



**ER-(ENDOPLAZMİK RETİKULUM)
STRES SİNYAL YOLAĞINDAKİ BAZI
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ GENLERİNİN
YONCA (*Medicago sativa* L.)'DA İFADE ANALİZİ**

Muhammet Çağrı OĞUZ

Yüksek Lisans Tezi

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Ahmet Metin KUMLAY

2017

Her hakkı saklıdır

İĞDIR ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ER-(ENDOPLAZMİK RETİKULUM) STRES SİNYAL YOLAĞINDAKİ BAZI
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ GENLERİNİN YONCA (*Medicago sativa*
L.)'DA İFADE ANALİZİ**

Muhammet Çağrı OĞUZ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

İĞDIR

2017

Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Ahmet Metin KUMLAY danışmanlığında Muhammet Çağrı OĞUZ tarafından hazırlanan bu çalışma 16/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Bünyamin YILDIRIM

İmza:

Üye: Doç. Dr. Ahmet Metin KUMLAY

İmza:

Üye: Yrd.Doç.Dr Igor KRYVORUCHKO

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun / /2017 tarih ve 2017/ sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Doç. Dr. Süleyman TEMEL

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Muhammet Çağrı OĞUZ



Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

ER-(ENDOPLAZMİK RETİKULUM) STRES SİNYAL YOLAĞINDAKİ BAZI TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ GENLERİNİN YONCA (*Medicago sativa* L.)’DA İFADE ANALİZİ

OĞUZ, Muhammet Çağrı

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ahmet Metin KUMLAY

Ağustos 2017, 57 sayfa

Büyük verim kayıplarına neden olan biyotik ve abiyotik stres koşullarına yönelik bitkinin stresi algılaması ve strese karşı tolerans sağlaması verim kayıplarının önüne geçilebilmesi için hayati önem taşımaktadır. Stres toleransında rol oynayan genlerin belirlenmesi stres yolaklarının aydınlatılmasında büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, stres faktörleri içeren ortamlarda (DTT ve PEG) yetiştirilen bitkilerin yapraklarındaki su potansiyelleri ölçülerek, bitki için kritik zaman aralıkları fizyolojik ön bulgu olarak elde edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında, Nimet yonca çeşidinde, yapay endoplazmik retikulum stresi oluşturan DTT ve kuraklık stresi (PEG) uygulamalarında, ER stres yolağında görev alan bZIP60 ve bZIP28 genlerinin ifade analizleri Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda, DTT’nin ER stres yolaklarında görevli bu iki genin işlevini azalttığı belirlenmiştir. Kuraklık (PEG) uygulamalarında bitkiler için en kritik saatin 8. saat olduğu ve bZIP60’ın yaprak dokusunda ifadesini diğer uygulamalara göre daha fazla artırdığı (yaklaşık 42 kat) belirlenmiştir. Ayrıca bu bulgular, kullanılan iki gen bölgesinden, özellikle bZIP60’ın bZIP28’e göre stres yolağında daha etkin rol aldığı; yaprak dokusunun kök dokusuna göre stresten daha fazla etkilendiği bulgusuna varılmıştır.

Araştırma, yoncada ER stres mekanizmasında görev alan genlerin ifadesine yönelik ilk çalışma olup, ER stres mekanizmasına yönelik gelecekte yapılacak çalışmalara da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: ER stresi, Transkripsiyon faktörleri ifadesi, Yonca stres mekanizması.

ABSTRACT

EXPRESSION ANALYSIS OF SOME TRANSCRIPTION-FACTOR GENES RELATED TO ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS SIGNALING PATHWAY IN ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

OĞUZ, Muhammet Çağrı

MSc Thesis, Department of Field Crops

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet Metin KUMLAY

August 2017, 57 pages

Perception of biotic and abiotic stress conditions in plants and to provide tolerance carries a crucial importance in prevention of huge yield losses. Identification of genes playing a role in stress tolerance has a great importance in elucidation of stress pathways.

In this study, the water potentials of the leaves of the plants grown under stress factors (DTT and PEG) were measured and the critical time intervals for the plant were obtained as physiological preliminary findings. Expression analysis of bZIP60 and bZIP28 genes involved at ER stress pathways were evaluated by RT-PCR assay at determined intervals of time, (in alfalfa cultivar Nimet) under the artificial ER stress implemented by DTT and drought stress (PEG). According to the results, it was determined that DTT reduced the function of these two genes involved in ER stress pathways. It was determined that the most critical time for plants in drought (PEG) tolerance was 8 hours after treatment, in which the expression of bZIP60 in leaves was increased more than other applications (about 42 times). Furthermore, according to the findings, of the two studied gene regions bZIP60 have a more active role in the stress pathways than bZIP28; and the leaf tissues were more affected than the root tissues under the stress conditions.

This study is the first research on alfalfa expression of genes involved in ER stress mechanisms and it is thought that it will contribute to the future studies on ER stress mechanism.

Key words: ER stress, Transcription factors expression, Alfalfa stress mechanism

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bitkilerde büyük verim kayıplarına sebep olan biyotik ve abiyotik stres koşullarına toleransın/dayanıklılığın artırılması büyük önem taşımaktadır. Stres koşullarına dayanıklılıkta rol alan mekanizmaların belirlenmesi; strese toleransın artırılmasında, dayanıklı çeşit geliştirilmesinde, dayanıklı transgenik bitki elde edilmesinde, genetik düzeyde spesifik seleksiyona imkan sağlayacaktır. Endoplazmik retikulum (ER), bitkinin bağışıklık sistemini kontrol eden mekanizmadır ve stres durumunda bitkinin hızlı ve etkili bağışıklık tepkisi vermesi için hayati önem taşımaktadır. Kuraklık stresi koşullarında ER stres mekanizmasında rol alan yolakların, belirli zaman aralıklarında gen ifadeleri belirlenmiştir. Yoncada ER stres mekanizmasında görev alan genlerin ifadesine, strese toleransın artırılmasına, yeni çeşit ıslahına, moleküler düzeyde genetik tanımlamalara, transgenik bitki elde edilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülen veriler elde edilmiştir.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini eksik etmeyen ve başarılarıma ön ayak olan, her konuda ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim değerli hocam sayın Doç. Dr. Ahmet Metin KUMLAY'a ve yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Bünyamin YILDIRIM'a içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik gelişimim ve tez çalışmalarım sırasında her türlü olanağından faydalandığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne; tez konusunun belirlenmesinden, tez çalışmamın sonuna kadar tüm aşamalarda beni yönlendiren, özverili katkısı ve bilimsel düşüncesi ile tez çalışmamın sonlandırılmasında büyük payı olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL'e en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tüm laboratuvar ve analiz çalışmalarımında bilgisinden ve tecrübesinden faydalandığım Dr. Canan YÜKSEL ve Uzm. Bio. Umut KİBAR'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen babam Muhsin OĞUZ, annem Necla OĞUZ, kardeşlerim Büşra ve Melik Ahmet OĞUZ ile sevgili eşim Ezgi OĞUZ'a bana inandıkları ve güvendikleri için teşekkür ederim.

Muhammet Çağrı OĞUZ

Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Bitkilerde Kuraklık Stresi ve Etkileri.....	4
2.2. Bitkilerdeki ER (Endoplazmik Retikulum) Stresi ve Sinyalizasyon Yolakları	5
2.3. ER Katlanmamış Protein Cevabı (UPR: Unfolded Protein Response)	6
2.3.1. ER stres sensörü IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1)	7
2.3.2. bZIP28 ve bZIP17 ER stres yolağı	9
2.4. Kuraklık Stresi Koşullarında Gen İfadesinin Belirlenmesi	12
2.5. Real Time PCR.....	12
2.5.1. Real Time PCR çalışmalarında kontrol (housekeeping) genleri	15
2.5.2. Real Time PCR çalışmalarında erime eğrisi (melting curve).....	16
3. MATERYAL ve METOT	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Metot	17
3.2.1. Bitkilerin stres ortamlarına aktarılması	18
3.2.2. Stres denemeleri.....	19
3.2.3. Bitkideki osmotik su potansiyeli ölçümü	20
3.2.4. RNA izolasyonu.....	21
3.2.5. Real Time PCR uygulamaları	21
3.2.6. Kullanılan primerler	22
3.2.7. cDNA sentezi.....	22
3.2.8. Standart eğri.....	23

3.2.9. Örneklerin alete yüklenmesi	25
3.2.10. Verilerin değerlendirilmesi	26
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	27
4.1. Stres Uygulamaları	27
4.1.1. Kuraklık ve DTT stresi uygulamaları, MPa ve osmometre sonuçları	27
4.2. Nükleik Asit İzolasyonu	30
4.2.1. RNA izolasyonu, miktar ve kalite tayini	30
4.3. Real Time PCR Analizleri	33
4.3.1. cDNA sentezi	33
4.3.2. Standart eğri (standart curve)	34
4.3.3. Gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri	35
4.3.4. Erime eğrisi (melting curve)	42
4.3.5. Real Time PCR normalize verilerinin relatif ifade analizleri	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$2^{-\Delta\Delta CT}$	qPCR Analiz Metodu
B	Bor
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Kalsiyum Nitrat Tetrahidrat
Ca	Sitrik Asit
Ca^{2+}	Kalsiyum (iyonize)
C_T	Döngü Eşiği
Cu	Bakır
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Bakır (II) Sülfat Pentahidrat
Fe	Demir
H_3BO_3	Borik Asit
$HO(C_2H_4O)_nH$	Polietilen Glikol
K	Potasyum
K_2SO_4	Potasyum Sülfat
KCl	Potasyum Klorür
$KHPO_4$	Monopotasyum Fosfat
M	Molarite
Mg	Magnezyum
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum Sülfat Heptahidrat
mM	Milimolar
Mn	Mangan
$MnSO_4$	Mangan (II) Sülfat
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Amonyum Molibdat Tetrahidrat
NH_4	Amonyum
NO_3	Nitrat
$^{\circ}C$	Santigrat derece
P	Fosfor
Zn	Çinko
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Çinko Sülfat

Kısaltmalar

ATF6	Activating Transcription Factor 6
BIP	Bağlayıcı Protein
bZIP	Temel Lösin Fermuarı
cDNA	Komplementer DNA
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER-İlişkili Bozulma
ERAD	ER İlişkili Degredasyon
ERQC	ER Kalite Kontrol
ERSE	ER Stres Element Motifi
IRE1	Inositol Requiring Enzyme
MAMP	Microbe Associated Molecular
MPa	Megapaskal
PCR	(Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
PERK	Sensör Molekülü
RIDD	Düzenlenen IRE1 Bağımlı Bozulma
RIDS	IRE1 Bağımlı Ekleme'yi Düzenleme
RNA	Ribo Nükleik Asit
SA	Salsilik Asit
SAR	Sistemik Edinilmiş Direnç
TM	Tunusamisin
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
UPRE	Unfolded Protein Response Elements

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Bitkilerde UPR sinyal yolları (Fanata <i>et al.</i> , 2013)	7
Şekil 2.2. IRE1 stres yolağı (Kørner <i>et al.</i> , 2015).....	8
Şekil 2.3. bZIP28 stres yolağı (Kørner <i>et al.</i> , 2015).....	11
Şekil 2.4 “SYBR Green” floresan ışımaya basamakları (Van der Velden <i>et al.</i> , 2003).....	13
Şekil 2.5. Real Time döngü aşamaları (Heid <i>et al.</i> , 1996).....	14
Şekil 3.1. Çimlendirme kağıdında çimlendirilen Nimet yonca çeşidinin görünüşü.	18
Şekil 3.2. Hoagland solüsyonunda kontrol bitkileri ve stres bitkilerine yapılan uygulamalar.....	18
Şekil 3.3. Stres uygulamaları için hazırlanan düzenek havalandırma sistemi	19
Şekil 3.4. PMS Model 600 Specs Pressure Chamber (USA) cihazı ile yaprak/su potansiyeli ölçümü	21
Şekil 4.1. Stres uygulanan bitkilerin 96.saat sonundaki görüntüsü	27
Şekil 4.2. Nimet yonca çeşidinde, osmometre sonuçlarının grafiksel gösterimi	29
Şekil 4.3. Nimet yonca çeşidinde, MPa ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	29
Şekil 4.4. İzole edilen Nimet yonca çeşidine ait bazı RNA’ların agaroz jel (%1) görüntüsü.....	30
Şekil 4.5. Sentezlenen bazı cDNA’ların agaroz jel (%1) görüntüsü.....	33
Şekil 4.6. Real Time PCR cihazından alınan bZIP-28 primerine ait standart eğri grafiği (efficiency ve slope değerleri).....	34
Şekil 4.7. Real Time PCR cihazından alınan housekeeping primerine ait standart eğri grafiği (efficiency ve slope değerleri)	34
Şekil 4.8. Real Time PCR cihazından alınan bZIP-60 primerine ait standart eğri grafiği (efficiency ve slope değerleri).....	35
Şekil 4.9. bZIP28 primeri standardına ve PEG uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	36
Şekil 4.10. bZIP28 primeri standardına ve PEG uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	36
Şekil 4.11. bZIP28 primeri standardına ve DTT uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	37

Şekil 4.12. bZIP28 primeri standardına ve DTT uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	37
Şekil 4.13. bZIP60 primeri standardına ve DTT uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	38
Şekil 4.14. bZIP60 primeri standardına ve DTT uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	38
Şekil 4.15. bZIP60 primeri standardına ve PEG uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	39
Şekil 4.16. bZIP60 primeri standardına ve PEG uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	39
Şekil 4.17. Housekeeping primeri standardına ve DTT uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	40
Şekil 4.18. Housekeeping primeri standardına ve DTT uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	40
Şekil 4.19. Housekeeping primeri standardına ve PEG uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 4.20. Housekeeping primeri standardına ve PEG uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri	41
Şekil 4.21. bZIP28 primeri standardına ve örneklerine ait erime eğrileri	42
Şekil 4.22. bZIP60 primeri standardına ve örneklerine ait erime eğrileri	42
Şekil 4.23. Housekeeping primeri standardına ve örneklerine ait erime eğrileri.....	43
Şekil 4.24. Nimet yonca çeşidine uygulanan DTT ve PEG stresinde bZIP28 ve bZIP60 primerlerine ait normalize verilerin relatif ifade seviyeleri	44
Şekil 4.25. Nimet yonca çeşidine uygulanan DTT ve PEG stresinde bZIP28 ve bZIP60 primerlerine ait normalize verilerin relatif ifade seviyeleri (HeatMap).....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Türkiye’de yıllara göre (2011-2016) yonca ekiliş ve hasat alanları, üretim ve verim miktarları (TUİK, 2017).....	3
Çizelge 3.1. Hoagland besin solüsyonu içeriği.....	17
Çizelge 3.2. DTT stresi uygulama deneme deseni (0.154 g DTT/L Sıvı Hoagland).....	20
Çizelge 3.3. Kuraklık stresi uygulama deneme deseni (%18 PEG/L Sıvı Hoagland)	20
Çizelge 3.4. Real time PCR primer dizileri (5’-3’).....	22
Çizelge 3.5. cDNA sentez karışımı içeriği	23
Çizelge 3.6. Promega cDNA sentez kiti PCR programı	23
Çizelge 3.7.bZIP60 primer optimizasyon koşulları	24
Çizelge 3.8. bZIP28 primer optimizasyon koşulları	24
Çizelge 3.9. PDF2 (housekeeping) primer optimizasyon koşulları	25
Çizelge 3.10. Real Time PCR programı	25
Çizelge 4.1. Nimet yonca çeşidinde ölçülen osmometre sonuçları (g/Mol) (VAPRO)..	28
Çizelge 4.2. Nimet yonca çeşidinde ölçülen MPa sonuçları (PMS).....	28
Çizelge 4.5. DTT stresi örneklerinden izole edilen RNA’ların spektrofometrik ölçümleri (Nanodrop sonuçları)	31
Çizelge 4.6. Kuraklık stresi örneklerinden izole edilen RNA’ların spektrofometrik ölçümleri (Nanodrop sonuçları)	32
Çizelge 4.7. cDNA’ların Spektrofometrik Ölçümleri.....	33
Çizelge 4.8. Nimet yonca çeşidine uygulanan DTT ve PEG stresinde bZIP28 ve bZIP60 primerlerine ait normalize verilerin relatif ifade seviyeleri	43

1. GİRİŞ

Değişik iklim koşullarına yüksek adaptasyon yeteneği ve geniş çevre şartlarında yüksek yem verimi ile yonca (*Medicago sativa*); tüm dünyada en önemli baklagil yem bitkilerinden birisi olarak kabul edilmektedir (Putnam *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010).

Dünya genelinde yaklaşık 40 milyon hektarlık alanda ekilen yonca (*Medicago sativa*) (Zhang *et al.*, 2010), yüksek protein içeriği, lezzeti ve hayvanlar tarafından sindiriminin kolay olması nedeniyle hayvansal ürün eldesi için vazgeçilmez yem kaynaklarından biridir. Yeşil ot olarak meralarda ve çayırlarda tercih edilmesinin yanı sıra kuru ot olarak saman ve silaj üretimi için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang and Wang, 2015).

Kuraklık, tuzluluk, spesifik toksisite, topraktaki bitki besin elementlerinin eksikliği gibi faktörler bitkinin büyümesini yavaşlatıcı ve ürün kaybına neden olabilecek çevresel stres faktörleridir (Hanson *et al.*, 1988; Zhu, 2001).

Kuraklık stresi, yüksek tuzluluk vb. için bitki toleransının artması, stres mekanizmalarının anlaşılması ve stres koşullarına dayanıklı çeşit ıslahı en önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır (Bartels and Sunkar, 2005).

Büyük verim kayıplarına neden olan biyotik ve abiyotik stres koşullarına yönelik bitkinin stresi algılaması ve strese karşı adaptasyon sağlaması, bitkinin yaşamsal bir fonksiyonudur. Bu stres koşullarına karşı direnç gösterebilmek için bitkiler; tehditlere karşı hızlı tepkiler vererek stres etmeninin erken tanınmasına ihtiyaç duymaktadır (Körner *et al.*, 2015).

ER, bitki hücrelerindeki salgı yolağı olup, bitki hücresinde salgılanan tüm proteinin üçte biri ER tarafından salgılanmakta veya katlanarak birleştirilmektedir. Katlanmanın hatalı olduğu durumlarda proteinlerin taşınması ve işlevselliği sekteye uğramaktadır (Deng *et al.*, 2013).

Stres koşulları, yeni sentezlenen protein katlanmasını doğrudan etkilemekte, protein katlanmasının stresten etkilenmesi halinde ise ER'da katlanmamış protein cevabı (Unfolded Protein Response) UPR, aktive edilmektedir (Liu and Howell, 2010). Bu durumda ER dengesinin bozulması (katlanmamış veya yanlış katlanmış protein

birikmesi) sonucu meydana gelen hücrel aktiviter ER stresi olarak tanımlanmaktadır (Kørner *et al.*, 2015).

Tarımsal açıdan yüksek önem taşıyan bitkilerin, bitki genetik mühendisliği ve biyoteknolojik yöntemler ile son yıllarda, biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı artan direnç, verim ve kalite kriterleri açısından arzu edilen üstün özellikli tarımsal ürünlerin üretimi mümkün hale gelmiştir (Tohidfar *et al.*, 2013).

Özellikle stres tolerans mekanizmasının ana kaynaklarından birini oluşturan UPR, aynı zamanda bitki gelişim fizyolojisinde hücredeki temel genetik düzenleyicilerden birisi olarak görülmektedir (Chen and Brandizzi, 2013). Yapay olarak oluşturulacak endoplazmik retikulum stresi koşullarında UPR mekanizmasında rol oynayan genlerden (transkripsiyon faktörleri) bZIP 28, bZIP 17, bZIP60'in ifadesinin incelenmesi, değişik stres süresindeki ifadesinin değişimi ve UPR cevabının aydınlatılması, iki yoldan hangisinin (bZIP 28/bZIP 17 veya bZIP60) daha fonksiyonel olduğunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, PEG-8000 (polietilen glikol) kullanılarak oluşturulacak bitki büyüme ortamında yetiştirilen yonca bitkisinin kuraklık kaynaklı ER stres yolağında, hangi transkripsiyon faktörünün aktif hale geldiği ve ifadesinin belirlenmesi bu tezin amacını oluşturmaktadır.

Ayrıca, yetiştiriciliğin değişik aşamalarında ortaya çıkan tuz, kurak, viral vb. stres sorunlarının her bir stres bazında poligenik olarak değil, merkez odaklı kontrol sistemini oluşturan genlerin üzerinde yoğunlaşma imkanı sağlayarak, tarımsal üretim açısından sorun teşkil eden konuların çözülmesinde birincil önem taşımaktadır.

Yoncanın değişik stres koşullarına (yüksek tuz ve kuraklık dahil olmak üzere, çeşitli abiyotik stres koşulları) adaptasyonunu artıracak olan UPR mekanizması ile ilgili olarak, yonca kök ve sürgün dokuları arasında endoplazmik retikulum stres cevabına yönelik aktif hale gelen genlerin karşılaştırmalı analizleri henüz yapılmamıştır.

