Tari I, Györgyey J, Dudits D, Erdei L. Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in *Triticum aestivum* during polyethylene-glycol induced osmotic stress. *Acta Biol. Szeged.* 2005;**49**(1-2):95–96.
- 195 Vernoux T, Wilson RC, Seeley KA, Reichheld J, Muroy S, Brown S, Maughan SC, Cobbett CS, Montagu M Van, Inzé D, May MJ, Sung ZR. The Root Meristemless1 / Cadmium Sensitive2 Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development. *Plant Cell* 2000;**12**:97–109.
- 196 Chavarria G, dos Santos HP. Plant Water Relations□: Absorption , Transport and Control Mechanisms. *Adv. Sel. Plant Physiol. Asp.* 2012:105–132.
- 197 Wu B, Steinbronn C, Alsterfjord M, Zeuthen T, Beitz E. Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J.* 2009;**28**(15):2188–94.
- 198 Weig A, Deswarte C, Chrispeels MJ. The Major Intrinsic Protein Family of Arabidopsis Has 23 Members That Form Three Distinct Groups with Functional Aquaporins in Each Group '. *Plant Physiol.* 1997;**114**:1347–1357.

- 199 Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H. Expression of Plasma Membrane Water Channel Genes under Water Stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiol.* 1997;**38**(11):1226–1231.
- 200 Mariaux J, Bockel C, Salamini F, Bartels D. Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol. Biol.* 1998;**38**:1089–1099.
- 201 Fouquet R, Leon C, Ollat N, Barrieu F. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. *Plant Cell Rep.* 2008;**27**:1541–1550.
- 202 Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 2004;**54**:713–725.
- 203 Bogeat-Triboulot M-B, Brosché M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T, Altman A, Hausman J-F, Polle A, Kangasjärvi J, Dreyer E. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol.* 2007;**143**:876–892.
- 204 Chen THH, Murata N, Regulated C. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002;**5**:250–257.
- 205 Karamanos AJ. The Involment Of Proline And Some Metabolites In Water Stress and Their Importance As Drought Resistance Indicators. *Bulg. J. Plant Phsyiology* 1995;**21**(2-3):98–110.
- 206 Kliewer WM, Nassar ALYR. Changes In Concentration Of Organic Acids, Sugars And Amino Acids In Grape Leaves. *Am. J. Enol. Vitic.* 1746;**17**(1):48–57.
- 207 Kishor PBK, Hong Z, Miao G-H, Hu C-AA, Verma DPS. Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants '. *Plant Physiol.* 1995;**108**:1387–1394.

208 Zhu J, Liu J, Xiong L. Genetic Analysis of Salt Tolerance in Arabidopsis: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *Plant Cell* 1998;**10**:1181–1191.

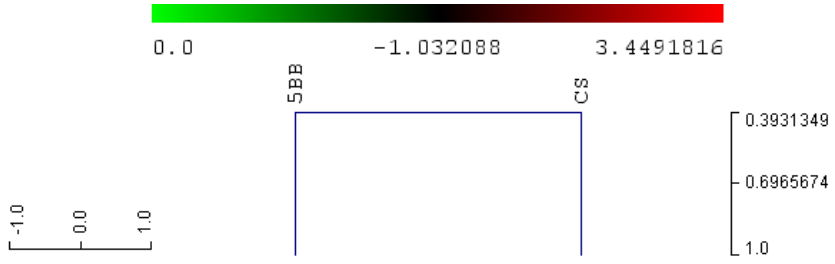
209 Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Lister D, Graaff E Van Der, Kunze R, Frommer WB. The Role of D 1 -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation. *Plant Cell* 2004;**16**:3413–3425.

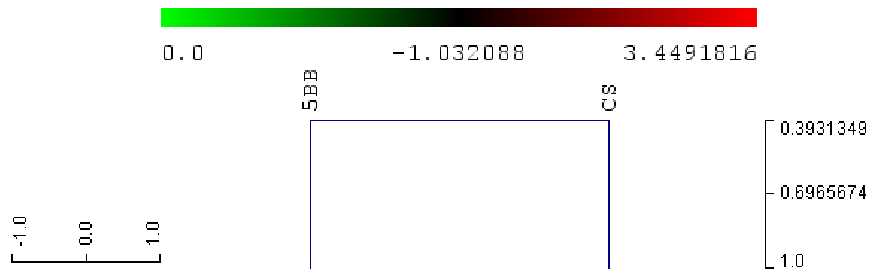
210 Frazier TP, Sun G, Burklew CE, Zhang B. Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Mol. Biotechnol.* 2011;**49**(2):159–65.

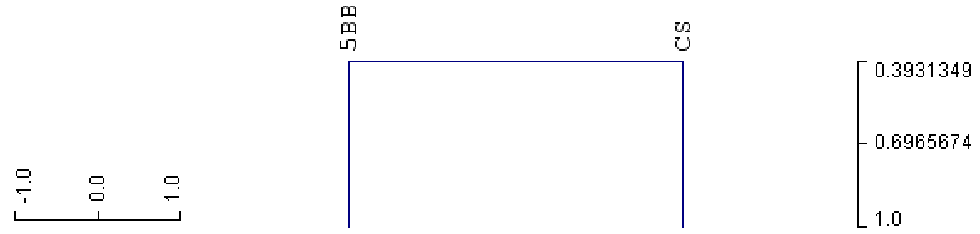
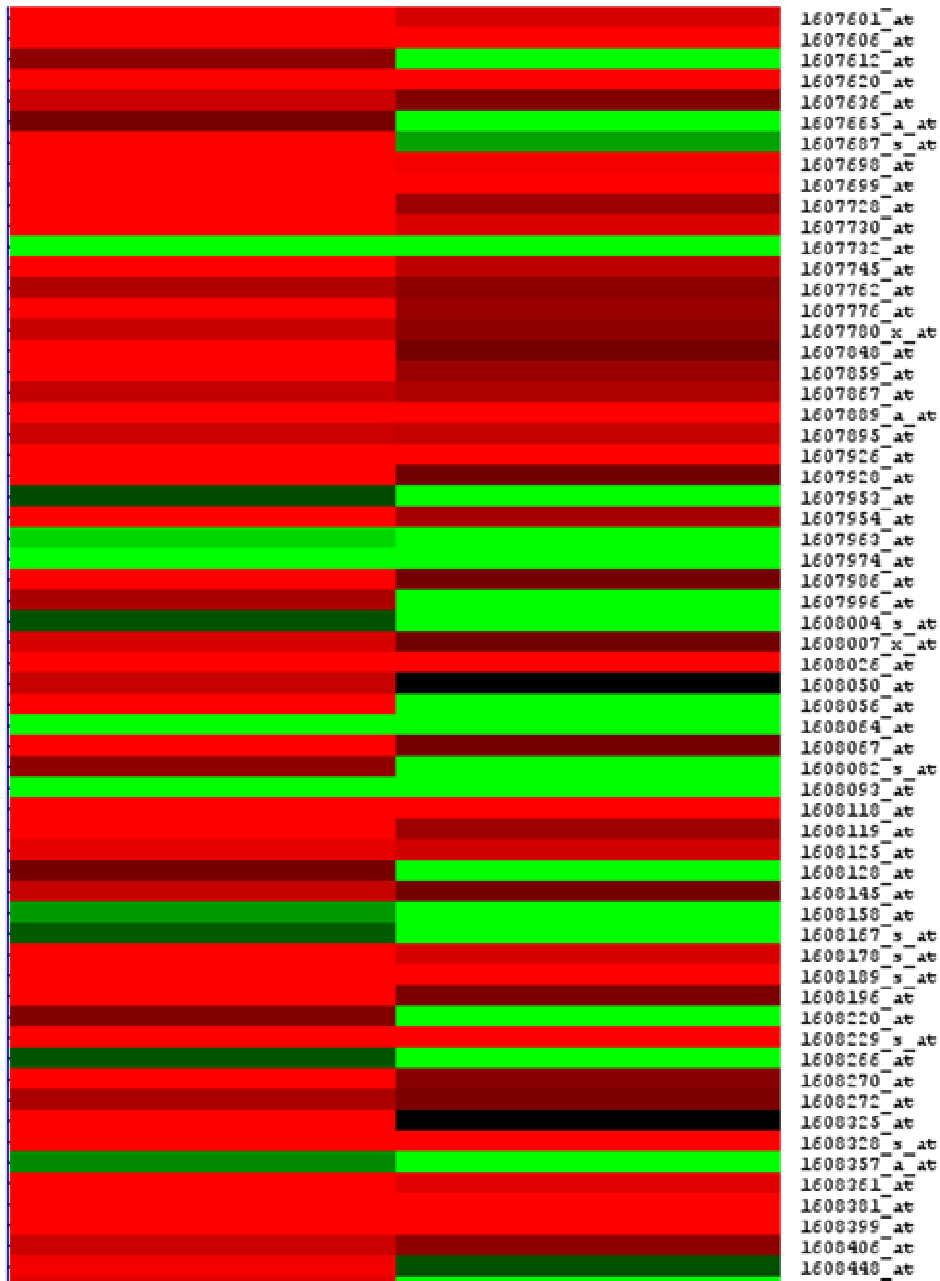
211 Xiao X, Yang F, Zhang S, Korpelainen H, Li C. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiol. Plant.* 2009;**136**(2):150–68.

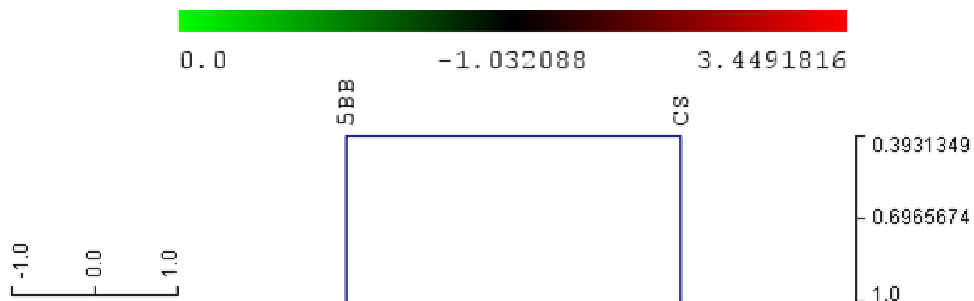
212 Kadioglu A, Terzi R, Saruhan N, Saglam A. Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. *Plant Sci.* 2012;**182**:42–8.

