

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ABIOTİK STRES ADAY GENLERİNİN ÜZÜM ÇEŞİT VE ANACINDA İFADE
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mohammed EBRAHİME

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ali ERGÜL

EYLÜL

2013

ETİK BEYAN

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

Mohammed EBRAHİME

İmzası

Prof. Dr. ALİ ERGÜL danışmanlığında, Mohammed EBRAHİME tarafından hazırlanan bu çalışma 25/9/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ali ERGÜL İmza:

Üye :Yrd. Doç. Dr. Birsen ÇAKIR İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ABIOTİK STRES ADAY GENLERİNİN ÜZÜM ÇEŞİT VE ANACINDA İFADE PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mohammed EBRAHİME

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Ali ERGÜL

Kuraklık ve tuz stresine toleransta rol oynayan aday genlerin belirlenmesi ve klonlanması, abiyotik stres yolaklarının aydınlatılmasında büyük önem taşımaktadır. LEA (Late Embryogenesis Abundant) gen ailesi ve bu ailenin alt grubunda yer alan Dehidrin (DHN) genlerinin kurak/tuz stres cevabında pozitif korelasyon gösterdiği bilinmekle birlikte, üzüm çeşit/anaçlarında konu ile ilgili aday genlerin belirlenmesi/klonlanması konusunda yürütülen araştırmalar sınırlıdır.

Bu çalışmada, Cabernet Sauvignon (CS) çeşidi ve *Solonis X riparia* 1616 C anacına tuz (120 mM NaCl) ve kuraklık stresi (%20 PEG) uygulamalarında, *Vitis vinifera*- LEA (VvLEA) ve *Vitis vinifera*- Dehidrin (VvDHN) olmak üzere iki aday genin ifadeleri Real Time PCR ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda; VvDHN aday geninin ifadesi çeşitte kuraklık stresinde 24. saatte, anaçta ise daha erken (2. saat) devreye girerken, tuzluluk koşullarında ise anaçta 12. saatte yüksek artış göstermiştir. VvLEA aday genin ifadesi ise çeşitte hem kurak hemde tuzluluk koşullarında 6. saatte anaçta ise 12. saatte yüksek artış göstermiştir.

Sonuç olarak, iki gen bölgesinin ifade düzeyinde iki farklı türde (çeşit-anaç) ifade varyasyonları belirlenmiş ve bu genlerin klonlanmaya aday stres genleri olduğu kanıtlanmıştır. Araştırma aşamada LEA gen ailesinin ifadesine yönelik ilk çalışma olup DHN genlerine yönelik çalışmalara da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2013, 98 Sayfa

Anahtar kelimeler: *Vitis*, 16-16C, Cabernet Sauvignon, late embryogenesis abundant (LEA), dehidrin (DHN), gen ekspresyonu

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

RESEARCH ON GRAPE CULTIVAR AND ROOTSTOCK EXPRESSION PROFILES OF THE PREDICTED ABIOTIC STRESS GENES

Mohammed EBRAHİME

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Ali ERGÜL

The identification and cloning of candidate genes involved in drought and salt stress tolerance, is of a great importance in elucidation of abiotic stress pathways.

LEA (Late Embryogenesis Abundant) gene family and the family's sub-group of the dehydrated (DHN) genes are known to be positively correlated with drought / salt stress response; however, the research conducted in determination and cloning of candidate genes in the grape cultivar / rootstocks is limited.

In this study, Cabernet Sauvignon (CS) variety and *Solonis X riparia* 1616 C rootstock were treated under salt (120 mM NaCl) and drought stress (20% PEG); then by using Real Time PCR, expression of two candidate genes, VvLEA and VvDHN were determined. The study showed that, in CS gene expression of VvDHN has increased at 24th hour after drought stress treatment; however, in 1616 C, it has showed the highest increase in salinity conditions at 12th hour post treatment. Gene expression of VvLEA increased at 6th hour after treatment for both salinity and drought conditions, but for the rootstock increased at 6th hour.

As a result, gene expression level of the two various regions of the two species (variety - rootstock) were determined and these genes have proven to be a candidate stress genes for cloning.

The research is the first in the study of the LEA gene family expression in grapevine and DHN genes are also thought to contribute to its efforts in the area.

2013, 98 Pages

Keywords: *Vitis*, 16-16C, Cabernet Sauvignon, late embryogenesis abundant (LEA), dehydrin (DHN), gen expression

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL'e en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Akademik gelişimim ve tez çalışmalarım sırasında her türlü olanağından faydalandığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne, birlikte çalışmaktan zevk aldığım Bitki Biyoteknolojisi ekibi Uzm. Bio. Canan YÜKSEL, Uzm. Bio. Umut KİBAR, Bio. Sinem DEMİREL, Bio. Filiz MUTAF ve Bio. Mert ÖKTEM'e,

Eğitimim boyunca her türlü maddi desteği sağlayan Ankara Üniversitesi Afrika Çalışmaları Merkezi'ne ve bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, bana inanan ve sürekli moral veren aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
ÖNSÖZ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER DİZİNİ	XI
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1 Bitkilerde Abiyotik Stres.....	3
2.1.1. Bitkilerde Kuraklık Stresi.....	3
2.1.2. Bitkilerde Tuz Stresi.....	5
2.1.3. Bitkilerde Kuraklık Stresi ile İlişkili Genler.....	7
2.1.4. Bitkilerde Tuz Stresi ile İlişkili Genler	8
2.1.5. Asma Çeşit (<i>Vitis vinifera</i> L.) ve Anaçlarında Kurak ve Tuz Toleransı	11
2.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Koşulları Altında Gen İfadesinin	12
Belirlenmesine Yönelik Yaklaşımlar	12
2.2.1 Real Time PCR (RT-PCR) (Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	12
3. GEREKÇE VE AMAÇ	16
4. MATERYAL VE YÖNTEM	18
4.1. Bitkisel Materyal	18
4.2. Yöntem.....	19
4.2.1 Doku Kültürü Denemesi.....	19
4.2.3. Stres Uygulamaları	22
4.2.3. Fizyolojik Ölçümler.....	25
4.2.4. RNA İzolasyonu	26
4.2.5. Real Time PCR Uygulamaları.....	27
5.ARAŞTIRMA BULGULARI	36
5.1 Stres Uygulamaları.....	36
5.1.1.Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulamaları.....	36
5.1.2 Stresin Fizyolojik Olarak (MPa) Belirlenmesi	37
5.2 Nükleik Asit İzolasyonu.....	41
5.2.1. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini	41
5.3 Real Time PCR Analizleri	43
5.3.1 cDNA Sentezi	43

5.3.2 Standart Eğri (Standart Curve)	45
5.3.3 Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri	47
5.3.4 Erime Eğrisi (Melting Curve).....	50
5.3.5. Real Time PCR Normalize Verilerinin İfade Analizleri	51
5.4. Fizyolojik Veriler (MPa) ile Gen İfadesi Analizlerinin	56
Karşılaştırılması	56
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
6.1. Dehidrin Gen Bölgesi İfade Analizleri	58
6.1.1.Tuz Stresi-Dehidrin Gen İfadesi Analizleri.....	58
6.1.2. Kuraklık Stresi-Dehidrin Gen İfadesi Analizleri.....	59
6.2. VvLEA Gen Bölgesi İfade Analizleri	61
6.2.1.Tuz Stresi-VvLEA Gen İfadesi Analizleri	61
6.2.2. Kuraklık Stresi-VvLEA Gen İfadesi Analizleri	62
KAYNAKLAR.....	65
EKLER.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	97
TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Real Time PCR Döngü Aşamaları	13
Şekil 4.1. 1616 C Anacının Sera Ortamında Geliştirilmesi	18
Şekil 4.2. Cabernet Sauvignon Çeşidi ve 1616 C Anacına Ait Bitkilerin Besi Ortamına Ekim Aşamaları	21
Şekil 4.3. Cabernet Sauvignon Çeşidi ve 1616 C Anacına Ait Bitkilerin Besi Ortamında Gelişimleri	21
Şekil 4.4. Cabernet Sauvignon Çeşidine Ait Bitkilerin Sıvı Ms Ortamında Gelişimleri	22
Şekil 4.5. 1616 C Anacına Ait Bitkilerin Sıvı Ms Ortamında Gelişimleri	23
Şekil 4.6. Basınç Bombasında (Pressure Bomb, Pms Instruments) Yaprak Su Potansiyeli Ölçümü	26
Şekil 5.1. 1616 C Anacına Ait Bitkilerde Kuraklık Stresi Görüntüsü (12. Saat)	36
Şekil 5.2. Cabernet Sauvignon Çeşidinde Yaprak Su Potansiyelinin (-MPa) Grafikselsel Gösterimi	39
Şekil 5.3. 1616 C Anacında Yaprak Su Potansiyelinin (-MPa) Grafikselsel Gösterimi	41
Şekil 5.4. İzole Edilen 1616 C Anacına Ait Bazı RNA'ların Agaroz Jel (%1.2) Görüntüsü ..	42
Şekil 5.5. Real Time PCR Cihazından Alınan VvLEA2 Primerine Ait Standart Eğri Grafiği, Efficiency ve Slope Değerleri	46
Şekil 5.6. Real Time PCR cihazından alınan DNHP1 Primerine Ait Standart Eğri Grafiği Efficiency ve Slope Değerleri	46
Şekil 5.7. ACT Primerinde Standart ve Örneklere Ait Amplifikasyon Eğrileri	47
Şekil 5.8. VvDHN1 Primerinde Standart ve Örneklere Ait Amplifikasyon Eğrileri	48
Şekil 5.9. DNHP2 Primerinde Standart ve Örneklere Ait Amplifikasyon Eğrileri	48
Şekil 5.10. VvLEA1 Primerinde Standart ve Örneklere Ait Amplifikasyon Eğrileri	49
Şekil 5.11. VvLEA2 Primerinde Standart ve Örneklere Ait Amplifikasyon Eğrileri	49
Şekil 5.12. VvDHN1 primerine Ait Standart ve Örneklerin Erime Eğrisi Grafiği	50
Şekil 5.13. ACT Primerine Ait Standart ve Örneklerin Erime Eğrisi Grafiği	51
Şekil 5.14. 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için 120 mM NaCl Stresinde VvDHN1-VvDHN2 Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2-sided) Verileri	52
Şekil 5.15. 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için PEG Stresinde VvDHN1-VvDHN2 Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2-sided) Verileri	53

Şekil 5.16. 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için 120 mM NaCl Stresinde VvLEA1-VvLEA2 Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2-sided) Verileri	54
Şekil 5.17. 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için %20 PEG Stresinde VvLEA1-VvLEA2 Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2- sided) Verileri	55
Şekil 5.18. CS Çeşidi MPa Değerleri ile Gen İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması	56
Şekil 5.19. 1616 C Anacı MPa Değerleri ile Gen İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Bitkisel Materyal Sterilizasyon Uygulama Aşamaları	19
Çizelge 4.2. Roubelakis Besin Ortamı Makroelementler, Mikroelementler ve Vitaminler	20
Çizelge 4.3. Tuz Stresi Uygulama Deneme Deseni (Konsantrasyon: 120mm NaCl-1:10 Oranında CaCl ₂ */50 Ml Sıvı MS)	24
Çizelge 4.4. PEG (%20) Stresi Uygulama Deneme Deseni	25
Çizelge 4.5. Real Time PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerlere Ait Bilgiler.....	29
Çizelge 4.6. VvDHN1 Primer Optimizasyon Koşulları	31
Çizelge 4.7. VvDHN2 Primer Optimizasyon Koşulları	32
Çizelge 4.8. VvLEA1 Primer Optimizasyon Koşulları	32
Çizelge 4.9. VvLEA2 Primer Optimizasyon Koşulları	32
Çizelge 4.10. ACT Primer Optimizasyon Koşulları.....	33
Çizelge 4.11. Real Time PCR Programı.....	34
Çizelge 5.1. Cabernet Sauvignon Çeşidinde Yaprak Su Potansiyeli (-MPa) Ölçümü ve t-test anlamlılık düzeyleri	37
Çizelge 5.2. 1616 C Anacında Yaprak Su Potansiyeli (-MPa) Ölçümü ve t-test Anlamlılık Düzeyleri	39
Çizelge 5.3. Cabernet Sauvignon Örneklerine ve Bir Kontrole Ait RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri.....	42
Çizelge 5.4. 1616 C Örneklerine ve Bir Kontrole Ait RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri	43
Çizelge 5.5. Cabernet Sauvignon Örneklerine ve Bir Kontrole Ait cDNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri.....	44
Çizelge 5.6. 1616 C Örneklerine ve Bir Kontrole Ait cDNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri	45

SİMGELER DİZİNİ

ACT	Aktin
ABA	Absisik Asit
bp	Base pair (Baz çifti)
Ct	Eşik döngü değeri
CTAB	Hekzadesil Trimetil-Amonyum Bromür
CS	Cabernet Sauvignon
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DHN	Dehidrin
EDTA	Etilen Diamine Tetra Asetik Asit
LEA	Late Embryogenezis Abundant
LiCl	Lityum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mM	Milimolar
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
µl	Mikrolitre
M	Molar
MS	Murashige and Skoog Basal Medium
NaCl	Sodyum Klorür
Real time PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
PVP-40	Polyvinylpyrrolidone-40
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SOS	Salt Overly Sensitive-Tuza Aşırı Duyarlı

1.GİRİŞ

Abiyotik stres faktörleri, dünya genelinde birçok tarım alanını etkilemekte buna bağlı olarak, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına neden olmaktadır (1). Abiyotik stres faktörlerinin başında gelen ve birbirleri ile ilişki halinde olan kuraklık ve tuz stresi bitkilerde metabolik olayları (fotosentez vb.) yavaşlatmakta ve stresin devamı halinde bitkilerde ölüm meydana gelebilmektedir.

Kurak ve tuz stresi koşullarında bitki de her iki strese karşı verilen erkencil cevaplar büyük oranda benzerlik göstermektedirler (2). Her iki stres içinde bitki hücrelerinde oluşan dehidrasyon nedeni ile hacimsel azalmalar gerçekleşmekte, bununla birlikte bitkide stres koşulu, süresi ve derecesine bağlı olarak, büyüme yavaşlamakta, stomalar kapanmakta, fotosentez hızı azalmakta, koruyucu protein ve antioksidan birikimi ise artmaktadır (2, 3). Oldukça kompleks olan bu süreç bir çok biyokimyasal ve moleküler mekanizmayı (gen vb.) içermektedir (1). Bu nedenle kurak ve tuz stresi toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının aydınlatılmasında stres ile ilişkili spesifik genlerin ifadesinin bilinmesi önem taşımaktadır.

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda; LEA (Late Embryogenesis Abundant) gen ailesi ve bu ailenin alt grubunda yer alan Dehidrin (DHN) genlerinin; tuzluluk, dehidrasyon ve düşük sıcaklık (1, 4) gibi abiyotik stres koşullarında, bitki stres cevabında önemli rol oynadığı belirtilmektedir.

Asmada kuraklık ve tuz stresine yönelik yapılan araştırmalarda; kültür asmaasının (*Vitis vinifera* L.) kuraklığa kısmen yüksek (5-10), tuza ise orta derecede tolerans gösterdiği belirtilmiştir (7, 11). *Vitis vinifera* L. çeşitleri ile Amerikan asma anaçlarının karşılaştırılmasında ise, anaçlarda genel olarak dayanıklılığın düşük olduğu bildirilmektedir (11). Kuraklık stresi bakımından özellikle *Vitis Rupestris* melezi (10R,

140Ru, 99Rvb) anaçlar kurağa daha toleranslı bulunurken, tuz stresinde ise 1616 C' nin en toleranslı anaçların başında geldiği bildirilmiştir (12).

Asmada kuraklık ve tuz stresi ile ilişkili genlerin bulunması ve bu genlerin ifade profillerinin çeşit- anaç bakımından karşılaştırılmasına dayanan çalışmalar azdır. Özellikle bitki dehidrasyonunda rol oynayan dehidrin gen ailesine yönelik bazı çalışmalar bulunurken (13), asmada LEA gen ailesine yönelik gen ifade profillerini içeren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında; kuraklık ve tuz stresi ile ilişkili olarak rol oynayan LEA ve dehidrin gen ailelerinden birer aday gen bölgesinin farklı koşul ve zamanlarda hem çeşit (Cabernet Sauvignon) hem Amerikan asma anacında (*Solonis X riparia* 1616 C) ifade profilleri karşılaştırılarak, söz konusu gen adaylarının stres cevabına yönelik ifadesi ve ifade dereceleri zaman bağımlı olarak araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Bitkilerde Abiyotik Stres

Stres; abiyotik (tuz, kuraklık, sıcaklık, ağır metaller, radyasyon vb.) ve biyotik (bakteri, virus, mantar vb.) etmenler nedeniyle bitkinin herhangi bir döneminde büyüme ve gelişmesindeki fizyolojik ve biyokimyasal olumsuzluklar şeklinde tanımlanmaktadır. Stres etmenlerinin oluşturduğu zarar; bitkinin türüne, çevreye adaptasyon ve tolerans derecesine, bağlı olarak değişim göstermekte olup bu etmenler değişik bitkilerin değişik bölgelerde en iyi şekilde adaptasyonunu belirleyen temel faktörler içerisinde yer almaktadır (14).

Bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olarak, gelişim, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına neden olan abiyotik stres etmenleri nedeni ile ürün verimlilik oranlarında istenmeyen kayıplar gözlemlenmektedir (1).

2.1.1. Bitkilerde Kuraklık Stresi

Abiyotik stres etmenlerinin başında gelen ve bitkisel üretimi sınırlandıran (15) kuraklık stresi; genel anlamda toprağın sahip olduğu suyun yetersiz kalması ve buna bağlı olarak bitkilerin normal gelişimlerini sağlayamaması koşuludur. Kuraklık stresi su noksanlığı ve kuruma olarak iki tipi bulunmaktadır. Kurumaya oranla daha fazla gözlemlenen su noksanlığı; stomalarda kapanmaya ve gaz değişiminde kısıtlamaya neden olan orta düzeydeki su kaybıdır (16). Kuruma ise, hücre yapısı ve metabolizmanın tamamen bozulmasına ve biyokimyasal reaksiyonların durmasına neden olabilecek potansiyele sahip olan aşırı miktardaki su kaybı olarak tanımlanabilir (16). Kuraklık seviyeleri kuraklık süresi, şiddeti bitkiye göre değişkenlik gösterip, bitkinin bulunduğu ortamdaki yağışsız dönem, toprağın su tutma kapasitesi, evapo- transporasyon hızı gibi etmenler kuraklık seviyelerini belirlemektedir (17). Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri 3 ana grupta gözlemlenmektedir;

Mekanik etki: Hücrelerde su azlığına bağlı olarak gerçekleşen turgor kaybı ile ortaya çıkan etkidir. Hücrede su kaybının başlaması ile membran yapısı yavaş yavaş değişikliğe uğrayarak jel fazına geçiş yapmakta, bu geçiş sırasında hücrede mevcut hacmin azalması ile meydana gelen gerilim sonucunda plasma membranında yırtılmalar meydana gelmektedir. Ortamda serbest hale geçen hidrolitik enzimler ile hücre otolize olabilmektedir (18).

Metabolik etki: Hücrede su kaybıyla meydana gelen iyon birikimi, membran bütünlüğünü denatürasyon ve enzim inhibisyonu ile hücredeki mevcut proteinlerin yapısını bozarak metabolik etkiyi başlatmaktadır. Bununla birlikte hücrede DNA, RNA degradasyonu da gözlenebilmektedir (19).

Oksidatif etki: Kuraklık stresi altında meydana gelen serbest radikaller (eşleşmemiş elektron içeren moleküller) hücre içinde lipid peroksidasyonu veya yağ asidi doygunluğu meydana getirerek membran yapısının bozunmasına neden olmaktadır (20).

Bitkilerde kuraklık stresine karşı geliştirilen dayanıklılık mekanizmaları ise; stresten kaçınma ve stres toleransı olmak üzere gerçekleştirilmektedir. Streten kaçınma mekanizmasına sahip tek yıllık bitki olan çöl efemerleri, kurak mevsim süresince yalnızca dormant tohum halinde bekleyerek kuraklık stresinden kaçmaktadırlar. Stres toleransı gösteren sukkulent bitkiler ise; sukkulent dokularında su depolayarak uzun süre kuraklığa karşı canlılıklarını sürdürebilmektedirler (21).

Bitkilerde kuraklık stresine karşı oluşturulan cevaplar; bitki türü, su kaybının seviyesi ve süresi, bitkinin gelişim durumu, yaşı, hücre tipi ve hücre içi kompartman (hücre zarı veya hücre çeperi gibi) durumuna göre değişim göstermektedir. Bu nedenle bitkide oluşturulan cevapların süresi de aynı şekilde birkaç saniyeden (fosforilasyon gibi) bir kaç saate (gen ifadesi değişiklikleri gibi) kadar farklılık gösterebilmektedir (22).

Kuraklık sırasında bitkide cevap olarak, hidrolik (hücrede turgor oluşumu) ve kimyasal sinyaller ile stomaların kapanması, vasküler dokularda değişiklikler gibi tepkiler gözlemlenmektedir. Bitkide cevap olarak geliştirilen bu stratejiler, kuraklıktan kaçınma (sakınma) veya kuraklığa tolerans mekanizmalarıdır (17, 23).

Stomaların kapanması fotosentez gerilemesinin de temel nedeni sayılmaktadır. Orta düzeydeki su noksanlığı koşulları altında stomaların kapanmasına bağlı olarak gerçekleşen bu sınırlamalarda, bitki hormonlarından ABA (Absisik asit) (24) ile meydana gelen kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler büyük rol oynamaktadır (25). Ayrıca hidrolik sinyaller olarak adlandırılan yaprak su potansiyeli veya toprak su potansiyelindeki değişimlerde yine fotosentez olayının gerilemesindeki diğer nedenler olarak gösterilmektedir (26).

Kuraklık stresinde morfolojik olarak ise sürgün gelişimi yavaşlamakta bununla beraber köklerde ise toprağın derin katmanlarındaki suya ulaşabilmek için kök sisteminin geliştirilmesi şeklinde adaptasyon gerçekleşmektedir (24).

2.1.2. Bitkilerde Tuz Stresi

Yer altı kaynaklarının olumsuz etkisi, kurak koşullar altında toprak katmanları arasında tuz birikmesi ile veya susuz tarım uygulamaları gibi nedenlerde meydana gelen tuzluluk tarım alanlarında verim ve kaliteyi olumsuz etkilemektedir (27). Dünya tarım alanlarına bakıldığında; yaklaşık olarak 800 milyon (% 6) hektarında tuzluluk sorunu bulunmaktadır (28). Ayrıca, susuz tarım uygulaması yapılan yaklaşık 1500 milyon hektar alanın 32 milyon (%2) hektar alanda, sulu tarım uygulaması yapılan yaklaşık 230 milyon hektar alan içerisinde ise, 45 milyon (%20) hektar alanda çeşitli derecelerde toprak tuzluluğu sorunu yaşanmaktadır (28).

Tuz stresi ortamda bulunan tuz yoğunluğu ve tuz stres süresine bağı olarak bitkilerde hücre bölünmesi, fotosentez gibi olayları etkileyerek normal büyüme ve gelişmeyi engellemektedir (29). Bitki gelişiminde tuzluluğun etkileri genel olarak iki farklı şekilde meydana gelmektedir. Bunlardan birincisi; bitkinin topraktan su alma yeteneğini azaltarak bitkide büyümenin yavaşlaması ve sonucunda meydana gelen ozmotik strestir. Diğeri ise, tuz stresinin bitkide yarattığı iyon (Na^+ , Cl^-) spesifik etkisidir (30). Bitki hücrelerinde tuz stresi ile Na^+ ve Cl^- gibi iyonların birikmesi hücre ölümlerine neden olmaktadır. Hücrede Na^+ oranındaki artışa bağı olarak, enzim fonksiyonlarında gerileme, fotosentez azalması, hücre membrane potansiyelinin bozulması, ozmotik dengesizlikler gibi birçok olumsuz etki yaratmakta (24) ayrıca protein yapısının bozulmasında da görev alabilmektedirler (31).

Oldukça kompleks olan tuz stresi hücrede beraberinde bir çok olayı aktive etmektedir. Bunlardan biri de tuz stresinin Reaktif Oksijen Türleri (ROT) üzerine etkisidir. Stresle beraber oluşan su noksanlığı beraberinde süperoksit (O^{2-}), hidrojenperoksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH) gibi çeşitli ROT oluşumunu gerçekleştirmektedir (32). Buna karşın bitkiler oluşan ROT' lerinden korunmak amaçlı antioksidan (glutatayon, karotenoid, askorbat gibi) ve antioksidatif enzimleri (peroksidaz -POX), katalaz (CAT) gibi kullanmaktadırlar (31).