Bu tezin önemi, tarımsal açıdan pratik anlamda daha tolerant/dayanıklı bireylerin genler düzeyinde karşılaştırılması, ıslah aşamasında strese dayanıklı F1 adaylarının seçimi vb. imkan sağlamanın yanı sıra, uzun vadede bu genlerin genetik modifikasyonuna veya klonlanıp aşırı ifade ettirilerek (over expressyon) çok yönlü streslere karşı kalıcı transgeniklerin geliştirilmesine olanak sağlamaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yonca (*Medicago sativa*), Fabaceae (Baklagiller) familyasına ait, besin değeri ve ham protein miktarı oldukça yüksek olan çok yıllık bir yem bitkisidir. Diğer yem bitkilerine göre daha yüksek miktarda mineral (özellikle kalsiyum, aynı zamanda magnezyum, potasyum, kükürt, demir, kobalt, mangan ve çinko) ve vitaminler (beta-karoten) içermektedir. Uzun ömürlü baklagil yem bitkisi olan yonca; derin kökleri ile toprak bünyesini iyileştirmek, köklerinde nodül şeklinde bulunan ve ortak yaşam gösteren “*Rhizobium*” bakterileri ile havanın serbest azotunu toprağa bağlayarak toprak besin elementini artırmak (Zhang and Wang, 2015), toprağa organik madde ilave etmek ve gölge yapmak suretiyle toprak erozyonunu önlemesi bakımından da oldukça önemlidir (Suttie, 2000).

Yoncanın toprak yönünden fazla seçiciliği olmamasına rağmen, derin, verimli, sulanabilir, iyi drenajlı, yeterli kirece sahip ve nötr topraklarda iyi geliştiği belirlenmiştir (Widyati *et al.*, 2012). Düşük verimli ve asidik karakterli topraklarda özellikle potasyumlu gübreleme, yüksek verim ve ot kalitesi açısından büyük önem taşımaktadır. Yonca bir yılda birçok kez biçildiğinden ve her biçimde fazla miktarda yeşil aksam ürettiğinden, topraktan oldukça fazla miktarda besin maddesi kaldırmaktadır. (Lanyon and Griffith, 1988).

Çizelge 2.1. Türkiye’de yıllara göre (2011-2016) yonca ekiliş ve hasat alanları, üretim ve verim miktarları (TUİK, 2017)

Yıl	Ekiliş Alanı (dekar)	Hasat Alanı (dekar)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
2011	5.585.525	5.545.763	12.076.159	2.178
2012	6.741.832	6.620.705	11.536.328	1.742
2013	6.286.419	6.264.502	12.616.178	2.014
2014	6.923.055	6.874.768	13.432.968	1.954
2015	6.620.459	6.595.357	13.949.958	2.115
2016	6.501.107	6.482.615	15.714.381	2.424

Son yıllara ait verilerinden Türkiye’de yonca ekiliş alanlarının ve üretilen yeşil ot miktarının arttığı görülmektedir. 2016 yılı verilerine göre Türkiye’de 6.501.107 dekar ekili yonca alanı ve 15.714.381 ton yeşil ot üretimi gerçekleştirilmiştir (TUİK, 2017).

2.1. Bitkilerde Kuraklık Stresi ve Etkileri

Kuraklık, tuzluluk, çevresel faktörler, hastalık ve zararlılar vb. koşulların sebep olduğu bitkisel üretimdeki kayıplar nedeniyle bitkideki stres fizyolojisi, tarımsal üretimin sürdürülebilirliği için en önemli konulardan birisi haline gelmiştir (Chaitanya *et al.*, 2003).

Bitkinin yaşamını sürdürebilmek için gereksinim duyduğu suyu topraktan karşılayamaması durumu kuraklık olarak tanımlanmaktadır (Miyashita *et al.*, 2005). Sıcaklıktaki artış, yağış miktarlarının azalması, terleme ile topraktan aşırı su kaybı, şiddetli rüzgar, düşük nem miktarı gibi etmenler kuraklığın oluşmasında etkili faktörlerdir.

Bitkilerin verimliliğini sınırlayan en önemli çevresel faktör, kuraklık stresidir (Araus *et al.*, 2002) ve tüm dünyada artan çölleşme ve tarım arazilerinde yüksek tuzluluk, tarıma elverişli arazilerin %10'una yakını etkisi altına almakta ve ürün veriminin %50 oranında düşüşüne neden olmaktadır (Bray, 1997).

Bitkide kuraklık stresinin etkileri, kuraklığın oranına, şiddetine ve maruz kalma süresine göre değişmekle birlikte bitkinin tüm gelişme dönemlerinde etkili olabilmektedir (Çarpıcı ve Erdel, 2015).

Kuraklık stresi bitkide hücre düzeyinden, doku ve bitki kaybına kadar geniş oranda etki alanına sahiptir. Buna ek olarak bitkide morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeyde metabolik değişimlere ve mutasyonlara sebep olabilmektedir (Medrano *et al.*, 2002).

Bitkisel üretimden elde edilen mahsulün verimi, bitkinin fotosentez yapma kapasitesine bağlıdır. Fotosentez ise kuraklık ile yakından ilişkilidir (Lawlor and Tezara, 2009). Topraktaki su noksanlığı bitkinin fotosentez hızını, etkinliğini ve ürün verimini etkileyen en önemli etmenlerin başında gelmektedir (Ingram and Bartles, 1996).

Kuraklık durumunda bitki aktivitelerinin (fotosentez, hücre büyümesi vb.) zarar görmesi ve verim kayıpları hücre boyutunda; solunum sistemi, hücredeki ATP sentezi, stres sonucu salgılanan metabolitlerin hücrede birikimi, gen ekspresyonu ve protein sentezi ile direkt ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Lawlor and Tezara, 2009). Kuraklık

koşullarında ürün verimindeki kayıpların önüne geçebilmek için, bitki stres mekanizmasının çok iyi algılanması gerekmektedir (Chaves *et al.*, 2009).

PEG (polietilen glikol-6000) kullanılarak hazırlanan kuraklık stresi ortamlarında yapılan denemelerde, belirlenen farklı kuraklık stres seviyelerinde (MPa/Bar) tohumların çimlenme yüzdesi üzerinde farklı oranlarda azalışa sebep olduğu belirlenmiştir (Castroluna *et al.*, 2014; Çarpıcı ve Erdel, 2015). Ayrıca büyümenin erken dönemlerinde bitkilerin kuraklığa maruz kalması ve stresin artmasına bağlı olarak vigor indeksinde önemli azalmalar ortaya çıktığı bildirilmiştir (Çarpıcı ve Erdel, 2015).

2.2. Bitkilerdeki ER (Endoplazmik Retikulum) Stresi ve Sinyalizasyon Yolakları

ER bitki bağışıklık sistemini kontrol eden mekanizma olarak kabul edilmektedir (Li *et al.*, 2009). ER yeni sentezlenen hücre membranındaki (transmembran) proteinlerin ve salgılanan (sekresyon) proteinlerin katlanma ve olgunlaşma merkezidir. ER' nin yüksek protein katlanması gerçekleştirmesi ve salgılama kapasitesi, stres durumunda bitkinin hızlı ve etkili bağışıklık tepkisi için hayati önem taşıdığı belirtilmiştir (Wang *et al.*, 2005).

Salgılanan proteinler, sentezlenme aşamasında, katlanmamış polipeptidler olarak endoplazmik retikulum lümenine giriş yaparlar. Bu proteinlerin katlanmaları endoplazmik retikulum faktörleri yardımcılığında gerçekleşmekte olup doğru katlanmamış proteinler ER kalite kontrol (ERQC) sistemi tarafından tespit edilir ve ER ilişkili degradasyon (ERAD) sistemiyle indirgenirler (Howell, 2013; Deng *et al.*, 2013).

Salgı proteinlerinin yüksek miktarda sentezlenmesi, hatalı katlanmış proteinlerin fazla miktarda ifadesi, katlanma işlevinin gerçekleştirilmesinde görevli proteinlerdeki mutasyonlar, besin kıtlığı, ER'daki Ca^{2+} seviyesindeki anormal değişimler ve viral enfeksiyonlar ER'da protein birikimini tetikleyen etkenler olarak sayılabilir (Howell, 2013).

ER, hücrede kalite kontrol sistemi sayesinde, yalnızca doğru bir şekilde katlanmış proteinlerin ER'dan çıkışını, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER içinde tutumunu ve sonradan parçalanmasını sağlar (Körner *et al.*, 2015; Howell, 2013).

Proteinlerin katlanamaması ya da hatalı katlanması durumunda ER içinde bulunan ERAD (ER - associated degradation) kontrol sistemi hasarlı ve hatalı katlanmış proteinlerin yıkımını sağlayarak proteinlerin ER içinde birikimini önlemektedir (Howell, 2013).

Deng *et al.* (2013), stres sinyalizasyon yolağında ERAD veya ERQC mekanizmalarında hataya sebep olan eksikliklerin gerçekleştiği durumlarda farklı kusurlar meydana gelirken, sinyalizasyonun başarıyla tamamlandığı bazı mutant bitkilerde, farklı çevresel stres faktörlerine karşı toleransın arttığını belirtmişlerdir.

2.3. ER Katlanmamış Protein Cevabı (UPR: Unfolded Protein Response)

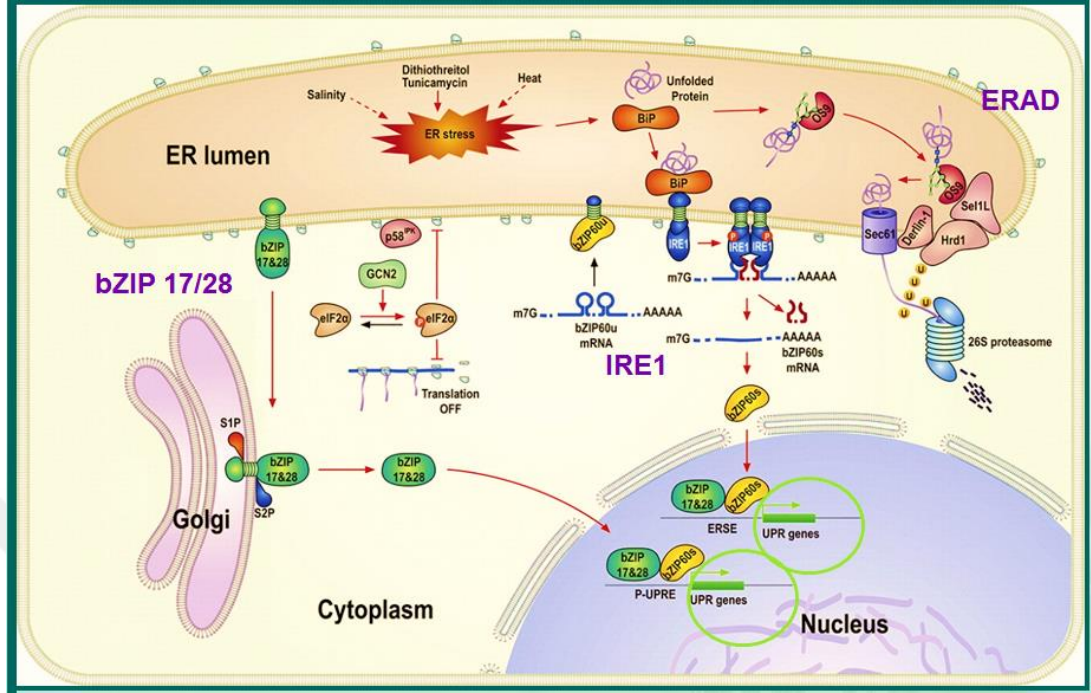
ER içinde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi sonucu hücrelerde gerçekleşen aktivitelerin tümü ER stresini meydana getirmektedir. ER stresi sonucu bozulan dengenin tekrar düzenlenebilmesi için UPR (Unfolded Protein Response) (katlanmamış protein cevabı) yolağı aktif hale geçmektedir (Brodsky and Wojcikiewicz, 2009; Banhegyi *et al.*, 2012).

UPR; ER'da protein katlanması ve taşınmasındaki rolü önemli olan Ca²⁺ bağımlı moleküler şaperon proteinlerinin ifadesini artırma veya translayonunu azaltma yoluna giderek, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER'da birikimini engellemektedir (Howell, 2013).

Bitkilerdeki UPR sinyal yolu mekanizması, *Arabidopsis*'deki çalışmalardan faydalanılarak ortaya çıkmıştır ve bitkilerdeki UPR mekanizmasının ilk tepkileri mutasyona uğratılmış mısırlardan elde edilmiştir (Kim *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2013).

Bitkilerde UPR sinyalizasyon yollarında, memelilerde ER membranında bulunup UPR sinyalizasyonundan sorumlu olan sensör moleküllerinden (IRE1, ATF6 ve PERK) sadece IRE1 (bZIP60) ve ATF6'nın homologunun (bZIP28 ve bZIP17) bulunduğu belirtilmiştir (Fanata *et al.*, 2013).

UPR mekanizmasında yer alan bZIP28, bZIP17, bZIP60 genlerinin kurak-tuz (Liu *et al.*, 2007a; Fujita *et al.*, 2007), yüksek sıcaklık vb. abiyotik streslere karşı ifadelerinin değişik bitkilerde (soya, buğday, tütün vb.) yürütülen çalışmalarda arttığı diğer bir ifade ile bitki toleransını artırmada bu genlerin devreye girdiği kanıtlanmıştır (Gao *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2011).

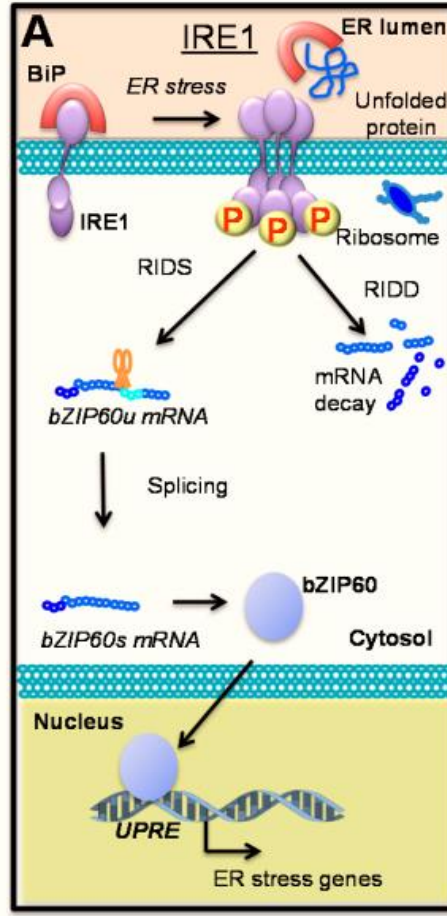


Şekil 2.1. Bitkilerde UPR sinyal yolları (Fanata *et al.*, 2013)

Temel lösin fermuar proteini (Basic leucine zipper protein) bZIP genlerinin bitkide çimlenme, çiçek gelişimi, tohum bağlama, bitkinin yaşlanması gibi fizyolojik aktivitelere etki etmesinin yanı sıra (Alonso *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010); patojen (Lee *et al.*, 2006), kuraklık, tuzluluk, vb. çevresel stres faktörlerine (abiyotik ve biyotik stresler) karşı bitki bünyesinde gerçekleşen stres mekanizmasında görev aldığı bildirilmiştir (Nijhawan, 2008). ER stres sinyal yolağı ikiye ayrılmıştır; birinci yolak bZIP, ER membranına bağlı ve katlanmamış veya aşırı katlanmış proteinlerin işlenmesi ve toplanması için iken, diğer yolak RNA ekleme faktörü olan IRE1'dir (Şekil 2.1) (Deng *et al.*, 2013).

2.3.1. ER stres sensörü IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1)

IRE1; Sitozolik kinaz/ribonukleaz alanı ve luminal ER stres sensör alanı ile birlikte, transmembran reseptör proteini olarak ER membranına yerleşmiştir (Chen and Brandizzi, 2013). IRE1 ilk olarak mayalarda tanımlanmıştır. ER'da ilk transkripsiyonel faktör olan IRE1'in bitki ve hayvanlardaki homologları belirlenmiştir. Tanımlanan tüm IRE1'ler benzer görev ve çalışma mekanizmasına sahiptir (Wang *et al.*, 1998; Koizumi *et al.*, 2001).



Şekil 2.2. IRE1 stres yolağı (Kørner *et al.*, 2015)

Stres koşullarının gerçekleşmediği durumlarda, ER lümenine Bağlayıcı Protein (BiP: Binding Protein) ile bağlanan IRE1'in sensör alanı duyarsızlaştırılarak stres dışı faktörlerde aktivasyonu durdurulmuş olur. ER stres koşullarında BiP, IRE1 ile arasındaki bağları kopararak, katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin IRE1 tarafından toplanmasına izin vermektedir (Şekil 2.2). Proteinlerin toplanması ardından IRE1 bileşenleri protein fosforilasyonu ile aktif hale geçer. Bu aşamadan sonra (*Arabidopsis*' de) AtbZIP60'ın kendine özgü hedefleri mRNA'ya eklediği belirtilmiştir (Kørner *et al.*, 2015). Bu aşama, RIDS (Regulating Independent Splicing-Düzenleyici IRE1) olarak adlandırılmaktadır (Deng *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2012).

RIDS, mRNA hedeflerinin artmasına ve mRNA'nın fonksiyonel transkripsiyon faktörlerine dönüşebilmesine sebep olur. Aktif hale geçen IRE1 aynı zamanda

(Regulated IRE1- Dependent Decay) RIDD adı verilen süreçte, spesifik hedefleri olan mRNA'ların hacminin küçültülmesine sebep olmaktadır (Hollien and Weissman, 2006).

RIDD boyunca IRE1 in indirgediği mRNA'ların, çekirdek zarından geçerek, ER katlanması (Unfolded Protein Response Elements–UPRE) için gerekli proteinin kodlanmasına yardımcı olur. Bu durum AtbZIP60'ın, katlanmamış protein cevabına bağlandığını göstermektedir (Mishiba *et al.*, 2013).

AtbZIP60, UPRE'e etki ederek ER stres geninin salgılanmasına yardımcı olmaktadır. Bu sayede, ER'ün protein katlama yükünü azalttığı öngörülmektedir (Mishiba *et al.*, 2013). AtbZIP60'ın ER stres geninin salgılanmasındaki önemli etkisi, UPRE'nin ER stresine sebep olan birçok gen tarafından teşvik edildiğinin kanıtı olarak gösterilmektedir (Sun *et al.*, 2013).

Fujita *et al.* (2007), bZIP60'ın aşırı ifade ettirilmesi sonucu (Overexpression), *Arabidopsis*' de tuz stresine karşı daha fazla tolerans gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Model bitki olarak tanımlanan *Arabidopsis*'in (*Arabidopsis thaliana*), IRE1a, IRE1b ismi verilen ve ER stres yolağında spesifik rol üstlenen iki adet IRE1 homoloğu kodladığı belirlenmiştir (Körner *et al.*, 2015). IRE1a, SA (salsilik asit) ve patojen kaynaklı stres sonucu bZIP60 eklemeye rol oynamasına karşın, IRE1b, TM (Tunusamisin) / DTT (Dithiothreitol) / Isı kaynaklı stres sonucu bZIP60 eklemesinde rol oynar (Deng *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2012).

Deng *et al.*, (2013), TM'nin ER protein geçişlerini engelleyerek strese sebep olduğunu, DTT'nin ise proteinlerde redoks koşullarını bozarak ER stresine sebep olabileceğini belirtmiştir.

2.3.2. bZIP28 ve bZIP17 ER stres yolağı

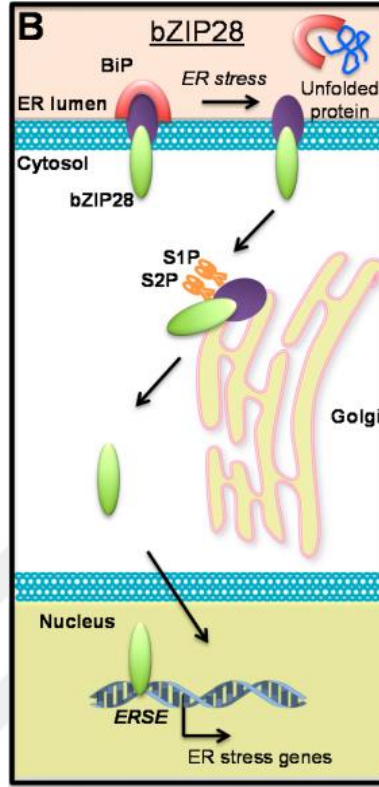
IRE1'in (bZIP60) yanı sıra bir diğer ER stres yolağı hayvanlardaki ATF6'nın (Activating Transcription Factor 6) homoloğu olan bZIP28 ve bZIP17'dir. bZIP28, ER stres sinyalini kontrol eden ve ER membranına bağlı transkripsiyon faktörüdür (Körner *et al.*, 2015). Hem bZIP17 hem de bZIP28, ER stres etkenleri (DTT ve TM) ısı ve tuz stresi gibi çevresel stres koşulları tarafından aktif hale geçer (Liu *et al.*, 2007b; Che *et al.*, 2010). bZIP28, ER lümeninde yanlış katlanmış proteininin birikmesi sonucu stres indüklemesi ile IRE1'e benzer şekilde aktif hale geçmektedir (Körner *et al.*, 2015).

bZIP28 C- terminal ve N- terminal olmak üzere iki kısma ayrılır (Di Cola *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2013). bZIP28'in C-terminal kuyruk kısmı ER lümenine ve N-terminal kısmı sitoplazmaya yöneliktir. Di Cola (2005), Stres algılanmadığı süre boyunca BIP tarafından ER lümenine C-terminal kısmından bağlı tutulmaktadır. IRE1 de olduğu gibi stres sonucu (katlanmamış protein birikimi) UPR algılandığı zaman BIP ile arasındaki bağ kopmaktadır (Liu *et al.*, 2007b; Srivastava *et al.*, 2013).