EK1:Genotiplere ait ifade farklılıklarını görselleştiren Heatmap grafiği





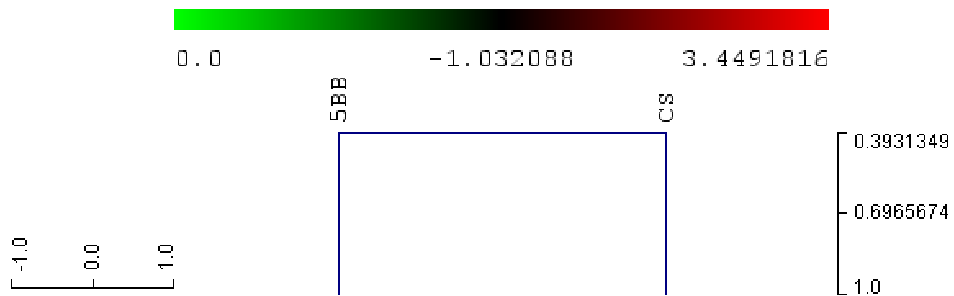






0.0 -1.032088 3.4491816







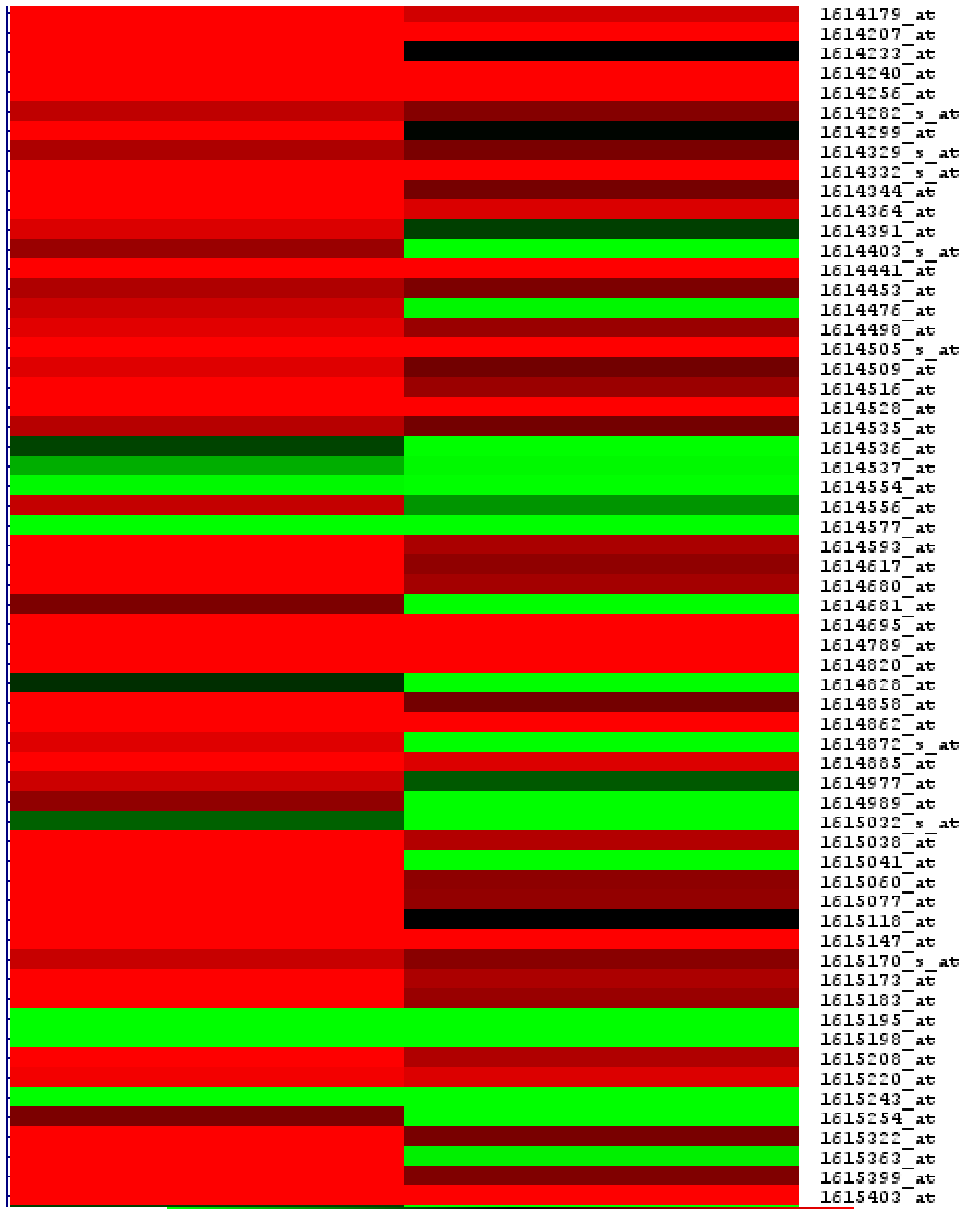
0.0 -1.032088 3.4491816



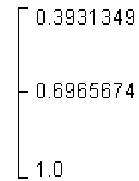
-1.0
-0.0
1.0

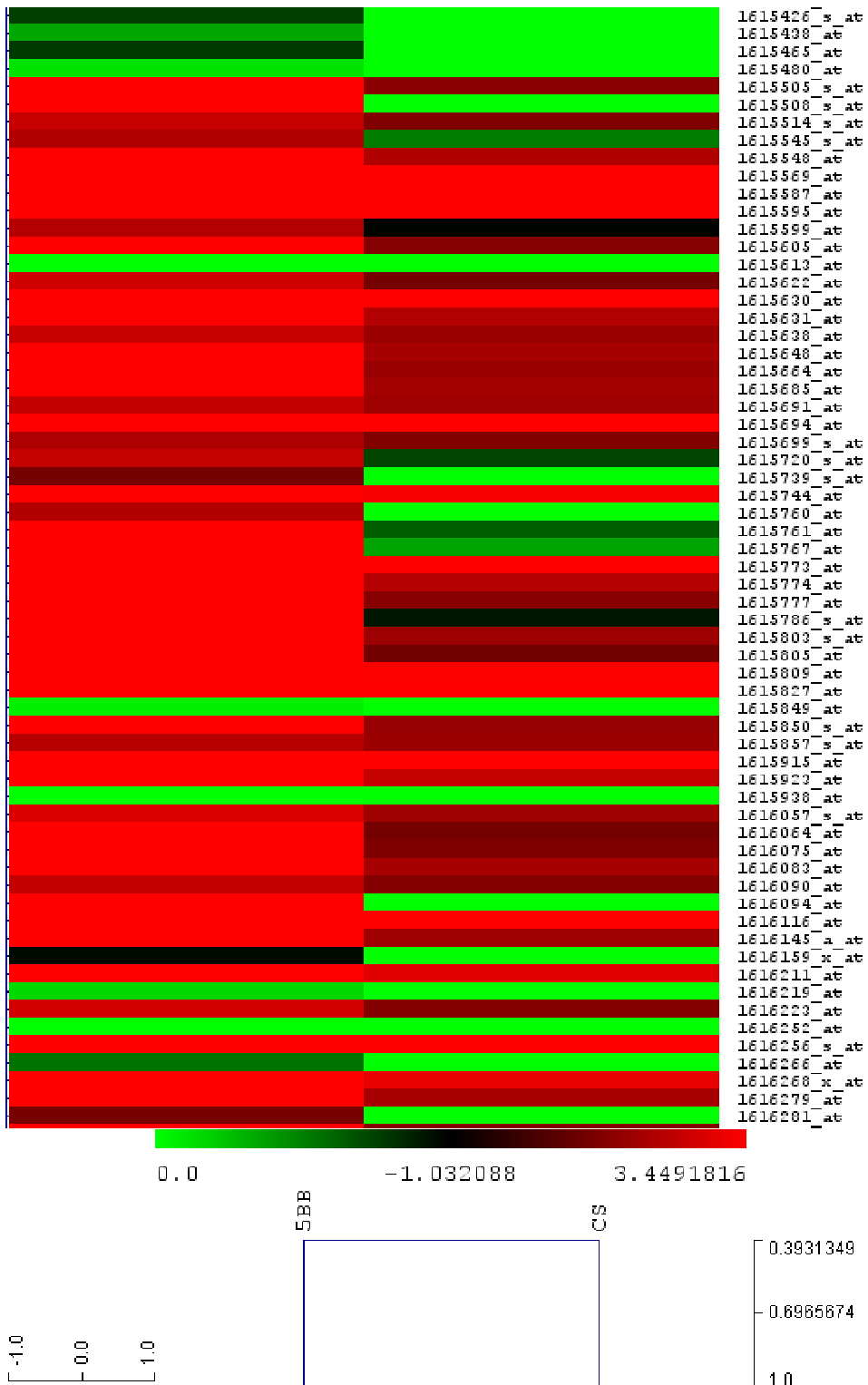
0.3931349
0.6965674
1.0





0.0 -1.032088 3.4491816

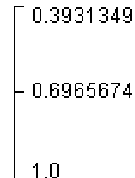






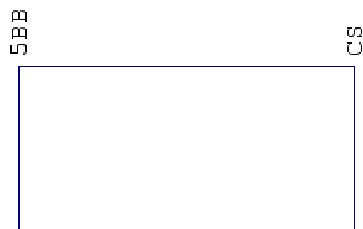
0.0 -1.032088 3.4491816

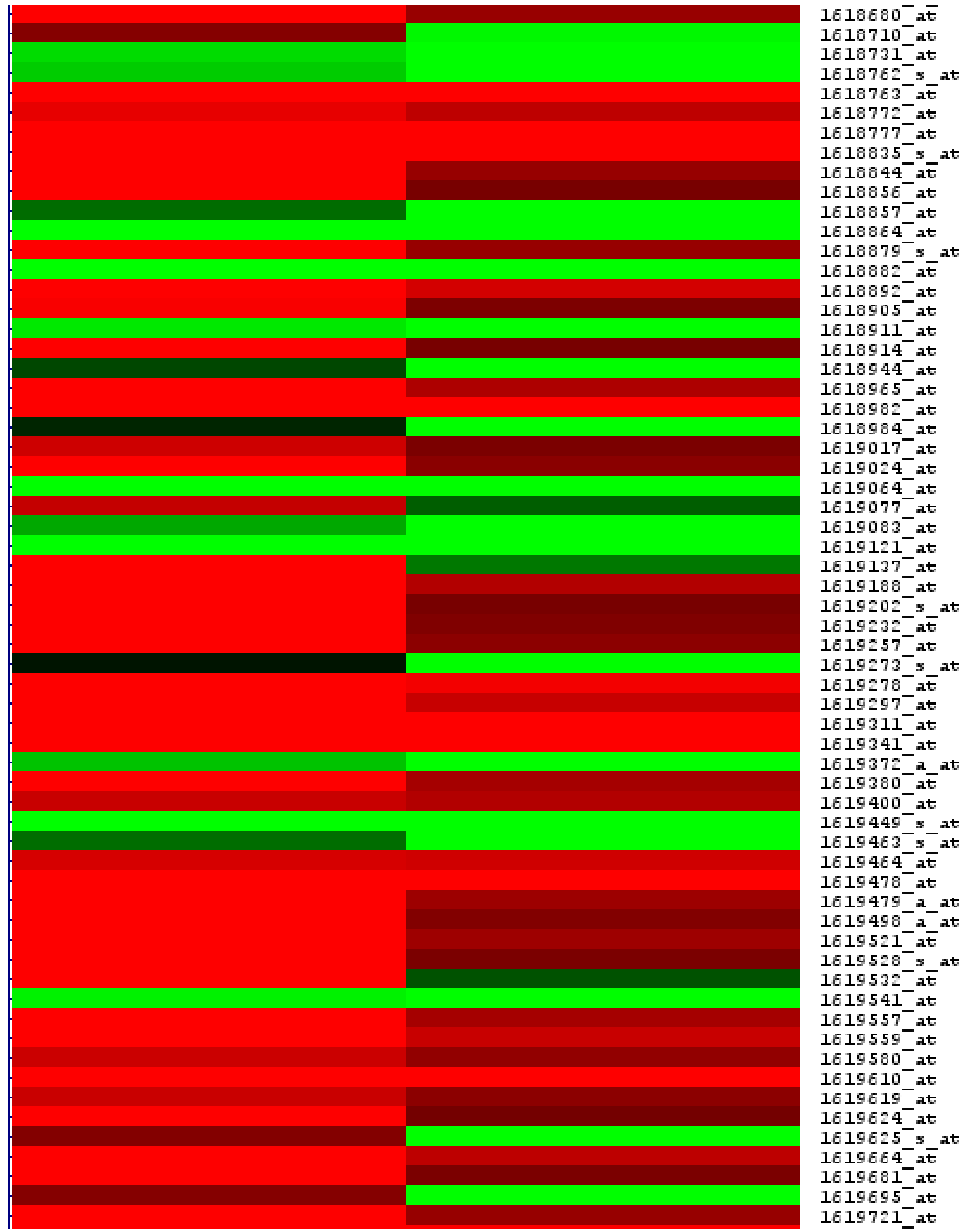
SBB CS





0.0 -1.032088 3.4491816





1618680_at
 1618710_at
 1618731_at
 1618762_s_at
 1618763_at
 1618772_at
 1618777_at
 1618835_s_at
 1618844_at
 1618856_at
 1618857_at
 1618864_at
 1618879_s_at
 1618882_at
 1618892_at
 1618905_at
 1618911_at
 1618914_at
 1618944_at
 1618965_at
 1618982_at
 1618984_at
 1619017_at
 1619024_at
 1619064_at
 1619077_at
 1619083_at
 1619121_at
 1619137_at
 1619188_at
 1619202_s_at
 1619232_at
 1619257_at
 1619273_s_at
 1619278_at
 1619297_at
 1619311_at
 1619341_at
 1619372_a_at
 1619380_at
 1619400_at
 1619449_s_at
 1619463_s_at
 1619464_at
 1619478_at
 1619479_a_at
 1619498_a_at
 1619521_at
 1619528_s_at
 1619532_at
 1619541_at
 1619557_at
 1619559_at
 1619580_at
 1619610_at
 1619619_at
 1619624_at
 1619625_s_at
 1619664_at
 1619681_at
 1619685_at
 1619721_at

0.0 -1.032088 3.4491816



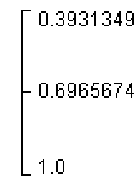
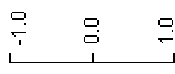
-1.0
 0.0
 1.0

0.3931349
 0.6965874
 1.0



0.0 -1.032088 3.4491816

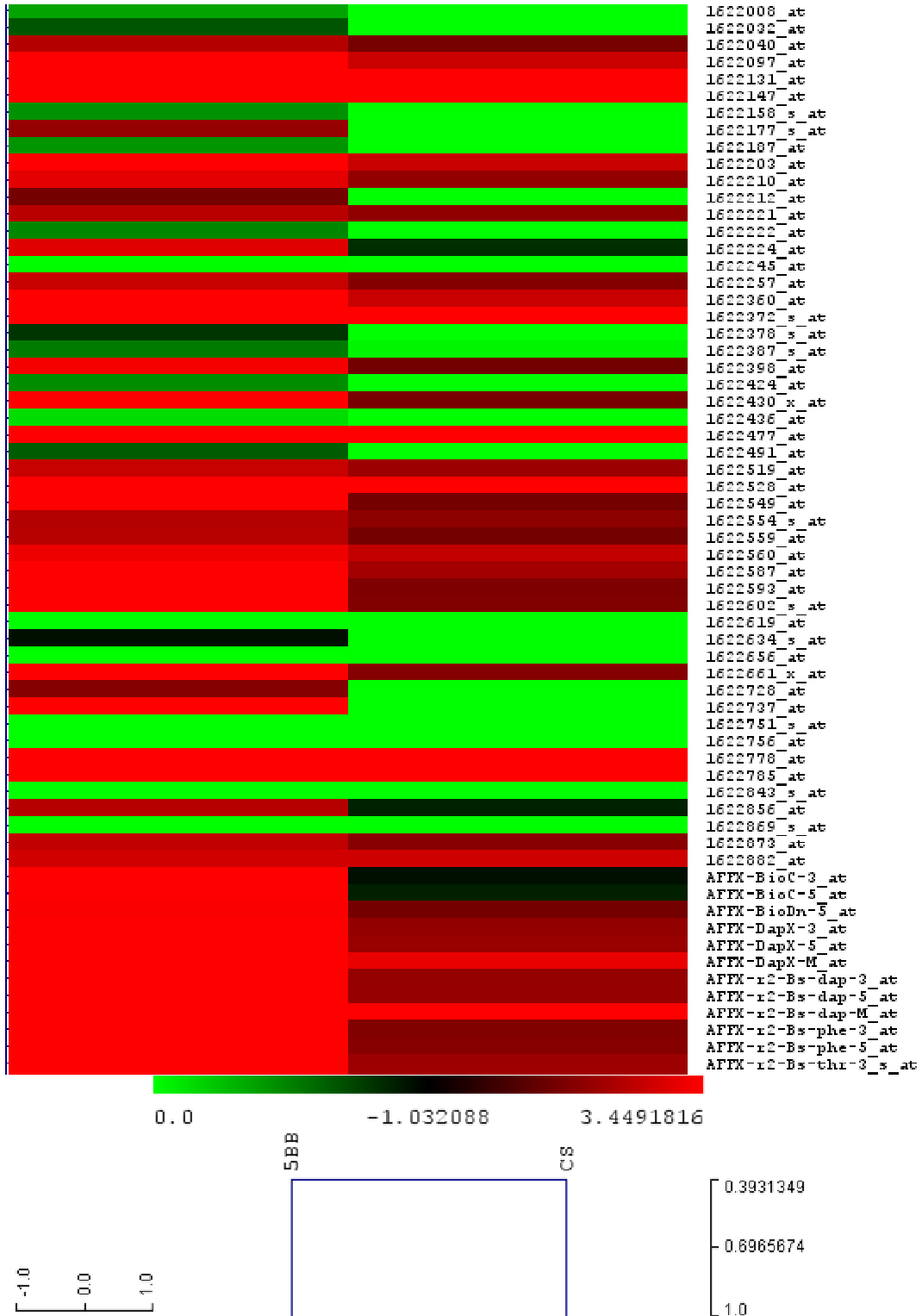
5BB CS





0.0 -1.032088 3.4491816







0.0 -1.032088 3.4491816



0.3931349
0.6985674
1.0



0.0 -1.032088 3.4491816



-1.0
-0.0
1.0

0.3931349
0.6965674
1.0

		1607805_s_at
		1607813_at
		1607831_at
		1607846_at
		1607854_at
		1607861_s_at
		1607865_at
		1607874_at
		1607878_at
		1607887_at
		1607931_s_at
		1607940_at
		1607942_at
		1607952_at
		1607960_at
		1607967_at
		1607975_s_at
		1607984_at
		1607992_at
		1607998_at
		1608009_s_at
		1608040_at
		1608041_at
		1608052_s_at
		1608066_at
		1608069_at
		1608070_at
		1608080_at
		1608087_s_at
		1608096_at
		1608100_at
		1608102_s_at
		1608110_at
		1608121_at
		1608123_at
		1608124_at
		1608129_at
		1608138_s_at
		1608146_at
		1608162_at
		1608166_at
		1608207_at
		1608252_s_at
		1608256_at
		1608259_at
		1608261_at
		1608262_at
		1608263_a_at
		1608288_at
		1608315_at
		1608320_at
		1608359_at
		1608365_at
		1608369_s_at
		1608379_at
		1608384_at
		1608410_at
		1608412_at
		1608423_at
		1608425_at
		1608440_at
		1608442_at
		1608449_at

EK2: EST dizileri ile eşleşme gösteren yaprak-kök transkriptomlarının listesi

Probe Set ID	Pro b x	prob y	Prob sorgu pozisyonu	Prob Dizisi	TSeq_sequence Eşleşmesi
1606669_s_at	566	597	217	TGCTCTTCCTTTACATTACGGTGCT	11
1614916_at	19	237	111	GACGTTGAAACCTCGGGACAAGAGT	12
1616933_at	204	105	253	AGCTCTTCGAATCAAGGGCCATCAC	16
1621835_at	40	429	181	GATTTCGAGAGGGTCTGTCAGCAGAA	19
1610955_s_at	208	471	520	GTCTTCGAGATCGTGATCACTTTTCG	21
1611643_at	449	411	463	GATCGCATCGAAGCCAAGGCGTACT	28
1608231_at	259	229	129	CAGGCATTGTTAGCACCTTCAACTA	38
1615722_s_at	417	587	469	TGACGAGGGCAGTGTACTACATGGT	40
1619703_at	186	511	544	GGTGAACGCTGGCTACACCAAAGGA	40
1614910_at	693	111	696	AGCCAATTCTCTATGCTACATCTTC	41
1608869_s_at	17	57	258	ATGTTGTTTCCACAGACTTCATCGG	42
1606669_s_at	633	275	106	CCTTCTCCGCCAAGGACTATCATGA	44
1615808_s_at	369	375	747	GACCCAAGAGGAGTGCCAGAGACT	44
1621076_at	516	65	639	AGGCTGTGATGCTTCATTGATTGC	47
1614910_at	682	715	225	TTGCTTACCCTTCCAATTTTGTTT	48
1619993_at	518	149	348	AAAGTCGCCTTCTCATCTCTGTT	50
1614093_s_at	536	261	1149	CTGGAAGGGATGCATTTATTAGATA	51
1621225_at	679	351	175	GAACATTTTGCGGATTTTCCCAGAA	54
1619695_at	341	63	104	ATGGCTTCATCTCTCTCCGGAGCTT	59
1608272_at	453	353	496	GAACAAGCTGCTGAACTTTTCCAAA	62
1609555_at	4	89	150	AGATCAGTTGCAGTTGCCGGCTGGT	64
1621473_at	52	697	114	TTAGACGCCAATTCCGCTGATTTTCG	72
1619517_at	76	69	271	AGGCAATTCCTCCTGCAGATGCAAT	74
1619501_at	567	219	708	CACCTGGGTTCTGGGTTGGAGTTCA	77
1610982_at	585	441	44	GTTACCTGGCAACAATTCATCA	83
1614916_at	147	115	261	ACTGTCCTAACAGTGATCGGATACA	83
1617244_s_at	156	395	575	GAGGGATGAGAACTGCCCCGAATCA	84
1610896_at	478	139	313	AAATTCTACCAGTCTCTAGCTAAGG	90
1610982_at	467	107	103	AGCTGCTGTCATCTATAACAACGAC	92
1609758_at	587	55	712	ATGTAGGGTTCCAAGTTTCTGCCT	93
1620798_s_at	126	337	135	GAAGGAGATCAAGTGTTAAGCAAGC	98
1620870_s_at	433	129	1100	ACATTTTGTACTTCGGCCATGGGT	98
1622037_s_at	51	343	333	GAAGAAATGCCCAAGCTTCTTGCAC	103
1616459_at	320	701	686	TTAATGTGGAGAGATTTGTTTTCTT	105
1621535_s_at	567	289	613	GCCCATGCTCAAGGCTGGTAATGCT	105
1614553_at	618	195	739	AATGCTGGAGGCCTTGCAAGACACA	110
1607228_at	45	645	832	TACAAGAACCCCAAAGTGCCAAACG	111
1617078_at	189	229	234	CAGGAGTTTGTGATGAAGTCAGTA	111
1621378_at	518	75	807	AGGGAAGTCTATGCCTGCTGACTC	113
1614030_at	153	617	359	TCTGTCCTGTTTCATGTGATGGCTAA	114
1621033_at	501	67	199	AGGTTGTTTTTAGCTGATTTATATA	115
1612570_at	284	13	301	ATTAAGCAGCTTCAAGATGGGTA	119
1616946_at	128	287	510	GCCATCGATCGCTTTGAACCAAAAA	127
1608864_s_at	187	107	291	AGCGTGGAAGGAAGGTATACCTCAC	133
1613999_x_at	151	111	271	AGCCTTATCGGGTTTCAGCAAGCGT	133
1618373_at	440	261	490	CGGTTTCGACCTGCACTGGGATGAC	133
1615114_at	122	319	754	GCAGATCTTCTAAAAGTCCCTGTGA	137
1608087_s_at	59	373	131	GACGATGTTGAGTTGGTTGCAGTCA	139
1608087_s_at	597	231	181	CATGACCTACATGTTTAAAGTACGAC	142
1610679_at	398	479	617	GTGCAGGTACGGATCTGGATCTCC	146

1616310_at	353	437	217	GTTGCCATTTGTGCTATATGTGTGA	148
1622361_s_at	315	199	657	AATCAGACTATGCTGGATTACAGA	159
1614910_at	674	361	617	GACAACCTCGGATGGGAAATACAGCT	161
1615105_s_at	595	167	618	AACCCTGATAAGATTCCATTTGTCC	165
1618915_at	324	467	286	GTCACATGTTCCACCAATGCATTC	167
1620700_at	220	297	567	GCTGGAAGAGGCTGTTCCGAGTATT	173
1619524_at	684	327	108	GAATTTTGGGCAGCTAGAATCTTCA	174
1611241_at	81	145	310	AAAGTGGGCCCAAGTGGACACCAAG	179
1608328_s_at	340	543	533	GGAAGCAGCAGCATTGGACGATCT	181
1615015_at	649	627	383	TCAGGCTATAAGTCTTGGGAGAAA	185
1614916_at	570	511	512	GGTGAAGGCGTTTCAGTCTTCGCTC	186
1619968_at	196	137	235	ACAAGCATGCGGAGGAGACAGCCAA	187
1620761_at	651	79	531	AGTCCCTCAGTGTTCGGCCTAGGCC	188
1610738_at	283	489	158	GTGTCAGCGTCCCTGAAGCTTTCAT	192
1616343_at	526	267	383	CGCCCAATCCCTGTGCTTAGCAT	194
1619601_at	655	51	198	ATGACAGACACGTATTGCCCAGAGT	204
1607076_s_at	725	523	625	GGATCTCCCAGTAACGACGCGGCCA	208
1614558_at	35	491	104	GTGGTTTCAACCACCAAGCTTTTG	210
1614152_at	186	181	671	AAGATTGGCCAGATTCTCAGGGTCA	211
1619051_at	5	551	321	GGCGGTGGTAAGTACTGAGATATGCTC	213
1622721_at	245	487	125	GTGTTGGGAGGTATCGCCACTTCTC	230
1608766_at	247	173	794	AAGTGTCTTACATTAGTGTCCCTGT	233
1622734_at	111	167	124	AACGGCAAGCTCTTCACCCAGAGTT	234
1610592_at	441	289	524	GCCCTTCATCCCAAGGTGCGACTCT	235
1622037_s_at	638	713	447	TTGTGGACTCCCTTCTAAACGCTGG	235
1615722_s_at	363	393	106	GAGTGGGAGCGAACAAGTTCTCAGA	237
1619703_at	410	297	551	GCTGGCTACACCAAAGGAGATGGGC	237
1619211_s_at	87	373	543	GACCTCGCTTTCGACTCCGGAGGGA	242
1607934_at	459	279	103	CCATGGATCGTGAAAGCGGCAGTCG	244
1609441_at	23	145	102	AAATGGGTTAGTGTCTTCTCTCTCT	247
1615169_at	141	523	409	GGTTCTTGTATTGAAATGCATCCTT	250
1608114_at	395	103	163	AGCATGCAAGGACGCTTGGCCAAA	253
1615459_at	389	63	587	ATGGACCTATTAACGCCTGTACTC	255
1618370_at	287	689	435	TTGTTGGGCCCTTTGTGAAGACCGG	258
1617342_at	449	659	112	TAGGGTTTCTTCTTCTTATCCTTCT	263
1614093_s_at	715	349	1026	GAACTAATTCAGACTGTGAAACTGC	272
1608896_at	540	9	261	ATTCTGGAGGACGTGGCAGCCACCA	273
1615105_s_at	556	463	523	GTAACAAGATGGATGCCACAACACC	274
1610955_s_at	193	301	544	GCTCTGGTCTACACCGTCTATGCAA	275
1621528_at	587	293	194	GCGTCCACGATTTCCAAGCTTGGGA	277
1606813_s_at	494	191	531	AATGTGAACAAGCTTCTGGTTGGAA	283
1622368_at	299	337	501	GAAGGCATTGGCTCCACTCAGGGAG	284
1607932_at	89	209	160	CAATAACTGCTACAAGCAAGGCCAT	285
1609376_at	530	509	110	GGTGGACTATTTTGTTCACTTCCGA	290
1621161_at	255	305	1015	GCTTCAGTTGTCTAATCCAATCGA	293
1621072_at	553	649	668	TACTCACTGGTCATGGAGATTCAA	295
1607904_at	51	573	163	TGTGAAGCTATATTATCTCTCTCGC	304
1619110_at	282	7	185	ATTGCCCTTACCAGTTGAGCTCGGA	305
1617897_at	41	263	482	CGGTATTTCCCGGATATTTGCAAAA	313
1616880_at	521	655	108	TAGAGATCACTCTGGGCATCTGTCT	319
1606778_at	544	143	150	AAATGAACGGCGGTCCATCTGGTTT	325
1608120_at	394	81	363	AGTAATCATATACCCATCGCCATTG	328
1622640_at	448	493	111	GTGGAGTTTGACATTACAGCTTGAGT	329
1616438_at	182	327	603	GCAAGGACCAACCTCACGTTGATA	334
1618875_s_at	325	179	805	AAGAGCTCTGAACTTTCTGCTCTAT	337
1608938_at	160	345	597	GAAGCATGACAGAGAGGTGCACCAT	342
1608138_s_at	681	1	3457	ATACGAGGTACTTTATTGCTTAGTC	343
1618524_x_at	654	97	73	AGAAGTCCTCCGTTTCGTCTGTGA	343