Tuzluluğun hücrede yarattığı değişimler temelde membran yapısındaki gözlemlenen değişikliklerdir (33). Farklı bitkilerde farklı hücrel olaylar gözlemlenmekle birlikte, genel anlamda membranda bozunma ve kıvrılmalar oluşmakta, ayrıca membran içeriğindeki lipitlerde yağ asitlerinin doygunluğunda meydana gelen artma nedeniyle membran akışkanlığında azalmalar olmaktadır (34).

Bitkiler kuraklık stresinde olduğu gibi tuz stresinde de birçok moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları devreye sokmaktadır (32). Tuz stresi altında dayanıklılığı sağlayan tuz toleransında bitkilerin genel olarak verdikleri cevap mekanizmaları ozmolit (uyumlu çözünenler) üretimi, iyon homeostasisi değişimi, su transportu olarak gerçekleşmektedir (35). Stres altında sitoplazmada iyon homeostasisinin sağlanması için bitkiler Na^+ 'un fazlasını vakuollerinde depo etmekte bu sayede metaboloik olaylarını devam

ettirmektedirler (32). Yapılan çalışmalarda Arabidopsis spp.'de iyon dengesinin sağlanmasında önemli rol oynayan ve birbirine bağlı halde üç bölge (SOS1, SOS2 ve SOS3) tespit edilmiştir. SOS (Salt Overly Sensitive-Tuza Aşırı Duyarlı) genleri ile aktive olan SOS sinyal yolağı hücrede Na⁺ ve K⁺ iyon dengesini düzenleyerek tuz toleransını sağlamaktadır (36). Diğer bir cevap mekanizması olan ozmolitlerin (polioller-polihidrik şeker alkolleri, azot içerikli bileşikler, çözünebilir proteinler, moleküler ağırlıklı şekerler) üretimi ise ozmotik dengesinin sağlanması amaçlı hücrelerde biyosentezi yapılmaktadır (30, 37). Ozmolitler; hücrede su tutulmasını sağlama, hücrel makromoleküllerin korunması, azot depolaması, hücrel pH'nın korunması ve oksijen radikallerin ortadan kaldırılması gibi pek çok olayda rol oynamaktadırlar (32, 36).

2.1.3. Bitkilerde Kuraklık Stresi ile İlişkili Genler

Kuraklık stresine karşı uyarılan genler; erken cevap genleri ve geç cevap genleri olarak iki genel grup olarak ayrılmaktadır. Bunlardan;

Erken Cevap Genleri: Kuraklık stresi karşısında çok hızlı (dakikalar içinde) ve geçici olarak indüklenmekte olup ayrıca gerekli sinyal bileşenleri önceden mevcut olduğu için bu genlerin indüklenmeleri için yeni protein sentezine ihtiyaç duyulmamaktadır. Erken cevap genleri ayrıca geç cevap genlerini aktive edecek transkripsiyon faktörlerinin sentezlenmesinde de görev almaktadırlar (38).

Geç Cevap Genleri: Kuraklık stresine karşı rol oynayan genlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadırlar (39). Bu genler daha yavaş indüklenmekte ve gen ifadeleri genellikle sürekli olmaktadır. Bu genlerin proteinleri ise; su kanal proteinleri, osmotik koruyucuların (şekerler, prolin, glisin-betain) biyosentezinden sorumlu enzimler, şaperonlar, proteazlar, detoksifikasyon enzimleri ve LEA (geç embriyogenez) proteinleri (39, 40) protein kinazlar, çeşitli transkripsiyon faktörleri ve fosfolipaz C gibi kuraklık stresine karşı rol oynayan genlerin regülasyonunda ve sinyal iletiminde görevli proteinler yer almaktadır (40).

Kuraklık stresi koşulları altında indüklenen genler sadece ilişkili proteinlerin üretiminde görev almayıp, aynı zamanda kuraklık stresi cevabında sinyal iletim genlerinin regülasyonunda da önemli rol oynamaktadır (40).

2.1.4. Bitkilerde Tuz Stresi ile İlişkili Genler

Bitkilerde kuraklık ve tuzluluk stres koşullarına karşı verilen erken cevap büyük ölçüde benzer olduğu, (2) her iki stres koşulunda birçok ortak hücrel reaksiyonun başlamakta olduğu ve bu reaksiyonların pek çok biyokimyasal ve moleküler düzeyde mekanizmayı içerdiği (1) bu nedenle pek çok genin ortak olduğu açıklanmıştır (41-44). Bugüne kadar tuzla birlikte ifadeleri artan pek çok gen karakterize edilmiş olup (38) tuz stresinde rol oynayan genler fonksiyonlarına göre ozmolit sentezinde görev alan genler, iyon dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan genler, antioksidatif enzimlerin sentezlenmesinden sorumlu genler, transkripsiyon faktörlerinin sentezinde rol oynayan genler, hücre dengesinin sağlanmasında rol oynayan genler olarak gruplandırılabilir (45-49).

2.1.4.1. LEA (Late Embryogenesis Abundant) Gen Ailesi

Embriyonun geç dönemlerinde bolca buldukları için LEA (Late Embryogenesis Abundant) olarak isimlendirilen proteinler (50), ilk kez gelişmekte olan pamuk embriyolarında çalışılmıştır (4, 50, 51). Küçük moleküler ağırlığına sahip olan (10 kDa-30 kDa) (52) LEA proteinleri bitkide kök ve diğer organlarda bulunmakla birlikte, hücrede genel olarak sitoplazma ve çekirdek kompartmanlarında lokalize olmuş durumdadırlar (53).

LEA proteinleri, tohumların olgunlaşma aşamasında ve vejetatif organlarda özellikle soğuk, kuruma, yüksek tuzluluk, su eksikliği gibi stres koşullarında biriken (54), sıcaklık değişimlerinde hücrelerin fizyolojisini korumak için gen ifadesini düzenleyen (55),

embriyo gelişimi ile indüklenen protein grubudur (54, 55). Hidrofilik protein grubu üyeleri (56) olan LEA proteinleri Alanin, Glisin, Glutamik asit ve Treonin gibi aminoasitler bakımından zengin, Triptofan ve Sistein gibi aminoasitler bakımından ise yoksundur (57).

Amino asit sekansları ve mRNA homolojilerine dayandırılarak LEA proteinleri temel olarak 5 sınıfa ayrılmaktadır (4, 50, 52). Bunlardan Grup1 proteinler (D19 gibi), gelişmiş bitkilerdeki vejetatif organlarda endosperm gelişimi ve ozmotik korumasında Grup2 proteinler ise (D11 gibi) metabolizmada moleküler şaperonlar olarak ve kuraklıkla yakından ilişkili savunma proteinleri olarak rol oynamaktadırlar (53, 58, 59). Grup1 proteinler sadece bitkilerde bulunmaktadır. Grup3 proteinler ise (D7 gibi) gelişmiş bitkilerde dehidrasyon sırasında iyon zenginleştirilmesi ile ilişkili olup, (53) Grup4 proteinler ise (pamuk LEA14, D113 gibi) dehidrasyon sırasında membran stabilitesinin korunmasında görev almaktadırlar (26). Grup3 proteinler yüksek bitkilerin yanısıra nematod ve prokaryotlarda bulunmaktadır (60). Grup5 proteinler ise hem tohum olgunlaşmasında, hem de dehidrasyon sırasında iyon konsantrasyon ayarlanmasında rol oynamaktadır (53).

2.1.4.2. Dehidrin Gen Ailesi

Son yıllarda birçok bitkiye klonlanması yapılan (61) dehidrin geni (DHN); 1980'lerde pamuk ve pirinçten izole edilmiştir (62, 63). Dehidrinler LEA grubu gen ailesinden (Grup2) olup, 9-200kDa arasında geniş bir moleküler ağırlığına sahiptir. Moleküler yapılarında bulunan karakteristik korunmuş dizilere sahip K-, S- ve Y- segmentlerin varlığına ve sayısına göre Kn, SKn, KnS, YnKn, ve YnSKn olmak üzere 5 alt gruba ayrılmaktadırlar (64, 65). Bu segmentlerden K segmenti lizin aminoasit dizisi ile (EKK GIME/DKI KEK LPG) zengin olup dehidrin molekülünün genellikle C terminal ucunda 1-11 kopya halinde yer almaktadır. Y segmenti ise korunmuş tirozin aminoasit dizisi ile zengin olup ((V/T)D(E/Q)YGNP) dehidrin molekülünün genellikle N terminalinde yer almaktadır. Casein kinaz2 (CK2) yardımı ile fosforilasyona uğrayabilen S segmenti ise serin aminosit dizisi bakımından zengindir (54, 66). Dehidrinler, yüksek bitkiler, algler, maya ve syonobakteri gibi canlılar arasında geniş bir yayılıma sahiptirler (66, 67). LEA

proteinleri gibi yüksek oranlarda hidrofilik aminoasit içermelerinden dolayı buldukları ortamın özelliğine göre (NaCl, SDS, Gliserol gibi yoğun ortamlarda) konformasyonel değişimler gösterdikleri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (68, 69).

Dehidrinlerin bitki dokularındaki lokasyonlarına bakıldığı zaman genellikle bitkide gelişme döneminde farklı dokularda farklı çeşit ve miktarlarda yayılım gösterdiği belirtilmiştir. Örnek olarak; model organizma olan Arabidopsisde RAB18 ve mısırdaki RAB17 (DHN1;YSK) dehidrin proteinlerinin olgun tohum içindeki endosperm ve embriyodaki tüm bölgelerde de dağınık halde buldukları açıklanmıştır (70, 71). Tohumun yanısıra Arabidopsis bitkisinde kök uçları, vasküler dokular, çiçek ve yapraklarda da dehidrinlerin varlığı belirlenmiş durumdadır (72). Hücresel konum olarak ise; dehidrinler sitozol, çekirdek ve plazma membranında bulunmalarına rağmen genel olarak hücre içi lokasyonları sitoplazma ve çekirdektir (73). Yapılan birçok araştırma dehidrin proteinlerinin fosforilasyona uğrayarak post-translasyonel konumda modifiye olduğunu göstermektedir. İlk kez mısırdaki DHN1 (Rab17)'de gözlenen bu durum domates, Arabidopsis gibi birçok bitkide de kanıtlanmıştır (74, 75). Tam olarak aydınlatılamamasına karşın post-translasyonel modifikasyonların çekirdek lokalizasyonları için (genellikle S- segmentinde casein kinaz 2 yardımı ile) gerçekleştirildiği bildirilmektedir (76).

Günümüzde yapılan araştırmalarda bitki stres toleransı ile DHN gen ifadesi arasında pozitif ilişki olduğu özellikle strese bağlı bitki hücrelerinde gerçekleşen su kayıplarına karşın ozmotik düzenleyici olarak görev aldığı bildirilmektedir. Bu nedenle kuraklık ve tuzluluk stresi çalışmalarında (4, 74, 77, 78) sıkça yer alan dehidrin genleriyle ilgili fonksiyonel araştırmalar halen çalışılmakta olup içerdikleri segment sayısı ve çeşidine (Kn, SKn, KnS, YnKn, ve YnSKn) göre farklı görevlerde de yer aldıkları açıklanmıştır. Özellikle K-segmenti içeren bazı dehidrinlerin yağ tanıma özelliğinin olduğu (79), turunçgillerde bulunan KnS segmenti içeren bazı dehidrinlerin ise protein dizilerinde metal tanıma domainini içerdiği (80), SKn ve Kn segmenti içeren bazı dehidrinlerin ise büyük olasılıkla bitkinin düşük sıcaklığa karşı savunmasında görev aldıkları yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (75). Bütün bu çalışmalar segmentlere göre sınıflandırılan dehidrin çeşitlerinin bahsedilen fonksiyon ve görevlerde özgünlük gösterebildiğini kanıtlamaktadır.

Ayrıca bazı DHN'ler dona karşı toleransda görev alan enzimlere karşı karyoprotektif aktiviteye sahiptirler (81).

2.1.5. Asma Çeşit (*Vitis vinifera* L.) ve Anaçlarında Kurak ve Tuz Toleransı

Rhamnales takımında yer alan 3 familya (*Rhamnaceae*, *Leeaceae*, *Vitaceae*) içerisinde *Vitaceae* familyasına ait asmanın, 12 cinsi ve yaklaşık olarak 700 alt türü bulunmaktadır. *Vitaceae* familyası *Vitis* cinsi *Muscadinia* ve *Euvitis* olmak üzere 2 alt cinsten oluşmaktadır. Bunlardan *Euvitis* alt cinsine ait Yakın Doğu ve Avrupa türü olan *Vitis vinifera* L. 2 yabancı alt tür (*ssp. sylvestris* Gmel. ve *ssp. caucasia* vav) ve bir kültür türü (*ssp. sativa*. D.C.) içermektedir (82). Gerek ekonomik (sofralık, şaraplık, kurutmalık) açıdan gerekse tıbbi kullanım açısından büyük öneme sahip üzüm dünya genelinde yaklaşık 8 milyon hektarlık bir alanda yetiştirilmektedir.

Asma kurak ve tuz stresi toleransı bakımından değerlendirildiğinde; kurağa kısmen yüksek (5-10), tuza ise orta derecede tolerans göstermektedir (7, 11). Yapılan çalışmalarda asmada yaprak su potansiyelinin -0,9 MPa'nın altına düştüğü kuraklık koşullarında ürün veriminde azalma meydana geldiği açıklanmıştır (83). Tuz stresi koşullarında ise; yaprak tuz miktarının 2.5 dS m⁻¹'den yüksek miktarlara ulaşması durumunda asma gelişiminin yavaşladığını ve ürün miktarının azaldığını, EC 6.7 dS m⁻¹'ye ulaştığında ise asmada ölüme neden olabildiği görülmüştür (84, 85).

Bağcılığın temel sorunlarından biri olarak gösterilen, asma yaprak ve köklerine zarar veren Filoksera böceğine (*Phylloxera vastatrix radicola*) dayanıklılık; *Vitis vinifera* L. türleri ve Amerikan asma türleri yaprak ve kök bazında farklılık göstermektedir. Amerikan asma türleri kök formuna dayanıklılık gösterirken, *Vitis vinifera* L. türlerinin yaprak formuna dayanıklılık göstermektedir (86). Bu durum bağcılıkta anaç kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Kurak ve tuz stresi altında anaçların dayanıklılıkları ise anaca göre değişkendir ancak anaçların çeşitlerle karşılaştırmasında; anaçların kurak ve tuz stresi altında

dayanıklıklarının çeşitlere göre düşük olduğu belirtilmektedir (11). Bu durum bağcılıkta verime ve kalite kaybına sebebiyet vermektedir. 10R, 110R, 140Ru, 99R anaçları kurağa daha toleranslı bulunurken, 5BB, 5C, SO4 gibi anaçların kurak toleransı yönünden zayıf olduğu, tuzlu alanlarda ise en toleranslı anaçların başında 1616 C, 1613 C gelirken özellikle 41B'nin tuza çok hassas olduğu bildirilmiştir (12).

2.2. Bitkilerde Abiyotik Stres Koşulları Altında Gen İfadesinin

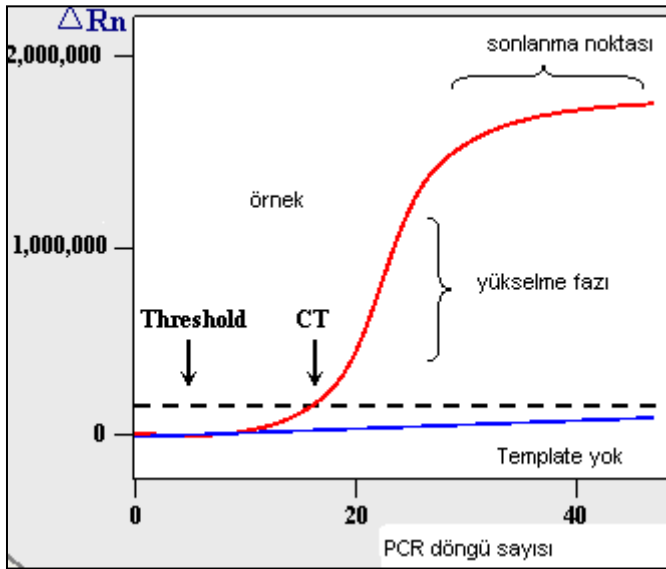
Belirlenmesine Yönelik Yaklaşımlar

Abiyotik stres koşulları altında bitkide meydana gelen değişim ve rol oynayan mekanizmaların belirlenmesinde, gen ifade analizleri büyük önem taşımaktadır. Günümüzde farklı stres koşullarında dokularda ifade edilen genlerdeki farklılıkların anlaşılması için geliştirilmiş birçok kapsamlı moleküler teknik bulunmaktadır. Bunlardan RNA temelli gen ifadesi analiz yöntemleri genel olarak; Northen Blot, Real Time PCR (RT-PCR), RNA mikroarray, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) gibi teknikleri içermektedir.

2.2.1 Real Time PCR (RT-PCR) (Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesine olanak sağlayan ve temeli PCR teknolojisine dayanan analiz teknolojisidir. Bu teknolojiye ortamdaki DNA sarmalına bağlanan ve floresan ışımaya yapan özel boyalar (SYBR Green, SYTO9 gibi) kullanılarak, sinyal oluşturan prob dizileri yardımı ile ortamdaki amplifikasyon miktarı tespit edilebilmektedir. Her PCR döngüsü sonrasında, ortamda oluşan çift zincirli ürünün bu sayede miktarı belirlenebilmekte ve kantitatif analizleri yapılabilmektedir (87, 88). Real Time PCR; çok sayıda örneğin aynı zamanda analizine olanak sağlaması, amplifikasyonun erken evrelerde saptanabilmesi, agaroz jelle gerek duyulmaması ve agaroz jelle rezolüsyondan dolayı ayırt edilemeyen ifade farklılıklarının rahatlıkla saptanabilmesi gibi çok sayıda avantajlara sahip bir yöntemdir.

RT PCR reaksiyonları; exponensiyal faz (yükselme fazı), linear faz (yüksek farklılık) ve plato faz (sonlanma noktası) olmak üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Exponensiyal fazda tüm reaksiyon içerikleri ortamda yeterli miktarda bulunduğundan etkinlik %100 olup, bu nedenle PCR ürün miktarı her döngüde iki katına çıkmaktadır. Linear fazda ise yavaş yavaş reaksiyon komponentleri azalmaya başlar bu nedenle PCR ürünlerinin oluşumunda azalma gözlemlenmektedir. Plateu fazda ise PCR ürün oluşumu tamamen sonlanmaktadır (89).



Sekil 2.1 Real Time PCR Döngü Aşamaları (90)

Real Time PCR'da; hibridizasyon proplar, hidroliz proplar ve SYBR green olmak üzere 3 çeşit prob (floresan ışımada görevli) kullanılmaktadır. Bunlardan hibridizasyon proplarının, 3' ucu (530 dalga boyu) floresan işaretli olup, 5' ucunda (640 dalga boyu) ise başka bir prob bağlıdır. 3'ucu normalde aldığı enerjiyi geri salmaktadır. Reaksiyon sırasında bu iki prob bir araya gelince (maksimum iki baz uzaklıkta) 3' ucundaki probun saldığı enerjiyi 5' ucundaki prop alır ve 640 dalga boyunda ışımaya (FRET-floresans rezonans enerji transferi) gerçekleşmektedir. Hidroliz propları ise dizi spesifik proplardır. Ortamda Quenter (söndürücü) ve reporter (haberci) olmak üzere iki prob bulunmaktadır (89). Hibridizasyon proplarından farklı olarak ışımının gerçekleşmesi için bu iki probun bir arada olmaması gerekmektedir. Reaksiyon sırasında uzama başlayıp Quenter

(söndürücü) parçalandığı zaman reporter (haberci) prob ışıması yaparak analize olanak sağlamaktadır. SYBER green ise diziye spesifik olmayıp, ortamda çift zincir DNA'nın minör groove'ne bağlanarak ışımaya gerçekleştirilmektedir (89).

Real Time PCR analizlerinde temel parametre eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct)'dir. Bu değer gerçekleşen amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınımının eşik çizgisini kestiği noktadır. Başka bir ifade ile eşik döngü değeri reaksiyonda ilk anlamlı artışın gerçekleştiği noktayı (eksponensiyel faza ilk geçiş) belirtmektedir. Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken olacaktır. PCR ürünleri eksponensiyel faza o kadar erken girecektir (91). Böylece Real time PCR sırasında farklı örneklerde oluşan ürün miktarı Ct değerleri ile karşılaştırılabilmektedir (92). Ayrıca analizler sırasında standart tanımlama çalışmasında kullanılacak kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Kontrol gruplarından ifadesi olan bir örnek, seri dilüsyonları yapılarak, standart olarak tanımlanabilmektedir. Burada önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı verilmektedir (91). Yapılan standart dilüsyonlar varsayılan konsantrasyon miktarları içermektedir. Bu nedenle bu standartlar kullanılarak konsantrasyonlara karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek, kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilmektedir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Reaksiyonu gerçekleştiren örneklerin Ct değerlerinin standart eğri üzerinde önceki yapılan dilüsyonlardaki hangi konsantrasyonu temsil ettiklerine bakılarak göreceli miktar tayini belirlenmektedir (89).

2.2.1.1. Real Time PCR Çalışmalarında Kontrol (Housekeeping) Genleri

Real time PCR çalışmalarında analiz edilen tüm örneklerin normalizasyonu için, çeşitli koşullarda ifade düzeyinin değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (91). Analizler sırasında ilgilenen genin ifade düzeyi, referans gen olarak seçilen housekeeping genin ifade düzeyine oranlanır. Böylece başta örnekler için RNA'lardan elde edilen cDNA miktarlarının örnekler arası başlangıç farklılıkları ve deney aşamalarında meydana gelen farklılıklar normalize edilmektedir. Real time PCR çalışmalarında seçilecek

housekeeping genin ifade düzeyinin değişim göstermemesi analizin doęruluęunu yükseltmektedir.

2.2.1.2. Real Time PCR Çalışmalarında Erime Eğrisi (Melting Curve)

Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde ‘erime eğrisi’ (melting curve) analizi yapılabilmektedir. Her çift zincirli DNA kendine özgün bir ‘erime eğrisi (T_m)’ yani çift zincirli DNA’nın %50’sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklığa sahiptir. Gerçekleştirilen amplifikasyon sonrası sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilmektedir. Bu sırada çift zincirli DNA denatüre olmaya başlar ve boya (SYBR Green) serbest kaldığı için ölçülen floresan miktarı da azalmaya başlamaktadır. Buradan elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgünlüğü tespit edilmektedir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

LEA proteinleri temel olarak dehidrasyon toleransında, tohum muhafazasında, bitkilerde kuraklık, tuz ve soğuk stresinde görev almakla (93) beraber, bazı çalışmalarda farklı ifade seviyelerinde ve tüm gelişim dönemlerinde ifade olduğu ve doku veya organa özgünlük göstermediği açıklanmıştır (53, 94). Kuraklık stresi, tuz stresi, soğuk stresleri gibi abiyotik streslerin LEA proteini ifadesi ve bitkinin gösterdiği tolerans arasındaki ilişki şuan çalışılan konular arasındadır (95, 96). Ayrıca LEA transkriptlerinin/proteinlerinin hücrede birikim, soğuğa uyum, (97) donma/buzlanma, kuruma ve tuzluluğa tolerans ile (98, 99) ilişkili olması (98, 100), bunların abiyotik stres faktörlerinin etkilerinin azaltılmasında etkin rol oynayabileceğini göstermektedir.

Dehidrin gen ifadesi ve dehidrin proteinleri ile bitki stres toleransı arasında pozitif korelasyon olduğu da, değişik bitki türleri ile yapılan çalışmalar ile kanıtlanmış durumdadır. İlk kez 1985 yılında Guy ve arkadaşları (101) soğuk iklim koşullarında dehidrin gen ifadesinin değiştiğini kanıtlamıştır. Sonraki yıllarda ise kavakta (*Populus popularis*) yapılan çalışmada kuraklık stresi ile dehidrin proteinleri arasında korelasyon bulunmuştur (77), aynı şekilde Kore arpasında yapılan çalışmada DHN3 ve DHN4 transkripti ile kuraklık arasında yüksek oranda ilişkinin varlığı kanıtlanmıştır (78). Dehidrin geni aslında, hücrede sürekli olarak sentezlenmekte (62, 63) ancak tuz, kuraklık ve soğuk stresinde (22, 102) stomaların kapanma modifikasyonlarında (103), osmotik dengede (104) ve gen ifadesinin düzenlenmesinde (4) görev almaktadır (66, 105, 106). Yapılan birçok çalışmada dehidrin genlerinin kuraklık ve tuzluluk stresindeki ifade seviyeleri farklı bitkilerde (*Arabidopsis*, kavak, domates gibi) araştırılmış olup (74, 77) kuraklık sonucu osmotik stresin artmasına bağlı olarak ifade seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Asmada yürütülen stres genlerine yönelik çalışmalara bakıldığında dehidrin gen ailesinden bazı gen adaylarına [VvDHN1a (AY706989.1), VvDHN1b (AY706990.1), VrDHN1a (AY706987.1), VrDHN1b (AY706988.1)] yönelik çalışmalar yürütülürken, LEA genlerine yönelik çalışmalara rastlanmamaktadır. Bu iki gen grubunun kurak-tuz stresi yollarında

kilit rölü vurgulandığı gibi büyük önem taşımaktadır. Ancak mevcut bilgiler ışığında yeni gen adaylarının fonksiyonlarının belirlenmesi ve bu cDNA klonları göz önüne alınarak gen klonlama çalışmalarının başlatılması büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla da literatürde daha önceden çalışılmamış gen-cDNA'larının fonksiyonlarının ve ifade varyasyonlarının belirlenmesi önemli bir başlangıç oluşturmaktadır.