ER lümeninden UPR sonucu oluşan proteinleri toplayan bZIP28, hedeflerinin işlenmesi için Golgi'ye doğru yer değiştirerek burada S1P ve S2P transkripsiyon faktörleri tarafından işlenirler. S1P ve S2P, bZIP17 ve bZIP28'in bölünmesi ve aktivasyonundan sorumlu iki anahtar proteazdır ve golgiye yerleşiktir (Şekil 2.3). Hem S1P hem de S2P'nin, BIP tarafından serbest bırakılan ve protein yüklü aktif bZIP17 veya bZIP28 ifadesi ile tamamlanabileceğini bildirmiştir (Che *et al.*, 2010).

S1P ve S2P transkripsiyon faktörleri tarafından işlenen bZIP28'in (benzer yolak bZIP17 için geçerli) BIP DNA'sı içeren kısımları, ER stres geninin (ER stres element motifi – ERSE) sentezlenmesine katılmak üzere çekirdeğe yönlendirilirler (Di Cola *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2007b). IRE1 (bZIP60) ile bZIP28 ve bZIP17 tarafından düzenlenen genler birbirine benzer yollar izlemesine rağmen her ikisi de farklı yollardır; her iki yolağın görevleri birbirinden farklı ve kendilerine özgüdür (Sun *et al.*, 2013).

Bunlara ek olarak *Arabidopsis*'de bZIP17 adı verilen (Basic Leucine Zipper 17) S1P ve S2P tarafından işlenmiş 2. Transkripsiyon faktörünün kodlandığı belirlenmiştir. bZIP17 absisik asit ve tuz stresi gibi etkilere cevap veren önemli bir etmenddir (Körner *et al.*, 2015).



Şekil 2.3. bZIP28 stres yolu (Kørner *et al.*, 2015)

Arabidopsis'de tuz stresi nedeniyle ER' da bZIP17'nin aktif hale geldiği ve bZIP17'nin aşırı ekspresyonu *Arabidopsis*'de tuz stresine toleransı artırdığı bildirmiştir. Ayrıca bZIP17'nin yapısal olarak bZIP28 e benzediği belirtilmiştir (Liu, 2008).

Stres durumunda ısıtılmanın, bZIP17 ve bZIP28'in ER lümeninden ayrılarak çekirdeğe yer değiştirmesini hızlandırdığı belirtilmiştir (Che *et al.*, 2010).

Valente *et al.* (2009), soya fasulyesinde BIP in aşırı miktarda ifadesi ile kuraklığa karşı daha fazla tolerans gösterildiğini bildirmişlerdir.

Bitkinin zararlı mikroorganizmalara karşı savunması, hücre boşluklarında (apoplast) bulunan stresi tetikleyici Mikroba Bağlı Molekül (MAMP: Microbe Associated Molecules)'lerin aktivasyonu ile başladığını, mikroorganizma saldırısının plazmada bulunan reseptörler tarafından algılanması ile ER'da protein katlanması aktif hale getirmesiyle proteinlerin ifadesi sonucu kontrol edildiği bildirilmiştir (Saijo *et al.*, 2009).

2.4. Kuraklık Stresi Koşullarında Gen İfadesinin Belirlenmesi

Gen ifadesi analizleri, stres koşulları altında bitkide meydana gelen değişim ve tepki mekanizmalarının belirlenmesinde önem taşımaktadır. Stres koşullarında bitki dokularında ifadesi gerçekleşen genlerin analizleri farklı moleküler teknikler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Gen ifade analizleri protein ve RNA temelli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Northern Blot, Real Time PCR (RT-PCR), RNA mikroarray, *in situ* Hibridizasyon, Gen İfadesinin Seri Analizi (SAGE: Serial Analysis of Gene Expression) gibi analiz yöntemleri RNA temelli genomik metotları oluşturmaktadır. Kütle spektrofotometresi, iki boyutlu jel elektroforezi veya protein mikroarray benzeri gen ifade analizleri protein tabanlı gerçekleşmekte olup, ifadesi artan ve azalan transkriptlerin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır (Bakır, 2012).

2.5. Real Time PCR

Kuraklık, tuzluluk vb. abiyotik stres koşulları altında bitkilerde meydana gelen fizyolojik, morfolojik, metabolik değişimlerde rol oynayan mekanizmaların belirlenmesinde, hangi genlerin rol oynadığının (gen ifadesi) belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Hücrelerde aktif hale gelen genlerin farklılıklarının belirlenmesinde Real Time PCR çoğu zaman doğru ve en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (Kozera and Rapacz, 2013).

Gen ifadesinin belirlenmesindeki hassasiyeti, güvenilirliği, reaksiyonların gerçek zamanlı ve toplu olarak tespiti, analizi yapılan örneklerin hızlı ve hassas ölçülmesi Real Time PCR'ın (qPCR) en büyük avantajları arasında sayılmaktadır (Gachon *et al.*, 2004).

Real Time PCR; çok sayıda örneğin aynı zamanda analizine imkan sağlamaktadır (Günel, 2007). Örneklerden izole edilen DNA'nın kopya sayısını belirleme, spesifik mutasyonları belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi ve kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda yaygın olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Kubista *et al.*, 2006).

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonlarının eş zamanlı olarak gözlemlenmesini sağlayan yenilikçi teknoloji olarak tanımlanmaktadır ve PCR (Polimeraz Zincirleme Tepkimesi) temelli analiz yöntemidir (Kubista *et al.*, 2006). Real time PCR teknolojisinde, reaksiyondaki genler veya hedef DNA parçalarındaki

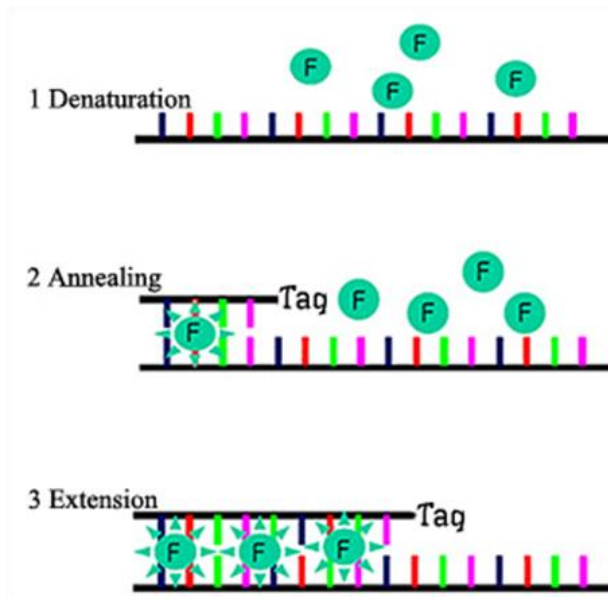
tamamlayıcı baz sırasını tanımlamak için kullanılan ve belirleyici molekülle işaretlenmiş tek zincirli DNA'dan oluşan prob dizilerinin yardımıyla, amplifikasyon miktarı tespit edilmektedir (Bustin *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006).

Bu yöntemde, ortamda bulunan DNA sarmalına bağlanan ve floresan ışımaya sebep olan bazı özel boyalar kullanılmaktadır. “SYBR Green” yalnız çift zincirli DNA sarmalına bağlandığında floresan ışımaya yapar (Monis *et al.*, 2005). “SYBR Green” diziyeye spesifik olamamakla birlikte, 497 nm dalga boyunda yükseltgenip, 520 nm dalga boyunda indirgenerek floresan ışımaya yapar (Morrison *et al.*, 1998).

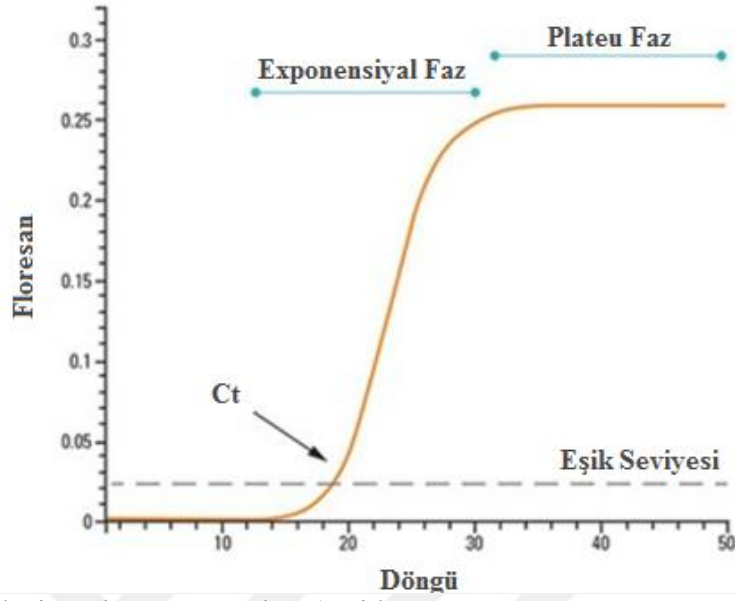
Real Time PCR’da kullanılan diğer floresan prob sistemleri ise Hidrolizasyon prob metodu (TaqMan (PE Biosystem), Beacons, Scorpions) ve Hibridizasyon prob metodudur (Light Cycler (Roche)).

RT PCR reaksiyonu için hazırlanan karışımda, çift zincirli DNA molekülü, hedeflenen gen dizisinin çoğalmasını sağlayabilmek için tasarlanan primerler ve “SYBR Green” bulunur (Kozera and Rapacz, 2013). RT PCR temelde 3 fazdan oluşan reaksiyon gerçekleştirir. İlk olarak yükselme fazı (exponensiyal faz), sırasıyla linear faz ve plateau fazıdır (Morrison *et al.*, 1998).

SYBR Green floresan ışımaya basamakları Şekil 2.4’de verilmiştir (Van der Velden *et al.*, 2003).



Şekil 2.4 “SYBR Green” floresan ışımaya basamakları (Van der Velden *et al.*, 2003)



Şekil 2.5. Real Time döngü aşamaları (Heid *et al.*, 1996)

RT PCR yükselme fazında (exponensiyal faz) tüm reaksiyon içeriğinin etkinliği %100 olmakta ve PCR ürün miktarı her döngüde iki katına çıkmaktadır. SYBR Green bağlanmayan DNA molekülünün gerçekleştirdiği ışımaya çok azdır. Primerler DNA ile bağlanmaya başladığında “SYBER Green” araya girer ve floresan ışımaya artar (van der Velden *et al.*, 2003) . Ürün miktarı arttıkça floresan ışımaya da artmakta, eş zamanlı olarak RT PCR ekranından okunan ışımaya değeri de artış göstermektedir (Kubista *et al.*, 2006). Real Time döngü aşamaları Şekil 2.5’de verilmiştir.

Linear faz (doğrusal faz) da ise reaksiyon bileşenlerinin giderek azalması nedeniyle PCR ürünlerinin oluşum hızı da düşmektedir. Linear fazda gerçekleşen döngülerde üretilen ürün miktarı az olduğu için ışımaya da azdır. Oluşan ürünler bozulmaya başlar ve reaksiyon hızı düşer. Son olarak plateu fazında (sonlanma noktası, durağan faz) reaksiyon içeriği tükenmekte, oluşan ürünlerin bozulma hızı artmakta ve yeni ürün oluşumu tamamen sonlanmaktadır (Ginzinger, 2002).

Amplifikasyon sırasında floresan ışınım değerlerinin eşik seviyesi ile kesiştiği nokta Ct (threshold cycle/eşik döngüsü) değerini oluşturur. Eşik döngüsü (Ct), reaksiyonun eksponensiyel faza ilk geçiş aşamasında, sistemin floresan ışınım miktarındaki artışı tanımlamaya başladığı anı belirtmektedir. Hedef DNA miktarı ne

kadar fazla ise PCR ürünleri eksponensiyal faza o kadar erken giriş yapmaktadır (Pfaffl, 2001).

Reaksiyon sırasında farklı örneklerin ilk anlamlı artışı gerçekleştirdiği Ct değerleri karşılaştırılabilmekte ve bu Real Time PCR analizinin temel bileşenlerinden birini oluşturmaktadır. Analizin gerçekleştirilebilmesi için bir diğer bileşen veri analiz metodunun (kantifikasyon/relative quantitation) belirlenmesidir. Kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda ifade olan bir örnek, seri seyreltmeler halinde standart olarak tanımlanmaktadır. Standartlar arasındaki seyreltme kalıplarının oranı tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmalıdır (Pfaffl, 2001). Kontrol örneklerden yapılan standart seyreltmeler kullanılarak konsantrasyonlara karşılık gelen seyreltmelerin Ct değerleri belirlenir. Elde edilen Ct değerleri ile standart eğri (regresyon eğrisi) çizilmektedir. Standart eğri, kantifikasyon için gerekli olup, Real Time PCR için önemli aşamalarından bir diğerini oluşturmaktadır (Dheda *et al.*, 2004).

Örneklerin reaksiyondan elde edilen Ct değerleri, standart eğri üzerinde önceden yapılan seyreltmelerdeki hangi konstantrasyonu temsil ettiği tespit edilerek göreceli miktar tayini yapılmaktadır (Ginzinger, 2002).

2.5.1. Real Time PCR çalışmalarında kontrol (housekeeping) genleri

Real Time PCR analizlerinde elde edilen tüm örnekleri eşit bir şekilde kıyaslayabilmek için tüm örneklerin ortak bir paydada eşitlenmesi gerekmektedir. Bu işlem normalizasyon olarak adlandırılmaktadır. Bu işlem için değişik koşullarda ifade düzeyinde fark olmayan bir referans gene ihtiyaç duyulmaktadır (Pfaffl, 2001). Diğer bir ifade ile normalizasyon için kullanılacak referans (housekeeping) gen, araştırılan dokularda ya da hücrelerde değişiklik göstermemeli (kararlılık) ve en stabil olan minimum sayıda gen kullanılmalıdır (Dheda *et al.*, 2004).

Analizlerde hedeflenen genin ifade düzeyi, housekeeping gen ile oranlanarak, Real Time PCR'dan önce örneklere ait RNA'lardan elde edilen cDNA miktarlarının, Real Time PCR sonrasında elde edilen analizler sonucunda meydana gelen farklılıklar normalize edilmektedir (Dheda *et al.*, 2004).

2.5.2. Real Time PCR çalışmalarında erime eğrisi (melting curve)

Real time PCR analizleri sırasında hedeflenen gen veya DNA'nın çoğaltımının yanı sıra, istenmeyen ürünlerin çoğalmasıyla da floresan ışığa açığa çıkması mümkündür. Ayrıca ortamda bağlanacak hedef DNA dizisinin olmaması durumunda da primerler birbirleri ile bağlanarak dimer oluşturabilmektedir. Tüm bu istenmeyen amplifikasyon ürünlerinin tespiti için "erime eğrisi" (melting curve) analizi yapılmaktadır (Kubista *et al.*, 2006).

Her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi olması nedeniyle, istenmeyen bağlanmaların (primer dimerleri vb.) belirlenmesinde DNA zincirlerinin Tm dereceleri arasındaki farktan yararlanılmaktadır. Çift zincirli DNA'nın, RT PCR döngüleri sırasında sıcaklık artışı ile zincirlerinin birbirinden ayrılmaya başladığı andaki sıcaklık derecesi erime sıcaklığı (melting temperature/TM) olarak adlandırılmaktadır. Amplifikasyon sonrası sıcaklık kademeli olarak artırılarak, açığa çıkan floresan boya belirli aralıklarla ölçülür. Elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun doğruluğu belirlenmektedir (Günel, 2007).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Yoncada ER stres yollarının belirlenmesi için yapılan çalışmada bitkisel materyal olarak Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ankara Yenimahalle Kampüsü Tohum Bankası'ndan alınan "Nimet" yonca çeşidi kullanılmıştır.

3.2. Metot

Çimlendirme kağıdında, 25°C sıcak ve karanlık koşullarda çimlendirilen yonca tohumları, Hoagland besin solüsyonunda (Çizelge 3.1), 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşullarında yaklaşık 3 hafta süre ile süre iklim odasında büyümeleri sağlanmıştır (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Hoagland besin solüsyonu içeriği

Makro elementler		Mikro elementler	
K ₂ SO ₄	1.57g/L	H ₃ BO ₃	0.124 g/L
KH ₂ PO ₄	0.27 g/L	MnSO ₄	0.066 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.4 g/L	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.100 g/L
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4.7 g/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0.048 g/L
KCl	0.07 g/L	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.155 g/L

Makro ve mikro elementler kullanılarak hazırlanan besin solüsyonunda son konsantrasyon; 2mM Ca, 10⁻⁶M Mn, 4mM NO₃, 2.10⁻⁷M Cu, 1mM Mg, 10⁻⁸M NH₄, 2mM K, 10⁻⁶M Zn, 0.2 mM P, 10⁻⁴M Fe ve 10⁻⁶M B olacak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Çimlendirme kağıdında çimlendirilen Nimet yonca çeşidinin görünüşü.

3.2.1. Bitkilerin stres ortamlarına aktarılması

Yeterli gelişim gösteren bitkiler, Hoagland besin solüsyonu içerisinde, 1mM dozunda DTT (Dithiothreitol) olacak şekilde (3.08 g DTT/20L) hazırlanan ortamlara aktarılmıştır. Kontrol bitkileri ise stres faktörü içermeyen Hoagland solüsyonunda bekletilmiştir.