1618125_at	154	501	207	GGGAGACCCCGATTATCACCAAGAG	344
1607807_s_at	344	55	1174	ATGTATTTTCCCATGGTTTATGATA	347
1621000_at	537	245	268	CTTTGAAGACTCTACCACACTGGTT	349
1619794_at	6	717	705	TTGCCTACTCCTTTGATCATGATCA	352
1608028_at	573	473	148	GTCGATATGTTATAAGCGCGGTCA	355
1609107_at	55	439	469	GTTCCGCGCTGAATCCTAGCGGGAA	360
1616740_s_at	376	29	522	ATAACTGATAAGCTTGGCCTCCACT	362
1609342_at	107	221	149	CACTACAACCGCTATGGCATTGCA	368
1607051_x_at	475	629	121	TCAGGGCTCAGCGTGCTAAATCAAT	370
1612324_s_at	229	407	559	GATACATGATATCCTCGGGTCAGCC	370
1613104_at	478	99	621	AGCAAGGTTTGTCCGAACCTGACC	374
1611671_at	463	305	563	GCTAGCATGTGGTTTATTCTCCTCT	376
1606530_s_at	302	671	612	TTTGTGCTGGAATAATAGCGAATAA	378
1612791_at	180	633	178	TAAGTCAAAGACTAACCCAGGCCA	378
1620011_at	713	357	288	GAAAGCCTGGTCCTCACAAGATTCA	380
1608229_s_at	154	331	178	GAATATGTTCTTCAGGGACATCTAC	381
1618525_s_at	447	539	202	GGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGA	382
1614558_at	582	321	357	GCAACTACGTGGTGCGAGTCAAACCT	388
1616901_at	601	381	491	GAGCATCTCTTCTGGATTTGGAGTA	390
1613935_at	462	73	697	AGGGTAGAACCATGTCATCTAAGTT	394
1617992_a_at	634	467	682	GTCAAGGACCCGGAATGGCTCATTG	397
1619901_at	383	125	56	ACTAGAGCTGGGTGCCCTAACTCAC	398
1622369_at	313	123	529	ACTGTTGGGCAGATGTTTGTGATTC	407
1611703_at	542	461	413	GTACTGGGTCAGATGAGTTGAAACA	415
1618043_a_at	663	15	69	ATTTTTGTTCAAGATTATGATGAGA	423
1608127_s_at	216	517	489	GGTCAAATCAATTCCAGAGCCGTAT	433
1621829_at	582	265	153	CGAAAACCTTCTCTCTTGTTC AAG	437
1622068_at	347	433	384	GTTAGACCTTATGTTGAACCCCAAG	439
1615672_at	329	135	627	ACACACCGCTACTCAGACAAACATG	440
1610329_at	582	163	129	AACTCTCTTTCGATCTCACTCATTT	449
1617430_s_at	67	31	561	ATACAGATTCCTACAAC TACAAC T	451
1607013_a_at	9	641	659	TAAGCAGAGGCCTCAGACTCTGGAC	456
1619308_at	192	421	109	GATATGGCTGCCAAGCTCATGCGCG	463
1618448_at	155	507	300	GGGTGGCTCCCGGATGGTTCCATCA	466
1619390_at	80	559	617	TGGCTCCAAAGCTGTTCTTAATTTT	469
1621771_at	679	685	695	TTTTCTACAGGGAGCCTGAGGAGCC	470
1611047_at	183	603	1251	TGCCTCCGAGGACTTCAACACAGTT	471
1611671_at	341	103	663	AGCAGTTCTGGGTCATTGGTGGTAC	472
1607515_at	97	387	605	GAGAGAAAACCTTCAGCTGAGAGATA	482
1615776_at	613	107	466	AGCTGCAGCCCCAGCAGAGGAAGCT	487
1620651_at	96	109	140	AGCTGGCTAGGGTGTGCCAGTACAT	489
1617430_s_at	323	323	642	GCAACAGATGCAGTCATATCATTCA	490
1620505_at	657	641	613	TAGACCTGGTAAACAACCCTGATCT	490
1612436_s_at	516	533	43	GGAGATGCCAAAGCTGTATTGAATT	491
1622360_at	562	113	701	ACCTCCACCTGAGTATCTTTACAGT	492
1616981_at	392	237	1119	CATTGTGGTACGAGCACCTTGGCAT	493
1620875_at	549	389	216	GAGATCTGATCGAGACATTCCTTGA	494
1622732_at	467	317	159	GCAGTGGCAGCAGCGGAAGCAACAT	498
1614387_s_at	556	553	101	GGCGGATTGACAACATCAGCTTCT	500
1622607_at	85	245	184	CGGCTGGTTTACACTGTATACGCA	500
1616294_s_at	204	411	806	GATGCCATTGAGGAGTATACAGCT	502
1621699_at	451	25	1016	ATATGGGCCTGGTTGCATACACAAA	504
1622564_at	5	427	545	GATTGGAAAGCCTCATACTGTGCCG	505
1621296_at	598	87	190	AGATTTCAATTTGGAGCCTCTTGCT	506
1622282_at	308	385	718	GAGACAGCGTTGTCGCTTTGGCACC	512
1607676_at	242	531	114	GGAGGAACCCTCAAAGCAATGGAT	514
1612496_at	86	165	299	AACTGGGTCAGGCATGGGAACACTC	515
1622004_at	56	493	86	GTGGTCTTCTGCCTATGATTGCAAA	516

1616311_at	101	563	108	TGGATCGCCCCAATCTCGAAGACTA	517
1612655_at	186	615	126	TCTCGCTACGTGCTTGATCGGAGGC	520
1614066_at	270	121	172	ACGGCTGGTATGTCGAGATCCCTAA	526
1612314_at	290	289	354	GCCTCTGGTTCTTTGGCTTAATGGA	529
1610028_at	577	717	542	TTGCAACCCCTGGTTCTACAACAAG	535
1606498_s_at	310	49	501	ATGCGATCACTTGAGACAGGTGTTT	536
1611211_at	525	151	110	AAACGCCTCTACTCTGTCTTCAAAG	537
1617962_at	431	375	495	GACCGAGGACAGCATCAACGACTTC	538
1619181_at	717	319	493	GCACTGTCCCTTATCGTAACTTTGGT	543
1608087_s_at	15	301	386	GCTGCCCATTTGAAGGGTGGTGCTA	546
1615682_s_at	476	463	452	GTACAGCCAAGACCTCGTGGCTTGA	551
1621502_at	222	167	525	AACGCTTCTTGGCTGGTTGCGAATT	552
1607992_at	488	359	362	GAAATGCATCTGTGGCAACTGCTTG	559
1615458_at	675	85	231	AGTTGCCAGCCTTTCGATATACAGA	563
1614671_at	571	217	606	CACTTTCCTGCCTCTAAAAACAGG	567
1608119_at	468	701	114	TTCTAGCCCCGATTCTGACTTAGAG	568
1614234_at	392	39	185	ATCTATCCCTTCATTTCTGGCATCA	569
1617261_at	77	589	655	TGACGGTGTTCCTTCGCCGGAGTTGT	573
1620765_at	238	175	753	AAGCAATTCTTTGTAGACCACCTG	574
1606669_s_at	30	609	407	TCCTGGCCCAGGAGGTGTCGCTGAT	575
1607228_at	612	377	766	GAGCTGGAACCCGAAGTCATTGAAT	579
1608579_at	316	373	451	GACGCCAAGTACCTGGTCGACGTGT	579
1610794_at	567	267	586	CGCGCCCGCTTGACAACAGAAAGG	581
1621115_at	572	129	146	ACATTGCCTTACTTTTGAGCTTCTG	582
1622000_s_at	382	335	121	GAAGGCCAAGAATCCAGATCCTCCG	584
1608372_at	330	573	397	TGTCGCTGTAGGAATATGGGCTTAC	588
1614631_at	7	641	415	TAAGATCACACCTTCAACCCGAGTT	589
1608865_at	547	431	554	GTTGGCTTACAAATCTGCTCAGGAC	599
1611184_at	533	651	368	TACGCTATCACCTTGGTCTGACCAA	600
1609377_at	245	511	578	GGTGTGATCCTTAACAAGGCCCAGA	605
1613431_at	670	129	53	ACATTGTGGAGAGTCGCCGACCGGC	612
1609697_at	99	639	185	TAATGTGCCTACCTTGATCTCTGAA	618
1615105_s_at	669	117	492	ACCCTTGGTGTGAAGCAGATGATTT	625
1610955_s_at	90	505	667	GGTGGATCAATGAACCCCGCCCGCT	626
1610218_s_at	262	669	292	TATACTGCTACAAAGGATGCCCATG	628
1615857_s_at	667	39	571	ATCTCTTTTCTGTTGGATGGGTTCA	639
1613240_s_at	355	283	65	GCCACTGACGCCAAGCGTAACGCTA	641
1615722_s_at	72	577	219	TGTTCTGTTGTCGTTTTACAGGGCTG	641
1615114_at	269	477	769	GTCCCTGTGATATTCATAAAGGCAG	642
1621570_at	487	255	642	CTGATCTTCAACACGTGGCACTGGT	643
1609556_at	336	253	160	CTCTCTCCATCATGTTCGGAAAAA	657
1611144_at	266	513	523	GGTGCAGCACATCCGGGCGAAATAT	665
1617921_at	690	697	630	TTCAAAGTTTTGTACCCCACTCTGA	669
1613620_at	168	141	257	AAATATCCTCTTCATCTCAGGAGTG	678
1616455_s_at	530	263	179	CGACACCAGCTATGCTACCGATGGT	685
1614631_at	228	449	633	GTATAGCTCAACCAAAGGAGTCCT	686
1606958_s_at	470	533	896	GGAGATTCTGTTAATGTTATATTGT	687
1613881_at	398	191	1003	AATGGGTCAAGACATGATAAGCTTT	687
1611434_at	638	39	805	ATCTGCAAGCACGAGGGAATCCCCT	689
1614980_at	712	87	48	AGATATGGGCTACGGTTGATCCCTA	689
1618614_at	159	83	128	AGATAAAGAACTCGACCCCTGACAG	690
1622863_at	244	465	107	GTAACAACATTTTGGCTGCTAAAAAC	691
1613677_at	637	89	576	AGATGTCTCTGGGACTGTCCACATT	692
1619375_at	369	371	641	GACTGAGCTCTCCATCAAACAAGTA	694
1607999_s_at	56	237	897	CATTTGTTTCGTCAGTGAGTGTGGC	700
1614944_at	102	327	365	GCAATGCATCTCTCTTGGCAATGTA	703
1615105_s_at	528	665	446	TATCTCCAAGGATGGACAAACCCGT	705
1617355_at	643	353	118	GAAAACACTGTATACGGCGGACCGA	717

1609004_s_at	580	195	1107	AATGCCCTTCTTCTCAAGGTCAATC	719
1617244_s_at	498	301	702	GCTCCATCTCCTAACATGGGACTGA	724
1610581_at	138	675	55	TTTGAGCTCCAATGGCGATGCCTAT	727
1609098_at	490	531	117	GGAGGATCTCGATTTCTCCTGCCT	735
1610393_at	603	665	109	TATCAGAGGACACCCGGGAGCCTGA	735
1622444_at	232	87	101	AGATCTGCAGCGGAGGTACGGCCT	736
1617082_a_at	615	19	1197	ATTTGCCTTTGGTATAATGCTCCCC	739
1613840_at	260	525	740	GGATTGGTTACATCACAGTTTGGAG	747
1617430_s_at	640	401	736	GATGGACCCCATCAGGTGCAGATAG	748
1614464_s_at	223	179	610	AAGAGATACTAGTCTCTTGAGTGCT	751
1614326_s_at	170	329	69	GAATTCTGCTTGAATCATCTTCTT	761
1608586_at	432	51	890	ATGAAGCTGGACAACAACACTACA	764
1613132_s_at	254	323	165	GAATGACCGTGGCACACCCATGAAG	764
1613667_at	399	191	570	AATGGCCTGCCAACCAGAACTCTT	768
1617035_s_at	445	687	225	TTTTACGCGTAATGGACTGCTTCT	769
1615936_at	201	577	331	TGTTATGCAGCCTGGTATGGCTCCT	772
1612871_at	426	503	138	GGGATATCGGCCTAGCAATGCTAAT	774
1610421_at	721	537	552	GGACTCAAATTCTAGTCTCCAGGAG	780
1617502_s_at	629	119	157	GAATCGGGTTAACATTCTGAACCG	785
1616577_at	231	705	172	TTCTTCTAGAAGCTTCTTCTTCTC	790
1616088_at	698	537	483	GGACTGTACAAGCAGATAACACTCA	795
1608359_at	662	589	494	TGAATCCCACCCAATGAAAGCCAA	809
1619927_s_at	509	245	151	CTTTCTGTCGTCGTCTGTCTTCAA	815
1608621_at	129	443	159	GTTACTCCCCTTATGAAGTTTGCCT	824
1608119_at	406	1	272	GTAAAACCTAACCTGTCTCACGACGG	825
1613930_at	588	579	517	TGTTGCTGGACTTGTCTTGTCCA	829
1612334_at	58	95	165	AGAGCTGAATATGGCAGCCGCCGTC	830
1620166_at	546	97	742	AGAAACAGCAGTGCCAGCAGCAGAA	835
1616882_at	113	289	555	GTCGGAACTCGGAGACCCAGTGCC	836
1620973_s_at	442	471	358	GTCTTCAGTGAAGTGGTGTATCA	838
1608787_at	555	527	534	GGATCCATCAGGTTTATATTTCTCA	840
1619511_at	58	617	782	TCTGCTTACACTGGGCCTTCCATGA	845
1618356_a_at	424	159	149	AACACCGAGGTCGTGTTTCGATCACT	847
1607277_at	185	337	566	GAAGGCTAGCAATGTCCACAGAGAA	852
1614916_at	275	419	280	GATACAAGAGCCAGTCCGACACCGA	854
1606951_at	178	721	179	TTGATTGATCTGAATGCTCGGCCCC	865
1607532_at	693	453	666	GTATCTACGTCAGCGAGAAGGGAAC	867
1617797_s_at	217	89	477	AGATGGTATTCAGGTAGAGTTGCAA	871
1613160_s_at	137	533	431	GGAGTTCATCAGAGAAATCCCACTC	874
1613365_at	496	115	812	ACCTCATTGTTGGTATTGACTTCAC	879
1619235_at	454	587	442	TGACCCAGATGGCTACATGATTGAG	880
1609392_s_at	329	703	618	TTCATCCAGGATGCTGCTGAGTACA	881
1617846_at	321	447	773	GTTTTTATTTGGTTTATCTTCTGTT	881
1606675_at	92	439	672	GTAAATGTGAATCCAAACCCTGATG	883
1606720_at	234	241	453	CTTCGAGATGATAAGCAGTTCTTCA	885
1621230_at	702	365	562	GACAGATCAGTGTGGTAGCCCCGC	891
1613126_at	334	115	540	ACCTCATGGTGACTGGAAACGTACA	908
1622051_at	291	263	355	CGGATCGATTGCCAATAATTCTGAA	914
1615814_at	324	149	850	AAAGCCGCTATCAAGGAGGAGTCTG	915
AFFX-Vvi-gapdh-5_at	179	345	315	GAACCCAGAAGAGATCCCATGGGCT	915
AFFX-Vvi-gapdh-M_at	140	183	754	AAGTTAACCGGCATGTCTTTCCGAG	915
1608511_at	671	247	149	CTCAACTTCTCTTGAAGCCGGAA	917
1621285_at	296	9	417	ATTGCCACCTTCAAGCTCAGGGAAG	921
1612678_at	250	593	143	TGAAGTACTCAAGTTGCTCACCCCTT	937
1616383_at	128	265	142	CGTTAGCCACAATCCCTTCTCTAGA	944
1620627_at	417	399	116	GAGGCACAGCTCCAAGTCGTGAC	947

1618387_at	157	111	119	AGCCAAGTGAGATCCGATGCTTCCA	956
1610573_at	367	341	146	GAAGATTTTTGCCACATTGCCTCTG	957
1613461_s_at	450	555	607	GGCGCTGCTGGAAACAGCATTGGAT	959
1615039_s_at	681	481	618	GTGACCCTAGTGGAACTATGGTGG	960
1607259_s_at	455	229	592	CAGGCTTTGGGCAAGTTTGAATCA	963
1609864_at	291	201	145	AATATAGTTGGATTGCCGGTTGCAC	966
1614530_at	220	629	100	TACTGGACTGAATAATTGCCGGATT	967
1622270_s_at	683	245	1022	CTATCAATCAATCTCAGTCGGCCAG	968
1609790_at	491	427	393	GATTGATTGGTCTAAGGCTCCTTTC	974
1612346_at	216	333	218	GAATCGGCGGCCAAGGATGACAAGA	979
1613417_at	534	497	440	GGGCTTTGTCTTCTTACAATCAGAG	982
1614414_at	361	223	648	CAGCCGCGTATGGGTATCAGGAAC	986
1614259_at	385	403	229	GATGAGCTTCTTCAAGGGTTTGTTT	986
1616324_s_at	44	115	109	ACCGATATGGTGACGGCCATCGCCA	994
1612058_at	93	367	467	GACTTGATGAAACCAGAGACCACTG	1003
1607964_s_at	99	707	145	TTCTTCTTCTTCTTGATGTCTGCAGT	1004
1611605_s_at	377	619	101	TCTCTCCCTTCTACTACTGATGTTG	1004
1617423_at	336	327	794	GAATTGGGTACCTTGATATTGCTTT	1005
1612518_at	43	65	517	ATGGCTCAGTTCTATGGGCTTGAA	1006
1620507_at	219	313	289	GCATTTGTATTGTGTCGAATCTTTC	1007
1615735_at	661	129	629	ACATTGAGACGTGGGCAGTCAGTCC	1010
1620134_at	115	695	124	TTAGGTGCGGTGTTCAACGTCTCAA	1014
1614221_at	577	163	796	AACTGGTTAGCCTGTAAGCGTCTCG	1016
1610982_at	111	455	202	GTATATTCTGAGAGCAGCGGCTATT	1019
1619752_at	578	115	105	ACTCTACAGGAACGGCCACAATGGT	1024
1621447_s_at	193	547	622	GGCAGGCTGAAAGGAACACGATTCT	1025
1614692_at	367	367	523	GACATGATACAAGAGGTTTCTGAAA	1026
1620349_at	660	461	647	GTACGCACATCTGTCAAAGTTTCTA	1027
1617342_at	601	491	491	GTGGTTTCAGTGAAGGTTATCCGAA	1030
1622523_at	419	45	102	ATCCGATTCTTTTCTCAAGCACAA	1033
1608381_at	449	291	343	GCCCGCTGTAGTGGTATCGACGATG	1036
1611434_at	169	553	559	GGCGGCAAACACTACATCGGACCTT	1040
1612321_at	470	543	112	GGAAGCTGAGAGATCTTATCATCAA	1041
1608424_at	384	419	644	GATACATCAGAAAAAGGCTCCTCAT	1043
1608938_at	604	163	666	AACTGAAGACGGTTCAACTGCTGAA	1044
1619167_at	88	523	641	GGTTCTGGACAACGAAGCTCTCTAC	1048
1612875_at	359	617	115	TCTGATCATGAGTTGATTTTGGATT	1049
1614910_at	617	559	521	TGGCAGAGTTTTGACTACCCCACTG	1051
1621888_at	136	287	117	GCCTGAGTACGAAGCACCGAGTTCT	1059
1616011_at	134	453	756	GTATTTAAGAACCAGGCCCGTGGTG	1064
1621416_at	611	133	586	ACAGCAGGGTGGTTTTCAGACAAAAA	1067
1622482_at	445	675	269	TTTGTGAGTCCAGCACATGCAGCCA	1068
1612244_s_at	184	159	599	AACAAAGGCACAGCTCTTGGTGCTG	1069
1609629_at	235	531	277	GGCCGCCGAAATACGAGACCCGAAG	1074
1609048_at	509	121	171	ACTGTAGTTCATGTTTCTTGGTTAA	1076
1614588_s_at	49	205	461	AATTTGCGTTCCTTGAGCAAGTCGA	1077
1607280_at	441	397	191	GAGGAATACTTTGAAAACCGCATTT	1080
1608914_at	369	669	253	TATACCTTTTCTCTACTCAGTTT	1080
1608566_s_at	477	273	628	CCGGAACCTCGCAGACTCGCAGTGTG	1083
1610982_at	550	621	232	TCTAGGATCTTTCAGGAGCAATGCC	1086
1610363_at	307	201	319	AATAGCACTTCACATGAGCGCTTCC	1090
1620788_at	706	723	160	TTGGCCGTCTCAGGTTTCTGTAA	1091
1613096_at	593	397	1891	GATGTATCTTGGGTTAATTCCTAG	1092
1618455_at	650	253	53	CTCGTTCCTCAAATCTTGAAACT	1100
1620207_at	118	477	327	GTCCATCTCAGCTGCAGGAATTG	1104
1610645_at	318	343	1021	GAAGACATGAACACCCGAGCCGAT	1105
1608756_at	148	367	825	GACTTGACTGATATTGCCGGGATC	1107
1618699_at	368	51	807	ATGAATCTGTAAATGTGCAAGTAC	1109