Bu tezde literatürde gen adayı (predicted) *Vitis vinifera* Late Embryogenesis Abundant protein D-29-like (XM-002268661.1) ve *Vitis vinifera* dehidrin mRNA-(AY634281) iki gen bölgesinin ifade düzeyinde fonksiyonları ile iki farklı türde (çeşit-anaç) ifade varyasyonları belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu iki gen bölgesinin türler bazında ifade varyasyonu gösterdiği ve stres koşullarında fonksiyonel görev aldığı belirlenerek bu genlerin klonlanmaya aday stres genleri olduğu kanıtlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Bitkisel Materyal

Cabernet Sauvignon (CS) çeşidi ve *Solonis X riparia* 1616 C anacına ait 5-6 gözlü kalemler, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Merkez Laboratuvarı iklim odasında düzenli olarak sulanmış ve yeterli sürgün ve yaprak gelişimi gösteren örneklerden (Şekil 4.1) homojen bitki eldesi amacı ile doku kültürü uygulamalarına geçilmiştir.



Şekil 4.1 1616 C Anacının Sera Ortamında Geliştirilmesi

4.2. Yöntem

4.2.1 Doku Kültürü Denemesi

Doku kültürü çalışmaları için yeterli gelişim göstermiş sağlıklı bitkilerden sürgün uçları toplanarak, bitkilerin doku kültürü ortamında boğum kültürü ile çoğaltımına gidilmiştir. Doku kültüründe besi ortamı olarak Roubelakis (107) köklendirme ortamı kullanılmıştır.

4.2.1.1 Bitkisel Materyal Sterilizasyon Aşamaları

Cabernet Sauvignon, 1616 C örneklerine ait sürgünlerden, yaprak sapını taşıyan ve aktif tomurcuk içeren boğum ve bir boğum arası bitki parçaları sterilizasyon işlemine sokulmuştur. Sterilizasyon aşamaları ve uygulama zamanları Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Bitkisel Materyal Sterilizasyon Uygulama Aşamaları

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

4.2.1.2 Köklendirme Besi Ortamı Hazırlama Aşaması

Örneklere ait sürgün parçalarının (2-4 cm) köklenmesi amaçlı kullanılan Roubelakis besin ortamına ait içerik ve miktarlar Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2 Roubelakis Besin Ortamı Makroelementler, Mikroelementler ve Vitaminler

Makro elementler	(mg/L)	Mikro elementler	(mg/L)	Vitaminler	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	500	MnSO ₄ .7H ₂ O	5	Biotin	0.1
KNO ₃	100	H ₃ BO ₃	1	Nicotinic asid	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	Panthenic asid	5
-	-	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01	Myo-İnositol	100
-	-	EDT	40	-	

Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O: 4.29g/100mL, Sucrose 2%(w/v), Agar 0.7%(w/v), pH 6.4

Hazırlanan besin ortamının otoklavda (120°C’de 20 dk) sterilizasyonu yapıldıktan sonra, magentalara 100’er ml dağıtılarak katılaşması beklenmiştir. Katılaşan besi ortamlarına önceden sterilize bistüri ve pens yardımı ile sterilize edilmiş sürgün içerecek şekilde kesilen bitki parçaları (Explantlar: bir boğum, aktif tomurcuk ve boğum arasını içerecek şekilde) 3’lü gruplar halinde magentalara dikilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3). 2 farklı türe ait explantlar optimum koşulları içeren doku kültürü odasında yaklaşık 3-4 hafta (24 °C’de 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık) köklenme için bekletilmiştir.



Şekil 4.2 Cabernet Sauvignon Çeşidi ve 1616 C Anacına Ait Bitkilerin Besi Ortamına Ekim Aşamaları



Şekil 4.3 Cabernet Sauvignon Çeşidi ve 1616 C Anacına Ait Bitkilerin Besi Ortamında Gelişimleri

4.2.3. Stres Uygulamaları

4.2.3.1. Köklenen Bitkilerin Stres Ortamlarına Aktarılması

Yeterli gelişim gösteren (4-5 yapraklı büyüklüğe geldiğinde) ve yeterli kök sayısına (2-4 kök) ulaşan bitkiler, sıvı MS (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma M5519) ortamına aktarılarak stres uygulamaları öncesi adaptasyon sağlanmıştır. Sıvı MS besin ortamının (4.4gr/lt MS ve 20gr/lt sukroz, pH: 6.4) otoklavda (120°C’de 20 dk) sterilizasyonu yapılarak 50 mL hacimde magentalara dağıtılmış ve laminar flow altında bitkiler sıvı ortama aktarılarak, iklim odasında 7-10 gün süre ile bekletilmiştir (Şekil 4.4., Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Cabernet Sauvignon Çeşidine Ait Bitkilerin Sıvı Ms Ortamında Gelişimleri



Şekil 4.5. 1616 C Anacına Ait Bitkilerin Sıvı Ms Ortamında Gelişimleri

4.2.3.2. Stres Denemeleri

Sıvı MS ortamına alınan Cabernet Sauvignon ve 1616 C bitkilerine, belirli zaman aralıklarında tuz stresi 120 mM NaCl ve osmotik olarak 120mM NaCl'e karşılık gelen ve osmometrede (Model 600, Wescor, Inc.) belirlenen %20 PEG (Polietilen Glikol) ile kuraklık stresi uygulamaları ile yapılmıştır. Her bir örneğe ait bitkilerden belirlenen her saat için 3 bitki alınmıştır. Uygulanan stres deneme deseni Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Tuz Stresi Uygulama Deneme Deseni (Konsantrasyon: 120mm NaCl-1:10 Oranında CaCl₂*/50 Ml Sıvı MS)

CABERNET SAUVIGNON	STRES UYGULAMASI(120 mM NaCl)			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3
CABERNET SAUVIGNON	KONTROL			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3
1616 C	STRES UYGULAMASI(120 mM NaCl)			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3
1616 C	KONTROL			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3

*Bitkilerde tuzun neden olduğu Ca⁺² hasarını engellemek için (108, 109) tuz solüsyonuna 1/10 oranında CaCl₂ eklenmiştir.

Çizelge 4.4 PEG (%20) Stresi Uygulama Deneme Deseni

CABERNET SAUVIGNON	STRES UYGULAMASI(% 20 PEG)			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3
CABERNET SAUVIGNON	KONTROL			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3
1616 C	STRES UYGULAMASI(% 20 PEG)			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3
1616 C	KONTROL			
Zaman Aralığı	2. saat	6. saat	12. saat	24. saat
Bitki Sayısı	3	3	3	3

4.2.3. Fizyolojik Ölçümler

Stres uygulamaları sonrasında yaprak su potansiyeli ölçümü; stres-kontrol bitkilerin yaprakları aliminyum folyo ile kaplanmış daha sonra basınç bombasında (Pressure bomb, PMS Instruments) gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Basınç Bombasında (Pressure Bomb, Pms Instruments) Yaprak Su Potansiyeli Ölçümü

Ölçümleri gerçekleştirilen bitkilere ait yapraklar sıvı azotta dondurulduktan sonra, RNA izolasyonuna kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

4.2.4. RNA İzolasyonu

Yapraklar sıvı azot yardımıyla porselen havanlarda ezilmiş ve falkon tüplere aktarılmıştır. RNA izolasyonu Gambino ve ark., (2008) (110) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Protokole göre;

- 882 μl *CTAB-RNA İzolasyon Buffer'ı ezilmiş örnek içeren 2 ml'lik tüplere konulur.
- Üzerlerine 18 μl β -Merkapto etanol eklenerek karıştırılır ve $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ su banyosunda 10 dk. bekletilir.
- Süre sonunda her tüpe kloroform/ izoamilalkol (24:1 v/v) eklenerek karıştırılır ve 11.000g' de 10 dk ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de) santrifüj edilir.

- Süpernatant yeni tüpe aktarılır ve üzerine 3M LiCl eklenir.
- Örnekler, 30 dk buz üzerinde bekletilir.
- 21.000g' de 20 dk (4 °C'de) santrifüj yapılır.
- Tüplerdeki sıvılar dökülür ve kalan pellet 500µl önceden ısıtılmış *SSTE Buffer 'da çözülür. Üzerlerine 500µl kloroform/ izoamilalkol (24:1 v/v) eklenir.
- 11000g' de 10dk (4 °C'de) santrifüj yapılır.
- Süpernatant yeni tüplere aktarılır ve %70 hacim soğuk isopropanol ile muamele edilir.
- 20.000g 15 dk (4 °C'de) örnekler santrifüj edilir.
- Üst sıvı dökülerek %70 alkol ile pellet yıkanır ve buz üzerinde kurutulur.
- Kuruyan pelletlere 40µl PCR suyu eklenerek pelletin çözülmesi sağlanır.

***CTAB-RNA İzolasyon Buffer (50ml):** %2 CTAB (1gr), %2.5 PVP-40 (1.25gr), 2M NaCl (5.822gr), 100mM Tris-HCL (pH: 8.00), 25mM EDTA (pH: 8.00).

*** SSTE Buffer (50ml):** 10mM Tris-HCL (pH:8.00), 1mM EDTA (pH:8.00), 0.5gr SDS, 1M NaCl.

Elde edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde görsel olarak kontrol edilerek, miktar ve saflık tayinleri ise, Nanodrop ND–1000 spektrofotometre aletinde belirlenmiştir.

4.2.5. Real Time PCR Uygulamaları

Real Time PCR uygulama reaksiyonları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'ndaki Light Cycler 480 (Roche) aletinde gerçekleştirilmiştir. Real time PCR uygulamaları Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4'de sunulan deneme deseninde, en az 3 bitkiden toplanan yaprak (stres ve kontrol) örneklerinin karşımından en az 3'lü tekniksel tekrar şeklinde, "Late Embryogenesis Abundant protein D-29-like" için 2 bölgeye

(VvLEA1, VvLEA2, ACT : housekeeping) ve “dehidrin mRNA” için de 2 bölgeye (VvDHN1, VvDHN2, ACT: housekeeping) yönelik gerçekleştirilmiştir. Denemeler ihtiyaç duyulduğunda (RNA izolasyonu, Real Time PCR uygulamaları vb) yeterli sayıda tekrar edilmiştir.

4.2.5.1 Kullanılan Primerler

Cabernet Sauvignon ve 1616 C örneklerinde; *Vitis vinifera* Late Embryogenesis Abundant protein D-29-like (XM_002268661.1) ve *Vitis vinifera* dehidrin mRNA-(AY634281) olmak üzere iki gen bölgesi ile *Vitis vinifera* actin-1-like geni (ACT) (XM_002283554.2) housekeeping kontrol gen bölgesinin primerleri kullanılmıştır. Genlere ait primer dizileri Çizelge 4.5’ de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Real Time PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerlere Ait Bilgiler

Vitis vinifera Late Embryogenesis Abundant geni (VvLEA)				
VvLEA1/Primer dizisi (5'-3')		Uzunluk (bp)	Tm	% GC
İleri	ttctggtggtgatggttag	21	57.58	47.6
Geri	ggctcttcggtctctcttc	22	58.16	50
VvLEA2/Primer dizisi (5'-3')				
İleri	tgatggttagtggtgcttac	22	58.33	45.5
Geri	ctgcttccttgctctct	20	57.80	50
Vitis vinifera Dehidrin geni (5'-3') (VvDHN)				
VvDHN1/Primer dizisi (5'-3')		Uzunluk (bp)	Tm	GC%
İleri	tctagtgccgcttcatactc	22	58.22	45.5
Geri	ggcagcttctcctgatctt	20	57.58	50
VvDHN2/Primer dizisi (5'-3')				
İleri	caaggtgggagaaggaagaaa	21	57.49	47.6
Geri	tgatgagaggctgcatatag	20	57.62	50
Vitis vinifera actin-1-like geni (5'-3') (ACT)				
ACT/Primer dizisi (5'-3')		Uzunluk (bp)	Tm	GC%
İleri	ggaatggttaaggctggattg	22	54.2	45.4
Geri	ggttgagaggagcttcagttag	22	54.8	50

4.2.5.2 cDNA Sentezi

Real Time PCR'in ilk aşaması olarak, örneklere ait cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için First Strand cDNA Sentez kiti (Roche, Cat no: 04897030001) kullanılmıştır.

RNA-Primer karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
RNA (2000ng)	Değişken
Oligo (dt) Primer (50pmol/μl)	0.5 μl
Su (PCR grade)	Değişken
Toplam	6.5 μl

Karışım, termal cycler'da (Biorad marka) 65°C'de 10 dk denatüre edilip hemen buza alınmış, 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)	2 μl	
RNase Inhibitor (40 ünite/μl)	0.25 μl	25 °C 10 dk
DNTP mix (10 mM)	1 μl	55 °C 10 dk
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzimi (20 ünite/μl)	0.25 μl	85 °C 5 dk
Toplam	3.5 μl	

cDNA sentezi sonrası Nanodrop ND-1000 spektrofotometre ile elde edilen cDNA miktarı ölçülerek miktar tayini yapılmıştır.

4.2.5.3 Standart Eğri

Real Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla uygulanan strese göre 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 PCR aletine ait analiz programı ile her bir primer için ayrı ayrı standart eğriler çizilmiştir. İyi bir standart eğri grafiği çizilebilmesi için, en az 1 logaritmik konsantrasyonun eğri üzerinden geçmesi ve etkinlik (efficiency) değerinin 1.7 ile 2 arasında, Slope değerinin ise -3.3' e yakın olması istenmektedir. Efficiency (etkinlik) değeri 2'ye yaklaştıkça standart eğri grafiğinin güvenilirliği de artmaktadır.

4.2.5.4 Primer Optimizasyonu

Tezde kullanılan 5 primer (VvDHN1, VvDHN2, VvLEA1, VvLEA2, ACT) ayrı ayrı, SYBR Green I (Roche) Master Kit içerikleri kullanılarak optimize edilmiştir. Primerlere göre optimize edilen içerik ve Real Time PCR programında kullanılan bağlanma dereceleri (T_m) Çizelge 4.6., Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9., Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 VvDHN1 Primer Optimizasyon Koşulları

VvDHN1 Primer Optimizasyon Koşulları (TM 57 °C)	
cDNA	3.4 ul
İleri primer (10 pmol)	0.8 ul
Geri primer (10 pmol)	0.8 ul
Syber Green	5 ul
Toplam hacim	10 ul

Çizelge 4.7 VvDHN2 Primer Optimizasyon Koşulları

VvDHN2 Primer Optimizasyon Koşulları (TM 57 °C)	
cDNA	2 ul
İleri primer (10 pmol)	0.4 ul
Geri primer (10 pmol)	0.4 ul
Syber Green	5 ul
Toplam hacim	10 ul

Çizelge 4.8 VvLEA1 Primer Optimizasyon Koşulları

VvLEA1 Primer Optimizasyon Koşulları (TM 61 °C)	
cDNA	4.2 ul
İleri primer (10 pmol)	0.4 ul
Geri primer (10 pmol)	0.4 ul
Syber Green	5 ul
Toplam hacim	10 ul

Çizelge 4.9 VvLEA2 Primer Optimizasyon Koşulları

VvLEA2 Primer Optimizasyon Koşulları (TM 57 °C)	
cDNA	3.4 ul
İleri primer (10 pmol)	0.8 ul
Geri primer (10 pmol)	0.8 ul
Syber Green	5 ul
Toplam hacim	10 ul

Çizelge 4.10 ACT Primer Optimizasyon Koşulları

ACT Primer Optimizasyon Koşulları (TM 57 °C)	
cDNA	3.4 ul
İleri primer (10 pmol)	0.8 ul
Geri primer (10 pmol)	0.8 ul
Syber Green	5 ul
Toplam hacim	10 ul

Her primer için optimize edilen koşullara göre hazırlanan karışım eklenerek Roche Light Cycler-LC 480 aletinde protokole uygun PCR programı koşullarında amplifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sırasında housekeeping gen olarak; ACT (*Vitis vinifera actin-1-like*) geni kullanılmıştır.

4.2.5.7 Örneklerin Alete Yüklenmesi

Her bir primere ait örnekleri içeren cDNA'lar ile SYBR Green I (Roche) Master Kit içerikleri karışımı alete ait 384'lük platelere yerleştirilerek plate 14.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında Roche Light Cycler Sealing foil ile plate kaplanarak Roche Light Cycler 480 aletinde optimize edilen sıcaklıklar seçilerek koşturulmuştur. Aletde kullanılan PCR programı aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Real Time PCR Programı

Program					
Program	Cycles		Analysis Mode		
Pre incubation	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
	None	1	00:10:00	4.8	
Amplification	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Quantification
95 °C	None	45	00:00:10	4.8	
T _M °C	None		00:00:10	2.5	
72 °C	Single		00:00:05	4.8	
Melting	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Melting Curve
95 °C	None	1	00:00:30		
T _M °C	None		00:00:30		
99 °C	Continuoues		-		
Cooling	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
40°C	None	1	00:00:10	0.11	None

4.2.5.8. Verilere Ait Analizler

Real Time PCR işlemi sonrasında, her iki örnekte analiz edilen her gen için, uygulanan tüm stres koşullarına ve kontrollere ait örneklere ait pik profilleri belirlenmiştir. Pik profillerinden yararlanarak Ct (Cycle Threshold) değerleri oluşturulmuştur. CS ve 1616 C genotiplerine ait Real Time PCR sonuçlarına göre elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre relatif ifade (relative expresyon) değerleri hesaplanmıştır. VvDHN1, VvDHN2, VvLEA1 ve VvLEA2 genlerinin ifade seviyelerine ilişkin bu sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla (111), ACT genine göre normalize edilerek elde edilmiştir. Relatif ifade seviyesindeki değişiklikler, her stres ve zaman koşulu için 3 tekrara (replikeye) ait ddCt değerleri ile bu replikelere ait kontrol ddCt değerlerine zaman faktörü dikkate alınarak uygulanan tek yönlü ANOVA testine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anova testi

uygulamaları aşamasında Anova istatistik program içerisinde yer alan Bonferroni testi ile çeşit/anac da tüm uygulamalara ait, stres X zaman koşulları birbirleri ile karşılaştırılmış p değeri 0.05' ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilirken, Dunnett testi (Dunnett t) ile de kontrol ile tüm koşullar karşılaştırılmış ve p değeri 0.05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Diğer bir ifade ile Bonferroni ile tüm gruplar birbiriyle, Dunnett ile tüm gruplar kontrolle karşılatırılmıştır. MPa değerlerinin kontrole göre anlamlılık düzeyleri t-test ile hesaplanarak $p < 0.05$ ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

5.ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 Stres Uygulamaları

5.1.1.Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulamaları

Cabernet Sauvignon eŐidi ve 1616 C anacına ait bitkilerde kuraklık ve tuz stresi sonucu uygulanan zaman aralıklarında (2., 6., 12. ve 24. saat) bitkilerde belirgin bir morfolojik değişim gözlenmemiŐtir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1 1616 C Anacına Ait Bitkilerde Kuraklık Stresi Görüntüsü (12. Saat)

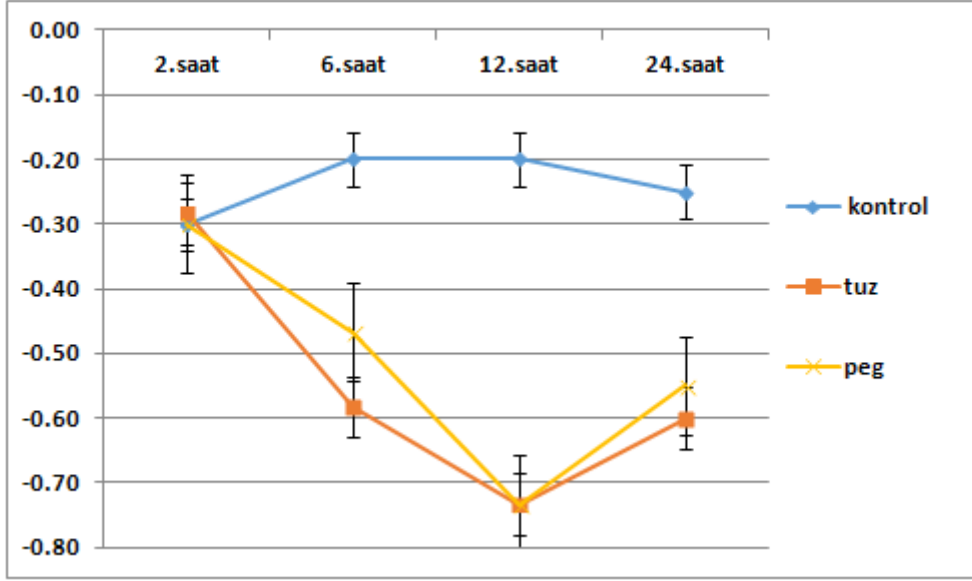
5.1.2 Stresin Fizyolojik Olarak (MPa) Belirlenmesi

Yaprak su potansiyeli ölçüm değerleri kurak ve tuz stresi uygulanan bitkilerde kontrole göre önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Uygulama süresince kuraklık stresinde CS (Çizelge 5.1, Şekil 5.2.) ve 1616 C bitkileri (Çizelge 5.2., Şekil 5.3.) 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. Gen ifadesinin anlamlı olarak yüksek oranda değiştiği zaman aralıkları (kritik saat uygulamaları) tuzluluk koşullarında 1616C'de ortalama MPa -0.8 çeşitte ise -0.7 MPa değerinde, kuraklık koşullarında ise sırasıyla -0.5 ve -0.75 MPa olarak belirlenmiştir. Bu değerler genel olarak; bitkinin strese girdiğine yönelik kabul edilen yaklaşık MPa değerleri (-0.7 ve alt değerleri) (112) değerleri ile uyumludur.