- Kontrol bitkileri için hazırlanan (stres faktörü içermeyen) Hoagland solüsyonu
- Stres faktörü (DTT/PEG) içeren Hoagland solüsyonuna aktarılan bitkiler

Şekil 3.2. Hoagland solüsyonunda kontrol bitkileri ve stres bitkilerine yapılan uygulamalar

Aynı şekilde kuraklık denemeleri de Hoagland besin solüsyonu içerisine eklenen %18 PEG-8000 ($\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$: Polietilen Glikol) (AppliChem/Darmstadt-Almanya) ile hazırlanan ortama aktarılan bitkiler ile yapılmıştır. Kuraklık stresi kontrol bitkileri PEG içermeyen Hoagland besin solüsyonunda bekletilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.3. Stres uygulamaları için hazırlanan düzenek havalandırma sistemi

Bitki köklerinin oksijen eksikliği yaşamaması için hava üfleyen motorlar düzeneklere yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bu sayede uygulanan stres faktörü (DTT ve PEG) dışında bitkinin strese girmesine sebep olabilecek durumlar (oksijen eksikliği, sıcaklık, ışık vb.) engellenmiştir. Hazırlanan tüm düzenekler iklim odalarında (Digitech-Growth Chamber) sabit sıcaklıkta (25°C), düzenli ışık (16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık) koşulunda ve sabit nem (%50) oranında muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Stres denemeleri

Nimet yonca çeşidine ait bitkiler üçerli gruplar halinde solüsyon için hazırlanan düzeneğe yerleştirilmiştir. DTT stresi için 0.154 gr/L (Dithiothreitol), kuraklık stresi ise osmotik olarak 0.154g/L DTT stresine karşılık gelen ve osmometrede (Wescor VAPRO 5520 Utah – USA) belirlenen %18 PEG (Polietilen Glikol) uygulamaları ile yapılmıştır. Stres denemesinde, belirlenen her zaman aralığından ölçüm için 3 bitki kullanılmıştır. Uygulanan stres deneme desenleri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2. DTT stresi uygulama deneme deseni (0.154 g DTT/L Sıvı Hoagland)

Yapay ER Stres Uygulamaları (DTT)								
Zaman Aralıkları	2.saat	4.saat	8.saat	12.saat	24.saat	48.saat	96.saat	Kontrol
Bitki Sayıları	3	3	3	3	3	3	3	3

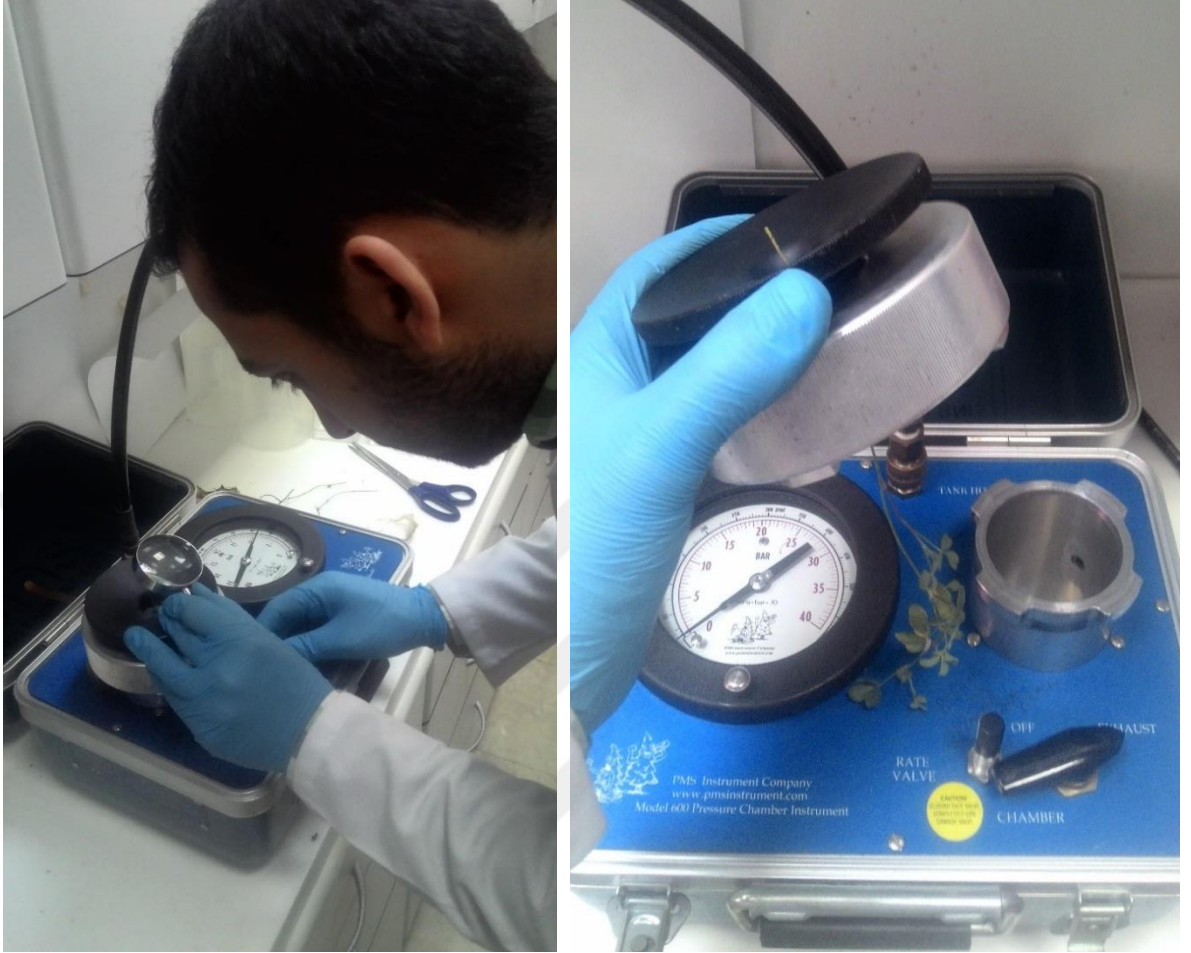
Çizelge 3.3. Kuraklık stresi uygulama deneme deseni (%18 PEG/L Sıvı Hoagland)

Kuraklık Stres Uygulamaları (PEG)								
Zaman Aralıkları	2.saat	4.saat	8.saat	12.saat	24.saat	48.saat	96.saat	Kontrol
Bitki Sayıları	3	3	3	3	3	3	3	3

3.2.3. Bitkideki osmotik su potansiyeli ölçümü

Tüm stres ve kontrol uygulamaları ölçümleri bitkilerin homojenliği (ölçüm yapılan bitkide yaprak sayısı aynı tutularak) sağlanarak yapılmıştır. Stres ölçümü için belirlenen her zaman aralığında bitkideki osmotik su potansiyeli, Wescor VAPRO 5520 (Utah–USA) osmometre cihazı ile ölçülerek fizyolojik ön bulgular sağlanmıştır. Bagatta (2008)'in belirttiği şekilde, stres uygulanmış/kontrol yaprak disklerinin sıvı azotta dondurulup çözdürülmesi sonrası çıkan öz sudan osmometre aleti kullanılarak osmometre okumaları tamamlanmıştır. Bitki öz suyunun osmometre okunma değeri $X \cdot 2.58/1000$ şeklinde MPa olarak hesaplanmıştır.

PMS Model 600 Specs Pressure Chamber (USA) cihazı ile bitkilerden alınan sürgünlerin, nitrojen gazı ile uygulanan basınç altında MPa değerleri ölçülerek osmotik su potansiyelleri belirlenmiştir (Şekil 3.4). Stres ve kontrol bitkileri hakkında fizyolojik ön bulgular tamamlanmıştır. Ölçümleri gerçekleştirilen bitkilere ait yapraklar sıvı azotta dondurulduktan sonra, RNA izolasyonuna kadar -80°C 'de saklanmıştır.



Şekil 3.4. PMS Model 600 Specs Pressure Chamber (USA) cihazı ile yaprak/su potansiyeli ölçümü

3.2.4. RNA izolasyonu

Stres dozları uygulanmış ve kontrol bitkileri kökleri ve yaprakları sıvı azotta dondurularak, RNA izolasyonu aşamasına kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Toplanan örnekler Promega SV Total RNA İzolasyon kiti (Madison-USA) ile izole edildikten sonra %1'lik agaroz jelde görsel olarak kontrol edilmiştir. Miktar ve saflık tayinleri, Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (USA) ile yapılmıştır.

3.2.5. 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 3.2 ve Çizelge 3.3' da sunulan

deneme deseninde, 3 bitkiden toplanan yaprak ve kök (stres ve kontrol) örneklerinin karışımından en az 3'lü teknik tekrar şeklinde Real Time PCR uygulama reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. İhtiyaç halinde Real Time PCR uygulamaları, RNA izolasyonları ve cDNA sentezleri tekrar edilmiştir.

3.2.6. Kullanılan primerler

Nimet yonca çeşidi kullanılarak oluşturulan kuraklık ve DTT stres yolaklarının belirlenmesinde, *Arabidopsis thaliana* basic region/ bZIP60 (NM_103458.3) ve Glycine max bZIP transcription factor bZIP28 (NM_001250309.2) iki gen bölgesi ile housekeeping kontrol gen bölgesinin primerleri kullanılmıştır. Genlere ait primer dizileri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Real time PCR primer dizileri (5'-3')

Gen Adı	Real Time PCR primerleri	
ER-bZIP 60	f: gaaatagagatgcgcggtt	r:gcaaacagtaacgtagagactgg
ER-bZIP 28	f: ttccaagaccgacgtagctg	r: ttgcgaggggtgaattgc
PDF2 (Kontrol geni)	f: gtgttttcttcgcccgtt	r: ccaaattctgctccctcatctg

f: İleri(Forward) primer; r: Geri(Revers) primer

3.2.7. cDNA sentezi

Fizyolojik ölçümü gerçekleştirilen örneklerden izole edilen RNA'lar kullanılarak, Promega GoScript™ Reverse Transcription System (Madison-USA) cDNA sentez kiti ile örneklerin cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için hazırlanan karışımın içeriği Çizelge 3.5'de, PCR programı Çizelge 3.6'da verilmiştir. PCR programı başlatılırken kapak ısıtması yapılmış, kapak ısıtması tamamlanınca program durdurulmuştur. Oligo DT ile RNA dan oluşan karışım PCR'a konulduktan sonra program devam ettirmiştir. PCR programı 2. basamağa geçtiği sırada tekrar durdurularak, örnekler buza alınmış ve en az 5 dk. bekletildikten sonra, hazırlanan cDNA sentez mix karışıma eklenmiştir. cDNA sentez karışımı ile örnekler iyi pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra PCR aletine geri konularak program devam ettirilmiştir.

Nanodrop ile miktar analizi yapılan cDNA'lar, Real-Time PCR aşamasına kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.5. cDNA sentez karışımı içeriği

İçerik	Hacim
RNA (1000ng)	2 µl
Oligo (dt) Primer (50pmol/µl)	0.5 µl
Su (PCR grade)	1.05 µl
5× Reaksiyon Buffer	2 µl
MgCl ₂	3.2 µl
dNTP (PCR Nuc. Mix)	0.5 µl
R inhibitör	0.25 µl
R transkriptas	0.5 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 3.6. Promega cDNA sentez kiti PCR programı

Kapak ısıtması	105°C	-
1. Döngü	70°C	5 dk
2. Döngü	25°C	5 dk
3. Döngü	42°C	60 dk
4. Döngü	70°C	15 dk
5. Döngü	10°C	∞

3.2.8. Standart eğri

Her bir primere ve ilgili housekeepinge yönelik (zeytinde kullanılan bir housekeeping geni seçilmiştir) primer optimizasyonlarında; örneğe ait cDNA'lardan 10^1 - 10^6 sulandırmalar ile (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000) her gene ait primerlere standart eğriler çizilmiştir. En az 1 logaritmik konsantrasyonun eğri üzerinden geçmesi ve etkinlik değerinin (efficiency) 1.7 ile 2 arasında olması istenmektedir. Slope değerinin ise -3.3'e yakın olması standart eğrinin güvenilirliğini desteklemektedir.

3.2.8.1. Primer optimizasyonu

Tezde kullanılan 3 primer (bZIP60, bZIP28 ve PDF2) ayrı ayrı, SYBER Green I (Roche) Master Kit içerikleri kullanılarak optimizasyonu sağlanmıştır. Primerlere göre optimize edilen içerik ve Real Time PCR programında kullanılacak bağlanma dereceleri Çizelge 3.7, Çizelge 3.8, Çizelge 3.9’ da verilmiştir.

Çizelge 3.7.bZIP60 primer optimizasyon koşulları

bZIP60 primer optimizasyon koşulları (TM 50 °C)	
İçindekiler	Miktar V/V µl
cDNA	3
İleri Primeri (10pmol)	2
Geri primeri (10pmol)	2
ddH2O	-
SyberGreen	5
Toplam hacim	12

Çizelge 3.8. bZIP28 primer optimizasyon koşulları

bZIP28 primer optimizasyon koşulları (TM 50°C)	
İçindekiler	Miktar V/V µl
cDNA	3
İleri Primeri (10pmol)	2
Geri primeri (10pmol)	2
ddH2O	0
SyberGreen	5
Toplam hacim	12

Çizelge 3.9. PDF2 (housekeeping) primer optimizasyon koşulları

PDF2 (housekeeping) primer optimizasyon koşulları (TM 51°C)	
İçindekiler	Miktar V/V µl
cDNA	3
İleri Primeri (10pmol)	2
Geri primeri (10pmol)	2
ddH2O	0
SyberGreen	5
Toplam hacim	12

3.2.9. Örneklerin alete yüklenmesi

Çizelge 3.10. Real Time PCR programı

Program	Cycles (Döngü)	Analysis Mode (Analiz Modu)			
Pre inkubation	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	00:00:10	4.8	
	TM °C	None	45	00:00:10	2.5
72 °C	Single		00:00:05	4.8	
Melting	Acquisition mode	Cycle	Hold	Ramp Rate	Melting Curve
	95 °C	None		00:00:30	
	TM °C	None	1	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

Örneklere ait cDNA'lar, her primer için optimize edilen koşullara göre, Promega GoTaq® qPCR Master Mix (Madison-USA) ile hazırlandıktan sonra Real Time PCR aletine ait 384'lük platelere dağıtılan örneklerin üzeri LightCycler® 480 Sealing Foil ile

kaplanmıştır. Hazırlanan plate Backman Coulter Allegra X-12 Centrifuge (USA) aletinde 14.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edilmiştir.

Roche LightCycler®-LC 480 aletinde optimize edilen sıcaklıklar seçilerek protokole uygun PCR (Polimeraz zincirleme reaksiyonu) programı koşullarında amplifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR programı Çizelge 3.10'da verilmiştir.

3.2.10. Verilerin değerlendirilmesi

Farklı zaman aralıklarında stres koşullarında bekletilen bitkilerin bünyesindeki su potansiyelleri ve MPa değerleri, IBM SPSS Statistics 22.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilen ANOVA testi ile istatistiksel açıdan önemli bulunan değerler belirlenmiştir.

Real-Time PCR sonucu çizilen standart eğriler yardımıyla ifade analizi yapılmak istenen örneklerin C_T (cycle threshold) döngü eşiği değerlerine, REST 2009 yazılımı ile uygulanacak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde analizler yapılmıştır.

Amplifikasyon eğrilerindeki değişimler, her stres ve zaman koşulu için 3 tekrara ait $\Delta\Delta Ct$ değerleri ile bu tekrarlara ait kontrol $\Delta\Delta Ct$ değerleri, zaman faktörü dikkate alınarak, uygulanan tek yönlü ANOVA testine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tüm uygulamalara ait, stres X zaman koşulları birbirleri ile karşılaştırılmış p değeri 0.05' ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm uygulamalar ve analizler, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarında yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Stres Uygulamaları

4.1.1. Kuraklık ve DTT stresi uygulamaları, MPa ve osmometre sonuçları

Nimet yonca çeşidi bitkilerde PEG ve DTT stresi sonucu uygulanan zaman aralıklarının da (2, 4, 8, 12, 24, 48, 96.saat) bitkilerde belirgin bir morfolojik değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Stres uygulanan bitkilerin 96.saat sonundaki görüntüsü

Yaprak su potansiyeli ölçüm değerleri farklı zaman aralıklarında, kuraklık (PEG) ve yapay ER stresi (DTT) uygulanan bitkilerde kontrole göre önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (2, 4, 8, 12, 24, 48 ve 96 saat) osmometre değerleri ortalama 300 ile 700 g/mol arasında değişim gösterirken (Çizelge 4.1); MPa değerleri ortalama 0.85–1.61 MPa arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). Gen ifadesinin anlamlı olarak yüksek oranda değiştiği zaman aralıklarında, kuraklık stresi uygulamalarında 1.61 MPa (8.saat) ortalama değer ölçülürken; DTT stresinden ortalama 1.34 MPa (8.saat) olarak belirlenmiştir.

Belirlenen bu değerler genel olarak; bitkinin strese girdiğine yönelik kabul edilen yaklaşık MPa değerleri ile (1.1–1.5 MPa) örtüşmektedir (Castroluna *et al.*, 2014).

Çizelge 4.1. Nimet yonca çeşidinde ölçülen osmometre sonuçları (g/Mol) (VAPRO)

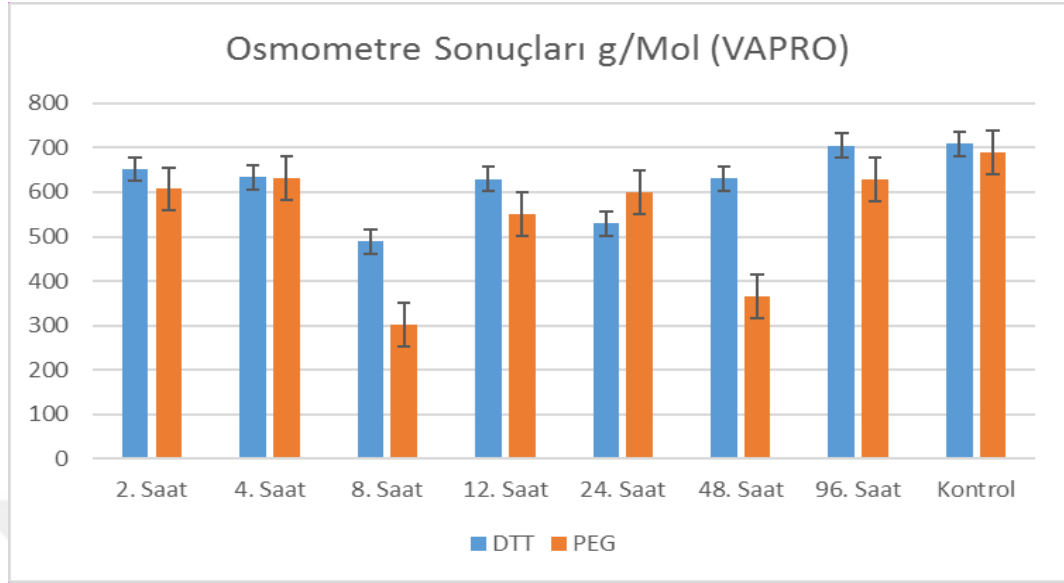
SAAT	DTT	PEG
Kontrol (0)	709,00 d	689,16 c
2.	652,00 c	607,33 bc
4.	634,00 c	631,00 bc
8.	489,66 a	301,33 a
12.	629,33 c	550,00 b
24.	529,66 b	600,66 b
48.	630,66 c	366,33 a
96.	704,33 d	628,00 bc

*Her sütundaki farklı harfler, ortalama farkın 0,05 düzeyinde önemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. Nimet yonca çeşidinde ölçülen MPa sonuçları (PMS)

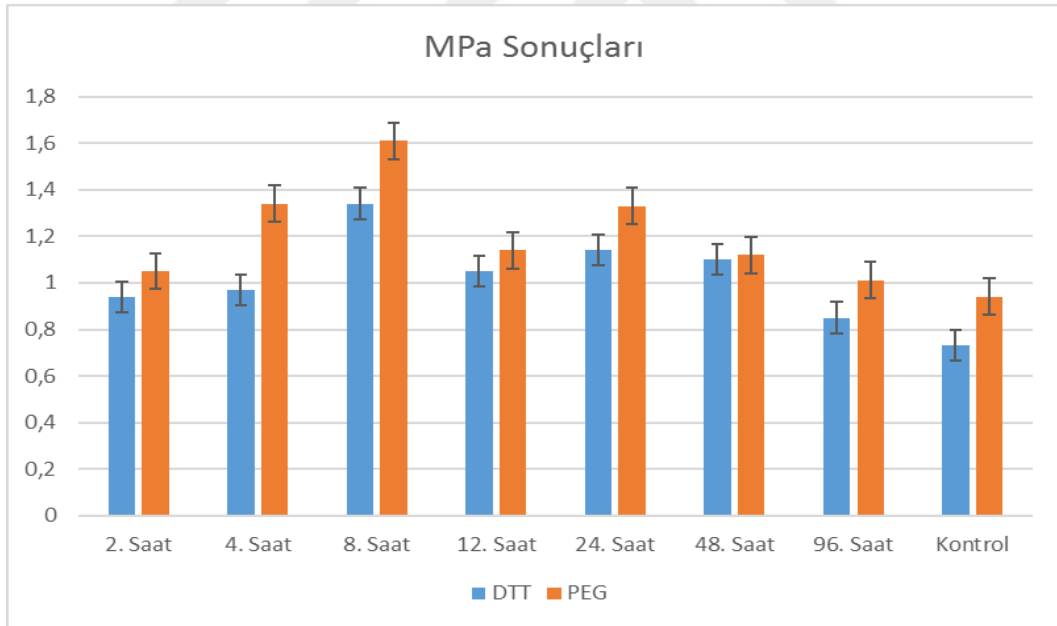
SAAT	DTT	PEG
Kontrol (0)	0,73 c	0,94 c
2.	0,94 bc	1,05 bc
4.	0,97 bc	1,34 ab
8.	1,34 a	1,61 a
12.	1,05 ab	1,14 bc
24.	1,14 ab	1,33 ab
48.	1,10 ab	1,12 bc
96.	0,85 bc	1,01 bc

*Her sütundaki farklı harfler, ortalama farkın 0,05 düzeyinde önemli olduğunu göstermektedir.



- Ortalamalara arasındaki fark 0.05 düzeyine göre gruplandırılmıştır ($p < 0.05$).
- Sonuçlar ve standart hata 3 (üç) tekrür ($n=3$) üzerinden hesaplanmıştır.