1614135_at	300	489	524	GTGTCTGCGTAAATATGGTTCTGTG	1113
1614467_at	134	229	470	CAGGGATCTCAGCAGTAGCAATTAA	1114
1614874_at	128	537	163	GGAGCCTGGCGCAGGATTTCTGAA	1115
1606487_at	718	381	299	GAGATACTTAACCTCCATGGCCGTTA	1120
1618409_at	422	719	409	TTGAACCAAACACCGTTGCATCACA	1135
1610573_at	498	343	252	GAAGAATTGCCATTCTGCCCTTTTA	1137
1612852_at	177	253	1254	CTCTCTTCGGGCTCATGCTATAATA	1141
1621339_at	55	443	152	GTTAGACCCAGTTGTGCAGATCTTA	1149
1617284_at	422	33	695	ATCAAGGGCATTAACTTCGACCTCC	1150
1617570_at	344	273	122	CCGTGAAGATCTGGGACGCCATGGA	1151
1617053_at	427	171	440	AAGCCTGAGGTTCGATTCTCCTGTTT	1159
1608113_at	33	329	458	GAATTAACCCTTACATGTCATCTCC	1165
1621829_at	262	85	441	AGTTCAGACATCATTTCCTTGGCTT	1167
1614505_s_at	234	629	603	TCAGAGACGCAACTTTGATAGCAA	1171
1612566_at	227	719	468	TTGAGGGATGCAGTGCTGCTTGT	1173
1617328_at	611	439	414	GTTCTTCGTGAGCACTGGGACTCAA	1175
1607968_at	265	567	288	TACCGTCAACGCTGTCGTGAAGCGG	1176
1611082_s_at	356	147	541	AAAGATCATTGTCAGCAGGAAGTGG	1177
1612334_at	10	533	199	GGAGTTCTAGGCAAAGTTCTGTCAA	1178
1610767_at	36	409	415	GATGCAACACGTATTGGCTCTGCTG	1182
1616880_at	192	295	47	GCTGCAAAAATGGCAAAAATCCCAGA	1190
1619662_at	26	563	138	TGGAAATGTATGCTGCCCGTGCT	1197
1615395_at	82	401	1278	GATGGAGACCGAGCTCGAGGACCTC	1203
1609822_at	351	663	546	TATGAGCGATTTCATCCGTCCTTCGG	1205
1617904_at	711	67	412	AGGCAACCTGTTATCCATCATTAT	1211
1617502_s_at	211	375	137	GACGCGGAGCTTCGAAAGGGAATC	1213
1607188_at	683	105	182	AGCTCAAATAAGTTCTGCTGTTGCA	1221
1610524_s_at	27	257	169	CTGCTGTGCAGGCTGCAATCTTGAG	1226
1617502_s_at	90	247	349	CTCGACGGCCCTTGAAAATCCGGAG	1229
1615182_at	432	423	397	GATTCTGACCCACAACAGCAAAGGA	1232
1615047_at	582	543	129	GGAAGAATCGCACTCCAATCCAAT	1233
1606505_at	604	61	579	ATGGTGCCGAAGCAGATCCGCATCA	1237
1616170_at	581	559	600	TGGACAGCCGACTGAAAGAAGCTCAA	1249
1622021_at	727	639	524	TAAGATTCTTGCTTCCTCATTCAA	1251
1618904_a_at	315	529	127	GGAGCACCCCTTGGAAATGTAGTCT	1254
1607963_at	165	321	543	GCACCTGTCTCGTGCCATAGGAAGA	1260
1615617_at	40	571	453	TGGGCCACGGTGCATGGATCAGAT	1266
1614202_s_at	578	265	663	CGAATCAGCCGGACTTTGTTCAAC	1267
1607259_s_at	323	129	680	ACTTCCTGTGGCCATTCAAGCTTAA	1268
1615104_s_at	177	341	535	GAAGATCAAGGAAAAGCTTCCTGGA	1274
1620275_x_at	725	381	596	GAGAAGGATTGTGAATAAGCCATA	1274
1622639_at	221	337	101	GAAGGCTTCATTTCTGTTGTACAAC	1274
1607078_at	532	185	107	AAGTGCTGATCTTTGCCTTGGGAA	1275
1608425_at	289	301	184	GCTCTCAACTGACCTCAGGAACAAA	1278
1622147_at	568	483	101	GTGATCAACATGGAGATGCTCAATG	1279
1616174_at	49	221	119	CACTATCATCTCCATTTCTTCAGA	1281
1610982_at	258	473	350	GTCTCAATCTCTTCCAGTGTTTT	1283
1614916_at	551	297	322	GCATCTTGGGTATCGCCTGGGCCTT	1283
1615346_at	385	43	1277	ATCGACAATCAAACCTCCAAGAAGA	1287
1613860_s_at	363	661	1000	TATGGAACATGGTTTTTGCTTTCAT	1290
1622543_at	706	595	119	TGCTTTTTCTCTTTCTCTAGGCAA	1292
1621947_at	466	349	343	GAACGGCTCGAGAAAAGTCTAGATT	1293
1610046_at	216	369	464	GACTTCACTTCAGGTGTTGAGCCTA	1300
1619738_at	116	349	299	GAACCTCAGCAAAGTCATCTCATT	1302
1608531_at	200	633	212	TCACAATTCATACCTACTGCGTGCG	1306
1611656_s_at	304	37	886	ATCTTGTGAAAAATGGTCCACTTGC	1312
1620795_at	696	183	106	AAGTCTAAAGTCTGATATGGCCAC	1315
1615908_at	315	459	233	GTAGCAAGAACAACCTGAGAACAA	1320

1607091_at	120	163	268	AACTCAGCACTCATGCTAGTTGCCT	1326
1611124_at	310	465	1013	GTAAGCATCAACAGCAATTGGGTAT	1329
1610407_at	381	545	804	GGCAACCCGACGCATTCAATTTTGG	1331
1619947_at	545	665	107	TATCCGTTGTGCCTCTGGAATTGTT	1333
1622567_at	180	553	140	GGCGGGAATTATACCACCATCGATA	1333
1618741_at	359	173	420	AAGCTTCCACCTTGTGACATATGCC	1343
1606498_s_at	165	409	770	GATGAAGATGCCTTCTTTGAGGATT	1344
1620476_at	689	707	142	TTCTCTCTTCACAAGTTCATGCTAG	1345
1607145_s_at	64	23	530	ATATTTTAATGTGCTTGTAGTGTG	1350
1610477_s_at	362	185	591	AAGGACCAAACCTGGTTCCATTGCT	1353
1620897_at	486	155	131	AAAAGCTTAGGGTTTCTGCATCCGA	1361
1614910_at	711	551	462	GGCTCAGACTGCTTCCAACCTGAAA	1370
1618247_at	462	493	231	GTGGAGAGCATCATCTAAAGCCATA	1376
1614905_at	299	175	539	AAGCAGCAGGGTTTCATTGAGAGGC	1377
1610786_at	606	667	830	TATAGGACAAGTTATATGGGCTCCA	1383
1616170_at	282	151	509	AAACTCGCCTGCAAACCTCTGAAGCC	1385
1608026_at	351	577	529	TGTTTGGATCAAATCCACCCATCAA	1386
1616039_at	368	549	513	GGCTTATGAACCTGTTTGGGCCATT	1388
1615105_s_at	242	295	176	GCGTGTATCGAGAGGTTGAAAAG	1389
1619394_at	513	515	195	GGTACAGTCATAACTCGGTTCTGTG	1398
1621540_at	180	69	415	AGGACTTCTGCATACGAAACATTGA	1399
1618079_at	357	203	1355	CAATTTGCACTAAAACTACAGTAT	1400
1619235_at	429	73	429	AGGTGTTTTTCCATGACCCAGATGG	1408
1622021_at	392	603	602	TGCCACTTCTTGAGAGCGCACAGAA	1417
1608978_a_at	19	99	442	AGAAAAGCTTGATGGAGTCCACATT	1419
1611450_at	21	243	195	CTTCTATAACGTGTTGCCATCTGGG	1419
1613208_at	229	281	1066	CCAGACGAGCTAGGAGTCCACCTAT	1422
1612651_at	300	399	270	GAGGATCTCCTGAAGGCATTGCACC	1428
1607189_at	343	305	44	GCTACTGAAAGTCATTGCAGGGATA	1429
1620116_at	198	337	118	GAAGGCTCTAGCTTCAGTCTTAGAA	1432
1616282_at	190	99	145	AGAATACAACCGACTAATCCGCAGA	1434
1616882_at	487	259	499	GGTGCGCACCCACGGATGGACCCA	1435
1610295_at	188	553	138	GGCGGCTGCGATCATGGCCAAAATT	1437
1615609_at	623	451	595	GTTTGATCAACCCATCAGGAAGAGA	1442
1607955_at	315	551	102	GGCTCTGAATTTTCTGAGGACAAAT	1449
1608252_s_at	509	439	1230	GTTCTCATTTCAACTTCGTGATGGT	1453
1611853_at	449	151	1162	AAACATAGTGAGTTGAGTGGCAAAC	1453
1612168_at	117	435	585	GTTGCATCTGGCAAAGATCTGAAGA	1461
1618658_at	290	515	693	GGATCTGAAAACGACCCCAAGGAC	1464
1608047_at	464	283	666	CCAAGCCTTGGGTTTTCTCAAGAT	1466
1607503_s_at	184	117	474	ACCGGGGGTTGCATGTACATACTGT	1469
1620761_at	215	289	553	GCCCTCGGGAAGTGGTGGCATCAC	1475
1610869_at	17	53	169	ATGAAGCTGGATTACTGGCAAGAA	1476
1607439_at	556	343	319	GAAGCAGTGGTGCTACCTCAGGACT	1489
1611434_at	157	721	464	TTGAGAACTGCGAGGCCAACGGCAC	1494
1617342_at	305	265	387	CGCAGGCGAGCAATCCCGAAGAGAT	1499
1613699_s_at	55	583	115	TGAGAGCATGCCTGTGCGGACCCGA	1509
1614745_at	563	619	138	TCTCTCTCAGACTTCCTTCTTCTTT	1515
1607028_at	218	699	104	TTACTTGACTATTCGGTTCACCTC	1522
1609629_at	423	505	443	GGGTATTTTCATGGACCACGCAGGCA	1526
1610176_at	599	431	871	GTTGGATTGGAACATCTCGAATACA	1528
1613240_s_at	240	29	107	ATACTGGCACCGTTGCCAATCGGGT	1538
1613986_at	169	315	209	GCACCTGGTCAAGGCTTGGGTGACA	1539
1614946_at	570	117	167	ACCCTGACGCTCAAGACATCGAGAA	1541
1616931_s_at	164	539	618	GGACATGTCTATGTTGTACACCAA	1545
1611792_at	571	177	163	AAGAGCCATGGGTTGTTTTCGTTGT	1549
1612535_s_at	589	141	174	AAATCTTCTTATCCGAAGTGTGGAA	1550
1619225_s_at	247	387	1274	GAGACCACACTGCATGATGTCAACA	1555

1616883_at	209	633	1057	TCAAGGGTTGCTGTGTTGGGCCTAA	1556
1616334_a_at	369	17	1489	ATTTCAATGGTCAGTTGGCCCTACC	1558
1622698_at	339	29	145	ATAAAATTGGTGTGCTTCTAATAGT	1558
1613630_s_at	238	267	1960	CGCAAAGATGTATCAGGGTGTGGT	1559
1610224_at	465	193	319	AATGAAGCCCAGATCACAGATGTCT	1561
1612584_s_at	719	449	910	GTTTGAAGAATGCACTTGCCTCTGG	1562
1608277_at	281	623	152	TCTTTTCGGCGCCAGGAGATTACAT	1568
1611221_at	283	607	129	TCCTTTTGAGAGATCCTTCCGTGCT	1575
1610060_at	645	561	816	TGGAGATTATTTATGCAGTGCGAAA	1579
1620441_s_at	138	39	383	ATCTCTCGTCGGGTTTGGCGTGTGG	1579
1622856_at	360	159	482	AACGATCGTGACAGGTACCGTGGGA	1582
1615182_at	659	637	670	TAATGCCATGTCAGCTCTCTGTGAG	1583
1615974_at	239	65	200	AGGCCAAGTGCAGTGCCACCCGGTA	1588
1618096_s_at	624	493	169	GTGGCACATGAGCAATGTTGACACT	1588
1609506_at	306	201	294	AATACACTCCAGGTGGGCTTTTCTA	1598
1615415_s_at	71	147	679	AAAGAAATGCAAGAGATTCCCATGT	1600
1607649_at	622	339	164	GAAGTCAGCAAAGCCACATGCAGAT	1611
1608614_at	197	585	46	TGAGGAGGAGGCCACTCTCAACCTC	1612
1610794_at	573	355	298	GAAACCGCCGAGAAAGTGCCTGACT	1613
1619557_at	119	121	287	ACTTTCTCCGATCGCGAGACCCTTG	1615
1606778_at	189	11	199	ATTCGTATGCTGTGCTCTATTCT	1622
1617936_at	364	11	562	ATTCTTGAACAAGTCCGGCTGTGTT	1624
1619604_at	183	263	109	CGGTTATACTGTCTGTCGGGTCATAC	1635
1610547_at	306	127	1041	ACATATGCAGTACTAGCTAAGCTAG	1638
1608464_at	482	365	256	GACAGCTAGCTTACATTGCTCTGGA	1641
1615882_at	310	659	173	TTTGATCGTCAGGAGTTGCGTAAAC	1643
1611285_s_at	587	405	46	GATCAGAGTTCCTGCGATAAGCTCG	1644
1622399_at	121	137	174	ACAACATCTCCGAAAACCTCTCTGT	1644
1614985_at	593	683	1013	TTTACGTGATAGAGGCACCCCTGGC	1650
1612436_s_at	449	457	369	GTACCCAGACTACAAGTATACTTCA	1651
1617421_at	523	203	486	AATATTATTGTCTTTCGAGGTTGGA	1651
1607886_at	558	215	104	CAACAGCGTCCGGTCTGCGCGGAA	1659
1610095_s_at	649	171	610	AAGCATATGGCAAGCTCCGTGTCCGA	1664
1620061_s_at	124	353	224	GAACAGAGTTCGTCAATTGCCGGAAC	1665
1608834_at	489	25	537	ATATGGGTCCCAGATCTCTGTGATC	1667
1616379_s_at	339	399	111	GAGGCACTGGCTATTTGGGTCAGCA	1668
1606568_at	529	467	140	GTCAAAGCCATCACAGCCATTTGGG	1675
1615754_at	536	623	1374	TCTTCAGATGAACGAGCCCAAATTA	1679
1606764_at	675	105	107	AGTCATCAAGGAGAGATTTGGCAAG	1685
1610454_s_at	474	205	162	AATTTTGCAAATCAAGCGTGCAGAG	1685
1619866_at	515	341	318	GAAGAGGCGTCTAAACTATTTGTTT	1692
1616263_s_at	28	509	1138	GGTGGCTACTATGATGGTCTCTGAG	1693
1612704_at	621	631	565	TCACCGGATCAGAACACACAGGCAT	1696
1616192_at	202	313	649	GCATTAACAGTGGTGTGGCCCATC	1702
1619211_s_at	142	65	532	ATGGCTGGATCGACCTCGCTTTCGA	1707
1621760_at	176	79	563	AGTCATCAGCATCAGCCTCAGAGGC	1708
1615485_at	63	285	537	GCCTTCTGGAAGATTGGTTCATCA	1720
1614910_at	420	335	288	GAATGGCTACTACCAGGTCTGAGTC	1722
1609441_at	579	269	252	CCGCTGCTGGATCCAAGGCTGAGAT	1723
1621384_at	530	255	355	CTGAAGACTCATACAAGCCACCAAC	1725
1611336_at	448	91	51	AGAGGAGCATGAAGACATCATCGAC	1734
1609654_at	349	481	542	GTGAATGGCGATAGTGCTGCTCCAC	1739
1606436_s_at	608	135	763	ACAAGGTTGGCGAAACTGTTACAGCA	1747
1613880_at	569	55	124	ATGTCATCCGACTAATTGGACCTC	1747
1607735_at	388	361	601	GAAATGTTGGATCCCCTTTTTCAGCA	1748
1609181_at	234	251	193	CTCACGTGTTTTACAGGAACCCAT	1758
1617284_at	565	365	773	GACATGTTTCGAGTCCATCCCTAACG	1759
1622819_at	255	47	363	ATGCCAACATCAGCCTGGCTCAAAG	1761