Çizelge 5.1 Cabernet Sauvignon Çeşidinde Yaprak Su Potansiyeli (-MPa) Ölçümü ve t-test anlamlılık düzeyleri

RNA no	Örnek no	Örnek	MPa	t-test p değeri
1	1	CS Tuz 2. saat	-0.30	
2	2	CS Tuz 2. saat	-0.25	
3	3	CS Tuz 2. saat	-0.30	
4	1	CS PEG 2. saat	-0.35	
5	2	CS PEG 2. saat	-0.25	
6	3	CS PEG 2. saat	-0.30	
7	Kontrol 1	CS 2. saat	-0.30	
8	Kontrol 2	CS 2. saat	-0.30	
9	Kontrol 3	CS 2. saat	-0.30	
10	1	CS Tuz 6. saat	-0.75	0.014
11	2	CS Tuz 6. saat	-0.60	

12	3	CS Tuz 6. saat	-0.40	
13	1	CS PEG 6. saat	-0.40	0.001
14	2	CS PEG 6. saat	-0.50	
15	3	CS PEG 6. saat	-0.50	
16	Kontrol 1	CS 6. saat	-0.20	
17	Kontrol 2	CS 6. saat	-0.20	
18	Kontrol 3	CS 6. saat	-0.20	
19	1	CS Tuz 12. saat	-0.60	0.001
20	2	CS Tuz 12. saat	-0.85	
21	3	CS Tuz 12. saat	-0.75	
22	1	CS PEG 12. saat	-0.75	
23	2	CS PEG 12. saat	-0.65	
24	3	CS PEG 12. saat	-0.80	
25	Kontrol 1	CS 12. saat	-0.20	
26	Kontrol 2	CS 12. saat	-0.20	
27	Kontrol 3	CS 12. saat	-0.20	
28	1	CS Tuz 24. saat	-0.50	0.004
29	2	CS Tuz 24. saat	-0.75	
30	3	CS Tuz 24. saat	-0.55	
31	1	CS PEG 24. saat	-0.40	0.032
32	2	CS PEG 24. saat	-0.65	
33	3	CS PEG 24. saat	-0.60	
34	Kontrol 1	CS 24. saat	-0.25	
35	Kontrol 2	CS 24. saat	-0.25	
36	Kontrol 3	CS 24. saat	-0.25	

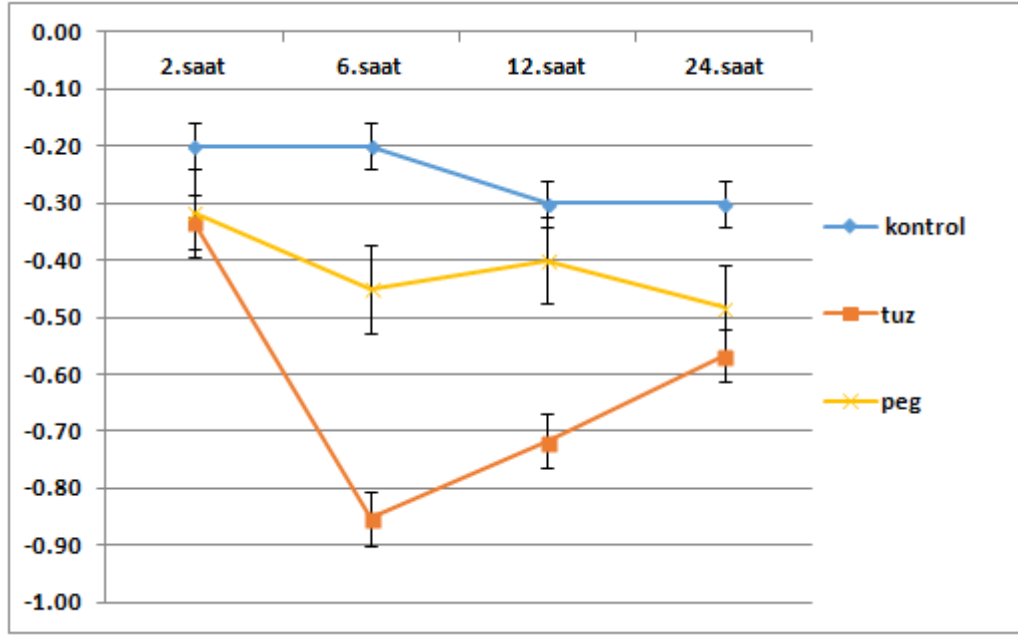


Şekil 5.2 Cabernet Sauvignon Çeşidinde Yaprak Su Potansiyelinin (-MPa) Grafiksel Gösterimi

Çizelge 5.2 1616 C Anacında Yaprak Su Potansiyeli (-MPa) Ölçümü ve t-test Anlamlılık Düzeyleri

RNA no	Örnek no	Örnek	MPa	p değeri (p<0.05)
1	1	1616 C Tuz 2. saat	-0.30	
2	2	1616 C Tuz 2. saat	-0.45	
3	3	1616 C Tuz 2. saat	-0.25	
4	1	1616 C PEG 2. saat	-0.35	
5	2	1616 C PEG 2. saat	-0.35	
6	3	1616 C PEG 2. saat	-0.25	
7	Kontrol 1	1616 C 2. saat	-0.20	
8	Kontrol 2	1616 C 2. saat	-0.20	
9	Kontrol 3	1616 C 2. saat	-0.20	
10	1	1616 C Tuz 6. saat	-0.95	0.019
11	2	1616 C Tuz 6. saat	-0.91	

12	3	1616 C Tuz 6. saat	-0.70	
13	1	1616 C PEG 6. saat	-0.40	0.015
14	2	1616 C PEG 6. saat	-0.45	
15	3	1616 C PEG 6. saat	-0.50	
16	Kontrol 1	1616 C 6. saat	-0.20	
17	Kontrol 2	1616 C 6. saat	-0.20	
18	Kontrol 3	1616 C 6. saat	-0.20	
19	1	1616 C Tuz 12. saat	-0.70	0.002
20	2	1616 C Tuz 12. saat	-0.80	
21	3	1616 C Tuz 12. saat	-0.65	
22	1	1616 C PEG 12. saat	-0.50	0.000
23	2	1616 C PEG 12. saat	-0.40	
24	3	1616 C PEG 12. saat	-0.30	
25	Kontrol 1	1616 C 12. saat	-0.30	
26	Kontrol 2	1616 C 12. saat	-0.30	
27	Kontrol 3	1616 C 12. saat	-0.30	
28	1	1616 C Tuz 24. saat	-0.55	0.044
29	2	1616 C Tuz 24. saat	-0.55	
30	3	1616 C Tuz 24. saat	-0.60	
31	1	1616 C PEG 24. saat	-0.45	
32	2	1616 C PEG 24. saat	-0.45	
33	3	1616 C PEG 24. saat	-0.55	
34	Kontrol 1	1616 C 24. saat	-0.30	
35	Kontrol 2	1616 C 24. saat	-0.30	
36	Kontrol 3	1616 C 24. saat	-0.30	

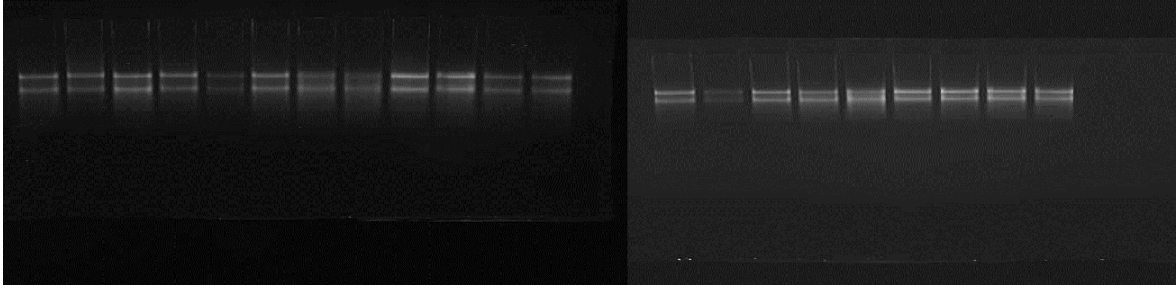


Şekil 5.3 1616 C Anacında Yaprak Su Potansiyelinin (-MPa) Grafikselsel Gösterimi

5.2 Nükleik Asit İzolasyonu

5.2.1. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini

İzole edilen RNA örnekleri % 1.2'lik agarozda yürütülerek (Şekil 5.4.), Nanodrop ND 1000 cihazı ile spektrofotometre ölçümleri (Çizelge 5.3, Çizelge 5.4.) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri ve spektrofotometrik veriler Real PCR analizlerinde kullanılacak kadar miktar ve saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 5.4 İzole Edilen 1616 C Anacına Ait Bazı RNA'ların Agaroz Jel (%1.2) Görüntüsü

Çizelge 5.3 Cabernet Sauvignon Örneklerine ve Bir Kontrole Ait RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri

RNA No	Örnek	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
1	CS Tuz 2. saat	1151.50	31.363	14.043	2.23	2.39
2	CS PEG 2. saat	900.00	40.100	18.541	2.22	2.36
3	Kontrol CS 2. saat	1036.25	25.906	11.608	2.23	2.32
4	CS Tuz 6. saat	1411.40	34.038	15.339	2.22	2.11
5	CS PEG 6. saat	683.64	24.135	10.532	2.22	1.28
6	Kontrol CS 6. saat	922.63	23.066	10.357	2.23	2.36
7	CS Tuz 12. saat	778.70	24.256	10.884	2.23	1.35
8	CS PEG 12. saat	2624.20	28.386	12.785	2.22	1.99
9	Kontrol CS 12. saat	880.73	22.018	9.860	2.23	2.36
10	CS Tuz 24. saat	734.40	26.811	12.025	2.23	1.97
11	CS PEG 24. saat	690.50	28.135	12.641	2.23	1.98
12	Kontrol CS 24. saat	958.89	23.047	10.363	2.22	2.36

Çizelge 5.4 1616 C Örneklerine ve Bir Kontrolle Ait RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri

RNA No	Örnek	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
1	1616 C Tuz 2. saat	558.70	25.434	11.057	2.16	2.11
2	1616 C PEG 2. saat	773.50	24.619	11.018	2.23	2.28
3	Kontrol 1616 C 2. saat	876.03	21.901	9.842	2.23	2.34
4	1616 C Tuz 6. saat	937.00	42.325	18.563	2.23	2.34
5	1616 C PEG 6. saat	445.60	42.387	18.581	2.23	2.33
6	Kontrol 1616 C 6. saat	1270.22	31.521	14.238	2.20	2.30
7	1616 C Tuz 12. saat	1266.10	37.046	17.601	2.15	2.29
8	1616 C PEG 12. saat	490.00	26.375	12.180	2.17	2.34
9	Kontrol 1616 C 12. saat	908.13	22.703	10.238	2.22	2.36
10	1616 C Tuz 24. saat	384.60	26.083	12.094	2.16	2.34
11	1616 C PEG 24. saat	625.60	40.765	18.512	2.23	2.32
12	Kontrol 1616 C 24. saat	728.50	42.456	18.671	2.22	2.3

5.3 Real Time PCR Analizleri

5.3.1 cDNA Sentezi

Cabernet Sauvignon ve 1616 C örneklerine ait cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri sırası ile Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6'da sunulmuştur. cDNA'ların saflıkları (260/280, 260/230) yeterli bulunurken, miktarları (ng/µl) beklenen oranlarda (yaklaşık 2000ng) elde edilmiştir.

Çizelge 5.5 Cabernet Sauvignon Örneklerine ve Bir Kontrole Ait cDNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri

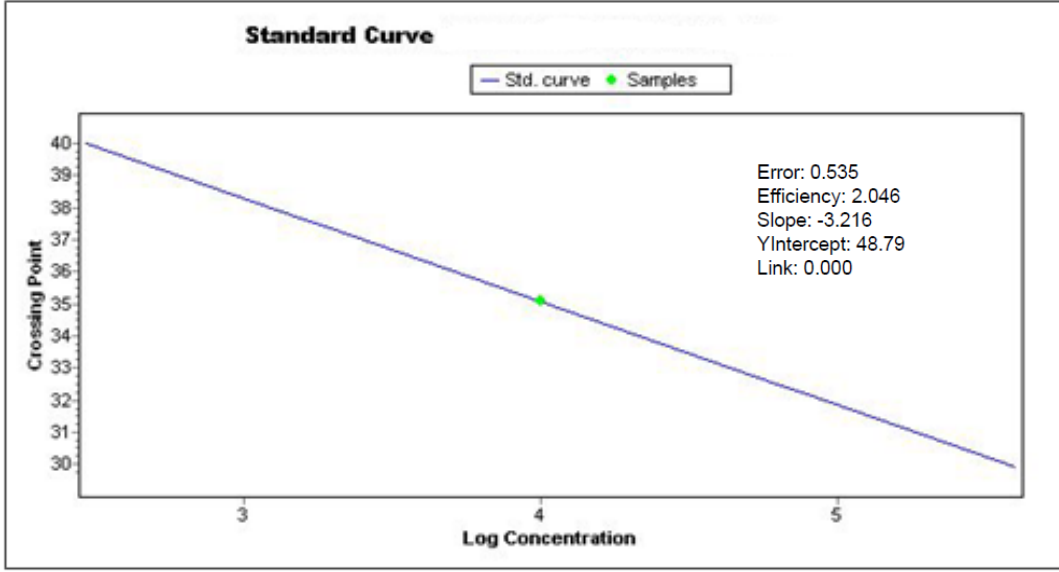
cDNA No	Örnek	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
1	CS Tuz 2. saat	1951.50	31.363	14.043	2.23	2.39
2	CS PEG 2. saat	1900.00	40.100	18.541	2.22	2.36
3	Kontrol CS 2. saat	1990.22	37.350	16.584	2.22	2.38
4	CS Tuz 6. saat	1988.23	34.252	15.656	2.23	2.12
5	CS PEG 6. saat	1934.50	22.759	10.166	2.24	2.28
6	Kontrol CS 6. saat	1921.89	23.047	10.363	2.22	2.36
7	CS Tuz 12. saat	2005.50	26.619	12.022	2.21	2.26
8	CS PEG 12. saat	2024.20	28.386	12.785	2.22	1.99
9	Kontrol CS 12. saat	1980.73	22.018	9.860	2.23	2.36
10	CS Tuz 24. saat	2005.90	20.291	9.105	2.23	2.32
11	CS PEG 24. saat	2018.00	20.333	9.154	2.22	2.31
12	Kontrol CS 24. saat	1958.89	23.047	10.363	2.22	2.36

Çizelge 5.6 1616 C Örneklerine ve Bir Kontrole Ait cDNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri

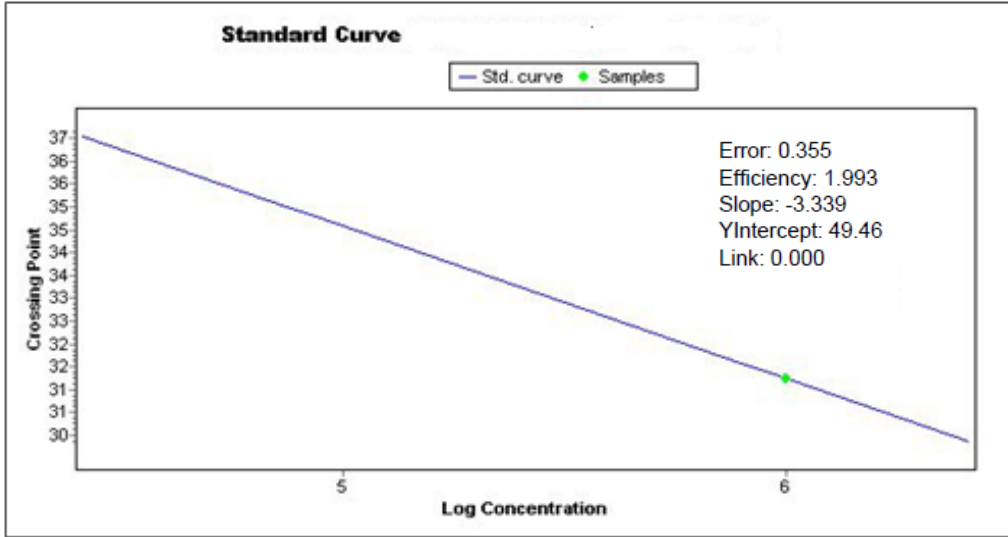
cDNA No	Örnek	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
1	1616 C Tuz 2. saat	1958.70	25.434	11.057	2.16	2.11
2	1616 C PEG 2. saat	2017.10	22.759	10.166	2.24	2.28
3	Kontrol 1616 C 2. saat	1976.03	21.901	9.842	2.23	2.34
4	1616 C Tuz 6. saat	1937.00	42.325	18.563	2.23	2.34
5	1616 C PEG 6. saat	2045.10	38.690	17.599	2.23	0.97
6	Kontrol 1616 C 6. saat	1970.22	31.521	14.238	2.20	2.30
7	1616 C Tuz 12. saat	2066.10	37.046	17.601	2.15	2.29
8	1616 C PEG 12. saat	2000.00	26.375	12.180	2.17	2.34
9	Kontrol 1616 C 12. saat	1998.13	22.703	10.238	2.22	2.36
10	1616 C Tuz 24. saat	2023.60	40.448	18.413	2.22	2.32
11	1616 C PEG 24. saat	2037.50	42.325	18.563	2.23	2.34
12	Kontrol 1616 C 24. saat	1978.50	42.456	18.671	2.22	2.30

5.3.2 Standart Eğri (Standart Curve)

Kullanılan primerlere ait bazı standart eğri grafikleri Şekil 5.6, Şekil 5.7' 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.



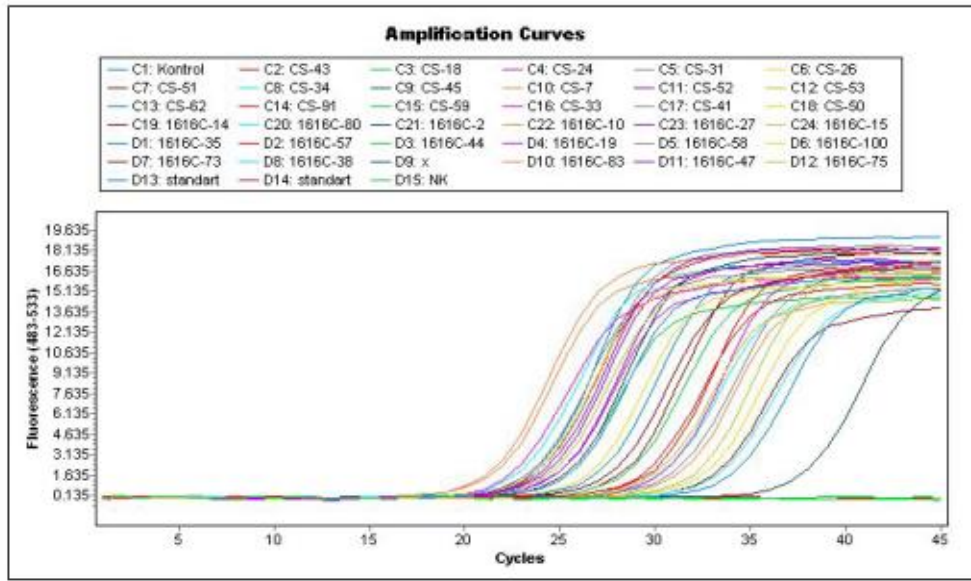
Şekil 5.5 Real Time PCR Cihazından Alınan VvLEA2 Primerine Ait Standart Eğri Grafiği, Efficiency ve Slope Değerleri



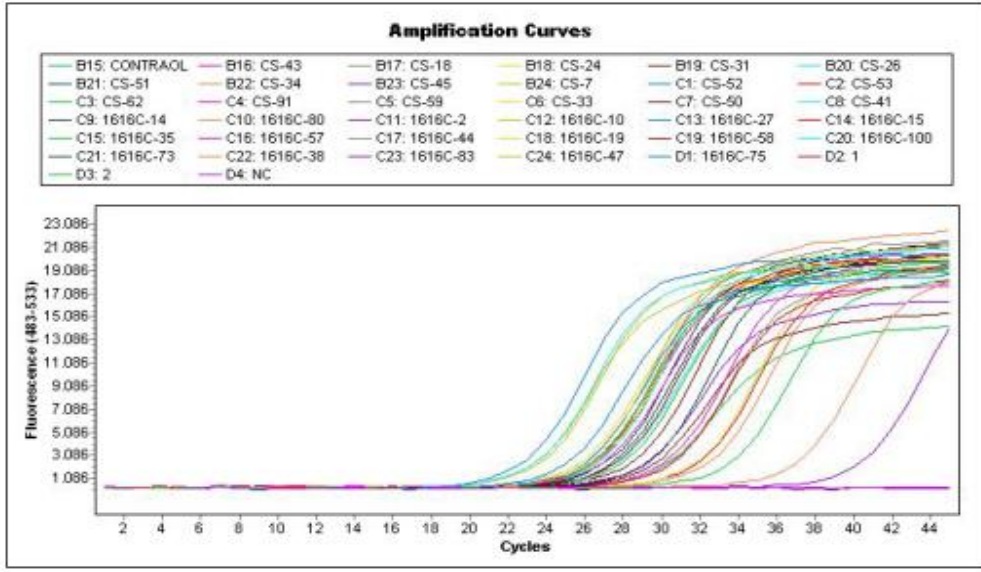
Şekil 5.6 Real Time PCR cihazından alınan DNHP1 Primerine Ait Standart Eğri Grafiği Efficiency ve Slope Değerleri

5.3.3 Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri

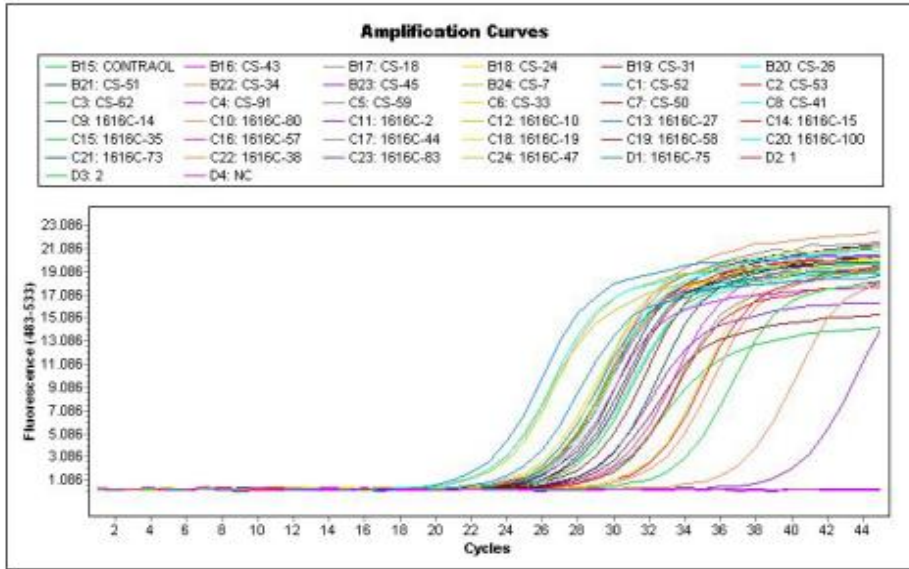
ACT, VvDHN1, VvDHN2, VvLEA1, VvLEA2 primerlerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri Şekil 5.8., Şekil 5.9., Şekil 5.10., Şekil 5.11., Şekil 5.12’de sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri 20-35. döngüler arasında elde edilmiş ve analizlerle bu Ct değerlerinin anlamlı değerler olarak kullanılabilceği belirlenmiştir (Ek 2, Ek 3).