Şekil 4.2. Nimet yonca çeşidinde, osmometre sonuçlarının grafiksel gösterimi



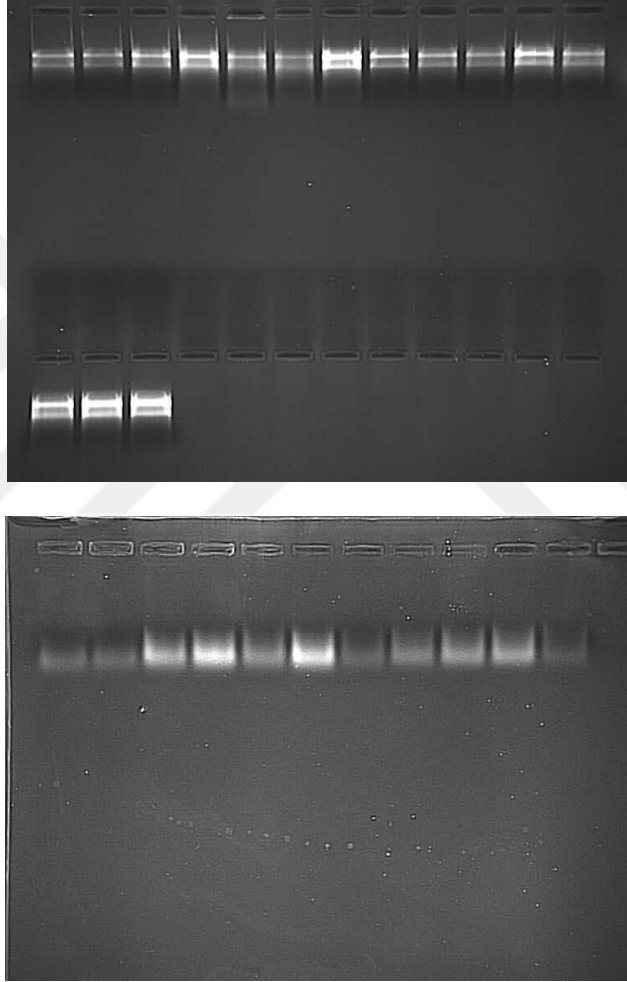
- Ortalamalara arasındaki fark 0.05 düzeyine göre gruplandırılmıştır ($p < 0.05$).
- Sonuçlar ve standart hata 3 (üç) tekrür ($n=3$) üzerinden hesaplanmıştır.

Şekil 4.3. Nimet yonca çeşidinde, MPa ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

4.2. Nükleik Asit İzolasyonu

4.2.1. RNA izolasyonu, miktar ve kalite tayini

İzole edilen RNA örnekleri %1' lik agarozda yürütülerek Nanodrop ND 1000 cihazı ile spektrofotometre ölçümleri Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6 verilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri (Şekil 4.4) ve spektrofotometrik veriler Real Time PCR analizlerinde kullanılacak kadar miktar ve saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.4. İzole edilen Nimet yonca çeşidine ait bazı RNA'ların agaroz jel (%1) görüntüsü

Çizelge 4.3. DTT stresi örneklerinden izole edilen RNA'ların spektrofometrik ölçümleri
(nanodrop sonuçları)

Örnek	ng/ μ l	260/280	260/230
2.sa. 1.yap.	247.32	2.12	1.99
2.sa. 2.yap.	132.62	2.20	1.98
2.sa 3.yap.	267.87	2.23	2.10
2.sa 1.kök	77.73	2.15	2.11
2.sa 2.kök	69.20	2.14	1.96
2.sa 3.kök	173.52	2.12	1.95
4.sa 1.yap.	91.42	2.21	1.97
4.sa 2.yap.	107.23	2.11	2.10
4.sa 3.yap.	154.12	2.10	2.08
4.sa 1.kök	120.80	2.14	1.97
4.sa 2.kök	56.32	2.21	2.01
4.sa 3.kök	76.21	2.10	2.05
8.sa 1.yap.	128.24	2.18	2.05
8.sa 2.yap.	124.93	2.17	2.09
8.sa 3.yap.	113.23	2.17	2.04
8.sa 1.kök	96.82	2.15	2.08
8.sa 2.kök	87.72	2.16	2.04
8.sa 3.kök	89.23	2.16	2.07
12.sa 1.yap.	130.41	2.17	1.98
12.sa 2.yap.	110.76	2.17	1.97
12.sa 3.yap.	105.21	2.19	2.05
12.sa 1.kök	89.51	2.12	2.09
12.sa 2.kök	93.32	2.11	2.04
12.sa 3.kök	76.11	2.14	2.08
24.sa 1.yap.	96.12	2.12	2.04
24.sa 2.yap.	134.21	2.13	2.07
24.sa 3.yap.	171.11	2.13	1.98
24.sa 1.kök	187.42	2.15	2.09
24.sa 2.kök	110.67	2.11	2.04
24.sa 3.kök	156.23	2.10	2.08
48.sa 1.yap	299.65	2.17	1.96
48.sa 2.yap.	191.57	2.13	1.95
48.sa 3.yap.	134.62	2.13	1.97
48.sa 1.kök	131.27	2.11	2.10
48.sa 2.kök	169.32	2.17	2.08
48.sa 3.kök	155.58	2.19	2.04
96.sa 1.yap	326.90	2.18	2.08
96.sa 2.yap.	198.17	2.18	1.96
96.sa 3.yap.	138.81	2.14	1.95
96.sa 1.kök	278.82	2.11	2.08
96.sa 2.kök	305.57	2.10	2.04
96.sa 3.kök	220.72	2.11	2.08

Çizelge 4.4. Kuraklık stresi örneklerinden izole edilen RNA'ların spektrofometrik ölçümleri (nanodrop sonuçları)

Örnek	ng/ µl	260/280	260/230
2.sa. 1.yap.	174.11	1.13	1.99
2.sa. 2.yap.	151.22	1.20	1.98
2.sa 3.yap.	197.87	1.23	2.10
2.sa 1.kök	98.73	1.15	2.11
2.sa 2.kök	62.20	1.14	1.96
2.sa 3.kök	53.23	1.12	1.95
4.sa 1.yap.	91.42	1.21	1.97
4.sa 2.yap.	78.23	1.11	2.10
4.sa 3.yap.	82.42	1.10	2.08
4.sa 1.kök	62.32	1.12	1.97
4.sa 2.kök	71.32	1.11	2.01
4.sa 3.kök	69.21	1.10	2.05
8.sa 1.yap.	248.21	1.12	2.05
8.sa 2.yap.	309.13	1.11	2.09
8.sa 3.yap.	206.11	1.17	2.04
8.sa 1.kök	83.12	1.15	2.08
8.sa 2.kök	165.13	1.16	2.04
8.sa 3.kök	99.41	1.16	2.07
12.sa 1.yap.	193.10	1.17	1.98
12.sa 2.yap.	186.76	1.17	1.97
12.sa 3.yap.	109.32	1.19	2.05
12.sa 1.kök	106.12	1.12	2.09
12.sa 2.kök	107.21	1.11	2.04
12.sa 3.kök	141.32	1.14	2.08
24.sa 1.yap.	72.32	1.12	2.04
24.sa 2.yap.	86.11	1.13	2.07
24.sa 3.yap.	79.92	1.13	1.98
24.sa 1.kök	68.12	1.13	2.09
24.sa 2.kök	98.63	1.11	2.04
24.sa 3.kök	123.41	1.17	2.08
48.sa 1.yap	285.62	1.21	1.96
48.sa 2.yap.	161.57	1.13	1.95
48.sa 3.yap.	96.62	1.13	1.97
48.sa 1.kök	121.27	1.11	2.10
48.sa 2.kök	120.32	1.17	2.08
48.sa 3.kök	73.58	1.19	2.04
96.sa 1.yap	236.90	1.10	2.08
96.sa 2.yap.	162.17	1.17	1.96
96.sa 3.yap.	184.11	1.13	1.95
96.sa 1.kök	164.31	1.11	2.08
96.sa 2.kök	76.57	1.17	2.04
96.sa 3.kök	89.72	1.21	2.08

4.3. Real Time PCR Analizleri

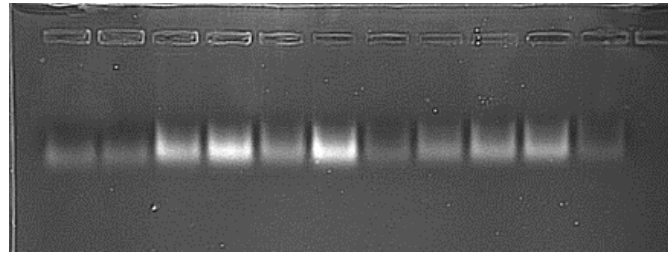
4.3.1. cDNA sentezi

Örneklerden izole edilen RNA'lerden sentezlenen cDNA'ların saflıkları Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre ile ölçülmüştür. Sentezlenen cDNA'ların miktarları (ng/μl) yaklaşık 1000 ng olarak ölçülmüştür. Diğer örneklerin ng/μl sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Ayrıca denemede Nimet yonca çeşidinden izole edilen RNA'lar kullanılarak sentezlenen bazı cDNA'ların agaroz jel (%1) görüntüsü Şekil 4.5' de verilmiştir.

Çizelge 4.5. cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri

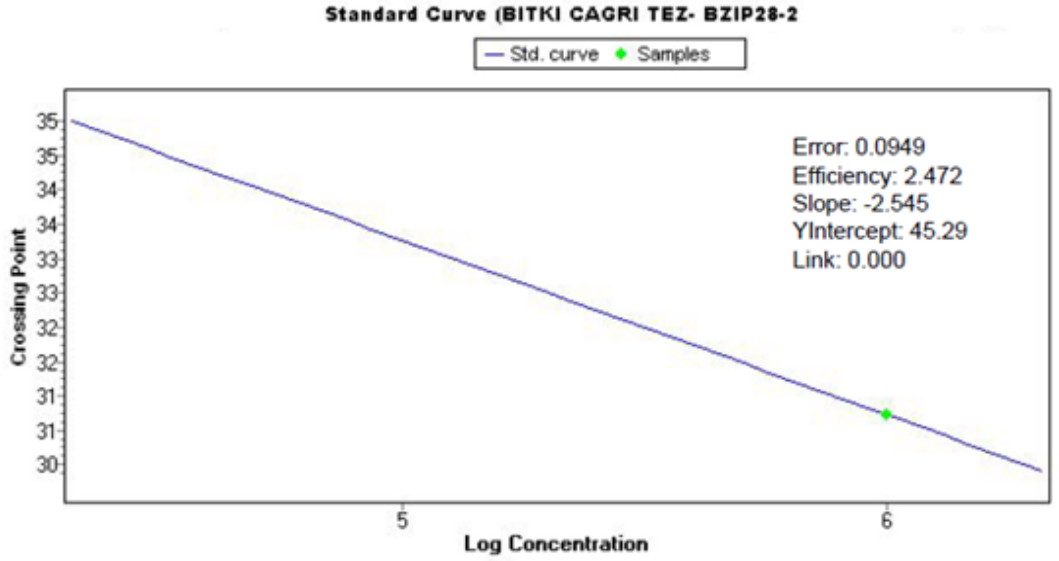
cDNA No	Örnek	ng/μl	260/280	260/230
1	DTT 2. saat	951.50	2.23	2.39
2	PEG 2. saat	900.00	2.22	2.36
3	DTT 4. saat	990.22	2.22	2.38
4	PEG 4. saat	988.23	2.23	2.12
5	DTT 8. saat	934.50	2.24	2.28
6	PEG 8. saat	921.89	2.22	2.36
7	DTT 12. saat	1005.50	2.21	2.26
8	PEG 12. saat	1024.20	2.22	1.99
9	DTT 24. saat	980.73	2.23	2.36
10	PEG 24. saat	1005.90	2.23	2.32
11	DTT 48. saat	1018.00	2.22	2.31
12	PEG 24. saat	958.89	2.22	2.36
13	Kontrol	987.21	2.23	2.31



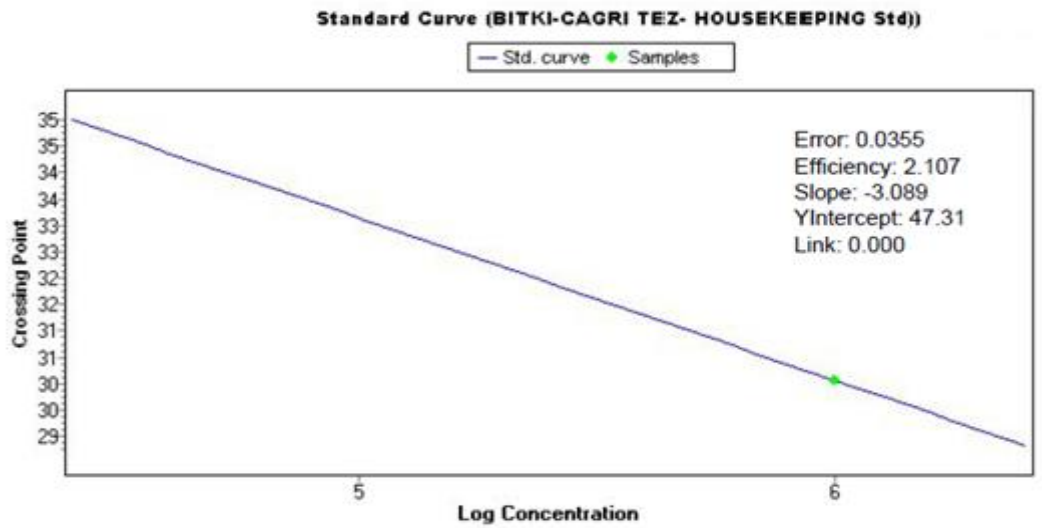
Şekil 4.5. Sentezlenen bazı cDNA'ların agaroz jel (%1) görüntüsü

4.3.2. Standart eğri (standart curve)

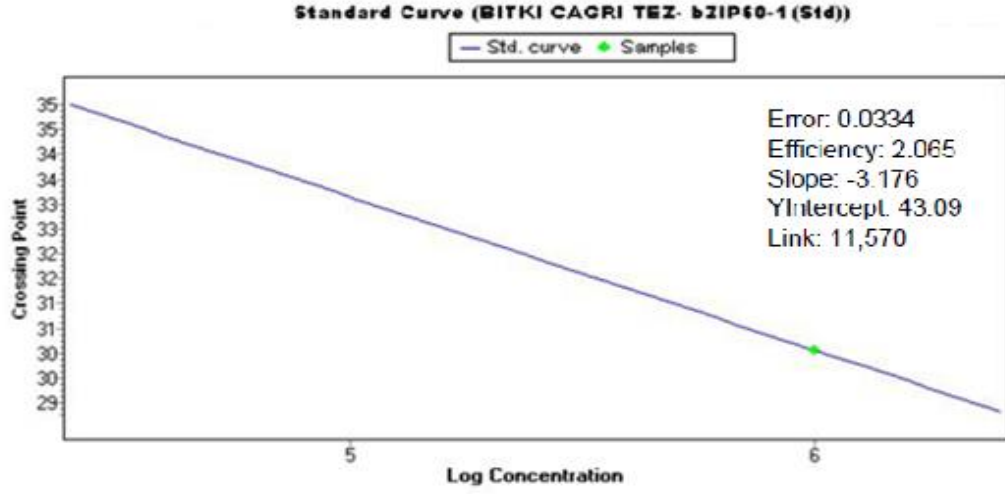
Kullanılan primerlere ait bazı standart eğri grafikleri Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve 4.8 de verilmiştir. Çizilen standart eğri grafiklerinin etkinlik değerleri ve slope değerleri uygun bulunmuştur. Kullanılan primerler için Real Time PCR reaksiyon koşullarının ve standart eğrilerin uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Real Time PCR cihazından alınan bZIP-28 primerine ait standart eğri grafiği (efficiency ve slope değerleri)



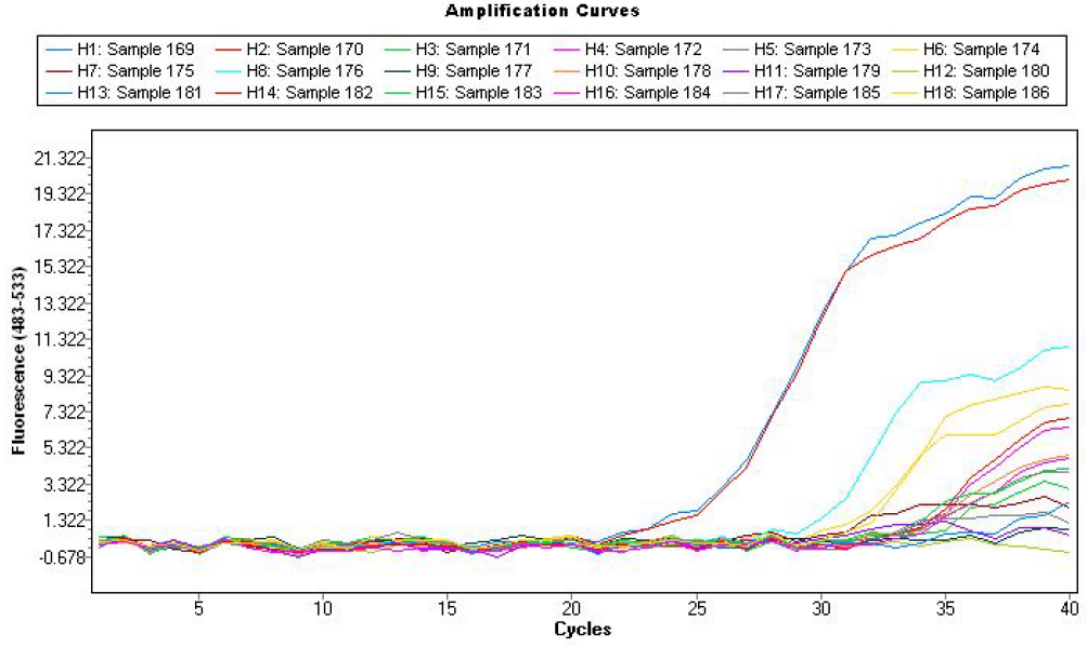
Şekil 4.7. Real Time PCR cihazından alınan housekeeping primerine ait standart eğri grafiği (efficiency ve slope değerleri)



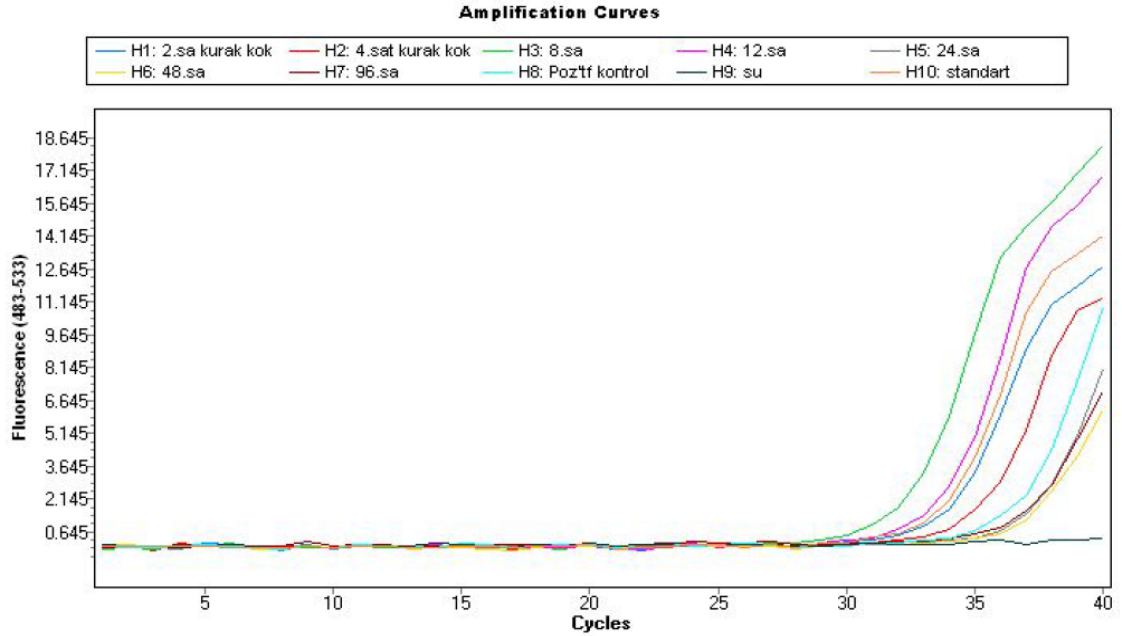
Şekil 4.8. Real Time PCR cihazından alınan bZIP-60 primerine ait standart eğri grafiği (efficiency ve slope değerleri)

4.3.3. Gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri

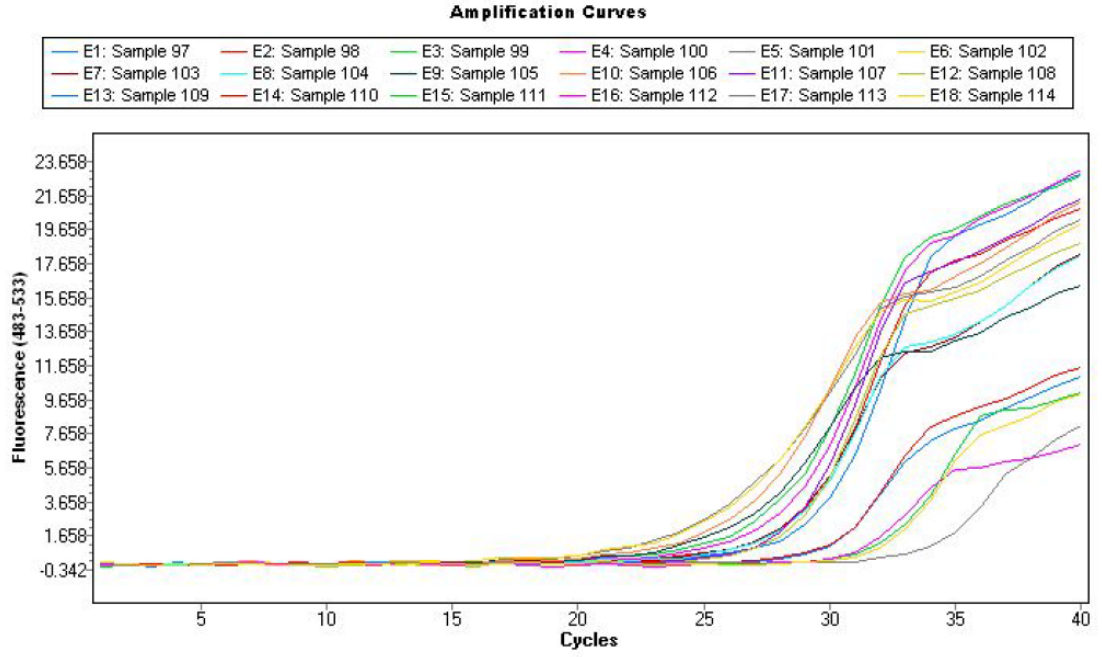
Tasarlanan primerlerin standart eğrileri ve örneklere ait 2 farklı dokunun (kök ve yaprak) amplifikasyon eğrileri Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20'de sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri 25-35. döngüler arasında elde edilmiş ve analizlerle bu Ct değerlerinin anlamlı değerler olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.