1609243_at	438	351	424	GAACTAGCAGTTTGGAGTTCCATTT	1766
AFFX-Vvi-actin-M_s_at	359	165	607	AACTGGTATTGTGCTGGATTCTGGT	1774
1615257_at	17	101	277	AGAAGGGCTTGTTGTGGCTATGTCC	1777
1620997_at	24	481	109	GTGCTGGTTGGCATGAACTCTATTA	1778
1613282_at	583	343	187	GAAGCTAGGAGGCACCAAGTCAGAT	1781
1619855_at	218	361	393	GAAATCGCGATCATCCATGGAAACA	1783
1612696_s_at	265	153	101	AACAGTTGAGAACAAAGTGGCGAAC	1784
1620491_at	480	371	477	GACTCGAGGAAGAAGCCCCGGCTAA	1784
1621384_at	618	465	665	GTAATTTCTTTCTTGTGACTCATA	1785
1609107_at	219	709	654	TTGCCGATTTCTGGCCGAGGTTTC	1788
1606464_at	453	603	141	TCCATAACCAATTACTCCTTCCGGG	1790
1614030_at	154	573	650	TGTGCAGTGTGCAGCTTGCTCATTC	1793
1609140_at	112	411	611	GATGCTAATGCATTGATTTCTAGAG	1797
1608162_at	703	45	336	ATCCTCTGGAGGACCATACGCGGGA	1799
1616840_at	187	643	415	TAAAGGATCACATGCGCCGTGCAGG	1801
1618847_s_at	295	495	1016	GGGCCTTCTATTCGATTAAATATAA	1805
1613091_s_at	685	559	117	TGGAACCGTAACTGGCCATTCCTGG	1811
1615722_s_at	335	527	244	GGATAGCGGAGTTCATAGCCACTTT	1816
1609345_s_at	278	301	1795	GTC CCTCAACCTGAGAATCTTGTG	1818
1616657_at	729	561	179	TGGACTCATGGCTTCCATGTGCAT	1819
1610524_s_at	532	567	62	TGGTGGTCTACTAGAATCCCCAAG	1829
1612630_at	94	299	289	GCTGATGCTATGATGCCTGAAGTTA	1832
1615717_s_at	415	159	600	AACAGAGAACCTTCGCTCTCAGGCA	1835
1621888_at	488	493	273	GGAGCCACCGAGGAGGCCTAGTTAT	1837
1615469_at	568	115	176	ACCTCCTAAATACCTCTATGCATCA	1848
1607566_s_at	327	99	395	AGAAGAGAATAGGTCCAGGAAACAG	1853
1619267_at	392	405	1424	GATGTTCTCATCAAGGTATTCGACA	1853
1621663_at	447	699	627	TTACAAAGACGTTCTTGGCCAGCCC	1860
1617797_s_at	341	335	198	GAAGGCAAAAAGAACCTACCGCTCT	1862
AFFX-Vvi-gapdh-5_at	529	681	44	TTTCTTCAATTGCTATCATGGGCTC	1869
AFFX-Vvi-gapdh-M_at	209	585	639	TGATGGGCCATCAAGCAAGGACTGG	1869
1609268_at	701	613	297	TCTCATACATGTCCGGGCGGTACGA	1876
1614829_at	413	717	250	TTGCTATTGACTCCGATCGAATCCA	1879
1622694_at	408	455	669	GTATGTGGCAGTTACTATTTGCTGA	1889
1620212_at	468	659	644	TTAACTTCCCTCAATGTTACCGG	1890
1612217_at	507	539	61	GGACACTGACTCAACAACCTGCACA	1891
1611830_at	681	583	290	TGATGTTGGGTTGAATCCCTCCTTG	1904
1619655_at	198	531	544	GGAGGCGCTGAGTCCTCCAGCACCG	1905
1615513_at	394	711	267	TTGCTACGGTGGCTTCTGGTTAAAC	1906
1608087_s_at	371	579	208	TGTTACGGTCAGTGAAGCATCAT	1913
1608087_s_at	634	137	372	ACAAGGACAAGGCTGCTGCCATTT	1914
1620784_at	56	707	183	TTCTTCTCCTGCTTTGTCTGCAAC	1919
1609519_at	586	545	151	GGCGGCTGCGGCTCAAGTAGACTAT	1920
1619349_at	272	299	111	GCTGATATTGATCTGGTTGTGAATT	1920
1617174_at	441	235	356	CTTGGCTACCACACTTTCCTTGGAG	1922
1619585_at	61	361	271	GAAATACGGCTCTGATTCGGAGTCT	1937
1607148_s_at	719	723	241	TTGTAAGCTTCAAGTGCTTTGCTTG	1939
1608826_at	234	615	584	TCTGCCAACTACAGGTTTAATAAA	1939
1607832_at	323	7	546	ATTCGAGGCGAATAATAGCGGCGGT	1941
1620808_at	385	135	170	ACACCTTACACAGTCCAAGGCTATGA	1946
1621668_at	407	295	503	GCGGTGACCAAGTTCACAAGTTCGT	1948
1618259_at	48	255	144	CTCCAGCTTCAAAAGCAGTCTTCTT	1949
1606742_at	582	177	545	AAGGCCAATGACACCGTTAAACTTG	1950
1621583_at	418	717	685	TTGAAGGTGAATCTGCTGGACCATC	1952
1614985_at	211	587	1094	TGAGCAAGTCGCCTTCATGACCAA	1954

1619276_at	571	493	243	GTGGAATCACAACGCTCATCACATT	1958
1610796_at	302	417	236	GATCACTCTTTTGTTCGAGACCAAG	1963
1614437_at	296	127	530	ACTTCAAGCCGATTGGACCGAGGTT	1995
1607146_at	233	501	177	GGGAAACTGTGCATGACGAGAGAAA	1998
1615846_at	129	95	200	AGACCACTGGATCCCCAAGACATAT	1998
1606648_at	654	17	265	ATTTAGAGGGTTTGGATGCTTCAGC	2001
1612020_at	386	137	110	ACAATCTCCGGCGACGTCATTAAGG	2005
1614494_at	146	503	46	GGGATCGCCCACTTGAAGATGCAAA	2011
1611020_at	624	283	206	GCCAAGCCCAGCAGAAGCGAATCCG	2017
1621808_s_at	545	141	547	AAACGACTGGATTCCAAGCCTCGAA	2017
1622782_at	13	495	120	GGGCTCAAATTCGTGTAGGCGTTTT	2018
1607932_at	619	645	170	TACAAGCAAGGCCATATTGCTGCTG	2028
1613688_at	436	667	106	TATCACTGGTCTTCACTGGCTTCTT	2035
1610880_s_at	86	265	161	CGAGTGCGGACAACCTCCATCGGAC	2036
1612123_at	467	149	123	AAACTCCAATATCGATTTGATCAGG	2040
1613127_at	194	265	129	CGACATGTCCATCATCAGCTACGGG	2050
1619555_at	12	297	1014	GCGGCCCTTATAGCAGATGTAGTC	2055
1612780_at	416	105	263	AGCTTATCATCTCCACTGTTCTTAT	2056
1617236_at	486	413	548	GATCTTCTGGGCATTAAGGTTTCAT	2060
1622543_at	105	397	154	GAGGGAAAAGCATCCATCGCTTTAG	2061
1610989_at	338	499	104	GGGATCAAGGAAAATCTGCCTTCCA	2066
1611723_at	600	33	269	ATCAGTGCCGGGACCGATCCTTTTG	2070
1619167_at	105	421	522	GATAGGATGATGCTAACATTCTCCG	2075
1613471_at	451	365	535	GACAGTGGCGATGTGTTTCATGACCT	2077
1619777_at	592	539	114	GGACAAAGTCAAGGGTTTCATGAAG	2079
1606781_at	717	597	107	TGCTCGTGTAAGGATCACCCGGCT	2082
1616933_at	567	595	472	TAGAGGCCAAACTCGGCAAGGTTTT	2086
1609446_at	266	581	555	TGATTGTGGATCATGGATGCCCATG	2088
1611329_s_at	419	379	155	GAGCGATATCGTTGGATCTCATCCT	2088
1607088_at	600	527	242	GGATGGGATTCCTGGTTTGTACAGA	2092
1622386_at	545	469	620	GTCAGTTCGGTGACGGCCACCACAA	2093
1622381_s_at	233	231	565	CTTAGATGTCTGGGCCGCACGCGC	2096
1607721_at	291	377	660	GACCATATTGGATGAGCTTCTTCCC	2097
1610330_at	614	377	596	GAGCATCGGTACACGGATCGGCACG	2101
1621405_at	220	497	109	GGGCACTTCCATTATCCCACCAAT	2102
1613410_s_at	552	41	480	ATCGAACAGCTCATCTCAAATAAGT	2106
1614464_s_at	94	531	375	GGATGTTTTGACTGACGGCGTTGAA	2109
1615939_at	229	31	127	ATAAAGGGTCTTATCTTCCTCACCT	2111
1612160_at	269	631	416	TCACCCTGGTTTCGGAGCAAGATT	2115
1618488_at	637	325	130	GAACGAGATCGAGCGTCCAGTTCT	2116
1619882_at	385	531	109	GGAGGTTCTCTCCAATCTAGATCTC	2117
1606368_s_at	690	279	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
AFFX-Vvi-actin-3_c3_s_at	32	690	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
AFFX-Vvi-actin-3_c7_s_at	682	690	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
AFFX-Vvi-actin-3_c4_s_at	359	40	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
AFFX-Vvi-actin-3_c8_s_at	359	690	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
AFFX-Vvi-actin-3_c1_s_at	32	40	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
AFFX-Vvi-	691	279	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124

actin-3_s_at					
AFFX-Vvi-actin-3_c6_s_at	682	370	1219	CCAGCAGATGTGGATCTCAAAGGGT	2124
1611713_s_at	129	161	545	AACAGAGGCTTTCCTAGTAGTGCTG	2127
1619601_at	552	459	609	GTAGAAGATCAAAAAGCCCCTCAGAG	2128
1609550_s_at	268	43	104	ATCCCGTCTGGTCAGTGTGGCCGT	2130
1609717_at	465	135	545	ACAAAGAAGAGCAACCATGTGGTGA	2130
1612918_at	194	725	341	TTGTAGTAGGTGACCGGGTTGCTCT	2132
1609243_at	476	299	643	GCTGAGGATTTTCTGTACTTATTTT	2138
1619993_at	154	411	583	GATGCGGCCGAGGAGCTCATATATT	2139
1614450_at	546	139	421	AAATACTTGGATTTGTAGTTCATGT	2142
1607082_at	728	369	114	GACTGCGATCAAATCTCCGGTGAAA	2144
1609141_at	671	683	805	TTTAACTGCATCCTTTGTCCATTTC	2145
1611821_at	257	525	104	GGATTGGGTTTGTGATCTTGCATT	2148
1608545_at	91	709	104	TTCTGTTTCTGGTTCTTTGAAGTCC	2153
1614558_at	318	159	248	AACATGGCCTCAAAGACCCAGCAC	2159
1620686_at	84	511	103	GGTGGATGCACCAACTGGGTATCAT	2167
1618181_at	718	517	471	TGGGTTAACTCGAGGCCATGGCTTA	2173
1609738_at	384	727	122	TTGGCAGTGACAGCAAGGAGCCACT	2175
1610063_at	86	599	43	TGCTCGAATCAATGCCCTTGAGATG	2179
1617014_at	283	27	583	ATAGCTATGGTATTCCACACCAACG	2189
1615198_at	537	461	150	GTACAGCTTACTGCATCTGAACAGC	2190
1611020_at	520	343	219	GAAGCGAATCCGACTCCCCGCTAAG	2194
1619613_at	715	251	124	CTCTTCTTCACTTTGGTCAGTCCA	2196
1606835_at	680	607	390	TCCGGCATGTCTCTCACCATTGAA	2199
1610092_at	441	633	379	TCAAGGACATCCTCGTTCGCTACGA	2205
1615065_at	79	613	404	TCGGCATTAATCACAATGCCCTCG	2206
1607366_at	492	83	213	AGTTACCTTACTCAACGATTCTCT	2207
1608026_at	387	725	454	TTGGGCACACTAATGCAGTAGCCAT	2225
1611964_at	726	687	162	TTTTTTCCTCAAATGTGTAGAGAGC	2231
1619305_at	705	233	121	CATCTTTGCATGATTGATCTGTTGT	2242
1616663_s_at	105	271	1023	CCCCGAAAATGGATGGCGCTTAAGC	2244
1618380_at	494	61	301	ATGGTAACAATCTGGCTCGTCTGAG	2246
1613677_at	147	297	547	GCTGGTGGCAGTACACTTTGAATT	2248
1616663_s_at	73	601	1008	TGCCGAATCAACTAGCCCCGAAAAT	2256
1613713_at	249	443	570	GTTACAAGCAGATTGCAGCTGCCAT	2257
1621547_at	332	79	594	AGTGCTGAAGCATCTTTGGCCTGAA	2258
1614982_at	274	589	720	TTACCGCTATACAGGGTGTTCCAC	2260
1609203_at	70	155	129	AAAAATCCTGCAGTTCCTCATGTCC	2268
1611569_at	617	641	354	TAACTCAGTGATAAGGACCTTGCTT	2269
1621826_at	92	497	353	GGGACTCTGCGGCACCTAAGCTACC	2271
1611744_s_at	387	469	577	GTCAGATAAGTACAACCACGTAGTT	2282
1617466_at	538	575	267	TGTTTCGTTCCATCAGGCACCATGGG	2284
1613947_at	197	145	533	AAAGAATTCCTAACCAAGCGCGACG	2285
1613699_s_at	708	151	179	AAACTCTGGTGGAGGCCCGCAGCGA	2292
1616663_s_at	365	185	1075	AAGGGCCAGGCCTCGATGAGTAGGA	2292
1606765_at	391	447	146	GTTTCTGTTACACAAGGGCTGTCTT	2295
1613837_at	129	23	513	ATATATACTATGCTGCCTTCCACAC	2298
1610794_at	663	1	569	ATGAGTACCAAGTGAATCGCGCCCG	2299
1607539_at	245	501	158	GGGAGATCCGACTATGCCTTCGACG	2301
1612684_at	452	485	175	GGGCATAAAAAGAGTTTGCAATACA	2305
1608128_at	228	309	542	GCTTATGCCATTCTATTGTATTGA	2312
1613189_at	145	559	106	TGGCCGTGCTGGAAGTGCACCTAGT	2319
1616469_at	572	119	137	ACGAGCCCTCCCTAAAGATGCAAAT	2319
1606551_at	585	485	100	GTGATCTTCGACTGAAATCCTTTCA	2323
1612220_at	595	591	348	TGAAGAGCTTCGAGTTGACATGAAT	2334
1607566_s_at	47	347	571	GAAGCCTTGCAACTGGCATAATAAG	2343

1619267_at	704	169	1630	AACCAGAGGGTGATCTGCAGCTCTT	2343
1611821_at	550	437	288	GTTCCAGGCCCTTCGTGATGCCAAA	2348
1610510_s_at	102	519	634	GGTAGTGAAGGCTGTTTCTTTGCT	2354
1619456_at	354	41	569	ATGCGATGACCTCAAGACCCTGAT	2355
1613095_at	136	113	61	ACCACCACACGTTTGGGCACGATTT	2357
1612988_at	268	717	673	TTGAAGTCTCTGGTGTCTTACGAC	2371
1611656_s_at	572	299	1029	GCTCCCATCCGGATGAAGGACAAGC	2375
1616170_at	15	193	756	AATGGTTTGGATGAGTGGTCTTAGA	2376
1606436_s_at	51	29	1056	ATACTCCATTGGATGCTGTGCATTC	2380
1618433_at	387	79	124	AGTCTCACACCTTGTTCAGGGAA	2381
1616733_s_at	358	47	113	ATGCTGCTGTAGAGAATCCATTTTC	2382
1611144_at	74	181	479	AAGTTCGTCCAGATCCAAGGCGGCT	2384
1616601_at	75	557	581	GGCCGTTATGGTCTTGATCGTAATG	2385
1608225_s_at	367	361	57	GACCGGGTCCATTACCTGCAATACG	2387
1611135_at	126	513	135	GGTGCTCATGGAGAATCCGGCTA	2387
1617491_at	648	329	80	GAATTTTCAGCGGAAAATCATATACA	2387
1616429_at	231	7	436	ATTGAACAATGGATGGGCTGCTGGA	2390
1615846_at	187	491	467	GTGGGAAAATGGTACTGTCTTTCA	2396
1611286_s_at	92	545	131	GGAATGAGGAATGGACATTGGCAAA	2397
1612656_at	612	285	472	GCCTTATGTGACTTATGGGTACCCC	2397
1617226_s_at	242	681	189	TTACACTGAGAAACCCCTCAACGA	2400
1622040_at	184	645	521	TAAATCAGGTGATCTATGAGGCTCT	2400
1608277_at	728	551	230	GGCGGTATTATGATTTTGGTCCAAA	2402
1611691_s_at	605	371	358	GACTGCGGCTGCTTTATATTGCTTG	2408
1612713_at	316	107	185	AGCTCGCTACAAAGGCTGCAAGGAA	2409
1615808_s_at	343	495	880	GGGCTGCTGTTATCTACAACAATGA	2416
1608626_at	431	363	149	GACAACATTGGAGTATACGCCTACA	2417
1620447_s_at	251	331	543	GAATAGAGTGGGTTTGCATTTTTT	2419
1617378_at	350	25	418	ATAGGGCAGCGTTCAATTTGTATAC	2422
1616500_at	167	295	1023	GCGTTGCTGTTCTTGTGGTGTGCC	2424
1607141_at	651	421	66	GATATTTTGGATCAAGCCCTCCTTA	2433
1614631_at	612	103	816	AGCATGCTCCATCAATCATCTTCAT	2433
1614576_s_at	19	21	287	ATTTGATCCAGGAACCCACTGTTTA	2439
1617385_at	295	679	603	TTTCTATAGGTACTTTGGTGCTGC	2440
1609082_at	225	543	105	GGAAGGCGACCCAATCCTTTTGGAT	2441
1617745_at	237	61	134	ATGGGCAGGGCAGCATATGCCGCAT	2442
1609853_at	106	89	545	AGATCCGCCCTTCTTTGAGGACTA	2443
1619930_a_at	288	379	48	GAGCGACAGATCTGGTCTGTGAGAA	2446
1608684_at	64	345	668	GAAGCTATTTACAGAGTTGGACACCC	2453
1606442_at	344	483	651	GTGAAGCTGACTGAACTATGATATT	2461
1607079_at	564	583	651	TGATGCCAATTGTTAGTCGCGCTCT	2470
1617898_at	517	79	120	AGTCTACTTCTGCTACCAGTGCAA	2480
1607481_at	683	17	155	ATTTTCAGTGATGTGAACTTGGCGAC	2484
1616360_at	722	123	117	ACTACTAAAGCAGAGGTCATAACCC	2486
1609774_s_at	128	639	655	TAAGAGATTGCCAGAGCTCAGCCT	2487
1620116_at	66	99	52	AGAACTACGATGAAGAGCCCCAGAA	2490
1622705_at	570	61	399	ATGGTGGGCAATTGGCAATCCTCTA	2510
1608586_at	317	593	1342	TGAAGTTGGGATGCATGTATGTAT	2512
1613132_s_at	676	297	148	GCTGTGCAGTATGTGAGGAATGACC	2512
1613879_at	36	671	193	TATTGAATTGGCTTGAGACGACTGG	2516
1615923_at	192	611	134	TCCAATGCCTGTGCGTGGAGCAAA	2517
1608052_s_at	196	545	561	GGAATCCCAGGCTGGTGGGTCATTC	2519
1615923_at	480	359	420	GAAAGAGCCTTCTTCTCAGAGAGGT	2530
1616712_at	315	337	679	GAAAGAGTTCCAGACTGAAGACCT	2531
1615203_at	697	207	195	AATCCATCTTGGTTCCTGCCATTT	2542
1620210_at	440	473	111	GTCGCCGGAATACCCATTTTCAGAGG	2543
1618396_at	169	73	347	AGGTTTTTCGCTTTGATGTAGCTGGT	2548
1613677_at	333	251	517	CTCAGCCAATAAGCCCTGTTAGTA	2559