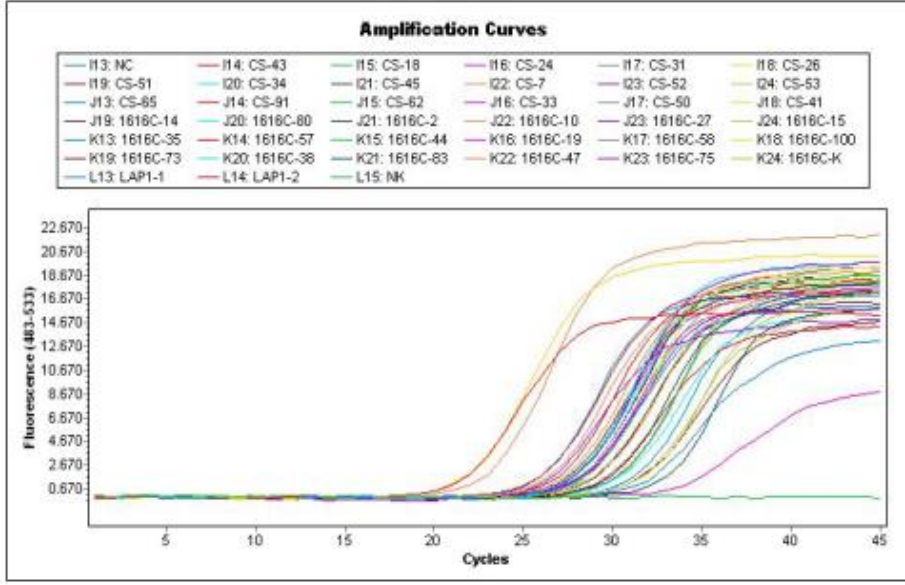
Şekil 5.7 ACT Primerinde Standart ve Örneklere Ait Amplifikasyon Eğrileri



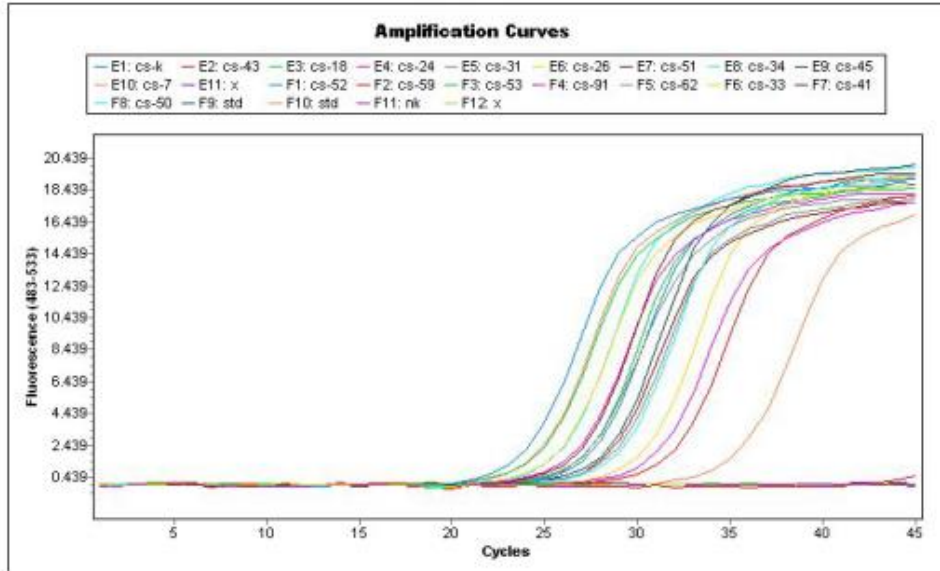
Şekil 5.8 VvDHN1 Primerinde Standart ve Örneklerle Ait Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 5.9 DNHP2 Primerinde Standart ve Örneklerle Ait Amplifikasyon Eğrileri



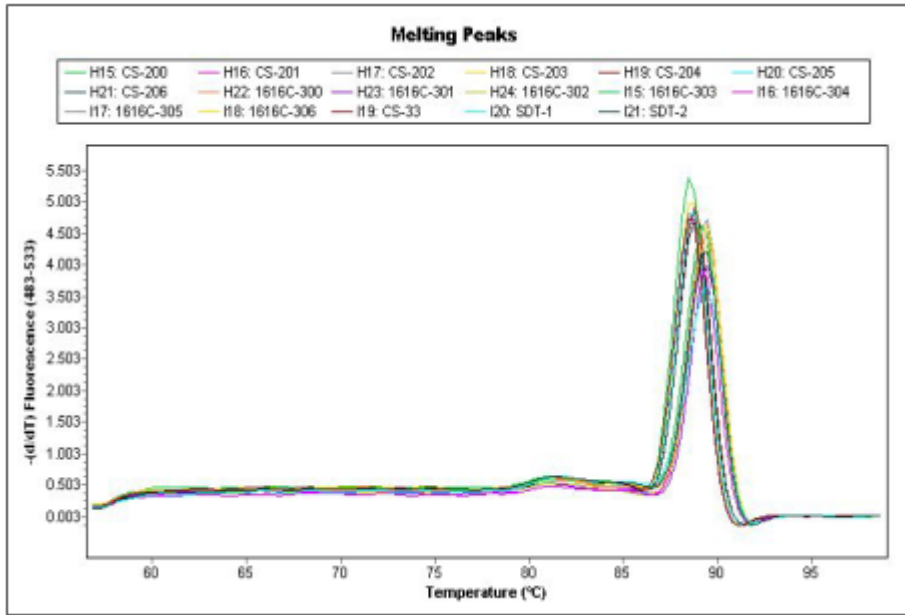
Şekil 5.10 VvLEA1 Primerinde Standart ve Örneklerle Ait Amplifikasyon Eğrileri



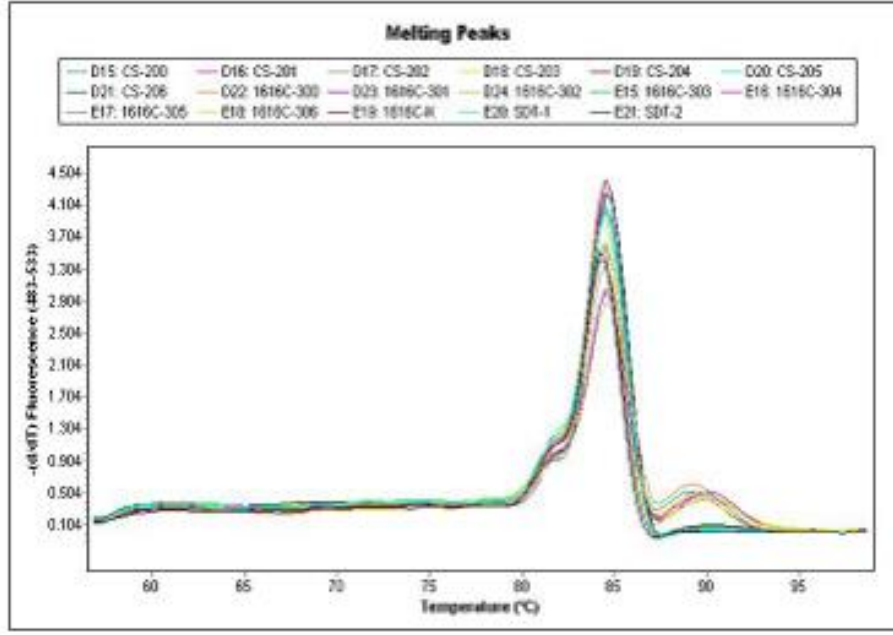
Şekil 5.11 VvLEA2 Primerinde Standart ve Örneklerle Ait Amplifikasyon Eğrileri

5.3.4 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 5.13., 5.14.). Erime eğrisi analizlerinde üst üste çakışan tek pik görüntüleri elde edilmiş ve dimer varlığı saptanmamıştır.



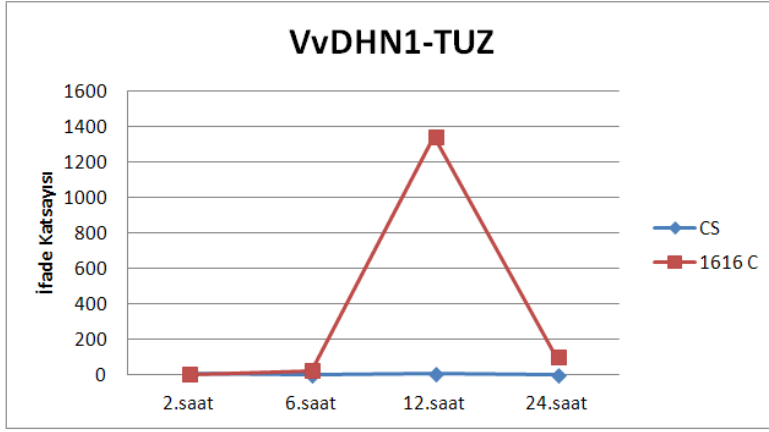
Şekil 5.12 VvDHN1primerine Ait Standart ve Örneklerin Erime Eğrisi Grafiği



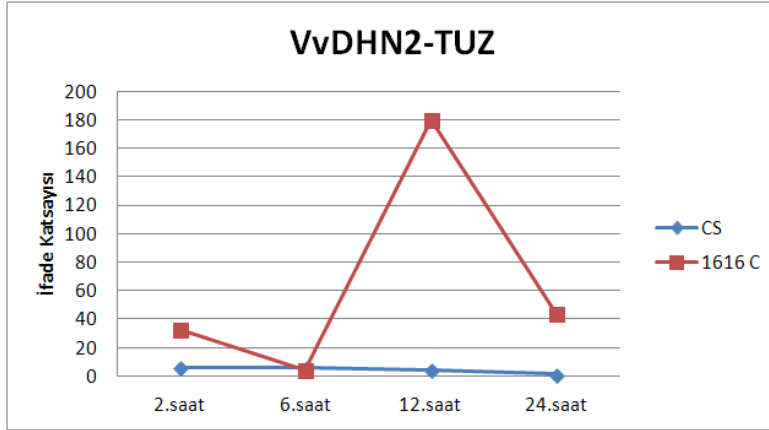
Şekil 5.13 ACT Primerine Ait Standart ve Örneklerin Erime Eğrisi Grafiği

5.3.5. Real Time PCR Normalize Verilerinin İfade Analizleri

Çeşit ve anaçda tuz ve PEG koşullarında aktine göre normalize edilmiş VvDHN1, VvDHN2, VvLEA1, VvLEA2 primerlerine göre ifade seviyeleri Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18.'de sunulmuştur.



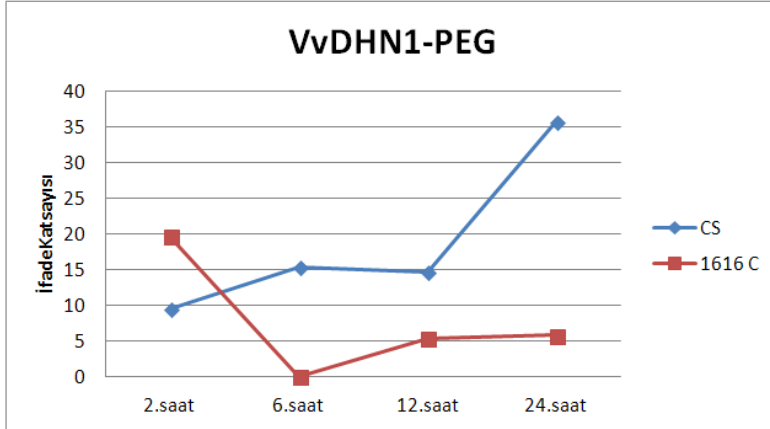
VvDHN1-TUZ				
ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	6.895038	1.487236	5.877875	0.928095
P değeri	0	0.951	0.001	1
1616 C	3.172637	23.36146	1339.003	98.65209
P değeri	1	0.999	0	0.794



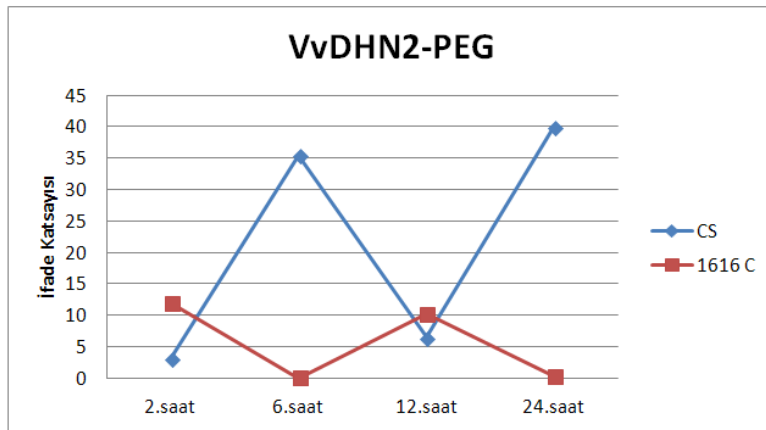
VvDHN2-TUZ				
ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	6.323837	5.673192	4.636809	1.46324
P değeri	0	0	0.001	0.902
1616 C	32.91827	4.68274	179.9211	43.70461
P değeri	0.335	0.999	0	0.146

Şekil 5.14 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için 120 mM NaCl Stresinde VvDHN1-VvDHN2 Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2-sided) Verileri

VvDHN1 ve VvDHN2 ifade seviyesi tüm 120mM tuz uygulama zamanlarında CS çeşidinde belirgin bir değişim gözlenmezken, 1616 C anacında ise 12. saatin kritik olduğu Dunnett t (2-sided) ve Bonferroni istatistik analizleriyle de $p < 0.05$ değeri için anlamlı olarak bulunmuştur (Ek 1).



ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	9.501424	15.32818	14.6077	35.68821
P değeri	1	0.344	0.425	0.001
1616 C	19.67116	0.042316	5.318354	5.787303
P değeri	0	0.991	0.407	0.327

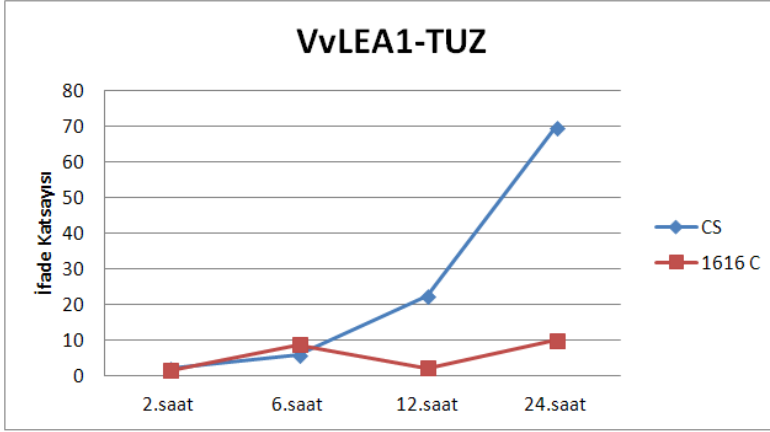


ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	3.082366	35.45101	6.516727	39.9188
P değeri	0.875	0	0.228	0
1616 C	11.90201	0.005447	10.21204	0.332601
P değeri	0	0.798	0	0.936

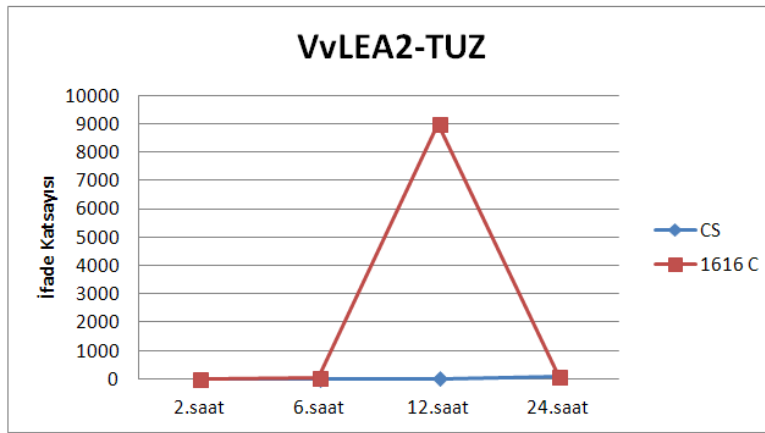
Şekil 5.15 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için PEG Stresinde VvDHN1-VvDHN2

Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2-sided) Verileri

%20 PEG uygulaması sonucunda çeşit ve anaçta $p < 0.05$ değerinde anlamlı değerler için VvDHN1 ve VvDHN2 bölgesi ifadesi artan profil izlemiştir. CS çeşidinde Dunnett t (2-sided) ve Bonferroni istatistik analizleriyle hem kontrole hem de diğer saat uygulamalarına göre en anlamlı ve en yüksek artan ifade katsayısı 24. saatte gözlenirken, aynı koşullarında 1616 C anacında ise 2. saatte belirlenmiştir.



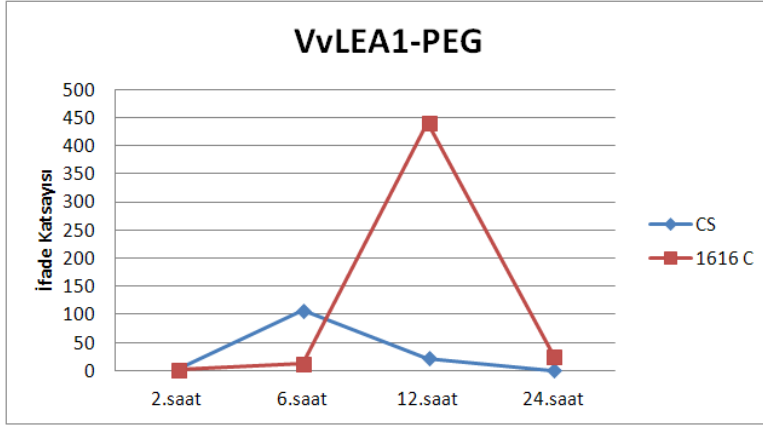
VvLEA1-TUZ				
ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	2.07689	5.715039	22.38968	69.56379
P değeri	1	0.921	0.055	0
1616 C	1.420737	8.739049	2.195104	9.84506
P değeri	0.947	0	0.380	0



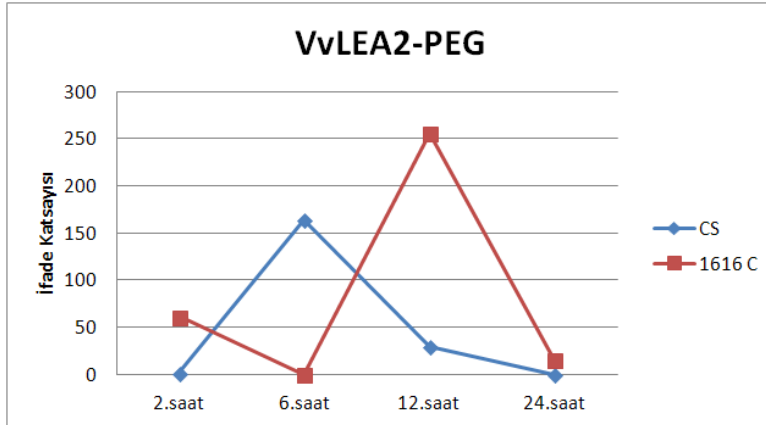
VvLEA2-TUZ				
ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	2.685794	1.96242	15.89029	67.79063
P değeri	1	1	0.445	0
1616 C	1.973217	20.27513	8985.354	97.07898
P değeri	1	1	0	1

Şekil 5.16 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için 120 mM NaCl Stresinde VvLEA1-VvLEA2 Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2-sided) Verileri

%20 PEG uygulaması sonucunda çeşitte artan ifade katsayısı zamana göre artmakla birlikte benzer profil sergilemiş ve 24. saate en yüksek seviyeye, 1616 C anacı için ise 12. saatin daha kritik bir uygulama olduğu (yüksek katsayıda anlamlı ifade artışı) belirlenmiştir.



VvLEA1-PEG				
ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	2.685794	1.96242	15.89029	67.79063
P değeri	1	0	0.213	1
1616 C	1.973217	20.27513	8985.354	97.07898
P değeri	1	0.997	0	0.954



VvLEA2-PEG				
ZAMAN	2.saat	6.saat	12.saat	24.saat
CS	1.995802	164.1271	30.23664	0.160464
P değeri	1	0	0.443	1
1616 C	61.33438	0.027671	255.7057	15.02261
P değeri	0.017	1	0	0.822

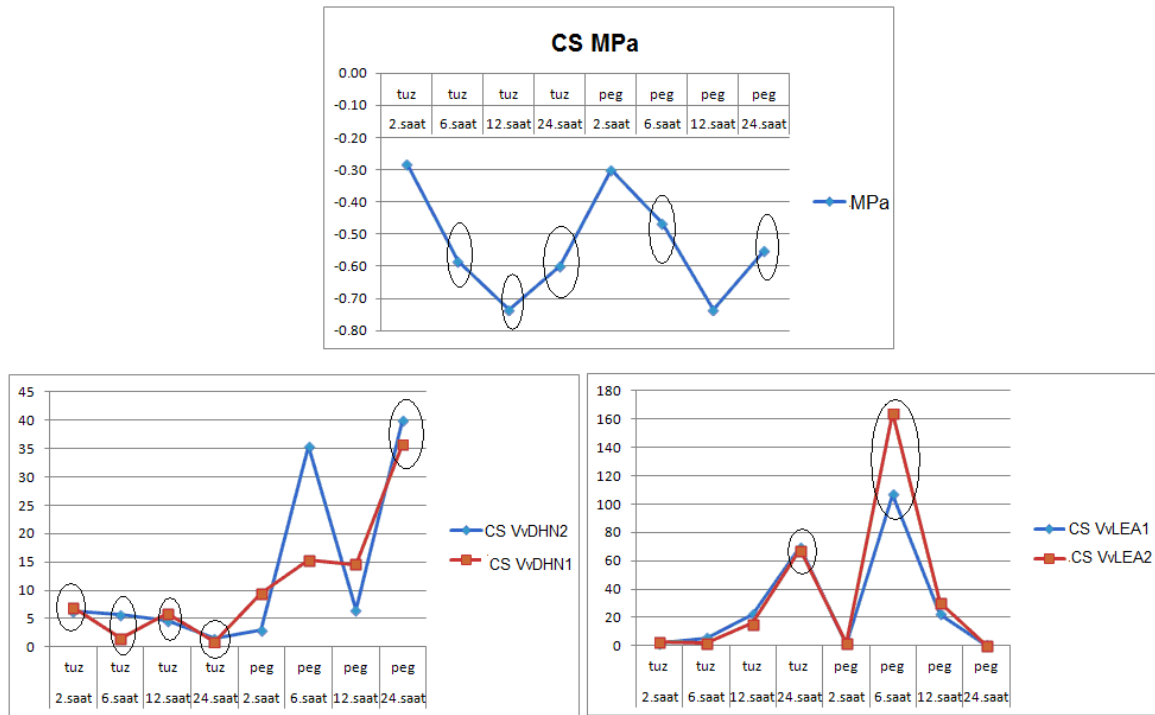
Şekil 5.17 1616 C Anacı ve CS Çeşidi için %20 PEG Stresinde VvLEA1-VvLEA2

Primerlerine Ait Normalize Verilerin İfade Seviyeleri ve Dunnett t (2- sided) Verileri

Dunnett t (2-sided) ve Bonferroni $p < 0.05$ değerinde en anlamlı ve en yüksek upregüle katsayısı 1616 C anacı için 12. saat uygulamasında ulaşılmış, CS çeşidinde ise 6. saatte belirlenmiştir.

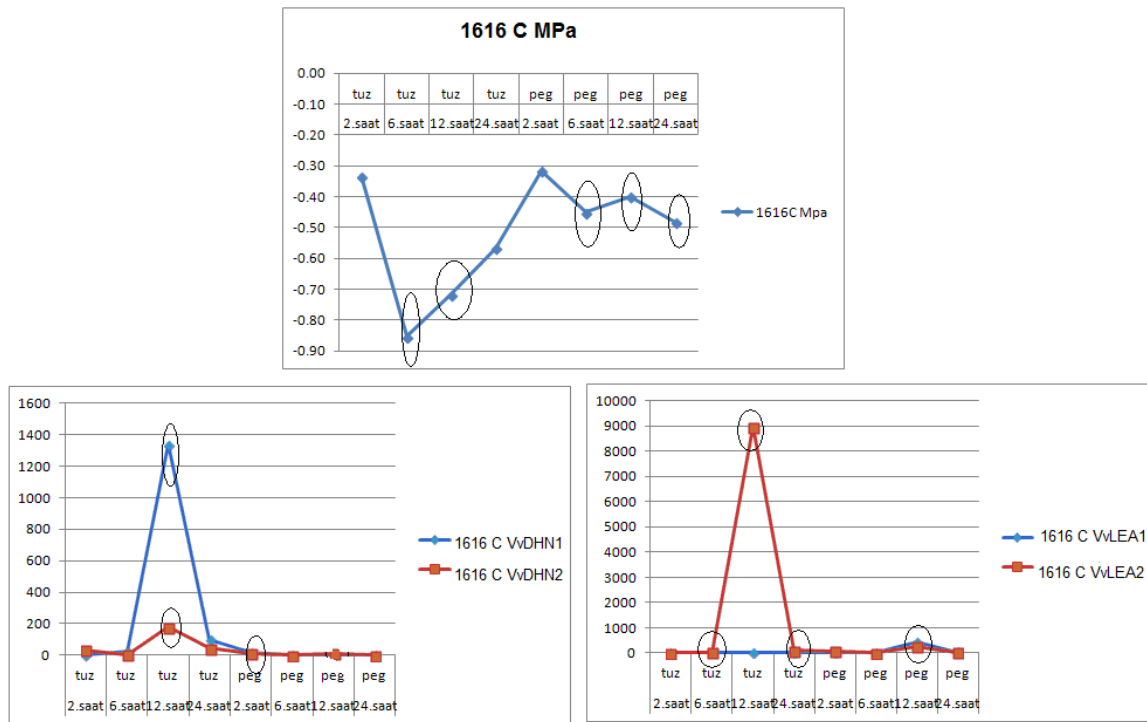
5.4. Fizyolojik Veriler (MPa) ile Gen İfadesi Analizlerinin Karşılaştırılması

Uygulama saatleri boyunca yapılan fizyolojik ölçümlerin kontrole göre anlamlılık ($p < 0.05$) t-test sonuçları ile 1616 C ve CS de gen ifadesi (VvDHN ve VvLEA) anlamlı saatlerinin birbiri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.18 ve Şekil 5.19). Kontrole göre anlamlı olan değerler işaretlenmiştir.



Şekil 5.18 CS Çeşidi MPa Değerleri ile Gen İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması

CS çeşidinde VvDHN ifadesi tuz stresi koşullarında stabil artan ifade profili gösterirken VvLEA ifadesinde ise 24. saat kritik olarak belirlenmiştir. Fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da tuz stresi koşullarında 6. 12. ve 24. saatin kontrole oldukça anlamlı ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Kuraklık koşullarında ise; VvDHN ifadesinde 24. saat, VvLEA ifadesinde ise 6. saatin kritik olduğu, fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da kuraklık stresi koşullarında sadece 6. ve 24. saatin kontrole oldukça anlamlı ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.19 1616 C Anacı MPa Değerleri ile Gen İfade Seviyelerinin Karşılaştırılması

1616 C anacında VvDHN ifadesi için tuz stresi koşullarında 12. saat kritik olarak belirlenirken VvLEA ifadesinde ise 6 -12. saatler arasındaki ifadenin kontrole göre yüksek ve anlamlı olduğu belirlenmiştir. Fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da tuz stresi koşullarında 6. 12. ve 24. saatin kontrole oldukça anlamlı ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Kuraklık koşullarında ise; VvDHN ifadesinde 2. saat, VvLEA ifadesinde ise 12. saatin kritik olduğu, fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da kuraklık stresi koşullarında 2. ve 12. saatin kontrole oldukça anlamlı ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında Cabernet Sauvignon (CS) çeşidi ve 1616 C anacında 2., 6., 12. ve 24. saatlik zaman dilimlerinde 120 mM NaCl ve osmotik olarak tuzluluk stresine eş PEG stresi koşullarındaki bir LEA (genin iki bölgesi VvLEA1, VvLEA2) ve bir VvDHN (genin iki bölgesi VvDHN1, VvDHN2) genlerinin ifade seviyeleri araştırılmıştır. Aktin (ACT) referans gen (house keeping) ile çalışılmış olup, anaç ve çeşit arasında zamana bağlı olarak değişen gen ifadeleri ve kritik saat uygulamaları (Gen ifadesinin anlamlı olarak yüksek oranda değiştiği zaman aralıkları) ACT'ye göre yapılan normalizasyonlar sonucunda tamamlanmıştır.