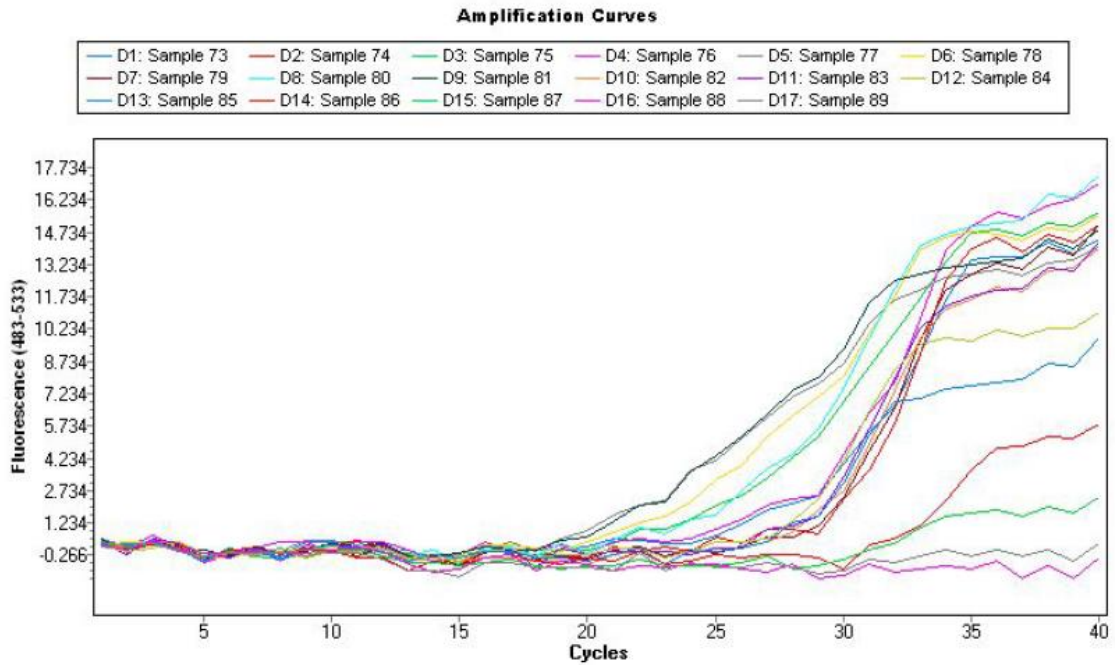
Şekil 4.9. bZIP28 primeri standardına ve PEG uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



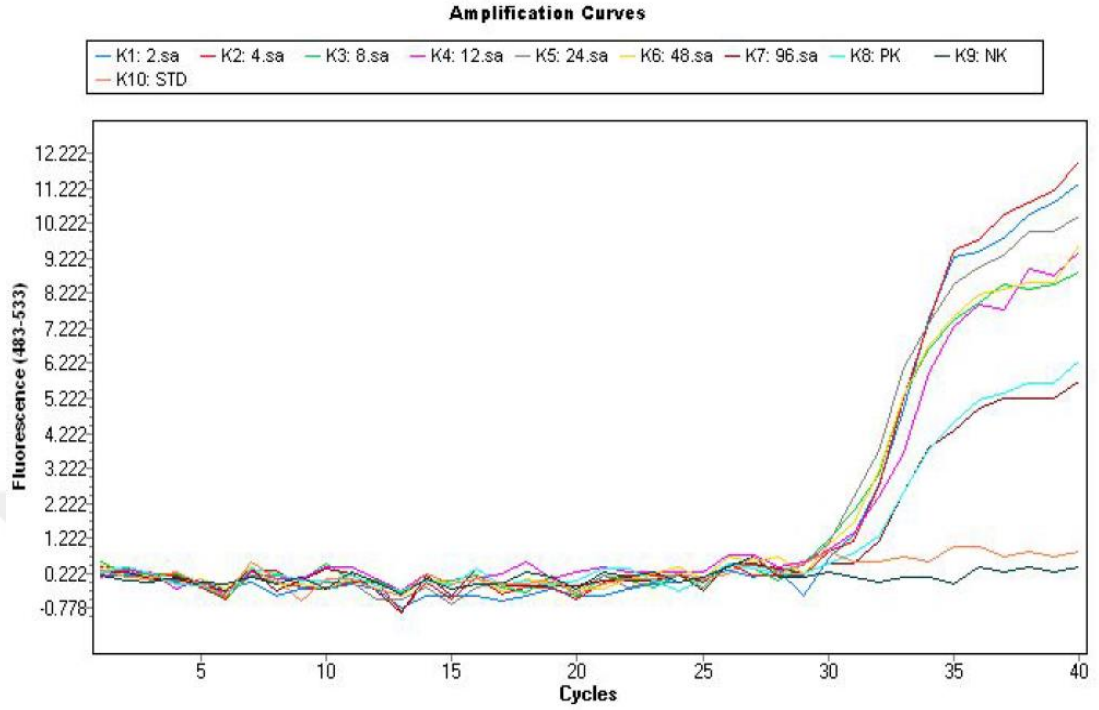
Şekil 4.10. bZIP28 primeri standardına ve PEG uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



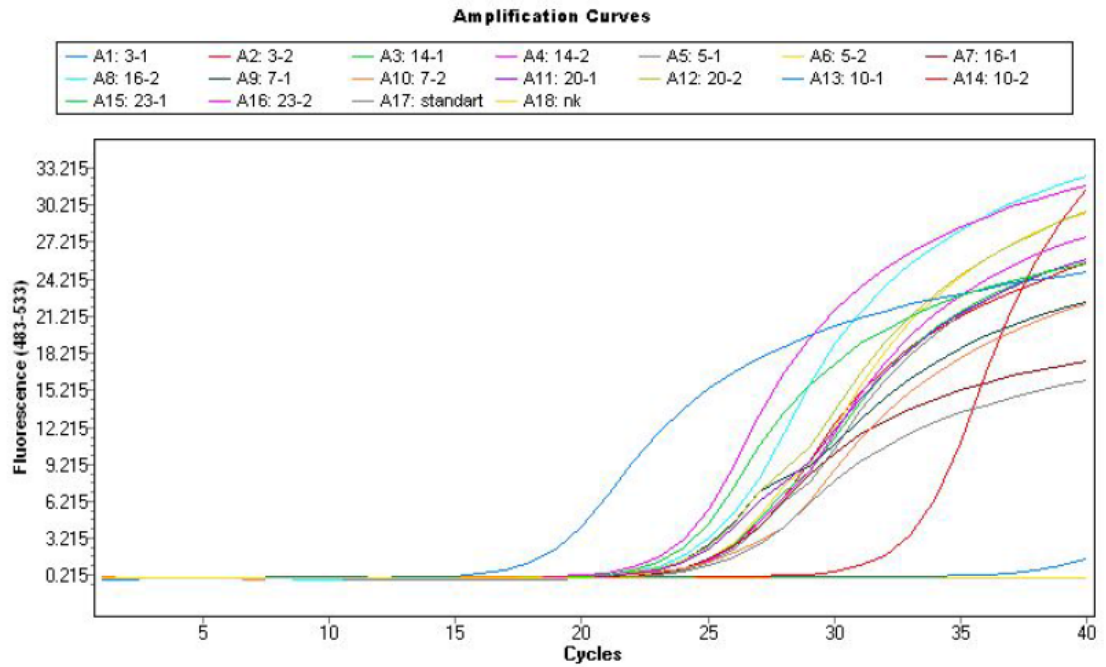
Şekil 4.11. bZIP28 primeri standardına ve DTT uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



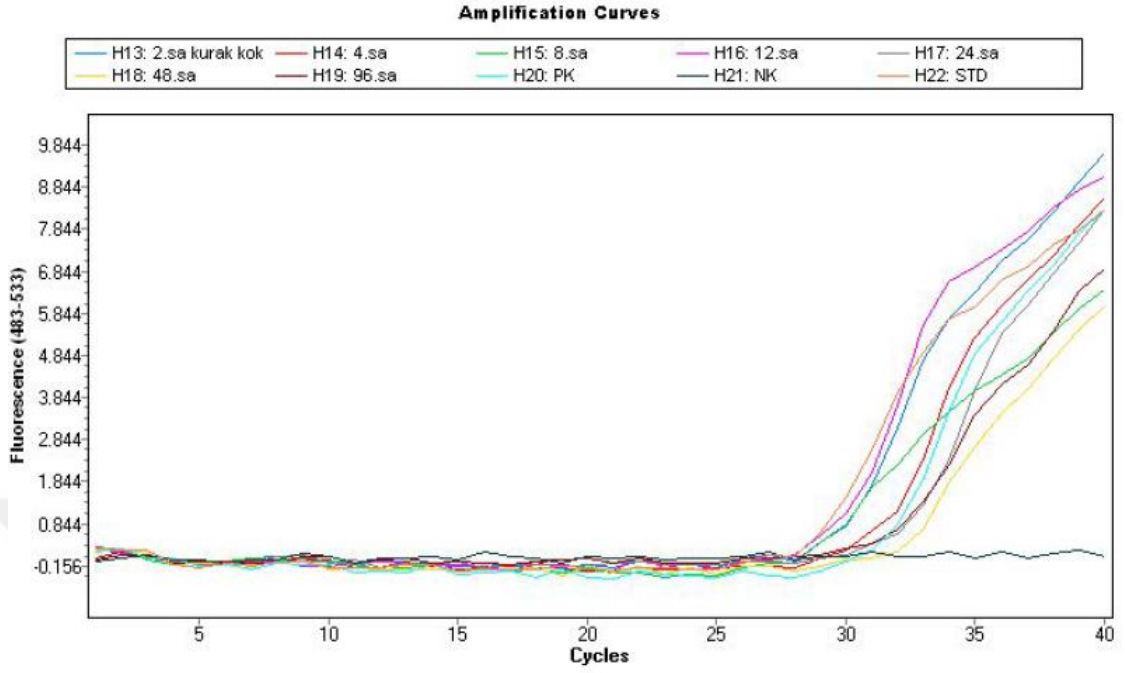
Şekil 4.12. bZIP28 primeri standardına ve DTT uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



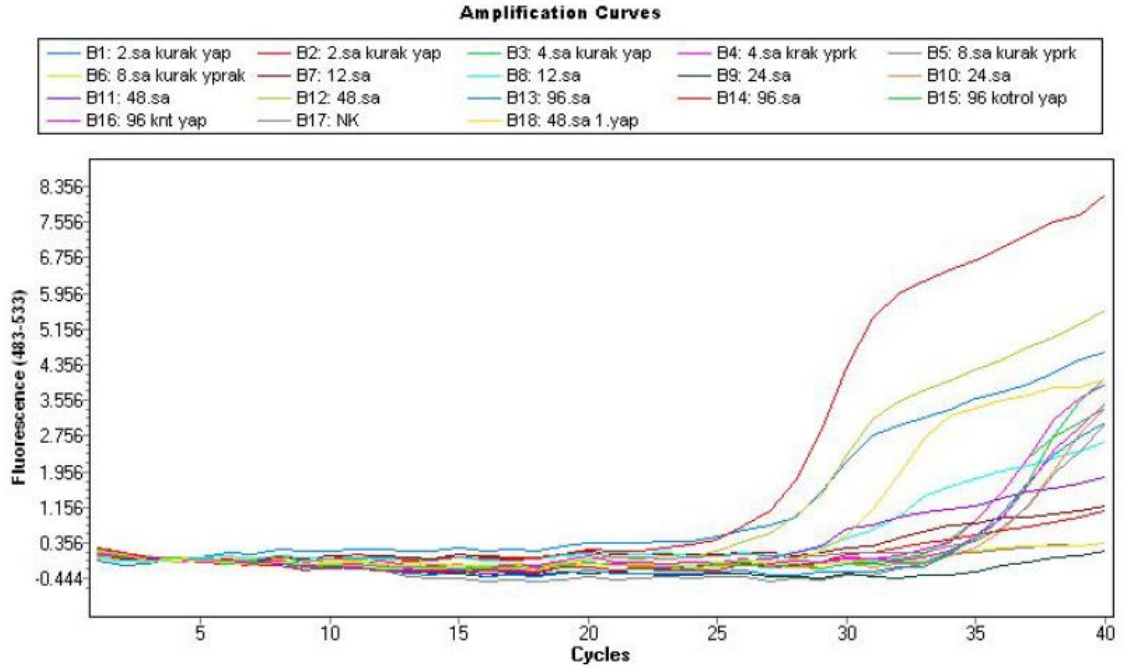
Şekil 4.13. bZIP60 primeri standardına ve DTT uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



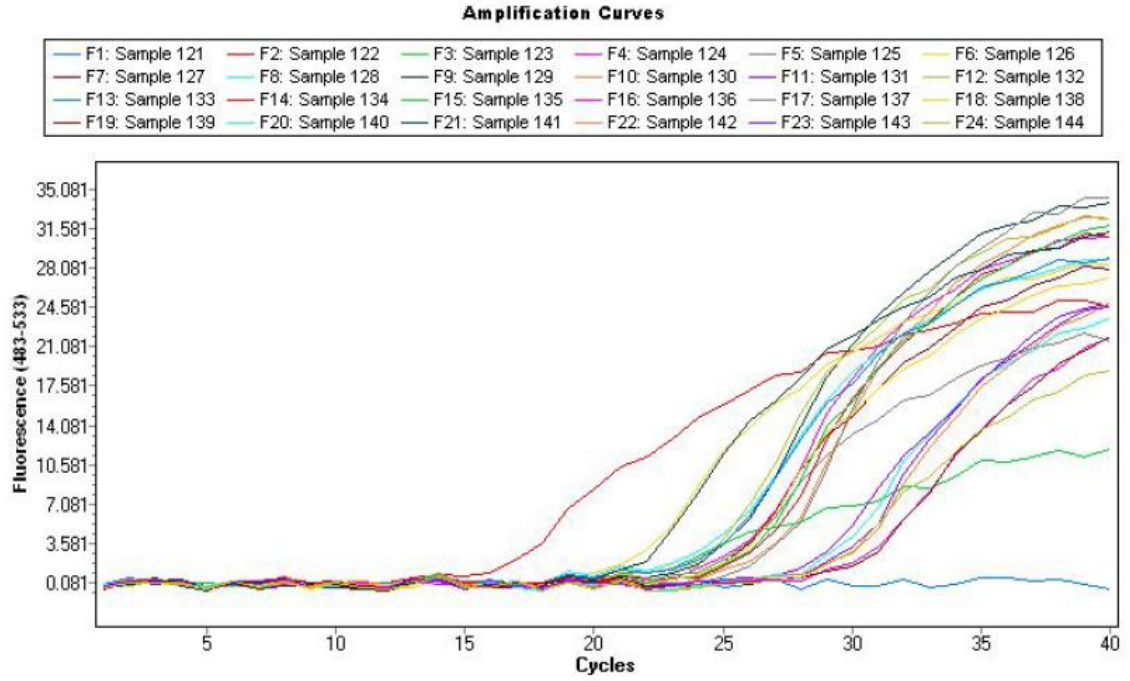
Şekil 4.14. bZIP60 primeri standardına ve DTT uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



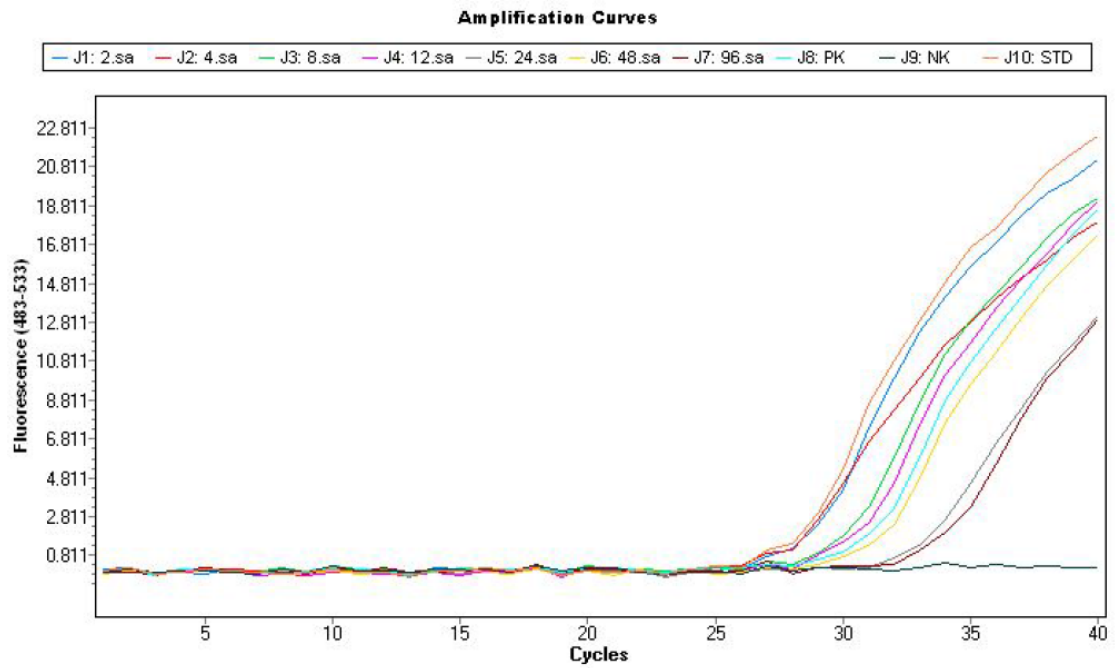
Şekil 4.15. bZIP60 primeri standardına ve PEG uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



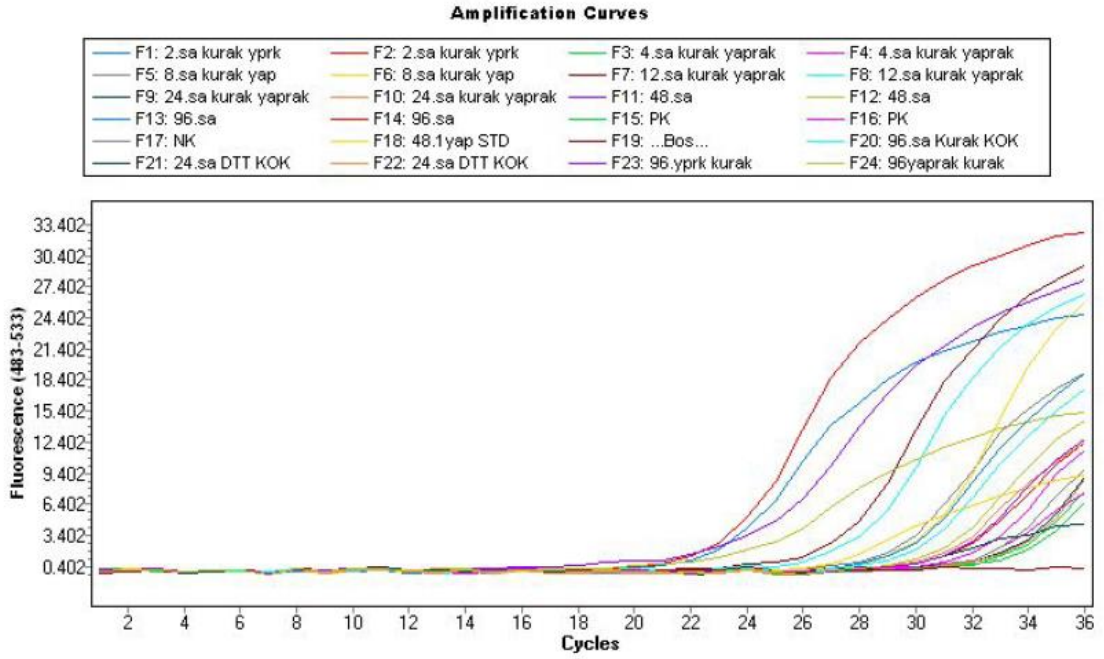
Şekil 4.16. bZIP60 primeri standardına ve PEG uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