1610989_at	440	573	151	TCGGACCCGGGTTGAAAGCGCCAGT	2562
1613527_at	253	235	556	CTTAGTACTGATATCCAACGTTGGA	2563
1621077_s_at	77	241	300	CTTGCATGCTTTCTGAATTGGTCAT	2565
1621591_at	652	241	600	CTTCATTGTCAATTTATCCGGCCAAG	2567
1613190_at	625	555	200	GGCCCTCTGAGATGTTCTGACAACA	2571
1613946_s_at	249	349	170	GAACGAGATGGTACAGCAGTCTGGA	2576
1611434_at	223	263	747	CGGGTTTTCCCATATAGCATGATG	2580
1606720_at	234	337	587	GAAGGCTGTCTTTGATGCGGCCATT	2590
1616698_at	376	75	275	AGTGTGCTGCACAGGGTCGTAGCCC	2592
1622147_at	79	247	239	TTGACAAAGGGACACTACAGGAAGT	2592
1620089_at	718	241	131	CTTACAAGACACTCATTGCTGCGGA	2603
1617723_s_at	166	185	435	AAGGTTCTGCTGTTCAACGGCCCCG	2605
1619008_x_at	594	193	403	AATGCTGGAAGATATTGTTCTACCT	2605
1610213_at	573	415	233	GATCATTTTTGCTATCCACATACA	2619
1620865_at	520	155	1211	AAAATGTCTAAACGAGCTGGCTGGG	2623
1610674_at	622	561	760	TGGACCGTACTCAAGTATCCGCAAA	2641
1609611_at	242	553	312	TGGTGGTACCAAAGGCAAGCGTTTT	2644
1622368_at	30	49	827	ATGCCTCTTACCAGTTTACAACAGC	2645
1608263_a_at	127	323	1053	GCAAAGAAATTTGGCGTCACTGAGT	2650
1610322_at	352	635	520	TAATTACTCAGTACCATTATGGCTG	2653
1609310_at	457	345	1544	GAAGCTACTCCAGTCCAGTGTAAG	2654
1606623_at	289	143	776	AAAGGGAAATTCTCCTCCACTGAAG	2655
1621903_at	158	419	604	GATAAGTTCGTGCGCCATGTAGGAG	2657
1607228_at	444	49	520	ATGCTTTGGGTTCAATCTGCGCTT	2664
1619662_at	659	617	44	TCTACTTCAACCACTGTCCAGTAA	2666
1618050_s_at	113	183	679	AAGTCTCTCGTGCTCCAATGGTTTA	2670
1616824_at	17	355	809	GAAAAGAATGTATCTGTCCTTGAC	2672
1620865_at	403	237	1100	CTTGTTACAAATCCTAAGCGTGTGG	2685
1611040_at	536	677	162	TTTGCCCCTTCAAAGGTCCAATTAT	2689
1621583_at	87	571	1161	TGTGGATTCAAGTTGCTGCTGCGCGC	2690
1619540_at	482	271	346	CCGAGGGTTCGGAGCATCCAAGCGA	2691
1610499_at	34	525	106	GGTTGGAGAATACCATAATCTACAT	2694
1611102_at	492	613	170	TTGACAAGATGTCTGGCCAAAGCCA	2694
1616109_at	217	599	520	TGCTGCCAGGCTTTTCTTGAAAAG	2719
1609898_at	148	401	141	GAGGCAGTCTGTTTCTCATACTC	2722
1609185_at	244	285	488	GCCAGCAGACGCTACAGCAGATGCA	2725
1621902_at	637	393	555	GATCACACGCCACAGTACAAGATT	2727
1609181_at	603	727	105	TTGGCTCTTCTTATCTCCATTCTTA	2728
1616274_at	241	645	231	TACAGAAGTGGTTTTCGGCTCTGCTC	2729
1614318_at	425	345	110	GAAGCTTCATCCACAGCAGATCTCT	2744
1622564_at	538	545	640	TGGCCGCTAGGGTTCCAAAGAAGGT	2753
1622651_at	689	461	1023	GTACCCTTGAGAACATCCACATGG	2756
1622606_at	98	621	1183	TCTACAGCAATGGAGGCGTTGTTCT	2757
1611871_at	553	349	554	GAAGTGGACTATCCCTGAAAGCTTG	2769
1610738_at	289	701	483	TTCAGGTGACCCAGATCTCCATTC	2775
1608119_at	688	243	182	CTTTTCAACCAAGCGCGATGACCAA	2782
1616636_at	494	311	121	GCTTGTGCAGTCGACTTAGGAGACT	2787
1608880_at	160	119	418	ACCCACTTGCTGGAACGGATGGCGT	2793
1620164_at	621	707	145	TTGAGTTACAGCTACAGCAGCACA	2794
1616763_at	257	273	550	CCGCTGCTGGAACAGATTGCAAAGT	2799
1614105_at	463	539	122	GGAAAGTCCAATGCCAGATCCTTCT	2800
1622822_at	189	613	538	TCGAGATCGTGATGACCTTCGGGCT	2801
1612244_s_at	402	577	655	TGTTTTCTCAGCCACTGACCCCAAG	2811
1616901_at	9	169	563	AACCTGTCTTGGTTACAGTGCTCAG	2817
1614153_at	71	497	420	GGGCGATCTCAGCATAGAGCAATAA	2818
1618043_a_at	218	501	114	GGGATGGATTTGACAAGGGTCACAA	2823
1611762_at	27	171	114	GAATTCGTTTCGCTGTACTAGGTGTA	2831
1607064_at	270	513	555	GGTGTGTACTAAGCATTCTGTTTCA	2835

1617274_at	545	465	536	GTAAGTATTCTTCATGAGACTGCAT	2837
1612918_at	541	101	540	AGCAATGTGTGAGCCGCTCAGTGTC	2841
1612610_s_at	194	335	582	GAATGTTTGGCTGATGAACTCATCA	2842
1611961_at	5	287	530	GCCATCAGCCAATGTAGTCCTCTTG	2844
1610578_at	708	63	346	AGGCCCTTGCATTTGTCCTACAAG	2848
1616785_at	165	539	655	GGACATGTTTCATGTCATCCTGCAAA	2850
1607259_s_at	579	545	444	GGCAACAATGAATATGCTGCACAGG	2853
1611124_at	279	213	692	CAAGAAGCTTTCTGCGCCCTATGAT	2855
1614414_at	524	509	178	GGGTGGAACCTAACGCTAAGTGCTC	2858
1612656_at	514	389	638	GAGATCATGACTGTTGGACCTCATT	2864
1610373_at	14	149	499	AAAGACTGACTGCAATCTGAAGAAT	2868
1615675_at	436	545	525	GGAATTCCTGGGATGCCTGGTATTA	2869
1608880_at	247	485	157	GTGAGATCATCTTCTTCTCCGAGTT	2870
1618523_at	650	395	516	GAGTGGATTTAGTTTTCGATTTAGA	2872
1613196_at	287	615	625	TCGGGCTTGAGAAGTCGAGAATCAT	2878
1617570_at	454	379	250	GAGCTGTGCAAGGATCTGTTCAAGA	2882
1613052_at	254	327	286	GCAATTTGTGCATGTTGGGCTTGAA	2885
1607064_at	579	151	471	AAAAAAGTCGTGTCAGGTCGCTTCT	2890
1612123_at	486	385	48	GAGACTCCGCCGAATTGTAAGGCAG	2898
1621397_at	507	639	415	TAAGCTCATGTTTGGCGCTGACAGC	2899
1607500_at	646	669	411	TATTCTCAGAATTTGGGACTATTAC	2902
1609619_at	596	89	607	AGATGCAATCTCCACTTTGTTGAG	2911
1622004_at	230	131	58	ACATTTGTCTTGACATCCTTCAGGA	2914
1613127_at	706	171	214	AAGCATGGGAAGTCGTACAACGCGT	2915
1615914_at	144	409	263	GATGCGTTTAATTTGACGTGTCAG	2918
1618703_at	560	443	43	GTTAGATTTTGTTCCTTCAGAGTT	2918
1610771_at	503	479	372	GTGAAACCTCAGAACATACTACTAG	2922
1616267_at	718	561	541	TGGACCCAGTTCTTGCTACAGGGAA	2926
1620897_at	78	343	154	GAAGAGTCTCTTTGGCTCAACCACT	2937
1615487_at	176	449	611	GTTTGTTATTCAAGTTCTGAACCAG	2941
1616071_at	539	213	108	CAAGAGGTTGAATGCATTGCTAAAT	2944
1609671_at	445	647	113	TACATTGCTTTGCTTGCCGTATCAA	2957
1607730_at	495	513	510	GGTGCTCACCATCTTGCCATGGAG	2960
1609840_at	588	295	486	GCGGTGACTCTGTTGCTAGCCTTGC	2981
1617459_at	640	509	586	GGTGGACATCGACCATAACTGTTCT	2985
1617244_s_at	2	473	627	GTGGGACGAACTTTAGGAAGCAGCA	2987
1614341_at	74	215	179	CAAATTCCTGAAGGGTCTCGAGTT	2993
1620582_s_at	574	719	837	TTGAGCATCCTTGCCAGTATCTTTG	2994
1616036_at	231	607	646	TCCTTATTATTATTGCTGGCCTGTG	2998
1609545_at	498	101	112	AGCACAGGCTTTCTACTTCTGGATA	3001
1615405_at	332	383	102	GAGAAAGTACGCACTTTCTCTTCC	3001
1609546_s_at	146	181	274	AAGATAGCATCGTGTGTCGTAATG	3009
1611859_at	105	415	1033	GATCTCTTGTTGTAATTCCTCATT	3019
1618769_at	14	537	646	GGACCAAAGGGAATGGCTTGAACA	3021
1621094_s_at	528	185	613	AAGTGTGATCTATCTCAGTATTCTA	3021
1619759_at	427	227	588	CAGTGTGAGCATTGTCACCAATTGT	3024
1614540_at	212	269	423	CCCAATTGTGCGATGCTTTGAAGAA	3032
1621901_at	554	677	595	TTTGCATTATTAAACTTCTTCCAT	3033
1616882_at	244	483	675	GTGATCAATTTAGCCACCCTTCTGG	3040
1621427_at	606	55	532	ATGTTCCGTCCAGCGAAGGCTGAGA	3041
1608021_at	357	11	1086	ATTCGGATTCTGGTTGACTTGGTTT	3049
1620788_at	270	315	329	GCATGTCAGTGCAACAAGCTAGCAT	3060
1619604_at	268	303	491	GCTCTCCTACTGTTGAATCTCAGT	3064
1607801_at	13	675	475	TTTGTCTTCTGATGCGGAGGATCCG	3066
1614627_at	25	21	215	ATATTCTGTCGGATCCTACTGTTGTC	3067
1619010_s_at	145	177	664	AAGACCGGGTGGCAGCCCATGTCAA	3068
1619573_at	154	597	346	TGCCCTGCAGGTGGAAGCTCCTAAA	3074
1619459_at	226	425	110	GATTTATTCATAAACGCTGCCCAAG	3075

1619780_at	282	563	755	TGGAGCAGCTTTTTGTACTGGCAGA	3075
1621035_at	473	21	1137	ATTTGGTCATATGGGTGTCTCCTCT	3076
1617855_at	682	87	113	AGATGAGGCTCCGATCCTGCGGACG	3079
1606825_s_at	172	267	798	CGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATT	3098
1616337_at	377	715	58	TTGCCAGCCAAGTTCCTAGAAATAA	3100
1622047_at	654	395	570	GAGTGGAACCCAATGATTCTCAATT	3104
1615593_at	400	515	105	GGTAAAGCCTGAGGCCAGCCCGACT	3105
1617391_at	614	197	49	AATCTGAATACCCTCGCCTTAGTTG	3106
1609177_at	280	523	796	GGTTGCATCTGCATTTGGAGAGGAT	3111
1614464_s_at	577	545	514	GGCAAAGAGGATGCTCTCGCAACGT	3112
1620140_at	406	23	430	ATCGGGTTCGGTCAAAGGGATCAACG	3113
1618433_at	539	131	324	ACATCCGATGCTAGACTTGTCTTG	3117
1618236_at	427	343	59	GAAGAACTCGAAGGAGCTCGCAAAT	3119
1607032_s_at	42	519	2152	GGCCCAAGAGGATACGCCTGGAAG	3121
1608695_s_at	156	479	620	GTCCACTGCTGCATGCACTGGTGTG	3129
1613014_at	653	413	660	GATCTAGATCCTACTAATCCGTTGG	3130
1616125_at	102	331	1049	GAATATATCACCTTGCTCTGGTCTC	3133
1620109_s_at	284	193	584	AATGACTCATCCTCAAACCAGATCA	3147
1616029_at	211	209	103	AATTGTCACAAATGCCATCAACAGAG	3151
1613712_at	166	87	643	AGATTGCTTCATCGACTTGCAGCAG	3153
1609181_at	716	65	208	AGGAACCCATGTCTGTCCCCAGGAT	3155
1609640_at	50	487	130	GTGTTGGTTCAATTGCATGCCGACT	3156
1619993_at	551	175	470	AAGAATCGGTATGTCTCTGCGGCCT	3160
1618860_at	400	533	102	GGAGATCATATTGTCCCAAACCTTGA	3161
1618703_at	164	555	101	GGCCCATTCCCATAACTTGAAATTG	3181
1615727_at	337	431	144	GATTGGCTTGTTCGATTTTGTTTGTA	3183
1616299_at	532	235	85	CATATTGCAGGTATTCAGTTGACAC	3187
1617843_at	40	475	469	GTCTGCATTAACATCTTCTATCTTT	3190
1619305_at	46	547	529	GGCAAGCGAGAGTACATGGCCATCT	3193
1607618_at	656	619	294	TCTCTTAGCAAGACCATAGGCACTG	3196
1612667_a_at	371	51	1000	ATGAAGGTGGTTGGCTGACTGTATT	3209
1616029_at	437	397	80	GAGGAGGTTTCGGCTTTCTGATATAA	3210
1615272_at	95	53	647	ATGAGTCTATGAGTGTATGGCCGAG	3216
1611011_at	36	513	797	GGTGAAACAGTATTCCTGCTGCCA	3218
1611932_at	611	333	344	GAATGCGCTCTGTGGCATTGTTTGA	3219
1609437_at	474	379	1236	GAGCTTCTTCTTTGGGTGTGGGAAC	3221
1611313_at	363	245	624	CTTTATCTCATCTTTTCAGCCTTGA	3222
1615810_at	487	45	157	ATCCAGCAATATAAGGCTTTTGAGT	3223
1619506_s_at	8	271	628	CCCTACTGTCTTTTTTGGAGTATG	3234
1607056_at	158	611	148	TCCCTCTTTGTACATGGCGGAGTCA	3238
1610469_at	644	193	612	AATGTTGTCTTAGCCTATGAGCCTG	3244
1610243_at	367	491	615	GTGGGTTGGATACCTCACTGGCTCA	3247
1621535_s_at	162	51	565	ATGCAGAGCAATGATTGGGCAGGTT	3256
1615105_s_at	708	461	320	GTACTACTGCACTGTTATTGATGCT	3259
1617466_at	17	345	461	GAAGCAGCCATCAGAGATCCAAGAG	3264
1619057_at	184	595	777	TGCAGCTTCCTTGTGGAGGTAATT	3265
1611482_at	663	509	174	GGTGTAAGAGACCCATTTTCAAAG	3270
1609181_at	609	479	451	GTGAGGTTCTCGTTGCCGACGCCGA	3287
1612188_at	287	625	106	TCATCGTGTCCAGAAAAATCACAGT	3298
1608667_at	314	165	148	AACTGAGTACGACTTGCTGATGGCC	3300
1613472_at	434	57	560	ATGTACAGGATTTTACTCTGCTG	3308
1622059_at	662	581	1000	TGATTTGCCTTACTTTGCCTCTAAG	3312
1614577_at	485	663	558	TATGTAAGGGAATCTTATCTCCAA	3321
1615712_s_at	608	627	584	TCATGACGACGGTGGAGTCTCTAG	3333
1606813_s_at	58	391	507	GAGATTGACCGTTATGCAAGTGA	3337
1611997_at	636	201	972	AATATATCCCGTTTTCTGGCTTTG	3339
1606742_at	471	87	532	AGATCCTCTCATCAAGGCCAATGAC	3344
1613305_at	246	313	502	GCATAGCACCTTGTCCAATGATCGG	3357

1613305_at	349	413	625	GATCGAGAGGCTGTTGATTCCCCGG	3363
1614128_at	661	433	737	GTTGAGCAGAGTTGGACAGCTGATT	3379
1614449_x_at	11	331	47	GAATAACTATGGGACTTCTAAGCCA	3379
1607837_at	498	245	311	CTTTGAGTTGGGTAGAGAGTTTTT	3382
1617829_at	617	411	138	GATCGACTTGCATTGCGACGGTTGT	3386
1609917_at	643	579	135	TGATATGAACCCCAACTCCAACCTGG	3388
1621094_s_at	320	477	208	GTCCATATGCTGGTGGAGTGTTTCT	3390
1611036_at	605	147	316	AAAGCCAAAGTTCATGTCCCCAAAG	3392
1610777_at	396	361	300	GAAATGCTTTGTTGCTTCTGCCCTA	3400
1608129_at	710	213	596	CAACCAGGAAGCTCAAGACCACCTA	3402
1614527_at	699	545	1023	GGAATTGTCCCTAACGAATATCTAA	3403
1622361_s_at	175	663	755	TATGATCATATTGTCTCTGCCCATC	3405
1610970_at	377	261	736	CTGGATGCTCGTGGGTGATGTTCCA	3408
1611390_a_at	338	97	121	AGAACTCTCTGATGCATTAGGCAAG	3408
1608865_at	503	299	537	GCTGCAGAGAGCACTTTGTTGGCTT	3410
1612001_s_at	305	487	348	GTGGAGTACACCAGCTTCGCGGACA	3414
1621872_s_at	131	353	606	GAACACATCTCAATCGCAGCAGTCT	3415
1608766_at	619	149	479	AAACCTACCCTGGTGTAAAGCGCAT	3417
1617261_at	327	85	674	AGTTGTGGTCTTCTCTCTGTACGGA	3419
1618362_s_at	406	429	239	GATTGTGCAACTGCAAACCTGATG	3421
1611078_a_at	17	433	254	GTTGACGAAAATGGAGTACAGCACA	3424
1611994_a_at	16	433	157	GTTGACGAAAATGGAGTACAGCACA	3424
1609035_at	382	395	461	GAGTGAGAACAGGAGCAGCAGCAAT	3425
1621969_s_at	148	289	551	GCCGTGCCTGCTGAATATGAACTGT	3426
1607595_at	476	239	121	CGGGATGGATGATGTGCTTCTCGAC	3427
1615219_at	240	543	107	GGAAACCAGAAACCAGACGCAGAATC	3433
1612524_at	668	711	43	TTCCGTGGATCAAATGTTGGGTCAG	3445
1615081_at	409	439	135	GTTCTACCCAGCTACAGTTTATCTA	3446
1617430_s_at	344	433	1028	GTTGTATCCATGAACTGTATGAATA	3447
1620505_at	679	633	989	TCAACCTGTTTTGTCCACTCTGCTA	3447
1606494_at	446	507	107	GGGTCATCGCCATGGCAGAGGACAA	3448
1614414_at	483	365	225	GACACCTTCCCTCTGGAACGAGA	3453
1618182_at	163	191	125	AATGGCTTCTCGAAAGCTTCTCTCA	3454
1622721_at	18	301	341	GCTGCATGCTTCTAGCTGTTGGTA	3462
1614414_at	621	349	242	GAACGAGACTCTCCACATTCCAGTG	3466
1621237_at	435	469	144	GTCAGTAGTGAATATGCCTCCCGGA	3476
1606564_at	383	223	627	CAGTTTTCCAGTCAAGGAGCTTGAT	3478
1608381_at	601	547	248	GGAGCTTGTAGTTCCATTTATGATT	3492
1612078_at	479	51	315	ATGACATCGATCTTGAGTTGCAGCG	3493
1617921_at	206	529	377	GGATGACTATGAGGTTGTTTCGAAA	3497
1615722_s_at	417	587	469	TGACGAGGGCAGTGTACTACATGGT	40
1619703_at	186	511	544	GGTGAACGCTGGCTACACCAAAGGA	40
1614910_at	693	111	696	AGCCAATTCTCTATGCTACATCTTC	41
1608869_s_at	17	57	258	ATGTTGTTTCCACAGACTTCATCGG	42
1606669_s_at	633	275	106	CCTTCTCCGCCAAGGACTATCATGA	44
1615808_s_at	369	375	747	GACCCCAAGAGGAGTGCCAGAGACT	44
1621076_at	516	65	639	AGGCTGTTGATGCTTCATTGATTGC	47
1614910_at	682	715	225	TTGCTTACCCTTCCAATTTTGTTT	48
1619993_at	518	149	348	AAAGCTGCCTTCTCTCATCTCTGTT	50
1614093_s_at	536	261	1149	CTGGAAGGGATGCATTTATTAGATA	51
1621225_at	679	351	175	GAACATTTTTCGGATTTTCCCAGAA	54
1619695_at	341	63	104	ATGGCTTCATCTCTCTCCGGAGCTT	59
1608272_at	453	353	496	GAACAAGCTGCTGAACTTTCCAAA	62
1609555_at	4	89	150	AGATCAGTTGCAGTTGCCGGCTGGT	64
1621473_at	52	697	114	TTAGACGCCAATTCCGCTGATTTTCG	72
1619517_at	76	69	271	AGGCAATTCCTCCTGCAGATGCAAT	74
1619501_at	567	219	708	CACCTGGGTTCTGGGTTGGAGTTCA	77
1610982_at	585	441	44	GTTCACTGGCAACAATTCCCATCA	83