6.1. Dehidrin Gen Bölgesi İfade Analizleri

6.1.1. Tuz Stresi-Dehidrin Gen İfadesi Analizleri

VvDHN1 bölgesinin ifadesinde CS çeşidinde tüm uygulama zamanları boyunca belirgin/kritik bir değişim gözlenmezken, 1616 C anacında ise 12. saatin kritik olduğu ve VvDHN1 bölgesinin ifadesinin yaklaşık 1339 kat arttığı ($p<0.05$) belirlenmiştir (Şekil 5.15.).

VvDHN2 için elde edilen sonuçlara bakıldığında da ise VvDHN1'e benzer şekilde CS'de belirgin bir gen ifade değişiminin olmadığı 1616 C'de ise 12. saatin kritik olduğu belirlenmiştir. 12. saatteki bu kritik kat artışı Dunnett t (2-sided) istatistik analizi ile kontrole göre ve Bonferroni analizi ile de diğer saat uygulamalarına göre istatistiksel olarak ($p<0.05$) değerinde oldukça anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.15.).

VvDHN1 ve VvDHN2 bölgelerinin ifadeleri 120 mM tuz stresinde, anaç ve çeşitte farklı olmakla birlikte, anaç ve çeşit ayrı ayrı değerlendirildiğinde birbirini desteklediğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma ile, dehidrasyon sırasında proteinlerin agregasyonlarının

önlenmesi ve hücre membran bütünlüğünün korunmasını sağlayan dehidrinlerin (113-115) hem anaç hem de çeşitte tuzluluk koşullarında ifadelerinin değiştiği gösterilmektedir.

Çeşitte tuz stres uygulaması ile artan gen ifadesi değişmezken, anaçta ise uygulamanın daha geç evresinde (12. saat) yüksek cevap belirlenmiştir. Bunun ise anaç ve çeşidin abiotik strese karşı dayanıklılıklarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Paul ve arkadaşları tarafından çay [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze] ' da farklı zamanlarda (0.,1.,4.,24.,48. saat) yapılan PEG ve 100mM tuz stresi uygulamaları sonucunda dehidrin genlerinin (DHN1 ve DHN2 genleri) ifade düzeyleri araştırılmıştır (116). 100mM NaCl stresi uygulamasında çayda 4-24. saat arasında DHN gen ifadesi yüksekken, bu çalışma da 1616 C anacında da özellikle 12. saatte ve CS çeşidinde benzer artan ifade profili belirlenmiştir. Ayrıca bu tez çalışmasında tuzluluk koşullarında VvDHN gen bölgelerinin ifadesi 6. saat sonrasındaki uygulamalarda (12. saat ve sonrası) 1616 C anacında yüksek cevapla değişmeye başlamıştır (Şekil 5.15). Daldoul ve ark., tarafından *Vitis vinifera* L. genotipleri arasında 100mM NaCl stresi koşullarında yapılan microdizin (microarray) analizlerinde de benzer olarak 6. ve 24. saatlerde dehidrin gen ifadesinin gözlemlendiği ve bu ifadesinin 24. saat sonrasında çok daha fazla olduğu belirtilmiştir (13).

6.1.2. Kuraklık Stresi-Dehidrin Gen İfadesi Analizleri

Dehidrinler dehidrasyon sırasında proteinlerin agregasyon ya da inaktivasyonunu önleyecek şaperonlar olarak görev yapmakta ve hücre membran bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadırlar (113-115). PEG uygulamasında zamana göre değişen gen ifade seviyeleri ise çeşit ve anaçta incelediğinde ise VvDHN1 gen bölgesi ($p < 0.05$ değerinde anlamlı ifade analizi sonuçlarına göre) için sürekli artan bir profil gözlenmektedir (Şekil 5.16). CS'de anlamlı ve en yüksek ifade katsayısı (yaklaşık 35 kat) 24. saatte gözlenirken, aynı anlamlılık koşullarında 1616 C anacında VvDHN1 bölgesi için en yüksek ifade artış katsayısı (yaklaşık 19 kat) 2. saatte belirlenmiştir. Aynı anlamlılık koşullarında VvDHN2 bölgesi için VvDHN1 bölgesi ifade profiline benzer olarak CS çeşidinde 24. saatte (yaklaşık 39 kat) 1616 C anacında ise 2. saatte (yaklaşık 11 kat)

belirlenmiştir (Şekil 5.17.). Kuraklık stresine cevapta VvDHN1 ve VvDHN2 bölgeleri için yapılan analizlerde anaç ve çeşitteki ifade profilleri birbirini desteklemektedir. Dehidrinlerin kuraklık koşullarındaki ifadesi çeşit ve anaçta benzer olarak oldukça yüksek bulunmuştur. VvDHN1 ve VvDHN2 bölgelerinin ortak anlamlı değerleri için çeşitteki gen ifadesi anaca göre daha geç ve yaklaşık 3 kat daha fazla, anaçta ise erken cevapta ifade artışı belirlenmiştir (Şekil 5.17.). Zeytinde yapılan çalışmada dehidrasyon/osmotik strese cevapta DHN'lerin rol oynadığı ve kurak tolerant genotiplerde kuraklığa hassas genotiplere göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (117). Bu çalışmada da benzer olarak kuraklık koşullarında CS çeşidi ve 1616 C anacı için en anlamlı ve kritik olan uygulama sürelerinde çeşitteki VvDHN lerin cevaptaki ifadesi anaca göre daha yüksektir. Paul ve ark., tarafından çay [*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze] ' da farklı zamanlarda (0., 1., 4., 24., 48. saat) yapılan PEG uygulaması sonucunda DHN gen ifadesi uygulamanın ilk başladığı 1. saat itibari ile artmaya başlamış ve 24. saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır (116). Benzer olarak bu tezde de 1616 C anacında ilk PEG uygulamasının yapıldığı 2. saat itibari ile VvDHN gen ifadesi artmaya başlamış, CS çeşidinde ise 24 saatte anlamlı olarak en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Ayrıca DHN genin yüksek derecede ifadesinin soğuk, kurak, tuzluluk ve osmotik strese karşı dayanıklılığı etkilediği transgenik hatlarda da belirlenmiştir (61, 118, 119).

Genel olarak DHN'lerin kuraklık ve tuz stresinde ifadesi artmakta ve bunu takip eden rehidrasyonla ifadesi azalmaktadır (120). Ayrıca yapılan çalışmalarda farklı DHN tiplerinin farklı abiotik stres koşullarına cevapta sorumlu olduğu belirtilmiş olup (106) *Vitis vinifera* L.'de diğer DHN gen/genlerinin kuraklık, yüksek tuz stresi vb. koşullarında ifadesinin arttığı gösterilmiştir (112, 116, 118). Pinot Noir çeşidinde de farklı ifade profillerine sahip dehidrinler tanımlanmıştır (115). *Vitis vinifera* L. ile birlikte kuraklık koşullarında arpa (121), tuzluluk stresi koşullarında da zeytinde (117) dehidrinlerin artan ifade profilleri gösterilmiştir. Bu tezin sonuçlarında da gözlenen tüm tuz ve kurak uygulamaları koşullarında VvDHN'lerin artan ifade profilleri desteklenmektedir. Doalysıyla bu araştırmada konu edilen VvDHN gen bölgesinin aday gen olabileceği anlaşılmaktadır.

6.2. VvLEA Gen Bölgesi İfade Analizleri

6.2.1. Tuz Stresi-VvLEA Gen İfadesi Analizleri

VvLEA1 ifadesinin 120mM NaCl stresinde 1616 C anacı ve CS çeşidinde genel olarak 2. saatte benzer profil sergilediği ve 6. saat itibari ile değişimin olduğu gözlenmiştir. Tüm saat uygulamalarında anaç ve çeşitte VvLEA1 ifadesi artan profile sahipken, 24. saatlik uygulamalarda CS'de anaca göre daha yüksek oranda (yaklaşık 6 kat) ifade artışı gözlenmiştir (Şekil 5.17.). VvLEA2 için elde edilen sonuçlara bakıldığında da ise anaç ve çeşitte genel olarak 2. saatte benzer ifade profili ve 12. saatte farklılaşma belirlenmiştir (Şekil 5.17.). Dunnett t (2-sided) analizine göre 24. saatteki bu artış çeşitte anlamlı bulunurken ($p < 0.05$), farkın ortaya çıkmaya başladığı 12. saatteki cevap ise anaçta Bonferroni istatistik analizleriyle de diğer zamanlara ($p < 0.05$) göre anlamlı bulunmuştur. Çeşitte ifadedeki artış katsayısı zamana göre artmakla birlikte anaca göre geç fakat daha yüksek cevabın ortaya çıktığı, 1616 C anacında ise 6-12. saatler arasında olduğu fakat çeşide göre daha az ifade katsayısıyla ortaya çıktığı belirlenmiştir. VvLEA gen ifadesi çeşit ve anaçta farklı olmakla birlikte, çeşitte daha geç fakat daha yüksek cevabın olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.17.).

Xiao ve ark., tarafından pirinçte yapılan çalışmada OsLEA3-1 genine farklı zamanlarda kurak, tuz, soğuk ve ABA uygulaması yapılmıştır (122). Araştırmacılar 200mM NaCl uygulamasında, genin ifadesindeki artışın özellikle 6., 12., ve 24. saatlerinde olduğunu ve en yüksek seviyesine 24. saatte ulaşıldığını bildirmişlerdir. Bu tezdeki anaç ve çeşitteki tuz uygulamasına bakıldığında da ifade artışının kritik saat aralığının 6-24 olduğu belirlenmiş, sonuçlar (122) ile oldukça uyumlu bulunmuştur. Ayrıca, Liu ve ark., tarafından mısırdaki ZmLEA3 geni ile yapılan çalışmada 150mM NaCl uygulaması sonucunda gen ifadesinin ilk 24 saat içerisinde, yüksek seviyeye ulaştığı belirtilmiş bu tezdeki kritik ve yüksek VvLEA gen bölgelerinin ifadesi olan saatler ile benzer bulunmuştur (123).

6.2.2. Kuraklık Stresi-VvLEA Gen İfadesi Analizleri

PEG uygulaması ile VvLEA gen bölgelerinin zamana göre değişen gen ifade seviyeleri incelendiğinde; VvLEA1 gen bölgesinin çeşit ve anaçta çoğunlukla artan ifade profiline sahip olduğu gözlenmiştir. 1616 C için kontrole ve diğer saat uygulamalarına göre istatistik olarak en anlamlı ve en yüksek ifade katsayısı (yaklaşık 441) 12. saat uygulamasında ulaşılmış ve 1616 C anacı için en kritik uygulama saati olduğu belirlenmiştir. Aynı koşullarda CS'de en yüksek ifade katsayısı 6. saatte (yaklaşık 106 kat) belirlenmiştir. VvLEA2 bölgesi VvLEA1'in ifade profiline benzer olarak CS çeşidinde 6. saatte (yaklaşık 164), 1616 C anacında ise 12. saatte (yaklaşık 255 kat) belirlenmiştir (Şekil 5.18.). Anaç ve çeşitteki kuraklık stresine cevapta VvLEA1 ve VvLEA2 bölgeleri için yapılan gen ifade analizleri artış katsayısı profili ve kritik saat uygulamaları açısından birbirini desteklemektedir. Kuraklık koşullarında VvLEA gen ifadesi çeşitte daha erken ve anaçta göre ifade seviyesi daha düşük olmakla birlikte, hem anaç hem de çeşitte yüksek ifade seviyelerine ulaşılmıştır. Bu tez çalışması sonucunda kuraklık uygulamasında 1616 C anacı için anlamlı ve en yüksek VvLEA ifadesine 12. saatte, CS çeşidi için ise 6. saatte ulaşılmıştır (Şekil 5.18.). OsLEA3-1 geni ile Xiao ve ark., 2007 (122) tarafından pirinçte yapılan çalışmada OsLEA3-1 geni ifadesinin özellikle 6-12. saatlerde diğer uygulamalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiş ve bu çalışmanın sonuçlarıyla benzer bulunmuştur.

LEA ifadesi özellikle abiotik stres koşullarında (soğuk, kurak ve yüksek tuzluluk) artmakta ve hücrenin stabilizasyonunda önemli görevler almaktadır (114, 123, 124). Hundertmark ve Hinch tarafından 51 Arabidopsis LEA geninde yapılan Real Time PCR çalışmasında tuz ve kuraklık stresi koşullarında ifade artış profilleri gösterilmiş bu tezdeki VvLEA'nın genel olarak artan ifade profili ile benzer bulunmuştur (124). Ayrıca benzer ifade artışı profili He ve ark. tarafından pirinç OsLEA5 geni ile rekombinant E.coli hücreleri ile yapılan çalışmada da gözlenmiş ve hücre çeşitli abiyotik stres koşullarına (yüksek tuzluluk, kuraklık, soğuk vb) maruz bırakılmış ve pirinç LEA geninin ifade artışının toleransa katkı sağladığı belirtilmiştir. Transgenik pirinç ve arpa yapılan çalışmalarda da ifadesi artan LEA'ların kuraklık (125-127) ve dehidrasyona (128) karşı tolerans sağladığı

belirtilmektedir. Wang ve arkadaşları tarafından pirinçte yapılan mikrodizin çalışmasında ise tuzluluk, kurak ve osmotik stres koşullarında ifade olan LEA ifade artış profilleri bu tezde VvLEA'nın tuz ve kurak koşullarındaki hem anaç hem de çeşitte kritik ve anlamlı olan uygulama zamanlarındaki ifade artışını desteklemektedir (129).

Gen ifadelerine toplu bir bakış çizilecek olursa;

Tüm tuzluluk stresi uygulamaları ile;

- Çeşit ve anaçta VvDHN ve VvLEA genleri ifadeleri en anlamlı kritik saat uygulamalarında ifadesi artan bir profil sergilemişlerdir.
- VvDHN'nin çeşitte tüm uygulama zamanları boyunca belirli bir seviyede (6-12 kat arası) ifadesi artarken anaçta ise 12. saat en kritik uygulama zamanı olarak belirlenmiştir.
- VvDHN gen ifadesinin anaçta daha geç ve yüksek seviyede, çeşitte ise erken dönemden itibaren stabil bir cevabın olduğu belirlenmiştir.
- VvLEA gen ifadesinde ise VvDHN'de gözlenen şekilde anaç ve çeşitteki kadar net ayrımlar belirlenememekle birlikte kritik ve anlamlı saat uygulamalarında benzer ifade profilleri belirlenmiştir.
- Çeşitte anlamlı yüksek ifade katsayısı ortak olarak 24. saatte belirlenmiş ve çeşitteki yüksek VvLEA ifadesinin anaçta göre daha geç (24. saat) olduğu belirlenmiştir.

1616 C anacında VvDHN ifadesi için tuz stresi koşullarında 12.saat kritik olarak belirlenirken VvLEA ifadesinde ise 6 -12. saatler arasındaki ifadenin kontrole göre yüksek ve anlamlı olduğu belirlenmiştir. CS çeşidinde VvDHN ifadesi tuz stresi koşullarında stabil artan ifade profili gösterirken VvLEA ifadesinde ise 24. saat kritik olarak belirlenmiş ve 1616 C anacı ve CS çeşidinde fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da tuz stresi koşullarında 6. 12. 24.saatin kontrole oldukça anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Tuz stresi koşulları fizyolojik ölçüm değerleri ile gen ifadesi analizleri kritik saat uygulamaları uyumlu olarak bulunmuştur.

Tüm kuraklık stresi uygulamaları ile;

- Çeşit ve anaçada VvDHN ve VvLEA genlerinin ifadeleri en anlamlı kritik saat uygulamalarında artış profili sergilemişlerdir.
- VvDHN gen ifadesi çeşitte 24. saat en kritik uygulama zamanı olarak belirlenirken anaçada 2. saat olarak belirlenmiştir.
- VvLEA ifadesinde kritik saat uygulamaları çeşitte 6. saat (106-164 kat) anaçada ise 12. saat (255-441 kat) olarak belirlenmiştir.
- VvDHN1 ve VvDHN2 bölgelerinin ortak anlamlı değerleri için çeşitteki gen ifadesi anaca göre daha geç ve yaklaşık 3 kat daha fazla, anaçada ise erken cevapta ifade artışı belirlenmiştir.
- VvLEA gen ifadesi ise çeşitte daha erken ve anaca göre ifade seviyesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir.

1616 C anacı kuraklık koşullarında; VvDHN ifadesinde 2.saat, VvLEA ifadesinde ise 12.saatin kritik olduğu, fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da kuraklık stresi koşullarında 2. ve 12. saatin kontrole oldukça anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. CS çeşidi kuraklık koşullarında ise; VvDHN ifadesinde 24.saat, VvLEA ifadesinde ise 6.saatin kritik olduğu, fizyolojik ölçüm değerlerine bakıldığında da kuraklık stresi koşullarında sadece 6. ve 24.saatin kontrole oldukça anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiş ve fizyolojik ölçüm değerleri ve gen ifadesi anlamlı saatlerinin uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, VvLEA ve VvDHN genlerinin üzüm çeşit ve anacında ifade seviyeleri belirlenerek söz konusu gen bölgelerinin stres aday genleri olduğu ortaya konmuştur. Bu veriler genlerin klonlanması başta olmak üzere asmada stresle ilgili yürütülecek moleküler ve ıslah çalışmalarına orijinal ve temel bilgi oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 2003 Nov;**218**(1):1-14.
2. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*. 2005;**24**:23 - 58.
3. Zeiger T. Water and Plant Cells. *Plant Physiology*. 3rd. ed: Sinauer Associates, Inc.; 2002. p. 33-46.
4. Ingram J, Bartels D. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. 1996 Jun;**47**:377-403.
5. Matthews MA, Anderson MM. Fruit Ripening in *Vitis-Vinifera L* - Responses to Seasonal Water Deficits. *Am J Enol Viticult*. 1988;**39**(4):313-20.
6. Matthews MAI, R.; Anderson, M. M.; O'Mahony, M. Dependence of wine sensory attributes on vine water status. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1990;**51**(3):321-35.
7. Prior LaG, AM and Slavich, PG and Cullis, BR,. Sodium chloride and soil texture interactions in irrigated field grown sultana grapevines. 3. Soil and root system effects. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1992;**43**(5):1085-100.
8. Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR. Effect of irrigation on changes in berry composition of Tempranillo during maturation. Sugars, organic acids, and mineral elements. *Am J Enol Viticult*. 1999;**50**(4):418-34.
9. Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera L*) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001;**81**(4):409-20.
10. Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*. 2000 Sep;**55**(1):77-85.

11. Mullins M.G. B, A., and Williams, L.E. . Biology of the grapevine. . Cambridge University Press; 1992. p. 239.
12. Howell GS. Vitis Rootstocks. In: Rom, R. C., Carlson, R.F. (Eds.), Rootstocks for Fruit Crops. A Wiley PInterSciece Publication, John Wiley and Sons, NewYork, Inc., 1987:451-72.
13. Daldoul S, Guillaumie S, Reustle GM, et al. Isolation and expression analysis of salt induced genes from contrasting grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. Plant science : an international journal of experimental plant biology. 2010 Nov;**179**(5):489-98.
14. R. S. DUBEY. Protein synthesis by plants under stressful conditions. In: Pessaraki M, editor. Handbook of Plant and Crop Stress. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1994. p. 277-99.
15. Ashraf MY, Sarwar G, Ashraf M, Afaf R, Sattar A. Salinity Induced Changes in α -Amylase Activity During Germination and Early Cotton Seedling Growth. Biologia Plantarum. 2002 2002/12/01;**45**(4):589-91.
16. Smirnoff N. Tansley Review .52. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water-Deficit and Desiccation. New Phytol. 1993 Sep;**125**(1):27-58.
17. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. 2d ed. New York: Academic Press; 1980.
18. McKersie BDL, Y. Y.,. Stress and stress coping in cultivated plants. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1994.
19. Iqbal M, Ashraf M, Jamil A. Seed enhancement with cytokinins: changes in growth and grain yield in salt stressed wheat plants. Plant Growth Regul. 2006 2006/09/01;**50**(1):29-39.
20. Sgherri CLM, Pinzincp, C. and Navari-Izzo, F.,. Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: Changes in O₂– production Aated to the composition of thylakoid membranes. . Physiologia Plantarum. 1996 March **96**(3):446–52.
21. Frank B. Salisbury and Cleon W. Ross. Plant Physiology. 4th ed. Belmont, CA, U.S.A: Wadsworth, Inc.; 1992.

22. Bray EA. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. 1997 February **2**(2):48-54.
23. Matthew A. Jenks PMH. *Plant Abiotic Stress*: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
24. Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2005 Dec 15;**444**(2):139-58.
25. Wilkinson S, Clephan AL, Davies WJ. Rapid low temperature-induced stomatal closure occurs in cold-tolerant *Commelina communis* leaves but not in cold-sensitive tobacco leaves, via a mechanism that involves apoplastic calcium but not abscisic acid. *Plant Physiol*. 2001 Aug;**126**(4):1566-78.
26. Chaves MM, Maroco J, #227, P. o, Pereira J, S. o. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 2003;**30**(3):239-64.
27. Rengasamy P. World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot*. 2006 Mar;**57**(5):1017-23.
28. Anonim. FAO Land and Plant Nutrition Management Service. 2008 [cited; Available from: <http://www.fao.org/ag/ag/agll/spush>].
29. Taiz L, Zeiger E, Türkan İ. *Bitki fizyolojisi*: Palme Yayıncılık; 2008.
30. Munns R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol*. 2005 Sep;**167**(3):645-63.
31. Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J-K. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Sci*. 2005 2005/3;**45**(2):437-48.
32. Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2005 Mar;**60**(3):324-49.
33. Niklas Holmberga LB. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*. 1998 February;**3**(2):61-6.
34. Mansour MMF, Salama KHA. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environ Exp Bot*. 2004 Oct;**52**(2):113-22.

35. Maggio A, Joly RJ, Hasegawa PM, Bressan RA. Can the Quest for Drought Tolerant Crops Avoid Arabidopsis Any Longer? *Journal of Crop Production*. 2003 2003/01/20;**7**(1-2):99-129.
36. Shuji Yokoi RABaPMH. Salt Stress Tolerance of Plants. Working Report. USA: Purdue University; 2002.
37. Ashraf M. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*. 2004;**199**(5):361-76.
38. R. K. Sairam aAT. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Sceince*. 2004 10 February;**86**(3).
39. Zhu JK. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*. 2002;**53**:247-73.
40. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol*. 1997 Oct;**115**(2):327-34.
41. Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2002 Aug;**31**(3):279-92.
42. Oztur ZN, Talame V, Deyholos M, et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant molecular biology*. 2002 Mar-Apr;**48**(5-6):551-73.
43. Zhao XC, Schaller GE. Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in Arabidopsis thaliana. *FEBS letters*. 2004 Mar 26;**562**(1-3):189-92.
44. Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, et al. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & integrative genomics*. 2007 Apr;**7**(2):111-34.
45. Borsani O, Valpuesta V, Botella MA. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tiss Org*. 2003 May;**73**(2):101-15.

46. Zhu JK. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current opinion in plant biology*. 2001 Oct;**4**(5):401-6.
47. Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol*. 2002 Dec;**130**(4):2129-41.
48. Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current opinion in biotechnology*. 2003 Apr;**14**(2):194-9.
49. Sahi C, Singh, A., Blumwald, E. and Grover, A., Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiologia Plantarum*. 2006 may;**127**(1):1-9.
50. Dure L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1993;**3**:363 - 9.
51. Dure L, III, Crouch M, Harada J, et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant molecular biology*. 1989 1989/05/01;**12**(5):475-86.
52. J.X. He JRF. The research progresses in Lea proteins of seeds. *Plant Physiology Communication*. 1996;**32**(4):241-6.
53. Hong-Bo S, Zong-Suo L, Ming-An S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2005 Nov 10;**45**(3-4):131-5.
54. Close TJ. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 1996;**97**(4):795-803.
55. Zhu J-K, Hasegawa PM, Bressan RA, Bohnert HJ. Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1997 1997/01/01;**16**(3):253-77.
56. Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Feb 25;**275**(8):5668-74.