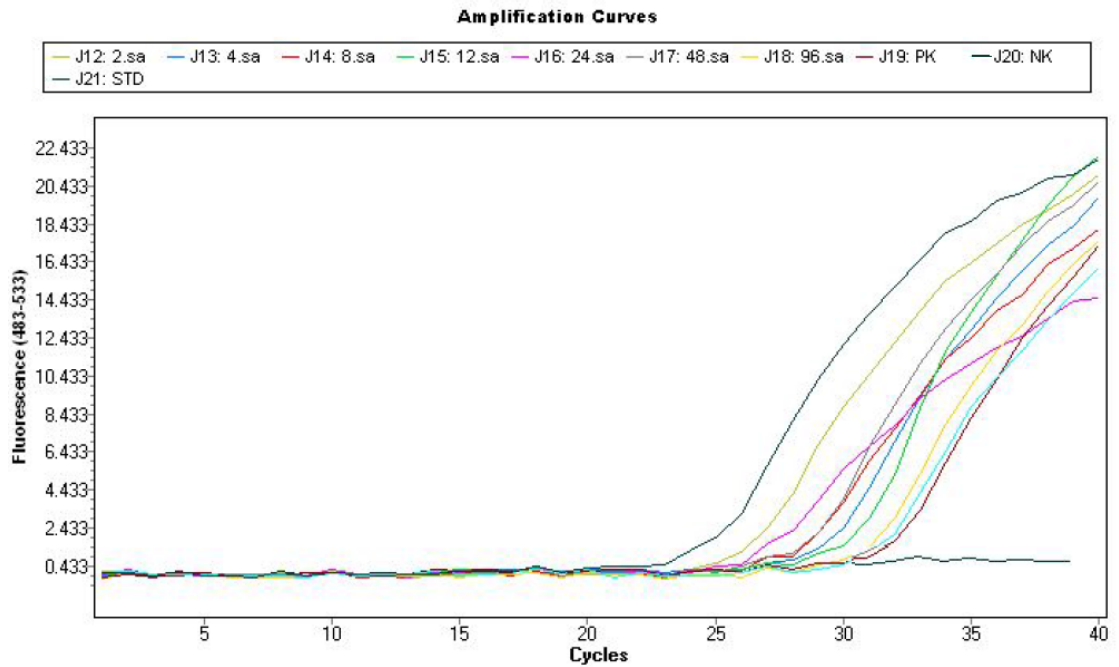
Şekil 4.17. Housekeeping primeri standardına ve DTT uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.18. Housekeeping primeri standardına ve DTT uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



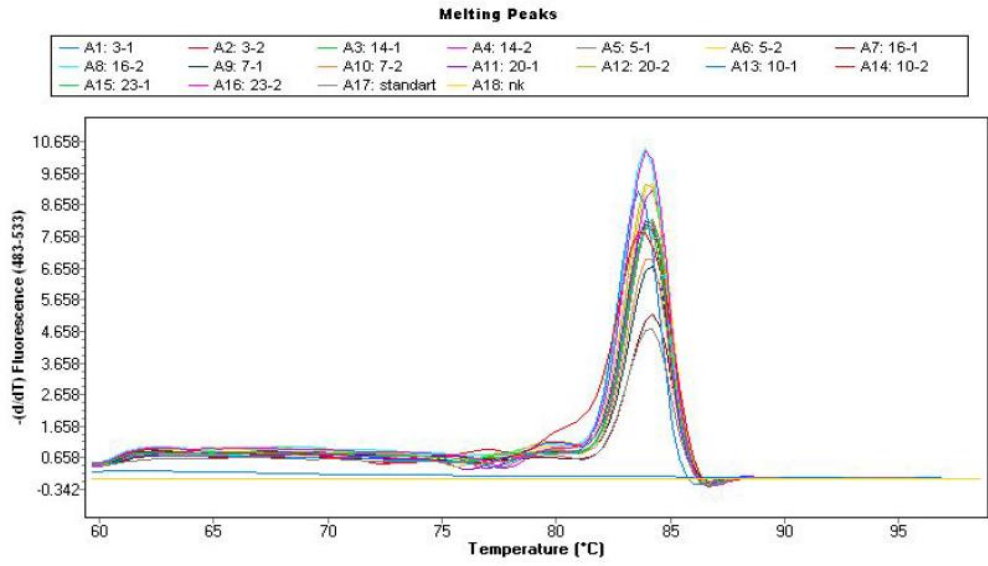
Şekil 4.19. Housekeeping primeri standardına ve PEG uygulanan yaprak örneklerine ait amplifikasyon eğrileri



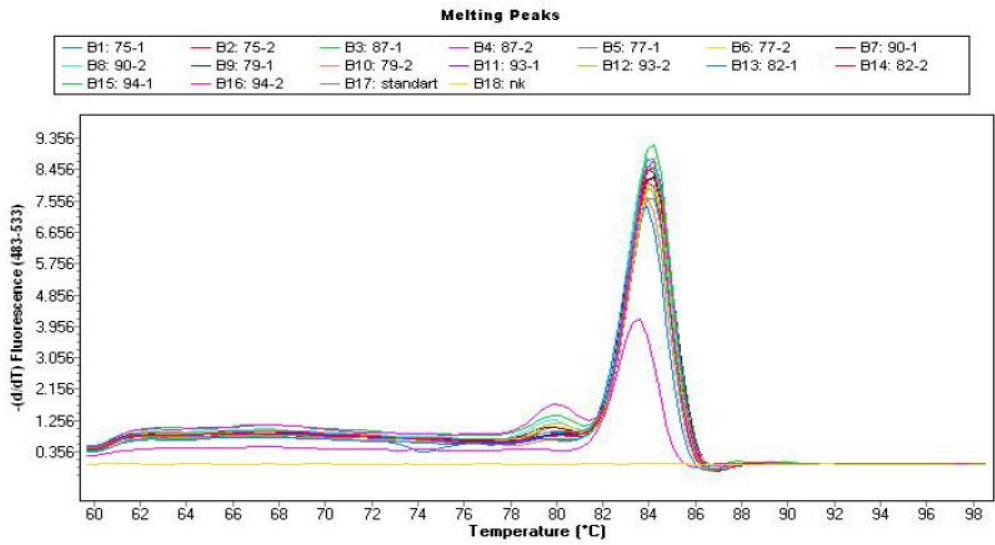
Şekil 4.20. Housekeeping primeri standardına ve PEG uygulanan kök örneklerine ait amplifikasyon eğrileri

4.3.4. Erime eğrisi (melting curve)

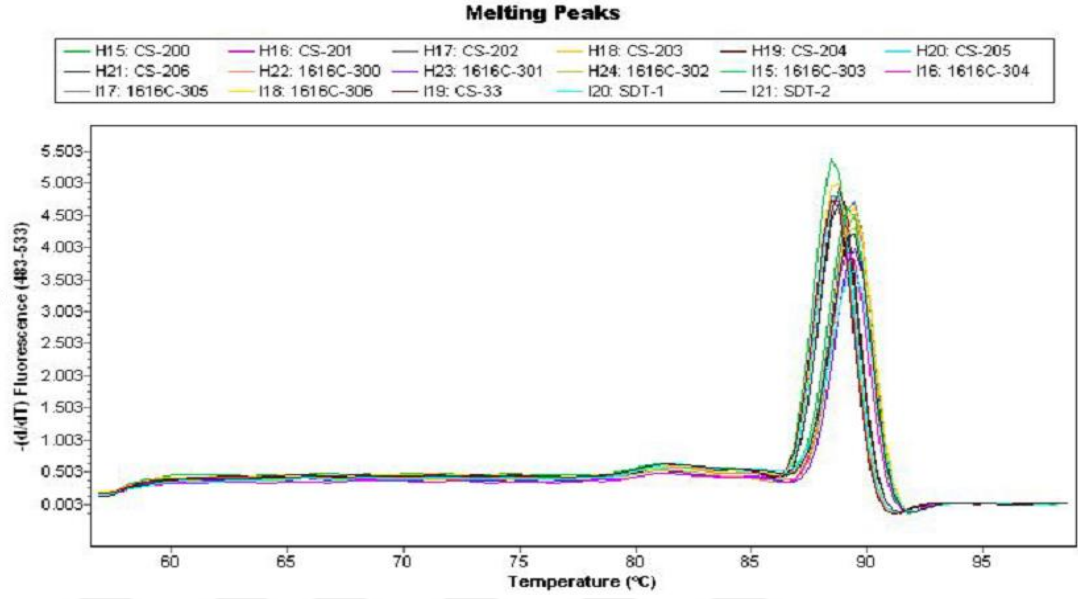
Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde erime eğrisi (melting curve) analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23.). Erime eğrisi analizlerinde üst üste çakışan tek pik görüntüleri elde edilmiş ve dimer varlığı saptanmamıştır. Erime eğrisinde farklılık olan örneklerin reaksiyonları tekrarlanmıştır.



Şekil 4.21. bZIP28 primeri standardına ve örneklerine ait erime eğrileri



Şekil 4.22. bZIP60 primeri standardına ve örneklerine ait erime eğrileri



Şekil 4.23. Housekeeping primeri standardına ve örneklerine ait erime eğrileri

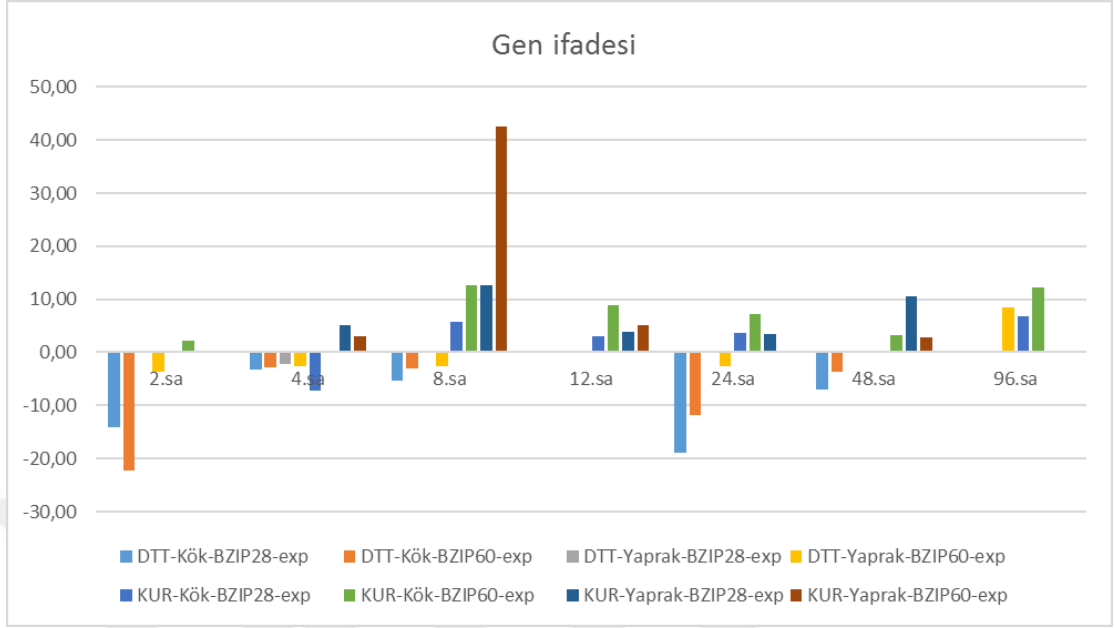
4.3.5. Real Time PCR normalize verilerinin relatif ifade analizleri

Nimet yonca çeşitinde DTT ve PEG koşullarında aktine göre normalize edilmiş (PDF2), bZIP60 ve bZIP28 primerlerine göre relatif ifade seviyeleri Çizelge 4.8, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25’ de belirtilmiştir.

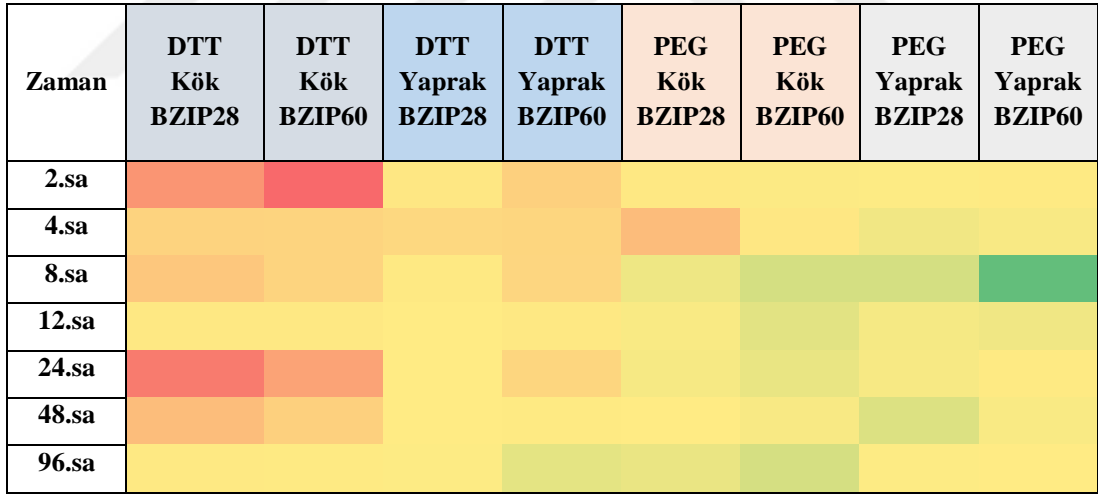
Çizelge 4.6. Nimet yonca çeşidine uygulanan DTT ve PEG stresinde bZIP28 ve bZIP60 primerlerine ait normalize verilerin relatif ifade seviyeleri (anlamli değişiklikler renkli alanlardır.)

Zaman	DTT	DTT	DTT	DTT	PEG	PEG	PEG	PEG
	Kök	Kök	Yaprak	Yaprak	Kök	Kök	Yaprak	Yaprak
	BZIP28	BZIP60	BZIP28	BZIP60	BZIP28	BZIP60	BZIP28	BZIP60
2.sa	-14,16	-22,21	Fark yok	-3,65	Fark yok	2,17	Fark yok	Fark yok
4.sa	-3,15	-2,87	-2,27	-2,63	-7,18	Fark yok	5,06	3,04
8.sa	-5,33	-2,94	Fark yok	-2,53	5,68	12,61	12,58	42,52
12.sa	Fark yok	Fark yok	Fark yok	Fark yok	2,93	8,94	3,85	5,13
24.sa	-18,90	-11,79	Fark yok	-2,60	3,66	7,13	3,51	Fark yok
48.sa	-6,96	-3,60	Fark yok	Fark yok	Fark yok	3,21	10,51	2,83
96.sa	Fark yok	Fark yok	Fark yok	8,46	6,74	12,32	Fark yok	Fark yok

* “-“ gen ifadesinin azaldığını belirtmektedir.



Şekil 4.24. Nimet yonca çeşidine uygulanan DTT ve PEG stresinde bZIP28 ve bZIP60 primerlerine ait normalize verilerin relatif ifade seviyeleri



Şekil 4.25. Nimet yonca çeşidine uygulanan DTT ve PEG stresinde bZIP28 ve bZIP60 primerlerine ait normalize verilerin relatif ifade seviyeleri (HeatMap)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında Nimet yonca çeşidinden 2, 4, 8, 12, 24, 48 ve 96 saatlik zaman aralıklarında, DTT ve PEG (kuraklık) stresi durumunda, ER stres sinyalizasyon yollarında aktif hale geçen bZIP60 ve bZIP28 genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. PDF2 housekeeping gen bölgesi ile normalizasyon sağlanmıştır. Uygulanan DTT ve PEG stres koşullarında, zaman aralıklarına bağlı olarak değişen gen ifadeleri ve kritik saat aralıkları (Gen ifadesinin anlamlı olarak yüksek oranda değiştiği zaman aralığı) PDF2 genine göre yapılan normalizasyonlar sonucunda tamamlanmıştır.

Yoncada DTT ve kuraklık (PEG) stresinin algılanmasında, ER stres sinyalizasyon yolağında bulunan ilişkili yolaklardaki genlerin ifadelerinin belirlenmesi, strese karşı toleransın belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Tarımsal ürün ve hayvansal gıda üretimi için oldukça önem taşıyan yonca yem bitkisinde bu alanda çalışma yok denecek kadar az olmakla birlikte, ER stres sinyalizasyon yolağının aktivasyonu ve bitkinin ER merkezli stres cevabına yönelik çalışmaların çoğu *Arabidopsis* model bitkisi üzerinde gerçekleştirilmektedir (Ruberti, 2014).

0.154g/L DTT içeren yapay ER stresi ortamında bitkilerde farklı dokularda, belirlenen zaman aralıklarında kontrol bitkisine göre değişen gen ifadesi seviyeleri incelendiğinde; yaprak dokusunda bZIP28 stres yolağının aktivasyonunda (gen ifadesinde) 4. saat hariç, diğer uygulama zamanları boyunca belirgin (istatistiksel açıdan önemli) bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). 4. saat zaman aralığında bZIP28'in yaprak dokusunda, kontrol bitkisine göre gen ifadesinde 2 kat azalma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Kök dokusunda bZIP28 in ifadesinin 2, 4, 8, 24 ve 48. saatlerde sırasıyla; 14, 3, 5, 18 ve 6 kat azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). 12. saat ve 96. saat aralıklarında kök dokusunda DTT uygulamasında kontrol bitkisine göre, bZIP28'in gen ifadesinde herhangi bir fark belirlenmemiştir. Bu durum bitkinin strese karşı verdiği tepki sonucu bünyesindeki su potansiyelini iyileştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Benzer şekilde 0.154 g/L DTT uygulamasında belirlenen zaman aralıklarında yaprak dokusunda bZIP60 gen ifadesi en anlamlı artış 96. saat aralığında (8 kat) olarak belirlenmiştir. DTT uygulaması yaprak dokusunda bZIP60'ın gen ifadesi 2, 4, 8 ve 24

saat zaman aralıklarında sırasıyla; 3, 2, 2, ve 2 kat azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). DTT kök dokusunda bZIP60'ın en anlamlı gen ifadesi azalışı (kontrol bitkisine göre) 2.saat de (22 kat) belirlenmiştir. Diğer zaman aralıklarında en önemli gen ifadesi azalışı 24.saat (11 kat) olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Deng *et al.* (2013), DTT' nin proteinlerde redoks koşullarını bozarak ER stresine sebep olabileceğini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada yapay ER stresi oluşturmada kullanılan DTT' nin ER stres yolağında rol alan genlerin ifadesinin azalmasına sebep olarak (engelleyerek), stres mekanizmasının aktif hale geçmesine yol açtığı belirlenmiştir. Tüm DTT uygulamalarında genel olarak gen ifadesinde azalma söz konusudur. Farklı doku (kök ve yaprak) ve stres yolaklarında (bZIP28 ve bZIP60), hedeflendiği gibi gen ifadelerindeki azalma zaman aralıklarına, dokulara ve stres yolaklarına göre değişim göstermektedir. Gen ifadelerindeki en fazla azalma bZIP28 ve bZIP60'a göre doku olarak kök de gözlemlenirken, yaprak dokusundaki gen ifadelerinde birbirine benzer sonuçlar vermiştir. bZIP28' in DTT koşullarında, yaprak dokusunda ifadesi istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$) (4.saat hariç). 12. saat zaman aralığında her iki yolda ve dokuda da fark önemsiz bulunmuştur.

DTT uygulamalarının bitkide hedeflenen genlerin ifadesinde azalmalara sebep olduğu ve bu durumun ER stres sinyalizasyon yolaklarında engellemeye yol açtığı belirlenmiştir.

DTT uygulamalarında kök dokusunda bZIP28 ve bZIP60'ın 2 ve 24 saat zaman aralığında gen ifadelerinde azalmalar oldukça fazla bulunmuştur. Bu nedenle belirtilen zaman aralıklarında, DTT stres faktörü yonca bitkisi için, kritik dönem olduğu kabul edilebilir. Diğer zaman aralıklarında ifadelerdeki değişimin az olması, bitkinin strese cevap vererek stres durumuna tolerans göstermesinden kaynaklandığı öngörülmektedir.

PEG uygulaması için bitkilerde zamana göre değişen gen ifade seviyeleri incelendiğinde, bZIP28 ve bZIP60 gen bölgesinin kök ve yaprak dokularında genellikle artan ifade gösterdiği gözlenmiştir. Paul and Kumar., 2013 tarafından çay (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) ' da farklı zamanlarda (1., 4., 24., 48. saat) yapılan PEG uygulaması sonucunda DHN gen ifadesi (bitki stres toleransı ile DHN gen ifadesi

arasında pozitif ilişki olduğu bilinmektedir) uygulamanın başladığı 1.saat itibari ile artmaya başladığı ve 24.saatte en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir.