1614916_at	147	115	261	ACTGTCCTAACAGTGATCGGATACA	83
1617244_s_at	156	395	575	GAGGGATGAGAACTGCCCCGAATCA	84
1610896_at	478	139	313	AAATTCTACCAGTCTCTAGCTAAGG	90
1610982_at	467	107	103	AGCTGTGTCATCTATAACAACGAC	92
1609758_at	587	55	712	ATGTAGGGTTCCAAGTTTTCTGCCT	93
1620798_s_at	126	337	135	GAAGGAGATCAAGTGTTAAGCAAGC	98
1620870_s_at	433	129	1100	ACATTTTTGTACTTCGGCCATGGGT	98
1622037_s_at	51	343	333	GAAGAAATGCCCAAGCTTCTTGCAC	103
1616459_at	320	701	686	TTAATGTGGAGAGATTTGTTTTCTT	105
1621535_s_at	567	289	613	GCCCATGCTCAAGGCTGGTAATGCT	105
1614553_at	618	195	739	AATGCTGGAGGCCTTGCAGAACACA	110
1607228_at	45	645	832	TACAAGAACCCCAAAGTGCCAAACG	111
1617078_at	189	229	234	CAGGAGTTTGTGATGAAGTCAGTA	111
1621378_at	518	75	807	AGGGAAGTCTATGCCTGCTGTA	113
1614030_at	153	617	359	TCTGTCCTGTTTCATGTGATGGCTAA	114
1621033_at	501	67	199	AGGTTGTTTTTAGCTGATTTATATA	115
1612570_at	284	13	301	ATTAAGCAGCTCTTCAAGATGGGTA	119
1616946_at	128	287	510	GCCATCGATCGCTTTGAACCAAAAA	127
1608864_s_at	187	107	291	AGCGTGAAGGAAGGTATACCTCAC	133
1613999_x_at	151	111	271	AGCCTTATCGGGTTTCAGCAAGCGT	133
1618373_at	440	261	490	CGGTTCCAGCCTGCCTGGGATGAC	133
1615114_at	122	319	754	GCAGATCTTCTAAAAGTCCCTGTGA	137
1608087_s_at	59	373	131	GACGATGTTGAGTTGGTTGCAGTCA	139
1608087_s_at	597	231	181	CATGACCTACATGTTTAAAGTACGAC	142
1610679_at	398	479	617	GTGCAGTGTACGGATCTGGATCTCC	146
1616310_at	353	437	217	GTTGCCATTTGTGCTATATGTGTGA	148
1622361_s_at	315	199	657	AATCAGACTATGCTGGATTCACAGA	159
1614910_at	674	361	617	GACAACCTCGGATGGGAAATACAGCT	161
1615105_s_at	595	167	618	AACCCTGATAAGATTCCATTTGTCC	165
1618915_at	324	467	286	GTCACTCATGTTCCACCAATGCATTC	167
1620700_at	220	297	567	GCTGGAAGAGGCTGTTCCGAGTATT	173
1619524_at	684	327	108	GAATTTTGGGCAGCTAGAATCTTCA	174
1611241_at	81	145	310	AAAGTGGGCCCAAGTGGACACCAAG	179
1608328_s_at	340	543	533	GGAAGCAGCAGCATTTGGACGATCT	181
1615015_at	649	627	383	TCAGGCTATAAGTTCTTGGGAGAAA	185
1614916_at	570	511	512	GGTGAAGGCGTTTCAGTCTTCGCTC	186
1619968_at	196	137	235	ACAAGCATGCGGAGGAGACAGCCAA	187
1620761_at	651	79	531	AGTCCCTCAGTGTTCGGCCTAGGCC	188
1610738_at	283	489	158	GTGTCAGCGTCCCTGAAGCTTTCAT	192
1616343_at	526	267	383	CGCCCAATTCCGTGTGCTTTAGCAT	194
1619601_at	655	51	198	ATGACAGACACGTATTGCCCAGAGT	204
1607076_s_at	725	523	625	GGATCTCCCAGTAACGACGCGGCCA	208
1614558_at	35	491	104	GTGGTTTCAACCACCAAGCTTTTG	210
1614152_at	186	181	671	AAGATTGGCCAGATTCTCAGGGTCA	211
1619051_at	5	551	321	GGCGGTGGTAACTGAGATATGCTTC	213
1622721_at	245	487	125	GTGTTGGGAGGTATCGCCACTTCTC	230
1608766_at	247	173	794	AAGCTGCTTACATTAGTGTCCCTGT	233
1622734_at	111	167	124	AACGGCAAGCTCTTACCCAGAGTT	234
1610592_at	441	289	524	GCCCTTCATCCCAAGGTGCGACTCT	235
1622037_s_at	638	713	447	TTGTGGACTCCCTTCTAAACGCTGG	235
1615722_s_at	363	393	106	GAGTGGGAGCGAACAAGTTCTCAGA	237
1619703_at	410	297	551	GCTGGCTACACCAAAGGAGATGGGC	237
1619211_s_at	87	373	543	GACCTCGTTTCGACTCCGGAGGGA	242
1607934_at	459	279	103	CCATGGATCGTGAAAGCGGCAGTCG	244
1609441_at	23	145	102	AAATGGGTTAGTGTCTTCTCTCTCT	247
1615169_at	141	523	409	GGTTCTTGTATTGAAATGCATCCTT	250
1608114_at	395	103	163	AGCATGCAAGGACGCTTGGCCAAA	253
1615459_at	389	63	587	ATGGACCTATTAACGCCTGTTACTC	255

1618370_at	287	689	435	TTGTTGGGCCCTTTGTGAAGACCGG	258
1617342_at	449	659	112	TAGGGTTTCTTCTTATCCTTCT	263
1614093_s_at	715	349	1026	GAACTAATTCAGACTGTGAACTGC	272
1608896_at	540	9	261	ATTCTGGAGGACGTGGCAGCCACCA	273
1615105_s_at	556	463	523	GTAACAAGATGGATGCCACAACACC	274
1610955_s_at	193	301	544	GCTCTGGTCTACACCGTCTATGCAA	275
1621528_at	587	293	194	GCGTCCACGATTTCCAAGCTTGGGA	277
1606813_s_at	494	191	531	AATGTGAACAAGCTTCTGGTTGGAA	283
1622368_at	299	337	501	GAAGGCATTGGCTCCACTCAGGGAG	284
1607932_at	89	209	160	CAATAACTGCTACAAGCAAGGCCAT	285
1609376_at	530	509	110	GGTGGACTATTTTGTTCACCTCCGA	290
1621161_at	255	305	1015	GCTTCAGTTGTCTAATCCAATCGA	293
1621072_at	553	649	668	TACTCACTGGTCATGGAGATTCAA	295
1607904_at	51	573	163	TGTGAAGCTATATTATCTCTCTCGC	304
1619110_at	282	7	185	ATTGCCCTTACCAGTTGAGCTCGGA	305
1617897_at	41	263	482	CGGTATTTCCGCCGATATTTCCGAAA	313
1616880_at	521	655	108	TAGAGATCACTCTGGGCATCTGTCT	319
1606778_at	544	143	150	AAATGAACGGCGGTCCATCTGGTTT	325
1608120_at	394	81	363	AGTAATCATATACCCATCGCCATTG	328
1622640_at	448	493	111	GTGGAGTTTGACATTCAGCTTGAGT	329
1616438_at	182	327	603	GCAAGGAGCCAACCTCACGTTGATA	334
1618875_s_at	325	179	805	AAGAGCTCTGAACTTTCTGCTCTAT	337
1608938_at	160	345	597	GAAGCATGACAGAGAGGTGCACCAT	342
1608138_s_at	681	1	3457	ATACGAGGTACTTTATTGCTTAGTC	343
1618524_x_at	654	97	73	AGAAGTCCTTCCGTTTCGTCTGTGA	343
1618125_at	154	501	207	GGGAGACCCCGATTATCACCAAGAG	344
1607807_s_at	344	55	1174	ATGTATTTTCCCATGGTTTATGATA	347
1621000_at	537	245	268	CTTTGAAGACTCTACCACACTGGTT	349
1619794_at	6	717	705	TTGCCTACTCCTTTGATCATGATCA	352
1608028_at	573	473	148	GTCGATATGTTATAAGCGCGGCTCA	355
1609107_at	55	439	469	GTTCCGCGCTGAATCCTAGCGGGAA	360
1616740_s_at	376	29	522	ATAACTGATAAGCTTGGCCTCCACT	362
1609342_at	107	221	149	CACTACAACCGCTATGGCATTTGCA	368
1607051_x_at	475	629	121	TCAGGGCTCAGCGTGCTAAATCAAT	370
1612324_s_at	229	407	559	GATACATGATATCCTCGGGTCAGCC	370
1613104_at	478	99	621	AGCAAGTTTGTCCGAACCTTGACC	374
1611671_at	463	305	563	GCTAGCATGGTTTATTCTCCTCT	376
1606530_s_at	302	671	612	TTTGCTGGAATAATAGCGAATAA	378
1612791_at	180	633	178	TAAGTCAAAGACTAACCCAGGCCA	378
1620011_at	713	357	288	GAAAGCCTGGTCCTCACAAGATTCA	380
1608229_s_at	154	331	178	GAATATGTTCTTCAGGGACATCTAC	381
1618525_s_at	447	539	202	GGAAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGA	382
1614558_at	582	321	357	GCAACTACGTGGTGCAGTCAAACCT	388
1616901_at	601	381	491	GAGCATCTCTTCTGGATTTGGAGTA	390
1613935_at	462	73	697	AGGGTAGAACCATGTCATCTAAGTT	394
1617992_a_at	634	467	682	GTCAAGGACCCGGAATGGCTCATTG	397
1619901_at	383	125	56	ACTAGAGCTGGGTGCCCTAACTCAC	398
1622369_at	313	123	529	ACTGTTGGGCAGATGTTTGTGATTC	407
1611703_at	542	461	413	GTAAGGTCAGATGAGTTGAAACA	415
1618043_a_at	663	15	69	ATTTTTGTTCAAGATTATGATGAGA	423
1608127_s_at	216	517	489	GGTCAAATCAATTCCAGAGCCGTAT	433
1621829_at	582	265	153	CGAAAACCTTCTCTCTTGTTCAG	437
1622068_at	347	433	384	GTTAGACCTTATGTTGAACCCCAAG	439
1615672_at	329	135	627	ACACCCGCTACTCAGACAACATG	440
1610329_at	582	163	129	AACCTCTTTTCGATCTCACTCATT	449
1617430_s_at	67	31	561	ATACAGATTTCCCTACAACCTACAAC	451
1607013_a_at	9	641	659	TAAGCAGAGGCCTCAGACTCTGGAC	456
1619308_at	192	421	109	GATATGGCTGCCAAGCTCATGCGCG	463

1618448_at	155	507	300	GGGTGGCTCCCGGATGGTTCCATCA	466
1619390_at	80	559	617	TGGCTCCAAAGCTGTTCTTAATTTT	469
1621771_at	679	685	695	TTTTCTACAGGGAGCCTGAGGAGCC	470
1611047_at	183	603	1251	TGCCTCCGAGGACTTCAACACAGTT	471
1611671_at	341	103	663	AGCAGTTCTGGGTCATTGGTGGTAC	472
1607515_at	97	387	605	GAGAGAAAACCTTCAGCTGAGAGATA	482
1615776_at	613	107	466	AGCTGCAGCCCCAGCAGAGGAAGCT	487
1620651_at	96	109	140	AGCTGGCTAGGGTGTGCCAGTACAT	489
1617430_s_at	323	323	642	GCAACAGATGCAGTCATATCATTCA	490
1620505_at	657	641	613	TAGACCTGGTAAACAACCCTGATCT	490
1612436_s_at	516	533	43	GGAGATGCCAAAGCTGTATTGAATT	491
1622360_at	562	113	701	ACCTCCACCTGAGTATCTTTACAGT	492
1616981_at	392	237	1119	CATTGTGGTACGAGCACCTTGGCAT	493
1620875_at	549	389	216	GAGATCTGATCGAGACATTCCTTGA	494
1622732_at	467	317	159	GCAGTGGCAGCAGCGGAAGCAACAT	498
1614387_s_at	556	553	101	GGCGGATTGACAACATCAGCTTCT	500
1622607_at	85	245	184	CGGCTGGTTTACACTGTATACGCA	500
1616294_s_at	204	411	806	GATGCCATTCGAGGAGTATACAGCT	502
1621699_at	451	25	1016	ATATGGGCCTGGTTGCATACACAAA	504
1622564_at	5	427	545	GATTGGAAAGCCTCATACTGTGCCG	505
1621296_at	598	87	190	AGATTTCATTTTGGAGCCTTGTCT	506
1622282_at	308	385	718	GAGACAGCGTTGTCGCTTTGGCACC	512
1607676_at	242	531	114	GGAGGAACCCTCAAAGCAATGGAT	514
1612496_at	86	165	299	AACTGGGTCAGGCATGGGAACACTC	515
1622004_at	56	493	86	GTGGTCTTCTGCCTATGATTGCAAA	516
1616311_at	101	563	108	TGGATCGCCCCAATCTCGAAGACTA	517
1612655_at	186	615	126	TCTCGCTACGTGCTTGATCGGAGGC	520
1614066_at	270	121	172	ACGGCTGGTATGTTCGAGATCCCTAA	526
1612314_at	290	289	354	GCCTCTGGTTCTTTGGCTTAATGGA	529
1610028_at	577	717	542	TTGCAACCCCTGGTTCTACAACAAG	535
1606498_s_at	310	49	501	ATGCGATCACTTGAGACAGGTGTTT	536
1611211_at	525	151	110	AAACGCCTCTACTCTGTCTTCAAAG	537
1617962_at	431	375	495	GACCGAGGACAGCATCAACGACTTC	538
1619181_at	717	319	493	GCACTGTCCTTATCGTAACTTTGGT	543
1608087_s_at	15	301	386	GCTGCCCATTTGAAGGGTGGTGCTA	546
1615682_s_at	476	463	452	GTACAGCCAAGACCTCGTGGCTTGA	551
1621502_at	222	167	525	AACGCTTCTTGGCTGGTTGCGAATT	552
1607992_at	488	359	362	GAAATGCATCTGTGGCAACTGCTTG	559
1615458_at	675	85	231	AGTTGCCAGCCTTTCGATATACAGA	563
1614671_at	571	217	606	CACTTTCCTGCCTCTAAAAACAGG	567
1608119_at	468	701	114	TTCTAGCCCCGATTCTGACTTAGAG	568
1614234_at	392	39	185	ATCTATCCCTTCATTTCTGGCATCA	569
1617261_at	77	589	655	TGACGGTGTCTTCGCCGGAGTTGT	573
1620765_at	238	175	753	AAGCAATTCTTTGTAGACCACCCTG	574
1606669_s_at	30	609	407	TCCTGGCCCCGAAGGTGTCGCTGAT	575
1607228_at	612	377	766	GAGCTGGAACCCGAAGTCATTGAAT	579
1608579_at	316	373	451	GACGCCAAGTACCTGGTTCGACGTGT	579
1610794_at	567	267	586	CGCGCCCGCTTGACACAACAGAAAGG	581
1621115_at	572	129	146	ACATTGCCTTACTTTTGAGCTTCTG	582
1622000_s_at	382	335	121	GAAGGCCAAGAATCCAGATCCTCCG	584
1608372_at	330	573	397	TGTCGCTGTAGGAATATGGGCTTAC	588
1614631_at	7	641	415	TAAGATCACACCTTCAACCCGAGTT	589
1608865_at	547	431	554	GTTGGCTTACAAATCTGCTCAGGAC	599
1611184_at	533	651	368	TACGCTATCACCTTGGTCTGACCAA	600
1609377_at	245	511	578	GGTGTGATCCCTTAAACAAGGCCAGA	605
1613431_at	670	129	53	ACATTGTGGAGAGTCGCCGACCGGC	612
1609697_at	99	639	185	TAATGTGCCTACCTTGATCTCTGAA	618
1615105_s_at	669	117	492	ACCCTTGGTGTGAAGCAGATGATTT	625