57. Dure L, III. Lea Proteins and the Desiccation Tolerance of Seeds. In: Larkins B, Vasil I, editors. Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development: Springer Netherlands; 1997. p. 525-43.
58. Chen Y, Qu LQ, Jia X. [The characters and gene expression of rice seed proteins]. Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji. 2003 May;**25**(3):367-72.
59. Wisniewski K, Zagdanska B. Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. J Exp Bot. 2001 Jul;**52**(360):1455-63.
60. Browne J, Tunnacliffe A, Burnell A. Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. Nature. 2002 Mar 7;**416**(6876):38.
61. Puhakainen T, Hess M, Kela P, Svensson J, Heino P, Palva E. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing. Plant molecular biology. 2004;**54**:743 - 53.
62. Baker J, dennSteele C, Dure L, III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. Plant molecular biology. 1988 1988/05/01;**11**(3):277-91.
63. Mundy J, Chua NH. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. The EMBO journal. 1988 Aug;**7**(8):2279-86.
64. Takahashi R, Joshee N, Kitagawa Y. Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. Plant molecular biology. 1994 1994/10/01;**26**(1):339-52.
65. Ouellet F, Houde M, Sarhan F. Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kDa protein induced by cold acclimation in wheat. Plant & cell physiology. 1993 Jan;**34**(1):59-65.
66. Close TJ. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiologia Plantarum. 1997;**100**(2):291-6.
67. Mtwisha L, Brandt W, McCready S, Lindsey GG. HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Plant molecular biology. 1998 Jun;**37**(3):513-21.
68. Lisse T, Bartels D, Kalbitzer HR, Jaenicke R. The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*

- displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biological chemistry*. 1996 Sep;**377**(9):555-61.
69. Mouillon JM, Eriksson SK, Harryson P. Mimicking the plant cell interior under water stress by macromolecular crowding: disordered dehydrin proteins are highly resistant to structural collapse. *Plant Physiol*. 2008 Dec;**148**(4):1925-37.
70. Lang V, Palva ET. The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant molecular biology*. 1992 Dec;**20**(5):951-62.
71. Goday A, Jensen A, Culiñez-Macia F, et al. The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*. 1994;**6**:351 - 60.
72. Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin B. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*. 2001 2001/02/01;**45**(3):263-79.
73. Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberte S, Sarhan F. Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 1995 Oct;**8**(4):583-93.
74. Godoy J, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo R, Pintor-Toro J. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant molecular biology*. 1994 1994/12/01;**26**(6):1921-34.
75. Alsheikh M, Heyen B, Randall S. Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;**278**:40882 - 9.
76. Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, Close TJ, Yu X-M, Griffith M. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*. 1999;**105**(4):600-8.

77. 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. *Physiologia Plantarum*. 1997;**99**(1):153-9.
78. Park S.Y. NKJ, Yoo J.H., Yu J.W., Lee B.W., Kim J.G., Seo H.S., Paek N.C.,. Rapid upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in response to dehydration is a characteristic of drought-tolerant genotypes in barley. *Journal of Plant Biology*. 2006;**49**(6):455-62.
79. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Apr 17;**273**(16):9443-9.
80. Hara M, Fujinaga M, Kuboi T. Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *J Exp Bot*. 2005 Oct;**56**(420):2695-703.
81. Hara M, Terashima S, Kuboi T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *Journal of Plant Physiology*. 2001;**158**(10):1333-9.
82. Çelik H, Y. S. Ağaoğlu, Y. Fidan, B. Marasalı and G. Söylemezoğlu, . Genel Bağcılık; 1998.
83. Grimes DW, Williams LE. Irrigation Effects on Plant Water Relations and Productivity of Thompson Seedless Grapevines. *Crop Science*. 1990 Mar-Apr;**30**(2):255-60.
84. Kotuby-Amacher J. JJ, Rasmussen V. P., James D. W. and Whitesides R. W., Salinity and Plant tolerance Utah, U.S.A.; Utah State University extension; 1997. p. 8.
85. Mark Battany. Grape Notes:Vine Mealybug Update, Irrigation Meetings, Syrah Disorder, Atmometer Research Results, Salinity management for drought years 2004. p. 8.
86. Carew ME, Goodisman MAD, Hoffmann AA. Species status and population genetic structure of grapevine eriophyoid mites. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2004;**111**(2):87-96.

87. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of molecular endocrinology*. 2005 Jun;**34**(3):597-601.
88. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*. 2006;**1**(3):1559-82.
89. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental hematology*. 2002 Jun;**30**(6):503-12.
90. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996 Oct;**6**(10):986-94.
91. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001 May 1;**29**(9):e45.
92. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005 Jul;**39**(1):75-85.
93. Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG. NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature*. 1994 Mar 24;**368**(6469):335-9.
94. Lin Zhong-ping and Hu Yuan-lei. Stress Resistance of Plants Induced via the Salicylic Acid-Mediated Signal Transduction Pathway. *Journal of Intergrative Plant Biology*. 1997 Julay;**39** (2):185–8.
95. Glenn A, Galau DWH, Leon Dure,. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant molecular biology*. 1986 April;**7**(3):155-70.
96. Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Metraux JP, Mauch-Mani B. Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol*. 2005 Sep;**139**(1):267-74.
97. Rinne PL, Kaikuranta PL, van der Plas LH, van der Schoot C. Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. *Planta*. 1999 Oct;**209**(4):377-88.

98. Tabaei-Aghdaei SR, Harrison P, Pearce RS. Expression of dehydration-stress-related genes in the crowns of wheatgrass species [*Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love and *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link.) Schult.] having contrasting acclimation to salt, cold and drought. *Plant, Cell & Environment*. 2000;**23**(6):561-71.
99. Zhu JK. Genetic analysis of plant salt tolerance using arabidopsis. *Plant Physiology*. 2000 Nov;**124**(3):941-8.
100. Ismail A, Hall A, Close T. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol*. 1999;**120**:237 - 44.
101. Guy CL, Niemi KJ, Brambl R. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985 Jun;**82**(11):3673-7.
102. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress. *Current opinion in biotechnology*. 1996 Apr;**7**(2):161-7.
103. Cornic G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 2000 May;**5**(5):187-8
104. Hare PD, Cress WA, Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*. 1998;**21**(6):535-53.
105. Close T. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant*. 1996;**97**:795 - 803.
106. Rorat T. Plant dehydrins--tissue location, structure and function. *Cellular & molecular biology letters*. 2006;**11**(4):536-56.
107. Roubelakis-Angelakis K, Zivanovite S. A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. *Hortscience*. 1991;**26**(12):1551-3.
108. Cramer GR, Lauchli A, Epstein E. Effects of NaCl and CaCl₂ on Ion Activities in Complex Nutrient Solutions and Root Growth of Cotton. *Plant Physiol*. 1986 Jul;**81**(3):792-7.

109. Reid RJ, Smith FA. The limits of sodium/calcium interactions in plant growth. *Functional Plant Biology*. 2000;**27**(7):709-15.
110. Gambino G, Perrone I, Gribaudo I. A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical analysis : PCA*. 2008 Nov-Dec;**19**(6):520-5.
111. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001 Dec;**25**(4):402-8.
112. Cramer G, Ergul A, Grimplet J, et al. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & integrative genomics*. 2007;**7**:111 - 34.
113. Suprunova T, Krugman T, Fahima T, et al. Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water deficit. *Plant Cell Environ*. 2004;**27**:1297 - 308.
114. Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K. Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant signaling & behavior*. 2011 Oct;**6**(10):1503-9.
115. Yang Y, He M, Zhu Z, et al. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*. 2012;**12**(1):140.
116. Paul A, Kumar S. Dehydrin2 is a stress-inducible, whereas Dehydrin1 is constitutively expressed but up-regulated gene under varied cues in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Molecular biology reports*. 2013 May;**40**(5):3859-63.
117. Tripepi M, Pohlschroder M, Bitonti M. Diversity of dehydrins in *Oleae europaea* plants exposed to stress. *Open Plant Sci J*. 2011;**5**:9 - 13.
118. 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**:968 - 77.

119. Ochoa-Alfaro A, Rodriguez-Kessler M, Perez-Morales M, et al. Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta*. 2011.
120. Dobra J, Vankova R, Havlova M, Burman A, Libus J, Storchova H. Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. *J Plant Physiol*. 2011;**168**:1588 - 97.
121. Tommasini L, Svensson J, Rodriguez E, et al. Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Functional & integrative genomics*. 2008;**8**:387 - 405.
122. Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet*. 2007 Jun;**115**(1):35-46.
123. Liu Y, Wang L, Xing X, et al. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant and Cell Physiology*. 2013 March 29, 2013.
124. Hundertmark M, Hinch D. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*. 2008;**9**:118.
125. Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T-H, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*. 1996;**110**:249 - 57.
126. Sivamani E, Bahieldin A, Wraith J, et al. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 2000;**155**:1 - 9.
127. He S, Tan L, Hu Z, Chen G, Wang G, Hu T. Molecular characterization and functional analysis by heterologous expression in *E. coli* under diverse abiotic stresses for OsLEA5, the atypical hydrophobic LEA protein from *Oryza sativa* L. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 2012 Jan;**287**(1):39-54.

128. Cheng Z, Targolli J, Huang X, Wu R. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breeding*. 1999;**10**:71 - 82.
129. Wang X, Zhu H, Jin G, Liu H, Wu W, Zhu J. Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 2007;**172**:414 - 20.

EKLER

EK 1. Dunnett -t ve Bonferroni Analizi Sonuçları

Dependent Variable		(I) zaman	(J) zaman	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
							Lower Bound	Upper Bound	
CS ACT VvDHN1 Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	5.40780(*)	0.90693	0.001	2.1597	8.6559	
			12. saat	1.01716	0.90693	1	-2.2309	4.2652	
			24. saat	5.96694(*)	0.90693	0.001	2.7189	9.215	
			Kontrol	5.89504(*)	0.90693	0.001	2.647	9.1431	
		6. saat	2. saat	-5.40780(*)	0.90693	0.001	-8.6559	-2.1597	
			12. saat	-4.39064(*)	0.90693	0.007	-7.6387	-1.1426	
			24. saat	0.55914	0.90693	1	-2.6889	3.8072	
			Kontrol	0.48724	0.90693	1	-2.7608	3.7353	
		12. saat	2. saat	-1.01716	0.90693	1	-4.2652	2.2309	
			6. saat	4.39064(*)	0.90693	0.007	1.1426	7.6387	
			24. saat	4.94978(*)	0.90693	0.003	1.7017	8.1979	
			Kontrol	4.87787(*)	0.90693	0.003	1.6298	8.126	
		24. saat	2. saat	-5.96694(*)	0.90693	0.001	-9.215	-2.7189	
			6. saat	-0.55914	0.90693	1	-3.8072	2.6889	
			12. saat	-4.94978(*)	0.90693	0.003	-8.1979	-1.7017	
			Kontrol	-0.0719	0.90693	1	-3.32	3.1762	
		Kontrol	2. saat	-5.89504(*)	0.90693	0.001	-9.1431	-2.647	
			6. saat	-0.48724	0.90693	1	-3.7353	2.7608	
			12. saat	-4.87787(*)	0.90693	0.003	-8.126	-1.6298	
			24. saat	0.0719	0.90693	1	-3.1762	3.32	
		Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	5.89504(*)	0.90693	0	3.2736	8.5165
			6. saat	Kontrol	0.48724	0.90693	0.951	-2.1342	3.1087
			12. saat	Kontrol	4.87787(*)	0.90693	0.001	2.2564	7.4993
			24. saat	Kontrol	-0.0719	0.90693	1	-2.6934	2.5496

CS ACT VvDHN2 Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	0.65064	0.69099	1	-1.8241	3.1253	
			12. saat	1.68703	0.69099	0.348	-0.7877	4.1617	
			24. saat	4.86060(*)	0.69099	0	2.3859	7.3353	
			Kontrol	5.32384(*)	0.69099	0	2.8491	7.7985	
		6. saat	2. saat	-0.65064	0.69099	1	-3.1253	1.8241	
			12. saat	1.03638	0.69099	1	-1.4383	3.5111	
			24. saat	4.20995(*)	0.69099	0.001	1.7352	6.6847	
			Kontrol	4.67319(*)	0.69099	0	2.1985	7.1479	
		12. saat	2. saat	-1.68703	0.69099	0.348	-4.1617	0.7877	
			6. saat	-1.03638	0.69099	1	-3.5111	1.4383	
			24. saat	3.17357(*)	0.69099	0.01	0.6989	5.6483	
			Kontrol	3.63681(*)	0.69099	0.004	1.1621	6.1115	
		24. saat	2. saat	-4.86060(*)	0.69099	0	-7.3353	-2.3859	
			6. saat	-4.20995(*)	0.69099	0.001	-6.6847	-1.7352	
			12. saat	-3.17357(*)	0.69099	0.01	-5.6483	-0.6989	
			Kontrol	0.46324	0.69099	1	-2.0115	2.9379	
		Kontrol	2. saat	-5.32384(*)	0.69099	0	-7.7985	-2.8491	
			6. saat	-4.67319(*)	0.69099	0	-7.1479	-2.1985	
			12. saat	-3.63681(*)	0.69099	0.004	-6.1115	-1.1621	
			24. saat	-0.46324	0.69099	1	-2.9379	2.0115	
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	5.32384(*)	0.69099	0	3.3266	7.3211	
		6. saat	Kontrol	4.67319(*)	0.69099	0	2.6759	6.6705	
		12. saat	Kontrol	3.63681(*)	0.69099	0.001	1.6395	5.6341	
		24. saat	Kontrol	0.46324	0.69099	0.902	-1.534	2.4605	
	CS ACT VvLEA1 Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	-3.63815	7.55283	1	-30.6879	23.4116
				12. saat	-20.31279	7.55283	0.227	-47.3625	6.7369
				24. saat	-67.48689(*)	7.55283	0	-94.5366	-40.4372
				Kontrol	1.07689	7.55283	1	-25.9728	28.1266
6. saat		2. saat	3.63815	7.55283	1	-23.4116	30.6879		
		12. saat	-16.67464	7.55283	0.518	-43.7244	10.3751		
		24. saat	-63.84875(*)	7.55283	0	-90.8985	-36.799		

			Kontrol	4.71504	7.55283	1	-22.3347	31.7648
		12. saat	2. saat	20.31279	7.55283	0.227	-6.7369	47.3625
			6. saat	16.67464	7.55283	0.518	-10.3751	43.7244
			24. saat	-47.17411(*)	7.55283	0.001	-74.2238	-20.1244
			Kontrol	21.38968	7.55283	0.178	-5.6601	48.4394
		24. saat	2. saat	67.48689(*)	7.55283	0	40.4372	94.5366
			6. saat	63.84875(*)	7.55283	0	36.799	90.8985
			12. saat	47.17411(*)	7.55283	0.001	20.1244	74.2238
			Kontrol	68.56379(*)	7.55283	0	41.514	95.6135
		Kontrol	2. saat	-1.07689	7.55283	1	-28.1266	25.9728
			6. saat	-4.71504	7.55283	1	-31.7648	22.3347
			12. saat	-21.38968	7.55283	0.178	-48.4394	5.6601
			24. saat	-68.56379(*)	7.55283	0	-95.6135	-41.514
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	1.07689	7.55283	1	-20.7544	22.9082
		6. saat	Kontrol	4.71504	7.55283	0.921	-17.1163	26.5463
		12. saat	Kontrol	21.38968	7.55283	0.055	-0.4416	43.221
		24. saat	Kontrol	68.56379(*)	7.55283	0	46.7325	90.3951
CS ACT VvLEA2 Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	0.72337	6.48362	1	-22.4971	23.9438
			12. saat	-13.2045	6.48362	0.69	-36.425	10.016
			24. saat	-65.10483(*)	6.48362	0	-88.3253	-41.8844
			Kontrol	1.68579	6.48362	1	-21.5347	24.9063
		6. saat	2. saat	-0.72337	6.48362	1	-23.9438	22.4971
			12. saat	-13.92787	6.48362	0.572	-37.1483	9.2926
			24. saat	-65.82821(*)	6.48362	0	-89.0487	-42.6077
			Kontrol	0.96242	6.48362	1	-22.258	24.1829
		12. saat	2. saat	13.2045	6.48362	0.69	-10.016	36.425
			6. saat	13.92787	6.48362	0.572	-9.2926	37.1483
			24. saat	-51.90034(*)	6.48362	0	-75.1208	-28.6799
			Kontrol	14.89029	6.48362	0.445	-8.3302	38.1108
		24. saat	2. saat	65.10483(*)	6.48362	0	41.8844	88.3253
			6. saat	65.82821(*)	6.48362	0	42.6077	89.0487

			12. saat	51.90034(*)	6.48362	0	28.6799	75.1208		
			Kontrol	66.79063(*)	6.48362	0	43.5702	90.0111		
			Kontrol	2. saat	-1.68579	6.48362	1	-24.9063	21.5347	
				6. saat	-0.96242	6.48362	1	-24.1829	22.258	
				12. saat	-14.89029	6.48362	0.445	-38.1108	8.3302	
				24. saat	-66.79063(*)	6.48362	0	-90.0111	-43.5702	
		Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	1.68579	6.48362	0.996	-17.055	20.4266	
			6. saat	Kontrol	0.96242	6.48362	1	-17.7783	19.7032	
			12. saat	Kontrol	14.89029	6.48362	0.13	-3.8505	33.6311	
			24. saat	Kontrol	66.79063(*)	6.48362	0	48.0499	85.5314	
		CS ACT VvDHN1 PEG	Bonferroni	2. saat	6. saat	-5.82676	5.85488	1	-26.7954	15.1419
					12. saat	-5.10628	5.85488	1	-26.075	15.8624
					24. saat	-26.18679(*)	5.85488	0.012	-47.1555	-5.2181
Kontrol	8.50142				5.85488	1	-12.4673	29.4701		
6. saat	2. saat			5.82676	5.85488	1	-15.1419	26.7954		
	12. saat			0.72048	5.85488	1	-20.2482	21.6892		
	24. saat			-20.36003	5.85488	0.059	-41.3287	0.6087		
	Kontrol			14.32818	5.85488	0.344	-6.6405	35.2969		
12. saat	2. saat			5.10628	5.85488	1	-15.8624	26.075		
	6. saat			-0.72048	5.85488	1	-21.6892	20.2482		
	24. saat			-21.08051(*)	5.85488	0.048	-42.0492	-0.1118		
	Kontrol			13.6077	5.85488	0.425	-7.361	34.5764		
24. saat	2. saat			26.18679(*)	5.85488	0.012	5.2181	47.1555		
	6. saat			20.36003	5.85488	0.059	-0.6087	41.3287		
	12. saat			21.08051(*)	5.85488	0.048	0.1118	42.0492		
	Kontrol			34.68821(*)	5.85488	0.001	13.7195	55.6569		
Kontrol	2. saat			-8.50142	5.85488	1	-29.4701	12.4673		
	6. saat			-14.32818	5.85488	0.344	-35.2969	6.6405		
	12. saat			-13.6077	5.85488	0.425	-34.5764	7.361		
	24. saat			-34.68821(*)	5.85488	0.001	-55.6569	-13.7195		
Dunnett t	2. saat			Kontrol	8.50142	5.85488	0.441	-8.422	25.4248	

	(2-sided)(a)	6. saat	Kontrol	14.32818	5.85488	0.103	-2.5952	31.2516	
		12. saat	Kontrol	13.6077	5.85488	0.125	-3.3157	30.5311	
		24. saat	Kontrol	34.68821(*)	5.85488	0.001	17.7648	51.6116	
CS ACT VvDHN2 PEG	Bonferroni	2. saat	6. saat	-32.36865(*)	2.85816	0	-42.6049	-22.1324	
			12. saat	-3.43436	2.85816	1	-13.6706	6.8019	
			24. saat	-36.83643(*)	2.85816	0	-47.0727	-26.6002	
			Kontrol	2.08237	2.85816	1	-8.1539	12.3186	
		6. saat	2. saat	32.36865(*)	2.85816	0	22.1324	42.6049	
			12. saat	28.93429(*)	2.85816	0	18.698	39.1705	
			24. saat	-4.46779	2.85816	1	-14.704	5.7685	
			Kontrol	34.45101(*)	2.85816	0	24.2148	44.6873	
		12. saat	2. saat	3.43436	2.85816	1	-6.8019	13.6706	
			6. saat	-28.93429(*)	2.85816	0	-39.1705	-18.698	
			24. saat	-33.40207(*)	2.85816	0	-43.6383	-23.1658	
			Kontrol	5.51673	2.85816	0.824	-4.7195	15.753	
		24. saat	2. saat	36.83643(*)	2.85816	0	26.6002	47.0727	
			6. saat	4.46779	2.85816	1	-5.7685	14.704	
			12. saat	33.40207(*)	2.85816	0	23.1658	43.6383	
			Kontrol	38.91880(*)	2.85816	0	28.6825	49.155	
	Kontrol	2. saat	-2.08237	2.85816	1	-12.3186	8.1539		
		6. saat	-34.45101(*)	2.85816	0	-44.6873	-24.2148		
		12. saat	-5.51673	2.85816	0.824	-15.753	4.7195		
		24. saat	-38.91880(*)	2.85816	0	-49.155	-28.6825		
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	2.08237	2.85816	0.875	-6.1791	10.3438	
		6. saat	Kontrol	34.45101(*)	2.85816	0	26.1895	42.7125	
		12. saat	Kontrol	5.51673	2.85816	0.228	-2.7447	13.7782	
		24. saat	Kontrol	38.91880(*)	2.85816	0	30.6573	47.1803	
	CS ACT VvLEA1 Peg	Bonferroni	2. saat	6. saat	-105.27803(*)	10.7612	0	-143.8183	-66.7378
				12. saat	-20.86061	10.7612	0.813	-59.4008	17.6796
				24. saat	1.01228	10.7612	1	-37.528	39.5525
				Kontrol	0.42223	10.7612	1	-38.118	38.9625

		6. saat	2. saat	105.27803(*)	10.7612	0	66.7378	143.8183
			12. saat	84.41741(*)	10.7612	0	45.8772	122.9576
			24. saat	106.29030(*)	10.7612	0	67.7501	144.8305
			Kontrol	105.70025(*)	10.7612	0	67.16	144.2405
		12. saat	2. saat	20.86061	10.7612	0.813	-17.6796	59.4008
			6. saat	-84.41741(*)	10.7612	0	-122.9576	-45.8772
			24. saat	21.87289	10.7612	0.695	-16.6673	60.4131
			Kontrol	21.28284	10.7612	0.762	-17.2574	59.8231
		24. saat	2. saat	-1.01228	10.7612	1	-39.5525	37.528
			6. saat	-106.29030(*)	10.7612	0	-144.8305	-67.7501
			12. saat	-21.87289	10.7612	0.695	-60.4131	16.6673
			Kontrol	-0.59005	10.7612	1	-39.1303	37.9502
		Kontrol	2. saat	-0.42223	10.7612	1	-38.9625	38.118
			6. saat	-105.70025(*)	10.7612	0	-144.2405	-67.16
			12. saat	-21.28284	10.7612	0.762	-59.8231	17.2574
			24. saat	0.59005	10.7612	1	-37.9502	39.1303
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	0.42223	10.7612	1	-30.6828	31.5273
		6. saat	Kontrol	105.70025(*)	10.7612	0	74.5952	136.8053
		12. saat	Kontrol	21.28284	10.7612	0.213	-9.8222	52.3879
		24. saat	Kontrol	-0.59005	10.7612	1	-31.6951	30.515
CS ACT VvLEA2 Peg	Bonferroni	2. saat	6. saat	-162.13130(*)	20.20329	0	-234.4875	-89.7751
			12. saat	-28.24083	20.20329	1	-100.597	44.1154
			24. saat	1.83534	20.20329	1	-70.5209	74.1915
			Kontrol	0.9958	20.20329	1	-71.3604	73.352
		6. saat	2. saat	162.13130(*)	20.20329	0	89.7751	234.4875
			12. saat	133.89047(*)	20.20329	0.001	61.5343	206.2467
			24. saat	163.96664(*)	20.20329	0	91.6104	236.3228
			Kontrol	163.12710(*)	20.20329	0	90.7709	235.4833
		12. saat	2. saat	28.24083	20.20329	1	-44.1154	100.597
			6. saat	-133.89047(*)	20.20329	0.001	-206.2467	-61.5343
			24. saat	30.07617	20.20329	1	-42.28	102.4324