PEG (kuraklık) uygulamasında Nimet yonca çeşidi için kontrole ve diğer saat uygulamalarına göre, bZIP28 ve bZIP60 gen bölgesinin her iki doku için (kök ve yaprak) en kritik ve gen ifadesinin istatistiksel açıdan önemli (42 kat artışı) bulunduğu saat aralığı 8. saat olarak belirlenmiştir.

PEG uygulaması sonucu bZIP28 ifadesinin kök dokusunda 8, 12, 24 ve 96 saat aralıklarında artış gösterdiği (sırasıyla; 5, 3, 3 ve 6 kat) belirlenmiştir. Yine beklendiği üzere PEG uygulaması sonucu bZIP28 ifadesinin yaprak dokusunda 4, 8, 12, 24 ve 48 saat zaman aralıklarında yaklaşık (sırasıyla) 5, 12, 3, 3 ve 10 kat arttığı belirlenmiştir. Bu durum PEG stres etmeni ile indüklenen bZIP28 aktivasyonunun kök ve yaprak dokusunda artışa sebep olduğunu göstermektedir. Değerler arasındaki farkların bitkinin strese olan cevap farkından (zaman) kaynaklandığı öngörülmektedir.

PEG kullanılarak hazırlanan kuraklık ortamlarında belirlenen zaman aralıklarında beklenen bitkilerin bZIP60 gen bölgesinin ifadesi genel olarak artış göstermiştir. En önemli artış yaprak dokusunda 8. saat zaman aralığında yaklaşık 42 kat arttığı belirlenmiştir. Kök dokusunda bZIP60 gen ifadesinin en fazla artış gösterdiği zaman aralığı yine 8. saat olarak belirlenmiştir (yaklaşık 12 kat). Bu sonuçlar istatistiksel olarak $p < 0.05$ değerinde kontrol bitkisine göre oldukça önemli bulunmuştur.

PEG uygulamasının gerçekleştirildiği zaman aralıklarında gen ifadesinde en düşük değerler 2.saat zaman aralığında (gen bölgeleri ve dokular arasında) gözlemlenmiştir ($p > 0.05$).

Her iki gen bölgesinin ifadesi (bZIP28 ve bZIP60) yonca bitkisinde 8.saat zaman aralığında hem kök hem de yaprak dokusunda önemli artış göstermiştir. Kuraklık stresi (PEG) için 8. saat kritik dönem olarak kabul edilebilir. 8. saat zaman aralığından sonra bitkinin toleransını artırmaya başlamasında, aktif hale gelen genlerin devreye girdiği kabul edilebilir.

UPR mekanizmasında yer alan bZIP28 - bZIP17, bZIP60 genlerinin kurak-tuz (Liu *et al.*, 2007b; Fujita *et al.*, 2007), yüksek sıcaklık vb. abiyotik streslere karşı ifadelerinin; soya, buğday, tütün vb. bitkilerde yürütülen çalışmalarda arttığı

belirtmiştir. Diğer bir ifade ile bitki toleransını artırmada bu genlerin devreye girdiği kanıtlanmıştır (Gao *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2011). Deng *et al.* (2013), sıcaklığın bZIP60 ifadesini artırdığını belirtmiştir. Fujita *et al.* (2007), bZIP60' ın overexpressiyon ile Arabidopsis de tuz stresine toleransı artırdığını göstermiştir.

Yapılan fizyolojik analizler sonucu elde edilen bulgulara göre (hem osmometre sonuçları hem de MPa sonuçları) 8.saat zaman aralığında bitkinin bünyesinde su potansiyelinin düşük olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu değerler genel olarak; bitkinin strese girdiğine yönelik kabul edilen yaklaşık MPa değerleri ile (1.1-1.5 MPa) örtüşmektedir (Castroluna *et al.*, 2014).

bZIP60 ve bZIP28'in ER stresi sonucu bitkinin bağışıklığının ve toleransının artırılmasında görev alması ve önemi göz ardı edilemeyecek önem taşır. ER stres sinyali ile bağışıklık sistemi ve toleransın ilişkilendirilmesine rağmen bitki toleransı üzerine farklı ER stres sinyali bileşenlerinin rolü tam olarak belirlenememiştir (Körner *et al.*, 2015).

Elde edilen Real Time PCR sonuçları, fizyolojik ön bulgular ile karşılaştırıldığında; bitkinin strese girdiği kabul edilen zaman aralığında hedeflenen genlerin ifadelerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Kuraklığın sebep olduğu ürün kayıplarının önüne geçebilmek için geliştirilecek yeni çeşit ve ıslah çalışmalarında, bu gen bölgelerinin moleküler biyoloji ve bitki biyoteknolojisi yardımıyla kültür bitkilerinde aşırı ifade ettirilerek veya bu genler susturularak strese toleranslı bitki elde edilmesi mümkündür. ER stres mekanizmasının aktivasyonunun belirlenmesi bu iş için büyük önem taşımaktadır.

Bu sonuçların ER stresi (DTT ve kuraklık stresi) çalışmalarında, ıslah araştırmalarında, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde ve aynı gen ifade seviyeleri bakımından diğer bitki türlerine yönelik araştırmalara da katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Sonuç olarak; ER stres mekanizmasına yönelik ilk tez çalışması gerçekleştirilmiştir. Kullanılan iki UPR geninden özellikle bZIP60' ın daha etkin rol aldığı ve bu genin yaprak dokusunda köke göre daha fazla ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir.

ER stresinin pozitif kontrolü olarak kullanılan DTT'nin, belirlenen iki genin işlevini azalttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla yoncanın, strese toleransını artırmada ve ER stres çalışmalarında kullanılmak üzere hedef tür oldukları kanıtlanmıştır.

Ayrıca elde edilen Real Time PCR sonuçlarına göre, iki genin bitkilerde gen düzeyinde seleksiyon yapılabileceğini göstermiştir. Osmotik stres kaynaklı bitki tolerans kayıplarına yönelik bu iki genin klonlanarak tekrar ana bitkiye aktarılmasıyla, kuraklık stresine dayanıklılığın artırılması ve iyimser transgeniklerin (bitki kökenli gen transferi) eldesi mümkün olabilecektir.



KAYNAKLAR

- Alonso, R., Oñate-Sánchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J., Droge-Laser, W., 2009. A pivotal role of the basic leucine Zipper Transcription Factor bZIP53 in the Regulation of *Arabidopsis* Seed Maturation Gene Expression Based on Heterodimerization and Protein Complex Formation. *Plant Cell*. 21,1747–1761.
- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., 2002. Plant Breeding and Water Relations in C3 Cereals. *What to Breed for Annals of Botany*. 89, 925–940.
- Bagatta, M., Pacifico, D. and Mandolino, G., 2008. Evaluation of the Osmotic Adjustment Response within the Genus Beta. *Journal of Sugar Beet Research*. 45, 119–133.
- Bakır, M., 2012. *Asma Çeşit ve Anaçlarında Kuraklık ve Tuz Stresi Toleransına Yönelik Mikrodizin Analizleri ve Stres İle İlgili Transkriptomların Tespiti*. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Banhegyi, G., Margittai E., Szarka A., Mandl J., Csala M., 2012. Crosstalk and Barriers Between the Electron Carriers of the Endoplasmic Reticulum. *Antioxid Redox Signal*, 16, 772–80.
- Bartels, D. and Sunkar, R., 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants, *Critical Reviews in Plant Science*. 24, 23–58.
- Bray, E.A., 1997. Plant Responses to Water Deficit. *Trends Plant Science*. 2, 48–54.
- Brodsky, J.L., Wojcikiewicz R.J., 2009. Substrate-specific Mediators of ER Associated Degradation (ERAD)”, *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 1–6.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., 2005. Quantitative Real-Time RT-PCR--a Perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 3, 597–601.
- Castroluna, A., Ruiz, O. M., Quiroga, A. M., Pedranzani, H. E., 2014. Effects of Salinity and Drought Stress on Germination, Biomass and Growth in Three Varieties of *Medicago sativa* L. *Advances En Investigación Agropecuaria*, 18(1), 39–50.

- Chaitanya, K. V., Jutur, P. P., Sundar, D., Reddy, A. R., 2003. Water Stress Effects on Photosynthesis in Different Mulberry Cultivars. *Plant Growth Regulation*. 40, 75–80.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis Under Drought and Salt Stress: Regulation Mechanisms From Whole Plant to Cell. *Annals of Botany*. 103, 551–560.
- Che, P., Bussell, J.D., Zhou, W., Estavillo, G.M., Pogson, B.J., Smith, S.M., 2010. Signaling From the Endoplasmic Reticulum Activates Brassinosteroid Signaling and Promotes Acclimation to Stress in *Arabidopsis*. *Science Signaling*. 3, 69.
- Chen, Y. and Brandizzi, F., 2013. IRE1: ER Stress Sensor and Cell Fate Executor. *Trends Cell Biology*. 23, 547–555.
- Çarpıcı, E.B. ve Erdel, B., 2015. Bazı yonca çeşitlerinde (*Medicago sativa* L.) Kuraklık Stresinin Çimlenme Özellikleri Üzerine Etkisi. *Derim*. 32 (2), 201–210.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.X., Srivastava, R., Rothstein, S.J., Howell, S.H., 2011. Heat Induces the Splicing by IRE1 of a mRNA Encoding a Transcription Factor Involved in the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 108, 7247–7252.
- Deng, Y., Srivastava, R., Howell S.H., 2013. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Response and Its Physiological Roles in Plants. *International Journal of Molecular Science*. 14, 8188–8212.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A., 2004. Validation of Housekeeping Genes for Normalizing RNA Expression in Real-Time PCR. *Biotechniques*. 37, 112–119.
- Di Cola, A., Frigerio, L., Lord, J.M., Roberts, L.M., Ceriotti, A., 2005. Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Ricin a Chain Has Unique and Plant-Specific Features. *Plant Physiology*. 137, 287–296.

- Fanata W.I.D., Lee, S.Y., Lee, K.O., 2013. The Unfolded Protein Response in Plants: A Fundamental Adaptive Cellular Response to Internal and External Stresses. *Journal of Proteomics*. 93, 356–368.
- Fujita, M., Mizukado, S., Fujita, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Seki, M., Matsui, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2007. Identification of Stress-Tolerance-Related Transcription-Factor Genes Via Mini-Scale Full-Length cDNA Over-Expressor (FOX) Gene Hunting System. *Biocheical Biophysical Research Communications*. 364, 250–257.
- Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B., 2004 Real-time PCR: What Relevance To Plant Studies? *Journal of Experimental Botany* 55, 1445–1454.
- Gao, H., Brandizzi, F., Benning, C., Larkin, R.M., 2008. A Membrane-Tethered Transcription Factor Defines a Branch of the Heat Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science*. USA. 105, 16398–16403.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene Quantification Using Real-Time Quantitative PCR: An Emerging Technology Hits the Mainstream. *Experimental Hematology*. 6, 503–12.
- Günel, T., 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. Bilimsel Mektup. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*. 27, 763–767.
- Hanson, A. A., Barnes, D. K., Hill, R. R. 1988. Alfalfa and Alfalfa Improvement, *The American Society of Agronomy, Monograph*. No:29 Madison, Wisconsin, USA, ISBN 0-89118-094-X.
- Hayashi, S., Wakasa, Y., Takahashi, H., Kawakatsu, T., Takaiwa, F., 2012. Signal Transduction by IRE1-Mediated Splicing of bZIP50 and Other Stress Sensors in the Endoplasmic Reticulum Stress Response of Rice. *Plant Journal*. 69, 946–956.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Quantitative Real Time PCR. *Genome Research*. 6, 986–994.

- Hollien, J., Weissman, J.S., 2006. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science*. 313, 104–107.
- Howell, S.H. 2013. “Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants”. *Annual Review of Plant Biology*. 64 (2), 1–23.
- Ingram, J. and D. Bartles, 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47, 377–403.
- Kim, C.S., Hunter, B.G., Kraft, J., Boston, R.S., Yans, S., Jung, R., Larkins, B.A., 2004. A Defective Signal Peptide in a 19-kD Alpha-Zein Protein Causes the Unfolded Protein Response and an Opaque Endosperm Phenotype in the Maize De-B30 Mutant. *Plant Physiology*. 134, 380–387.
- Koizumi, N., Martinez, I.M., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., Chrispeels, M.J., 2001. Molecular Characterization of Two *Arabidopsis* IRE1 Homologs, Endoplasmic Reticulum-Located Transmembrane Protein Kinases. *Plant Physiology*. 127, 949–962.
- Körner C. J., Du, X., Vollmer, M.E., Pajeroska-Mukhtar K.M., 2015. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Plant Immunity- At the Crossroad of Life and Death. *International Journal of Molecular Science*. 16, 26582–26598.
- Kozera, B. and Rapacz, M., 2013. Reference Genes in Real-Time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 54, 391–406.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., 2006. The Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27, 95–125.
- Lanyon, L.E. and Griffith, W.K., 1988. Nutrition And Fertilizer Use. *Agronomy*. 29, 333–372.
- Lawlor, D.W. and Tezara, W., 2009. Causes of Decreased Photosynthetic Rate and Metabolic Capacity in Water-Deficient Leaf Cells: a Critical Evaluation of Mechanisms and Integration of Processes. *Annals of Botany*. 103, 543–549.

- Lee, S.C., Choi, H.W., Hwang, I.S., Choi, S., Hwang, B.K., 2006. Functional Roles of the Pepper Pathogen-Induced bZIP Transcription Factor, CAbZIP1, in Enhanced Resistance to Pathogen Infection and Environmental Stresses. *Planta*. 224, 1209–1225.
- Lee, S.J., Kang, J.Y., Park, H.J., Kim, M.D., Bae, M.S., 2010. DREB2C Interacts with ABF2, a bZIP Protein Regulating Abscisic Acid-Responsive Gene Expression, and Its Over Expression Affects Abscisic Acid Sensitivity. *Plant Physiology*. 153, 716–727.
- Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C., Jones, J.D., 2009. Specific ER Quality Control Components Required for Biogenesis of the Plant Innate Immune Receptor EFR. *Proceeding of the National Academy of Science*. USA, 106, 15973–15978.
- Liu, J.X. and Howell, S. H., 2010. Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control and Its Relationship to Environmental Stress Responses in Plants. *The Plant Cell*. Vol. 22, 2930–2942.
- Liu, J.X., Srivastava, R., and Howell, S.H., 2008. Stress-Induced Expression of an Activated Form of AtbZIP17 Provides Protection From Salt Stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment*. 31, 1735–1743.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H., 2007a. An Endoplasmic Reticulum Stress Response in *Arabidopsis* is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *Plant Cell*. 19, 4111–4119.
- Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P., Howell, S.H., 2007b. Salt Stress Responses in *Arabidopsis* Utilize a Signal Transduction Pathway Related to Endoplasmic Reticulum Stress Signaling. *Plant Journal*. 51, 897–909.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulias, J., Flexas, J., 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany*. 89, 895–905.

- Mishiba, K., Nagashima, Y., Suzuki, E., Hayashi, N., Ogata, Y., Shimada, Y., Koizumi, N., 2013. Defects in IRE1 Enhance Cell Death and Fail to Degrade mRNAs Encoding Secretory Pathway Proteins in the *Arabidopsis* Unfolded Protein Response. *Proceeding of the National Academy of Science*. USA. 110, 5713–5718.
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., Kimura, K., 2005. Recovery Responses of Photosynthesis, Transpiration, and Stomatal Conductance in Kidney Bean Following Drought Stress. *Environmental and Experimental Botany*. 53, 205–214.
- Monis, P.T., Giglio, S., Saint, C.P., 2005. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for Real-Time Polymerase Chain Reaction and Investigation of The Effect of Dye Concentration on Amplification and DNA Melting Curve Analysis. *Analytical Biochemistry*. 340, 24–34.
- Moreno, A.A., Mukhtar, M.S., Blanco, F., Boatwright, J.L., Moreno, I., Jordan, M.R., Chen, Y., Brandizzi, F., Dong, X., Orellana, A., 2012. IRE1/bZIP60-Mediated Unfolded Protein Response Plays Distinct Roles in Plant Immunity and Abiotic Stress Responses. *PLoS One*. 7, 2–6.
- Morrison, T.B. *et al.*, 1998. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR[®] Green Monitoring during Amplification. *BioTechniques*. 24, 954–962.
- Munns, R. and Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance Annu. Rev. *Plant Biology*. 59, 651–681.
- Nijhawan, A., Jain, M., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., 2008. Genomic Survey and Gene Expression Analysis of the Basic Leucine Zipper Transcription Factor Family in Rice. *Plant Physiology*. 146, 333–350.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA Using Real-Time RT-PCR. *Nature Protocols*. 3, 1559–82.
- Paul, A. and Kumar, S., 2013. Dehydrin 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*. 40(5), 3859–63.

- Pfaffl, M.W., 2001 A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Researcher*.1, 29(9).
- Putnam, D., Russelle, M., Orloff, S., Kuhn, J., Fitzhugh, L., Godfrey, L., Kiess, A., Long, R. 2001. Alfalfa, Wildlife, and the Environment: The Importance and Benefits of Alfalfa in the 21st Century. *California Alfalfa and Forage Association 36 Grande Vista*. Novato, CA 94947.
- Ruberti, C. and Brandizzi, F. 2014. Conserved and plant-unique strategies for overcoming endoplasmic reticulum stress. *Front. Plant Science*. 5, 69.
- Saijo, Y., Tintor, N., Lu, X., Rauf, P., Pajerowska-Mukhtar, K., Haweker, H., Dong, X., Robatzek, S., Schulze-Lefert, P., 2009. Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *EMBO Journal*. 28, 3439–3449.
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A.G., Howell, S.H., 2013. Binding Protein is a Master Regulator of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor/Transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25, 1416–1429.
- Sun, L., Yang, Z.T., Song, Z.T., Wang, M.J., Sun, L., Lu, S.J., Liu, J.X., 2013. The Plant-Specific Transcription Factor Gene NAC103 is Induced by bZIP60 Through a New Cis-Regulatory Element to Modulate the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 76, 274–286.
- Suttie, J.M., 2000. Hay Crops-Legumes And Pulses. In: Hay and Straw Conservation-For Small- Scale Farming and Pastoral Conditions. *FAO Plant Production and Protection Series*. No. 29,2.
- Tohidfar, M. Zare, N., Jouzani G.S., Eftekhari S.M., 2013. Agrobacterium-Mediated Transformation of Alfalfa (*Medicago sativa*) Using a Synthetic cry3a Gene to Enhance Resistance Against Alfalfa Weevil. *Plant Cell Tiss Organ Cultivar*. 113, 227–235.
- TUİK, 2017. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. Erişim Tarihi (13.05.2017).

- Valente, M.A., Faria, J.A., Soares-Ramos, J.R., Reis, P.A., Pinheiro, G.L., Piovesan, N.D., Morais, A.T., Menezes, C.C., Cano, M.A., Fietto, L.G., 2009. The ER luminal binding protein (BIP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. **Journal of Experimental Botany**. 60, 533–546.
- Van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J.J., 2003. Detection of Minimal Residual Disease in Hematologic Malignancies by Real-Time Quantitative PCR: Principles, Approaches, and Laboratory Aspects. *Leukemia*. 17, 1013-34.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M., Dong, X., 2005. Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*. 308, 1036–1040.
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., Ron, D., 1998. Cloning of Mammalian IRE1 Reveals Diversity in the ER Stress Responses. *Embo Journal*. 17, 5708–5717.
- Widyati, S.S., Anwar, S., Widjajanto, D.W., 2012. Growth With of Alfalfa Mutant In Different Nitrogen Fertilizer and Defoliation Intensity. *International Journal of Science And Engineer* Vol. 3(2), 9–11.
- Zhang, H.E., Huang, Qi-man and Jin, S.U., 2010. Development of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Regeneration System and *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Agricultural Sciences in China*. 9(2), 170–178.
- Zhang, W.J. and Wang T., 2015. Enhanced Salt Tolerance of Alfalfa (*Medicago sativa*) by *rstB* Gene Transformation. *Plant Science*. 234, 110–118.
- Zhu, J. K., 2001. Plant Salt Tolerance. *Trends in Plant Science*. 6(2),66–71.

ÖZGEÇMİŞ

23.04.1991 tarihinde Manisa’da doğdu. İlköğretim, ortaöğretim ve lise öğrenimini Iğdır’da tamamladı. 2009 yılında Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde başladığı yükseköğrenimini 2013 yılında tamamladı. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında başladığı Yüksek Lisans eğitimini yarıda bırakarak; 2015 yılında Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Ankara Üniversitesi Tarbiyotek Laboratuvarında ve 2014 yılında Ankara Şeker Fabrikasında bursiyer öğrenci olarak çalışmıştır. 2015 yılından itibaren Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarında bursiyer öğrenci olarak çalışma hayatını devam ettirmektedir.