1610955_s_at	90	505	667	GGTGGATCAATGAACCCCGCCCGCT	626
1610218_s_at	262	669	292	TATACTGCTACAAAGGATGCCCATG	628
1615857_s_at	667	39	571	ATCTCTTTTCTGTTGGATGGGTTCA	639
1613240_s_at	355	283	65	GCCACTGACGCCAAGCGTAACGCTA	641
1615722_s_at	72	577	219	TGTTTCGTGGTCGTTTTACAGGGCTG	641
1615114_at	269	477	769	GTCCCTGTGATATTCATAAAGGCAG	642
1621570_at	487	255	642	CTGATCTTCAACACGTGGCACTGGT	643
1609556_at	336	253	160	CTCTCTCTCCATCATGTTCGGAAAAA	657
1611144_at	266	513	523	GGTGCAGCACATCCGGGCGAAATAT	665
1617921_at	690	697	630	TTCAAAGTTTTGTACCCCACTCTGA	669
1613620_at	168	141	257	AAATATCCTCTTCATCTCAGGAGTG	678
1616455_s_at	530	263	179	CGACACCAGCTATGCTACCGATGGT	685
1614631_at	228	449	633	GTATAGCTCAACCAAAGGGAGTCCT	686
1606958_s_at	470	533	896	GGAGATTCTGTTAATGTTATATTGT	687
1613881_at	398	191	1003	AATGGGTCAAGACATGATAAGCTTT	687
1611434_at	638	39	805	ATCTGCAAGCACGAGGGAATCCCCT	689
1614980_at	712	87	48	AGATATGGGCTACGGTTGATCCCTA	689
1618614_at	159	83	128	AGATAAAGAACTCGACCCCTGACAG	690
1622863_at	244	465	107	GTAACAACATTTTGGCTGCTAAAAAC	691
1613677_at	637	89	576	AGATGTCTCTGGGACTGTCCACATT	692
1619375_at	369	371	641	GACTGAGCTCTCCATCAAACAAGTA	694
1607999_s_at	56	237	897	CATTTGTTTCGTCCAGTGAGTGTGGC	700
1614944_at	102	327	365	GCAATGCATCTCTCTTGGCAATGTA	703
1615105_s_at	528	665	446	TATCTCCAAGGATGGACAAAACCCGT	705
1617355_at	643	353	118	GAAAACACTGTATACGGCGGACCGA	717
1609004_s_at	580	195	1107	AATGCCCTTCTTCTCAAGGTCAATC	719
1617244_s_at	498	301	702	GCTCCATCTCCTAACATGGGACTGA	724
1610581_at	138	675	55	TTTGAGCTCCAATGGCGATGCCTAT	727
1609098_at	490	531	117	GGAGGATCTCGATTTCTCTCTGCCT	735
1610393_at	603	665	109	TATCAGAGGACACCCGGGAGCCTGA	735
1622444_at	232	87	101	AGATCTGCAGCGGAGTGACGGCCT	736
1617082_a_at	615	19	1197	ATTTGCCTTTGGTATAATGCTCCCC	739
1613840_at	260	525	740	GGATTGGTTACATCACAGTTTGGAG	747
1617430_s_at	640	401	736	GATGGACCCCATCAGGTGCAGATAG	748
1614464_s_at	223	179	610	AAGAGATACTAGTCTCTTGAGTGCT	751
1614326_s_at	170	329	69	GAATTCTGCTTGAATCATCTTCTT	761
1608586_at	432	51	890	ATGAAGCTGGACAACAATACTACA	764
1613132_s_at	254	323	165	GAATGACCGTGGCACACCCATGAAG	764
1613667_at	399	191	570	AATGGCCTGCCAACCAGAAACTCTT	768
1617035_s_at	445	687	225	TTTTACGCGGTAATGGACTGCTTCT	769
1615936_at	201	577	331	TGTTATGCAGCCTGGTATGGCTCCT	772
1612871_at	426	503	138	GGGATATCGGCCTAGCAATGCTAAT	774
1610421_at	721	537	552	GGACTCAAATTCTAGTCTCCAGGAG	780
1617502_s_at	629	119	157	GAATCGGGTTAACATTCTGAACCG	785
1616577_at	231	705	172	TTCTTCTAGAAGCTTCTTCTTCTTC	790
1616088_at	698	537	483	GGACTGTACAAGCAGATAAACTCA	795
1608359_at	662	589	494	TGAACTCCCACCCAATGAAAGCCAA	809
1619927_s_at	509	245	151	CTTTCTGTGTCGTCTGTCTTTCAA	815
1608621_at	129	443	159	GTTACTCCCCTTATGAAGTTTGCCT	824
1608119_at	406	1	272	GTAAAACCTAACCTGTCTCACGACGG	825
1613930_at	588	579	517	TGTTGCTGGACTTGTCTTGTTCCTA	829
1612334_at	58	95	165	AGAGCTGAATATGGCAGCCGCCGTC	830
1620166_at	546	97	742	AGAAACAGCAGTGCCAGCAGCAGAA	835
1616882_at	113	289	555	GTCCGGAACTCGGAGACCCAGTGCC	836
1620973_s_at	442	471	358	GTCTTCAGTGACTAGGTTGCTATCA	838
1608787_at	555	527	534	GGATCCATCAGGTTTATATTTCTCA	840
1619511_at	58	617	782	TCTGCTTACACTGGGCCTTCCATGA	845
1618356_a_at	424	159	149	AACACCGAGGTTCGTGTTTCGATCACT	847

1607277_at	185	337	566	GAAGGCTAGCAATGTCCACAGAGAA	852
1614916_at	275	419	280	GATACAAGAGCCAGTCCGACACCGA	854
1606951_at	178	721	179	TTGATTGATCTGAATGCTCGGCC	865
1607532_at	693	453	666	GTATCTACGTCAGCGAGAAGGGAAC	867
1617797_s_at	217	89	477	AGATGGTATTTCAGGTAGAGTTGCAA	871
1613160_s_at	137	533	431	GGAGTTCATCAGAGAAATCCCCTC	874
1613365_at	496	115	812	ACCTCATTGTTGGTATTGACTTCAC	879
1619235_at	454	587	442	TGACCCAGATGGCTACATGATTGAG	880
1609392_s_at	329	703	618	TTCATCCAGGATGCTGCTGAGTACA	881
1617846_at	321	447	773	GTTTTTATTTGGTTCATCTTCTGTT	881
1606675_at	92	439	672	GTTAATGTGAATCCAAACCCTGATG	883
1606720_at	234	241	453	CTTCGAGATGATAAGCAGTTCTTCA	885
1621230_at	702	365	562	GACAGATCAGTGTGGTAGCCCCGC	891
1613126_at	334	115	540	ACCTCATGGTGACTGGAAACGTACA	908
1622051_at	291	263	355	CGGATCGATTGCCAATAATTCTGAA	914
1615814_at	324	149	850	AAAGCCGCTATCAAGGAGGAGTCTG	915
AFFX-Vi-gapdh-5_at	179	345	315	GAACCCAGAAGAGATCCCATGGGCT	915
AFFX-Vi-gapdh-M_at	140	183	754	AAGTTAACCGGCATGTCTTTCCGAG	915
1608511_at	671	247	149	CTCAACTTCTCTTGAAGCCGGAA	917
1621285_at	296	9	417	ATTGCCACCTTCAAGCTCAGGGAAG	921
1612678_at	250	593	143	TGAAGTACTCAAGTTGCTCACCTT	937
1616383_at	128	265	142	CGTTAGCCACAATCCCTTCTCTAGA	944
1620627_at	417	399	116	GAGGCACAGCTCCAAAGTCGTCGAC	947
1618387_at	157	111	119	AGCCAAGTGAGATCCGATGCTTCCA	956
1610573_at	367	341	146	GAAGATTTTTGCCACATTGCCTCTG	957
1613461_s_at	450	555	607	GGCGTGTGGAAACAGCATTGGAT	959
1615039_s_at	681	481	618	GTGACCTAGTGGAACTATGGTGG	960
1607259_s_at	455	229	592	CAGGCTTTGGGCAAGTTTGGAAATCA	963
1609864_at	291	201	145	AATATAGTTGGATTGCCGGTTGCAC	966
1614530_at	220	629	100	TACTGGACTGAATAATTGCCGGATT	967
1622270_s_at	683	245	1022	CTATCAATCAATCTCAGTCGGCCAG	968
1609790_at	491	427	393	GATTGATTGGTCTAAGGCTCCTTTC	974
1612346_at	216	333	218	GAATCGGCGGCCAAGGATGACAAGA	979
1613417_at	534	497	440	GGCTTTGTCTTCTTACAATCAGAG	982
1614414_at	361	223	648	CAGCCGCGTATGGGTATCAGGAAC	986
1614259_at	385	403	229	GATGAGCTTCTTCAAGGGTTTGTTT	986
1616324_s_at	44	115	109	ACCGATATGGTGACGGCCATCGCCA	994
1612058_at	93	367	467	GACTTGATGAAACCAGAGACCACTG	1003
1607964_s_at	99	707	145	TTCTTCTTCTTGTATGTCTGCAGT	1004
1611605_s_at	377	619	101	TCTCTCCCTTCTACTACTGATGTTG	1004
1617423_at	336	327	794	GAATTGGGTACCTTGATATTGCTTT	1005
1612518_at	43	65	517	ATGGCTCAGTTCTATGGGCTTGAA	1006
1620507_at	219	313	289	GCATTTGTATTGTGTGCAATCTTTC	1007
1615735_at	661	129	629	ACATTGAGACGTGGGCAGTCAGTCC	1010
1620134_at	115	695	124	TTAGGTGCGGTGTTCAACGTCTCAA	1014
1614221_at	577	163	796	AACTGGTTAGCCTGTAAGCGTCTCG	1016
1610982_at	111	455	202	GTATATTCTGAGAGCAGCGGCTATT	1019
1619752_at	578	115	105	ACTCTACAGGAACGGCCACAATGGT	1024
1621447_s_at	193	547	622	GGCAGGCTGAAAGGAACACGATTCT	1025
1614692_at	367	367	523	GACATGATACAAGAGGTTTCTGAAA	1026
1620349_at	660	461	647	GTACGCACATCTGTCAAAGTTTCTA	1027
1617342_at	601	491	491	GTGGTTTCAGTGAAGGTTATCCGAA	1030
1622523_at	419	45	102	ATCCGATTCTTTTCTCAAGCACAA	1033
1608381_at	449	291	343	GCCCGCTGTAGTGGTATCGACGATG	1036
1611434_at	169	553	559	GGCGGCAAACACTACATCGGACCTT	1040
1612321_at	470	543	112	GGAAGCTGAGAGATCTTATCATCAA	1041

1608424_at	384	419	644	GATACATCAGAAAAAGGCTCCTCAT	1043
1608938_at	604	163	666	AACTGAAGACGGTTCAACTGCTGAA	1044
1619167_at	88	523	641	GGTTCTGGACAACGAAGCTCTCTAC	1048
1612875_at	359	617	115	TCTGATCATGAGTTGATTTTGGATT	1049
1614910_at	617	559	521	TGGCAGAGTTTTGACTACCCCACTG	1051
1621888_at	136	287	117	GCCTGAGTACGAAGCACCGAGTTCT	1059
1616011_at	134	453	756	GTATTTAAGAACCAGGCCCGTGGTG	1064
1621416_at	611	133	586	ACAGCAGGGTGGTTTCAGACAAAAA	1067
1622482_at	445	675	269	TTTGTGAGTCCAGCACATGCAGCCA	1068
1612244_s_at	184	159	599	AACAAAGGCACAGCTCTTGGTGCTG	1069
1609629_at	235	531	277	GGCCGCCGAAATACGAGACCCGAAG	1074
1609048_at	509	121	171	ACTGTAGTTCATGTTTCCTTGGTTAA	1076
1614588_s_at	49	205	461	AATTTGCGTTCCCTGAGCAAGTCGA	1077
1607280_at	441	397	191	GAGGAATACTTTGAAAACCGCATTT	1080
1608914_at	369	669	253	TATACCTTTTCTCTACTCAGTTT	1080
1608566_s_at	477	273	628	CCGGAACCTCGCAGACTCGCAGTGTG	1083
1610982_at	550	621	232	TCTAGGATCTTTCAGGAGCAATGCC	1086
1610363_at	307	201	319	AATAGCACTTCACATGAGCGCTTCC	1090
1620788_at	706	723	160	TTGGCCGTCTCTCAGGTTTCTGTAA	1091
1613096_at	593	397	1891	GATGTATCTTGGGTTAATTCCTAG	1092
1618455_at	650	253	53	CTCGTTCTCAAATCTTGGAAACT	1100
1620207_at	118	477	327	GTCTACCTTCAGCTGCAGGAATTG	1104
1610645_at	318	343	1021	GAAGACATGAACACCCCTGAGCCGAT	1105
1608756_at	148	367	825	GACTTGTACTGATATTGCCGGGATC	1107
1618699_at	368	51	807	ATGAATCTGTAAATGTGCAAGTAC	1109
1614135_at	300	489	524	GTGTCTGCGTAAATATGGTTCTGTG	1113
1614467_at	134	229	470	CAGGGATCTCAGCAGTAGCAATTAA	1114
1614874_at	128	537	163	GGAGCCTGGCGCAGGATTTCTGAA	1115
1606487_at	718	381	299	GAGATACTTAACCTCCATGGCCGTTA	1120
1618409_at	422	719	409	TTGAACCAAACACCGTTGCATCACA	1135
1610573_at	498	343	252	GAAGAATTGCCATTCTGCCCTTTTA	1137
1612852_at	177	253	1254	CTCTCTTCGGGCTCATGCTATAATA	1141
1621339_at	55	443	152	GTTAGACCCAGTTGTGCAGATCTTA	1149
1617284_at	422	33	695	ATCAAGGGCATTAACTTCGACCTCC	1150
1617570_at	344	273	122	CCGTGAAGATCTGGGACGCCATGGA	1151
1617053_at	427	171	440	AAGCCTGAGGTCGATTCTCTGTTC	1159
1608113_at	33	329	458	GAATTAACCCTTACATGTCATCTCC	1165
1621829_at	262	85	441	AGTTCAGACATCATTTCTTGGCTT	1167
1614505_s_at	234	629	603	TCAGAGACGCAACTTTGATAGCAA	1171
1612566_at	227	719	468	TTGAGGGATGCAGTGCTGCTTGTTT	1173
1617328_at	611	439	414	GTTCTTCGTGAGCACTGGGACTCAA	1175
1607968_at	265	567	288	TACCGTCAACGCTGTCTGTAAGCGG	1176
1611082_s_at	356	147	541	AAAGATCATTGTCAGCAGGAAGTGG	1177
1612334_at	10	533	199	GGAGTTCTAGGCAAAGTTCTGTCAA	1178
1610767_at	36	409	415	GATGCAACACGTATTGGCTCTGCTG	1182
1616880_at	192	295	47	GCTGCAAAATGGCAAATCCCCAGA	1190
1619662_at	26	563	138	TGGAGAATGTATGCTGCCCGGTGCT	1197
1615395_at	82	401	1278	GATGGAGACCGAGCTCGAGGACCTC	1203
1609822_at	351	663	546	TATGAGCGATTCATCCGTCTTCGG	1205
1617904_at	711	67	412	AGGCAACCTGTTATCCATCATTCAT	1211
1617502_s_at	211	375	137	GACGCGGAGCTTCGAAAGGGAATC	1213
1607188_at	683	105	182	AGCTCAAATAAGTTCTGCTGTTGCA	1221
1610524_s_at	27	257	169	CTGCTGTGCAGGCTGCAATCTTGAG	1226
1617502_s_at	90	247	349	CTCGAGGCCCTTGAAAATCCGGAG	1229
1615182_at	432	423	397	GATTCTGACCCACAACAGCAAAGGA	1232
1615047_at	582	543	129	GGAAGAATCGCACTCCAATCCAAT	1233
1606505_at	604	61	579	ATGGTGCCGAAGCAGATCCGCATCA	1237
1616170_at	581	559	600	TGGACAGCCGACTGAAGAAGCTCAA	1249

1622021_at	727	639	524	TAAGATTCTTGCTTCCTCATTCAAA	1251
1618904_a_at	315	529	127	GGAGCACCCCTTTGGAAATGTAGTCT	1254

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Canan Yüksel Özmen

Doğum Yeri:Edirne

Doğum Tarihi:05.12.1983

Medeni Hali:Evli

Yabancı Dili:İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ankara Çağrıbey Anadolu Lisesi

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

İş Tecrübesi

Kurumu:	Görevi:	Yılları:
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarı	Araştırmacı	2007-

Yayımlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

- Sarıkamış G., Yanmaz R., Ermiş S., Bakır M., **Yüksel C.**, Genetic characterization of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey using morphological and SSR markers. Genet. Mol. Res. 9 (1): 591-600 (2010).
- Ünal F, Turgay EB, Yıldırım AF, **Yüksel C.**, (2011) First Report of Leaf Blotch on Sorghum Caused by *Bipolaris spicifera* in Turkey. Plant Disease 95:4, 495.
- Agar G., Yildirim N., Ercisli S., Ergul A., **Yüksel C.** "Determination of Genetic Diversity of *Vitis Vinifera* Cv. Kabarcik Populations From The Coruh Valley Using SSR Markers Biochem Genet. DOI 10, 1007/S10528-011-9492-Y (2011).
- Hizarci, Y., Ercisli, S., **Yüksel, C.**, Ergul, A. 'Genetic characterization and relatedness among autochthonous grapevine cultivars from Northeast Turkey by Simple Sequence Repeats (SSR)' Journal of Applied Botany and Food Quality, 85: (2), 224-228 (2012).

- Öz M.H., Vurgun H., Bakir M., Büyük İ. **Yüksel C.**, Ünlü H.M., Çukadar K., KaradoğanB., Köse Ö. and Ergül A..Molecular Analysis Of East Anatolian Traditional Plum and Cherry Accessions Using SSR Markers. Genet. Mol. Res. 12 (4): 5310-5320 (2013).
- **Yüksel C.**, Mutaf F., Demirtaş İ., Öztürk G., Pektaş M., ErgülA.Characterization of Anatolian traditional quince cultivars, based on microsatellite markers.Genet. Mol. Res. 12 (4): 5880-5888 (2013).
- Akçay M.E, Burak M, Kazan K, **Yüksel C**, Mutaf F, Bakır M, Ayanoğlu H, Ergül A. 2014. Genetic analysis of Anatolian pear germplasm by Simple Sequence Repeats (SSRs), Annals of Applied Biology 164 (3):441-452.
- Burak M., Ergül A., Kazan K., Akçay M.E., **Yüksel C.**, Bakır M., Mutaf F., Akpınar A.,Yasasın S., Ayanoğlu H., Genetic analysis of Anatolian apples (*Malus* sp.) by simple sequence repeats. Journal of Systematics and Evolutions, 52(5); 580-588. (2014).
- Çakır B, Ergül A. **Yüksel C**, Mutaf F, Kibar U, Kazan K. 2014. Microarray analysis of endoplasmic reticulum (ER) and salt stress transcriptons in grapevine rootstocks (Sunuldu).

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- Ergül, A., Y. Boz, G. Söylemezoğlu, K. Kazan, H. Çelik, M. Bakır, P. Çelikkol, N.Yıldırım, **C. Yüksel**, A.S. Yaşasın, C. Özer. 2010.“The Turkish grape (*Vitis vinifera* L.) SSR database (Oral- Abstract)”.10th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Geneva, New York, USA, August 1-5, 2010. Program and Abstracts, (Or:44) p:64.
- Bakır, M., G. Soylemezoglu, Ş. Aslantaş, P. Çelikkol, N. Yildirim, **C.Yüksel**, A. S. Yasasin, Y. Boz, C. Ozer, H. Celik, A. Ergul. 2010. “SSR Based Characterization of Grape (*Vitis vinifera*L.) Germplasm from Southeast Anatolia (Poster- Abstract)”. 28th International Horticultural Congress, Lisbon, Portekiz. August 22-27, 2010. Abstracts. Vol. II (Symposia) (Sm12.221), p:552.
- Bulut M.Ç., **Yüksel C**, Ergül A, Ayanoğlu F, "Molecular characterization of laurel (*Laurus nobilis* L.) populations using simple sequence repeat (SSRs)" , The First

Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants Turkish Republic of Northern Cyprus., 2013.

- **Yüksel C.**, Kazan K., Söylemezoglu G., Kibar U., Schlauch KA.,Cushman JC., Ergül A,Comparative Analysis of Root Transcriptomes of Cabernet Sauvignon and the 5BB Rootstock Under Drought Stress, 11th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, in Yanqing County, Beijing, 28 July- 2 August, 2014.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

- Burak, M., H. Ayanoğlu, M. E. Akçay, H. Kocataş, M. H. Öz, İ. Demirtaş, N. Tekin, A.E. Akpınar, Ş. Aslantaş, S. Soydam, **C. Yüksel**, H. Aygün, G. İnan, N. Şahin, N. Tan, B. Karadoğan, H. Vurgun, A. Doğan, G. Öztürk, M. Pektaş, A. Küden, S. Bayazıt, S. Çömlekçioğlu, K. Kazan, A. Ergül “Bazı Meyve Türlerine Ait Gen Kaynaklarının High-Throughput Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması-I (Orjinal araştırma)”. Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi.4-7 Eylül 2007, s:60-64, Erzurum, 2007.
- **C. Yüksel**, A. Ergül. Manisa, İzmir, Aydın, Muğla Ve Kütahya İllerine Ait Asma Gen Kaynaklarının SSRs (Simple Sequence Repeats)’a Dayalı Genetik Karakterizasyonu. (Poster) I. Biyoteknoloji Araştırma Ve Kariyer Günü (Poster), 25 Mayıs, 2009 Ankara Üniversitesi.
- Masum BURAK, Melike BAKIR, Kemal KAZAN, Mehmet Emin AKÇAY, **Canan YÜKSEL**, Filiz MUTAF, A. Semih YAŞASIN, Hamit AYANOĞLU, Ali ERGÜL. Türkiye Elma Gen Kaynaklarının Simple Sequence Repeats (SSRs)’a Dayalı Genetik Karakterizasyonu (Sözlü Sunum), 26-29 Ekim 2013, Ulusal Tarım Kongresi, Antalya.