			Kontrol	29.23664	20.20329	1	-43.1196	101.5928	
		24. saat	2. saat	-1.83534	20.20329	1	-74.1915	70.5209	
			6. saat	-163.96664(*)	20.20329	0	-236.3228	-91.6104	
			12. saat	-30.07617	20.20329	1	-102.4324	42.28	
			Kontrol	-0.83954	20.20329	1	-73.1957	71.5167	
		Kontrol	2. saat	-0.9958	20.20329	1	-73.352	71.3604	
			6. saat	-163.12710(*)	20.20329	0	-235.4833	-90.7709	
			12. saat	-29.23664	20.20329	1	-101.5928	43.1196	
			24. saat	0.83954	20.20329	1	-71.5167	73.1957	
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	0.9958	20.20329	1	-57.4014	59.393	
			6. saat	Kontrol	163.12710(*)	20.20329	0	104.7299	221.5243
			12. saat	Kontrol	29.23664	20.20329	0.443	-29.1606	87.6338
			24. saat	Kontrol	-0.83954	20.20329	1	-59.2367	57.5577
1616 C ACT VvDHN1Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	-20.18882	111.34543	1	-418.962	378.5844	
			12. saat	-1335.82988(*)	111.34543	0	-1734.6031	-937.0567	
			24. saat	-95.47945	111.34543	1	-494.2527	303.2938	
			Kontrol	2.17264	111.34543	1	-396.6006	400.9458	
		6. saat	2. saat	20.18882	111.34543	1	-378.5844	418.962	
			12. saat	-1315.64106(*)	111.34543	0	-1714.4143	-916.8679	
			24. saat	-75.29063	111.34543	1	-474.0638	323.4826	
			Kontrol	22.36146	111.34543	1	-376.4117	421.1347	
		12. saat	2. saat	1335.82988(*)	111.34543	0	937.0567	1734.6031	
			6. saat	1315.64106(*)	111.34543	0	916.8679	1714.4143	
			24. saat	1240.35043(*)	111.34543	0	841.5772	1639.1236	
			Kontrol	1338.00251(*)	111.34543	0	939.2293	1736.7757	
		24. saat	2. saat	95.47945	111.34543	1	-303.2938	494.2527	
			6. saat	75.29063	111.34543	1	-323.4826	474.0638	
			12. saat	-1240.35043(*)	111.34543	0	-1639.1236	-841.5772	
			Kontrol	97.65209	111.34543	1	-301.1211	496.4253	
		Kontrol	2. saat	-2.17264	111.34543	1	-400.9458	396.6006	

			6. saat	-22.36146	111.34543	1	-421.1347	376.4117		
			12. saat	-1338.00251(*)	111.34543	0	-1736.7757	-939.2293		
			24. saat	-97.65209	111.34543	1	-496.4253	301.1211		
			Kontrol							
	Dunnett t (2-sided)(a)			2. saat	Kontrol	2.17264	111.34543	1	-319.6691	324.0144
				6. saat	Kontrol	22.36146	111.34543	0.999	-299.4803	344.2032
				12. saat	Kontrol	1338.00251(*)	111.34543	0	1016.1608	1659.8443
				24. saat	Kontrol	97.65209	111.34543	0.794	-224.1897	419.4938
	1616 C ACT VvDHN2Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	28.23553	19.22071	1	-40.6016	97.0727	
				12. saat	-147.00285(*)	19.22071	0	-215.84	-78.1657	
				24. saat	-10.78635	19.22071	1	-79.6235	58.0508	
				Kontrol	31.91827	19.22071	1	-36.9189	100.7554	
			6. saat	2. saat	-28.23553	19.22071	1	-97.0727	40.6016	
12. saat				-175.23838(*)	19.22071	0	-244.0755	-106.4012		
24. saat				-39.02187	19.22071	0.698	-107.859	29.8153		
Kontrol				3.68274	19.22071	1	-65.1544	72.5199		
12. saat			2. saat	147.00285(*)	19.22071	0	78.1657	215.84		
			6. saat	175.23838(*)	19.22071	0	106.4012	244.0755		
			24. saat	136.21651(*)	19.22071	0	67.3793	205.0537		
			Kontrol	178.92112(*)	19.22071	0	110.084	247.7583		
24. saat		2. saat	10.78635	19.22071	1	-58.0508	79.6235			
		6. saat	39.02187	19.22071	0.698	-29.8153	107.859			
		12. saat	-136.21651(*)	19.22071	0	-205.0537	-67.3793			
		Kontrol	42.70461	19.22071	0.505	-26.1325	111.5418			
Kontrol		2. saat	-31.91827	19.22071	1	-100.7554	36.9189			
		6. saat	-3.68274	19.22071	1	-72.5199	65.1544			
		12. saat	-178.92112(*)	19.22071	0	-247.7583	-110.084			
		24. saat	-42.70461	19.22071	0.505	-111.5418	26.1325			
Dunnett t (2-sided)(a)				2. saat	Kontrol	31.91827	19.22071	0.335	-23.6388	87.4753
				6. saat	Kontrol	3.68274	19.22071	0.999	-51.8743	59.2398
				12. saat	Kontrol	178.92112(*)	19.22071	0	123.364	234.4782

		24. saat	Kontrol	42.70461	19.22071	0.146	-12.8525	98.2617	
1616 C ACT VvLEA1Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	-7.31831(*)	0.76243	0	-10.0489	-4.5877	
			12. saat	-0.77437	0.76243	1	-3.505	1.9562	
			24. saat	-8.42432(*)	0.76243	0	-11.1549	-5.6937	
			Kontrol	0.42074	0.76243	1	-2.3098	3.1513	
		6. saat	2. saat	7.31831(*)	0.76243	0	4.5877	10.0489	
			12. saat	6.54394(*)	0.76243	0	3.8134	9.2745	
			24. saat	-1.10601	0.76243	1	-3.8366	1.6246	
			Kontrol	7.73905(*)	0.76243	0	5.0085	10.4696	
		12. saat	2. saat	0.77437	0.76243	1	-1.9562	3.505	
			6. saat	-6.54394(*)	0.76243	0	-9.2745	-3.8134	
			24. saat	-7.64996(*)	0.76243	0	-10.3805	-4.9194	
			Kontrol	1.1951	0.76243	1	-1.5355	3.9257	
		24. saat	2. saat	8.42432(*)	0.76243	0	5.6937	11.1549	
			6. saat	1.10601	0.76243	1	-1.6246	3.8366	
			12. saat	7.64996(*)	0.76243	0	4.9194	10.3805	
			Kontrol	8.84506(*)	0.76243	0	6.1145	11.5756	
	Kontrol	2. saat	-0.42074	0.76243	1	-3.1513	2.3098		
		6. saat	-7.73905(*)	0.76243	0	-10.4696	-5.0085		
		12. saat	-1.1951	0.76243	1	-3.9257	1.5355		
		24. saat	-8.84506(*)	0.76243	0	-11.5756	-6.1145		
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	0.42074	0.76243	0.947	-1.7831	2.6245	
		6. saat	Kontrol	7.73905(*)	0.76243	0	5.5352	9.9428	
		12. saat	Kontrol	1.1951	0.76243	0.38	-1.0087	3.3989	
		24. saat	Kontrol	8.84506(*)	0.76243	0	6.6413	11.0489	
	1616 C ACT VvLEA2 Tuz	Bonferroni	2. saat	6. saat	-18.30192	1280.5975	1	-4604.6417	4568.0378
				12. saat	-8983.38053(*)	1280.5975	0	-13569.72	-4397.0408
				24. saat	-95.10576	1280.5975	1	-4681.4455	4491.234
				Kontrol	0.97322	1280.5975	1	-4585.3665	4587.313
6. saat		2. saat	18.30192	1280.5975	1	-4568.0378	4604.6417		

			12. saat	-8965.07861(*)	1280.5975	0	-13551.418	-4378.7389	
			24. saat	-76.80385	1280.5975	1	-4663.1436	4509.5359	
			Kontrol	19.27513	1280.5975	1	-4567.0646	4605.6149	
		12. saat	2. saat	8983.38053(*)	1280.5975	0	4397.0408	13569.72	
			6. saat	8965.07861(*)	1280.5975	0	4378.7389	13551.418	
			24. saat	8888.27476(*)	1280.5975	0	4301.935	13474.615	
			Kontrol	8984.35375(*)	1280.5975	0	4398.014	13570.694	
		24. saat	2. saat	95.10576	1280.5975	1	-4491.234	4681.4455	
			6. saat	76.80385	1280.5975	1	-4509.5359	4663.1436	
			12. saat	-8888.27476(*)	1280.5975	0	-13474.615	-4301.935	
			Kontrol	96.07898	1280.5975	1	-4490.2608	4682.4187	
		Kontrol	2. saat	-0.97322	1280.5975	1	-4587.313	4585.3665	
			6. saat	-19.27513	1280.5975	1	-4605.6149	4567.0646	
			12. saat	-8984.35375(*)	1280.5975	0	-13570.694	-4398.014	
			24. saat	-96.07898	1280.5975	1	-4682.4187	4490.2608	
		Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	0.97322	1280.5975	1	-3700.5685	3702.5149
	6. saat		Kontrol	19.27513	1280.5975	1	-3682.2665	3720.8168	
	12. saat		Kontrol	8984.35375(*)	1280.5975	0	5282.8121	12685.895	
	24. saat		Kontrol	96.07898	1280.5975	1	-3605.4627	3797.6207	
	1616 C ACT VvDHN1 Peg	Bonferroni	2. saat	6. saat	19.62884(*)	2.85123	0	9.4174	29.8403
				12. saat	14.35280(*)	2.85123	0.005	4.1414	24.5642
				24. saat	13.88385(*)	2.85123	0.007	3.6724	24.0953
				Kontrol	18.67116(*)	2.85123	0.001	8.4597	28.8826
			6. saat	2. saat	-19.62884(*)	2.85123	0	-29.8403	-9.4174
				12. saat	-5.27604	2.85123	0.94	-15.4875	4.9354
				24. saat	-5.74499	2.85123	0.716	-15.9564	4.4664
				Kontrol	-0.95768	2.85123	1	-11.1691	9.2537
			12. saat	2. saat	-14.35280(*)	2.85123	0.005	-24.5642	-4.1414
6. saat				5.27604	2.85123	0.94	-4.9354	15.4875	
24. saat				-0.46895	2.85123	1	-10.6804	9.7425	

			Kontrol	4.31835	2.85123	1	-5.8931	14.5298	
		24. saat	2. saat	-13.88385(*)	2.85123	0.007	-24.0953	-3.6724	
			6. saat	5.74499	2.85123	0.716	-4.4664	15.9564	
			12. saat	0.46895	2.85123	1	-9.7425	10.6804	
			Kontrol	4.7873	2.85123	1	-5.4241	14.9987	
		Kontrol	2. saat	-18.67116(*)	2.85123	0.001	-28.8826	-8.4597	
			6. saat	0.95768	2.85123	1	-9.2537	11.1691	
			12. saat	-4.31835	2.85123	1	-14.5298	5.8931	
			24. saat	-4.7873	2.85123	1	-14.9987	5.4241	
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	18.67116(*)	2.85123	0	10.4297	26.9126	
			6. saat	Kontrol	-0.95768	2.85123	0.991	-9.1991	7.2837
			12. saat	Kontrol	4.31835	2.85123	0.407	-3.9231	12.5598
			24. saat	Kontrol	4.7873	2.85123	0.327	-3.4541	13.0287
1616 C ACT VvDHN2 Peg	Bonferroni	2. saat	6. saat	11.89656(*)	1.14331	0	7.8019	15.9912	
			12. saat	1.68997	1.14331	1	-2.4047	5.7846	
			24. saat	11.56941(*)	1.14331	0	7.4747	15.6641	
			kontrol	10.90201(*)	1.14331	0	6.8073	14.9967	
		6. saat	2. saat	-11.89656(*)	1.14331	0	-15.9912	-7.8019	
			12. saat	-10.20659(*)	1.14331	0	-14.3013	-6.1119	
			24. saat	-0.32715	1.14331	1	-4.4218	3.7675	
			Kontrol	-0.99455	1.14331	1	-5.0892	3.1001	
		12. saat	2. saat	-1.68997	1.14331	1	-5.7846	2.4047	
			6. saat	10.20659(*)	1.14331	0	6.1119	14.3013	
			24. saat	9.87944(*)	1.14331	0	5.7848	13.9741	
			Kontrol	9.21204(*)	1.14331	0	5.1174	13.3067	
		24. saat	2. saat	-11.56941(*)	1.14331	0	-15.6641	-7.4747	
			6. saat	0.32715	1.14331	1	-3.7675	4.4218	
			12. saat	-9.87944(*)	1.14331	0	-13.9741	-5.7848	
			Kontrol	-0.6674	1.14331	1	-4.7621	3.4273	
		Kontrol	2. saat	-10.90201(*)	1.14331	0	-14.9967	-6.8073	
			6. saat	0.99455	1.14331	1	-3.1001	5.0892	

			12. saat	-9.21204(*)	1.14331	0	-13.3067	-5.1174		
			24. saat	0.6674	1.14331	1	-3.4273	4.7621		
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	10.90201(*)	1.14331	0	7.5973	14.2067		
		6. saat	Kontrol	-0.99455	1.14331	0.798	-4.2993	2.3102		
		12. saat	Kontrol	9.21204(*)	1.14331	0	5.9073	12.5168		
		24. saat	Kontrol	-0.6674	1.14331	0.936	-3.9721	2.6373		
1616 C ACT VvLEA1 Peg	Bonferroni	2. saat	6. saat	-10.07005	49.73939	1	-188.207	168.0669		
			12. saat	-438.75069(*)	49.73939	0	-616.8877	-260.6137		
			24. saat	-24.40226	49.73939	1	-202.5392	153.7347		
			Kontrol	1.79329	49.73939	1	-176.3437	179.9303		
		6. saat	2. saat	10.07005	49.73939	1	-168.0669	188.207		
			12. saat	-428.68064(*)	49.73939	0	-606.8176	-250.5437		
			24. saat	-14.33221	49.73939	1	-192.4692	163.8048		
			Kontrol	11.86334	49.73939	1	-166.2736	190.0003		
		12. saat	2. saat	438.75069(*)	49.73939	0	260.6137	616.8877		
			6. saat	428.68064(*)	49.73939	0	250.5437	606.8176		
			24. saat	414.34843(*)	49.73939	0	236.2115	592.4854		
			Kontrol	440.54398(*)	49.73939	0	262.407	618.681		
		24. saat	2. saat	24.40226	49.73939	1	-153.7347	202.5392		
			6. saat	14.33221	49.73939	1	-163.8048	192.4692		
			12. saat	-414.34843(*)	49.73939	0	-592.4854	-236.2115		
			Kontrol	26.19555	49.73939	1	-151.9414	204.3325		
		Kontrol	2. saat	-1.79329	49.73939	1	-179.9303	176.3437		
			6. saat	-11.86334	49.73939	1	-190.0003	166.2736		
			12. saat	-440.54398(*)	49.73939	0	-618.681	-262.407		
			24. saat	-26.19555	49.73939	1	-204.3325	151.9414		
		Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	1.79329	49.73939	1	-141.9774	145.564	
			6. saat	Kontrol	11.86334	49.73939	0.997	-131.9074	155.6341	
			12. saat	Kontrol	440.54398(*)	49.73939	0	296.7733	584.3147	
			24. saat	Kontrol	26.19555	49.73939	0.954	-117.5752	169.9663	
		1616 C ACT	Bonferroni	2. saat	6. saat	61.30671(*)	16.93427	0.047	0.6582	121.9552

VvLEA2 Peg							
		12. saat	-194.37133(*)	16.93427	0	-255.0198	-133.7228
		24. saat	46.31177	16.93427	0.21	-14.3367	106.9603
		Kontrol	60.33438	16.93427	0.052	-0.3141	120.9829
	6. saat	2. saat	-61.30671(*)	16.93427	0.047	-121.9552	-0.6582
		12. saat	-255.67804(*)	16.93427	0	-316.3265	-195.0295
		24. saat	-14.99493	16.93427	1	-75.6434	45.6536
		Kontrol	-0.97233	16.93427	1	-61.6208	59.6762
	12. saat	2. saat	194.37133(*)	16.93427	0	133.7228	255.0198
		6. saat	255.67804(*)	16.93427	0	195.0295	316.3265
		24. saat	240.68310(*)	16.93427	0	180.0346	301.3316
		Kontrol	254.70571(*)	16.93427	0	194.0572	315.3542
	24. saat	2. saat	-46.31177	16.93427	0.21	-106.9603	14.3367
		6. saat	14.99493	16.93427	1	-45.6536	75.6434
		12. saat	-240.68310(*)	16.93427	0	-301.3316	-180.0346
		Kontrol	14.02261	16.93427	1	-46.6259	74.6711
	Kontrol	2. saat	-60.33438	16.93427	0.052	-120.9829	0.3141
		6. saat	0.97233	16.93427	1	-59.6762	61.6208
		12. saat	-254.70571(*)	16.93427	0	-315.3542	-194.0572
		24. saat	-14.02261	16.93427	1	-74.6711	46.6259
	Dunnett t (2-sided)(a)	2. saat	Kontrol	60.33438(*)	16.93427	0.017	11.3862
6. saat		Kontrol	-0.97233	16.93427	1	-49.9205	47.9758
12. saat		Kontrol	254.70571(*)	16.93427	0	205.7575	303.6539
24. saat		Kontrol	14.02261	16.93427	0.822	-34.9256	62.9708
* The mean difference is significant at the .05 level.							
a Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.							

EK 2: CS çeşidinde ACT, VvDHN1, VvDHN2, VvLEA1 ve VvLEA2 bölgelerine ait Ct değerleri

Deneme Deseni	ACT Ct değerleri	VvDHN1 Ct değerleri	VvDHN2 Ct değerleri	VvLEA1 Ct değerleri	VvLEA2 Ct değerleri
CS Tuz 2. saat	24.94	25.83	26.52	29.19	27.40
CS Tuz 2. saat	24.58	25.79	26.41	29.09	27.01
CS Tuz 2. saat	24.95	25.7	26.91	29.47	27.82
CS PEG 2. saat	24.66	25.12	27.37	29.84	27.8
CS PEG 2. saat	24.24	25.21	27.4	29.33	27.18
CS PEG 2. saat	24.94	25.1	27.55	29.7	27.89
PEG -Tuz 2. saat kontrol	22.89	26.72	27.13	28.31	26.89
PEG -Tuz 2. saat kontrol	22.85	26.19	27.51	28.04	26.8
PEG -Tuz 2. saat kontrol	22.79	26.65	27.22	28.56	26.85
CS Tuz 6. saat	24.41	27.8	26.26	27.7	27.17
CS Tuz 6. saat	24.61	27.51	26.49	27.29	27.64
CS Tuz 6. saat	24.21	27.27	26.53	27.29	27.54
CS PEG 6. saat	27.78	27.18	27.2	26.45	24.98
CS PEG 6. saat	27.82	27.72	27.1	26.84	24.37

CS PEG 6. saat	27.71	27.76	27.11	26.44	24.07
PEG -Tuz 6. saat kontrol	22.90	26.66	27.19	28.30	26.83
PEG -Tuz 6. saat kontrol	22.80	26.25	27.50	28.10	26.78
PEG -Tuz 6. saat kontrol	22.76	26.59	27.26	28.58	26.86
CS Tuz 12. saat	26.44	27.29	28.14	27.15	26.07
CS Tuz 12. saat	26.24	27.46	28.96	27.44	26.29
CS Tuz 12. saat	26.2	27.53	28.6	27.38	26.46
CS PEG 12. saat	25.43	25.46	27.78	26.39	24.91
CS PEG 12. saat	25.46	25.92	27.01	26.4	24.54
CS PEG 12. saat	25.79	25.1	27.43	26.93	24.52
PEG -Tuz 12. saat kontrol	22.92	26.58	27.16	28.34	26.80
PEG -Tuz 12. saat kontrol	22.88	26.40	27.54	28.07	26.75
PEG -Tuz 12. saat kontrol	22.76	26.60	27.25	28.59	26.88
CS Tuz 24. saat	28.35	32.12	32.07	27.72	26.05
CS Tuz 24. saat	28.64	32.21	32.3	27.62	26.47
CS Tuz 24. saat	28.05	32.18	32.67	27.9	26.39
CS PEG 24. saat	21.65	20.96	20.96	28.57	28.52
CS PEG 24. saat	21.84	20.24	20.97	28.63	28.15

CS PEG 24. saat	21.92	20.04	20.99	28.53	28.71
PEG -Tuz 24. saat kontrol	22.78	26.58	27.30	28.25	26.90
PEG -Tuz 24. saat kontrol	22.89	26.49	27.35	28.36	26.79
PEG -Tuz 24. saat kontrol	22.80	26.50	27.28	28.30	26.80

EK 3: 1616 C anacında ACT, VvDHN1, VvDHN2, VvLEA1 ve VvLEA2 bölgelerine ait Ct değerleri

Deneme Deseni	ACT Ct değerleri	VvDHN1 Ct değerleri	VvDHN2 Ct değerleri	VvLEA1 Ct değerleri	VvLEA2 Ct değerleri
CS Tuz 2. saat	27.02	29.91	24.68	30.8	33.22
CS Tuz 2. saat	27.85	29.62	24.93	30.5	33.46
CS Tuz 2. saat	27.27	29.92	24.48	30.6	33.68
CS PEG 2. saat	23.19	23.25	22.04	25.98	24.95
CS PEG 2. saat	23.49	23.49	22.19	25.56	24.52
CS PEG 2. saat	23.86	23.32	22.55	25.76	24.51
PEG -Tuz 2. saat kontrol	28.82	32.97	30.97	32.19	35.21
PEG -Tuz 2. saat kontrol	28.4	32.18	30.97	32.15	35.73
PEG -Tuz 2. saat kontrol	28.65	32.93	30.83	32.43	35.63
CS Tuz 6. saat	25.07	24.86	25.06	25.62	27.7
CS Tuz 6. saat	25.49	24.54	25.25	25.79	27.91
CS Tuz 6. saat	25.19	24.94	25.72	25.88	27.82
CS PEG 6. saat	22.78	31.12	32.82	22.2	34.83
CS PEG 6. saat	22.66	31.78	32.38	22.98	34.72

CS PEG 6. saat	22.63	31.15	32.3	22.96	34.74
PEG -Tuz 6. saat kontrol	28.63	32.75	30.90	32.30	35.55
PEG -Tuz 6. saat kontrol	28.65	32.62	30.97	32.25	35.57
PEG -Tuz 6. saat kontrol	28.60	32.65	30.85	32.23	35.45
CS Tuz 12. saat	29.46	23.18	24.76	32.18	23.8
CS Tuz 12. saat	29.81	23.71	24.13	32.74	23.7
CS Tuz 12. saat	29.95	23.42	24.83	32.07	23.27
CS PEG 12. saat	28.52	30.62	27.44	23.99	27.82
CS PEG 12. saat	28.71	30.24	27.91	23.42	27.37
CS PEG 12. saat	28.9	30.28	27.64	23.46	27.72
PEG -Tuz 12. saat kontrol	28.61	32.80	30.99	32.37	35.70
PEG -Tuz 12. saat kontrol	28.73	32.60	30.93	32.18	35.40
PEG -Tuz 12. saat kontrol	28.53	32.64	30.81	32.28	35.52
CS Tuz 24. saat	28.59	25.7	25.17	28.71	28.72
CS Tuz 24. saat	28	25.57	25.18	28.5	28.47
CS Tuz 24. saat	28.28	25.95	25.1	28.71	28.6
CS PEG 24. saat	23.75	25.03	27.91	22.65	26.83
CS PEG 24. saat	23.91	25.34	27.49	22.67	26.42

CS PEG 24. saat	23.1	25.04	27.14	22.08	26.69
PEG -Tuz 24. saat kontrol	28.80	32.82	30.95	32.44	35.72
PEG -Tuz 24. saat kontrol	28.50	32.60	30.88	32.18	35.40
PEG -Tuz 24. saat kontrol	28.60	32.65	30.97	32.20	35.48

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mohammed EBRAHİME

Doğum Yeri: Ayssaita

Doğum Tarihi: 11-09-1985

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: Türkçe ve İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Mohammed Hanfere Secondary School (Fen Bölümü)

Lisans: Jimma University, College of Agriculture and Veterinary Medicine (Bahçe Bitkileri Bölümü)

İş Tecrübesi

Kurumu:	Görevi:	Yılları:
Nemalefena Tendaho Project	Agricultural Expert	2007
Wagningeingen Üniversitesi (Holanda)	Staj	2013
Samara Üniversitesi (Etiyopya)	Öğretim üyesi	2007-

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler: Özlem Bilir, Sebahattin Özcan, Ali Ergül, Vahdettin Çiftiçi, **Mohammed Ebrahime** Bingöl İli Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin SSR DNA Belirteçleriyle Genetik Karakterizasyonu. 10. Türkiye Tarla Bitkiler Kongresi.,Konya, Türkiye, Eylül, 2013.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR