

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA KURAKLIK STRESİ
DAYANIKLILIĞI İLE İLİŞKİLİ DNA MARKÖRLERİN BELİRLENMESİ**

Emine AÇAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Emine AÇAR tarafından hazırlanan “Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.)’da Kuraklık Stresi Dayanıklılığı İle İlişkili DNA Markörlerin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Turgay ÜNVER

Jüri Üyeleri :

Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ

Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA KURAKLIK STRESİ DAYANIKLILIĞI İLE İLİŞKİLİ DNA MARKÖRLERİN BELİRLENMESİ

Emine AÇAR

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Turgay ÜNVER

Dünyada yaygın olarak üretilen ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.), önemli bir protein, vitamin ve mineral kaynağı olmasının yanı sıra kompozisyonu ile insanların kalori tüketiminin %20’sini karşılamakta ve dünya nüfusunun % 35’ini kapsayan yaklaşık 40 ülkenin temel gıda maddesini oluşturmaktadır. Buğday üretimi yapılan arazilerin büyük bir kısmı, kuraklık ve yüksek sıcaklık streslerine maruz kalmakta, bu durum tarımsal ürünlerin verimini ve kalitesini önemli derecede düşürmektedir. Temel besin kaynakları arasında yer alması, olumsuz koşulların verim ve kaliteyi düşürmesi buğday tarımının önemini arttırmış, olumsuz çevre koşullarına dayanıklı çeşit ıslahını zorunlu kılmıştır. Bu tez çalışmasında 11 ekmeklik buğday çeşidinin, kuraklığa dayanıklılık bakımından filogenetik yakınlıkları 26 SSR markörleri ile belirlenmiştir. Ayrıca seçilen çeşitlere sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık stresi uygulanmış, çeşitlere ait yaprak ve kök dokularında WRKY, çinko parmak proteini (bZIP) transkripsiyon faktörleri (TF) ile ısı şoku proteini (HSP) ailesine ait bazı üyelerin gen ifade seviyelerindeki değişimler Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PCR) ile ölçülmüştür. Dayanıklı Zubkov çeşidinde ait dokularda WRKY ve HSP gen ifade seviyesinde önemli artışlar görülmüş, hassas Atay 85 ve orta dayanıklı Karahan 99 çeşitlerine ait dokulardaki ifade seviyesi artışı daha düşük olarak görülmüştür. Zubkov çeşidinde ait yaprak dokularında ve Atay 85 çeşidinde ait kök dokularında bZIP TF ailesine ait üyelerin gen ifade düzeyinde dokuya özgü anlamlı artışlar görülmüştür. Bu çalışma ile sıcaklık ve kuraklık streslerine tolerant veya hassas olduğu bilinen buğday çeşitlerinde WRKY, bZIP ve HSP gen ailelerine ait bazı üyelerin gen ifadelerinin çeşide ve dokuya özgü değişebilmektedir. Kuraklıkla ilişkili genetik karakterizasyonları SSR markörleri ile belirlenmiş ve gen ifade analizleri ile desteklenmiştir. Sonuç olarak Zubkov çeşidinin uygulanan tüm stres koşullarına dayanıklı olduğu ve ıslah çalışmaları için başarılı bir aday olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur.

2016, 99 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: bZIP, gen ifade seviyeleri, HSP, SSR, WRKY

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF DNA BASED MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH DROUGHT TOLERANS IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.)

Emine AÇAR

Çankırı Karatekin University
Institute of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Turgay UNVER

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.), is an important plant grown worldwide as a source of protein, vitamins and minerals. It supplies the 20% of human calories and 35% of the world population including 40 countries used it as a basic dietary. Most of the areas in which wheat planted expose to drought and heat stresses which lead to reduce in yield efficiency and quality of wheat. Therefore the agriculture and breeding of wheat against unfavorable environmental conditions is getting more important due to being a basic dietary. In this study, genetic characterization among 11 bread wheat varieties was determined using 26 SSR markers. Further, some members of WRKY, zing finger protein (bZIP) transcription factors (TFs) and heat shock proteins (HSPs) gene expression levels were measured in leaf and root tissues in three varieties that exposed to heat, drought, both heat and drought with quantitative real time PCR (qRT-PCR). Whereas significant gene expression induction was detected in WRKY and HSP in resistant Zubkov, the expression levels were lower in susceptible Atay 85 and moderate resistant Karahan types. All the members of bZIP TFs revealed higher expression in leaf tissues of Zubkov and root tissues of Atay 85. As a result of this study, some members of WRKY, bZIP and HSPs showed tissue- or variety-specific gene expression patterns in resistant or susceptible types. The genetic characterization associated with drought was performed via SSR molecular markers and validated with the gene expression analysis. Consequently, Zubkov was found to be resistant in both stress conditions and demonstrated that it can be a successful candidate for breeding systems.

2016, 99 pages

Key Words: bZIP, gene expression, HSP, SSR, WRKY

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimin boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, çalışmalarında olumlu yönde ilerlememi sağlayan, disiplin ile çalışma azmini öğrenmeme vesile olan, akademik olarak ilerlememe öncülük eden, gösterdiği sabır ve hoşgörüsü ile her an yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca fikir ve deneyimleri ile yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarımın manevi desteği ve olumlu eleştirileri ile yanımda olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarıma katkı ve desteklerinden dolayı Dr. Güray AKDOĞAN'a, bitkilerin yetiştirtmesinde yardımını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Arif İPEK'e, değerli fikirleri ve manevi desteği ile yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Behcet İNAL'a, olumlu eleştirileri ve yardımları ile her an yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Ebru DERELLİ TÜFEKÇİ'ye, bilimsel çalışmalara ilgi duymama vesile olan, manevi desteği ile yanımda olan Doç. Dr. Sadin ÖZDEMİR'e, Doç. Dr. Osman KARABACAK'a ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emre EREZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürüttüğüm çalışmalarda desteğini esirgemeyen Ümmügülüm TANMAN ZIPLAR'a, Günseli BABAOĞLU'na, Öğretim Görevlisi Esmâ ÖZHÜNER'e, Yağız ALAGÖZ ve Yusuf PEKMEZCİ'ye teşekkür ederim. Tüm yaşantım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, hayata bakışımı şekillendiren başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması F12035L16 nolu proje ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler (BAP) Birimi ve 1130016 nolu proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Emine AÇAR
Çankırı, Mayıs 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1 Ekmeklik Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.) ve Önemi	5
2.2 Markör Destekli Seleksiyon (MAS).....	7
2.3.2 Isı şok proteinleri	17
2.3.2.1 HSP70 proteinleri.....	18
2.3.4 Transkripsiyon faktörleri.....	21
2.3.4.1 WRKY tipi transkripsiyon faktörleri	22
2.3.4.2 bZIP tipi transkripsiyon faktörleri	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1 Materyal	27
3.2 Yöntem	30
3.2.1 Buğday çeşitlerinin SSR markörler ile taranması	30
3.2.1.1 Buğday çeşitlerinin ekimi ve yetiştirilmesi	30
3.2.1.2 Buğday materyallerinin toplanması	31
3.2.1.3 Materyallerin genomik DNA izolasyonu için hazır hale getirilmesi	31
3.2.1.4 Genomik DNA izolasyonu	31
3.2.1.5 PZR reaksiyonları (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	33
3.2.1.6 Analiz.....	34
3.2.2 Çeşitlere ait HSP70 proteinlerinin bazı üyelerinin ve bZIP, WRKY TF'lerinin bazı üyelerinin gen ifade seviyelerinin belirlenme.....	35
3.2.2.1 Stres uygulamaları	35
3.2.2.2 Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi	36
3.2.2.3 Bitkilerin büyütülmesi	36
3.2.2.4 Bitkilere stres uygulanması	37
3.2.2.5 Çeşitlere ait doku örneklerinin toplanması	38
3.2.2.6 Total RNA izolasyonu	38
3.2.2.7 İzole edilen RNA örneklerine ait kalitatif ve kantitatif ölçümler	39
3.2.2.8 İzole edilen RNA örneklerinin yıkanması.....	39
3.2.2.9 cDNA sentez aşaması	40
3.2.2.10 Primer optimizasyonu.....	42
3.2.2.11 Gerçek zamanlı RT-PZR (Real Time PZR/ qRT-PZR)	42
4. BULGULAR	45
4.1 Filogenetik Analizlere Ait Bulgular.....	45
4.1.1 Buğday çeşitlerine ait DNA izolasyon sonuçları.....	45
4.1.2 PZR reaksiyonlarına ait sonuçlar.....	46
4.1.3 Kullanılan markörlerin kromozom lokasyonlarının ve motiflerinin belirlenmesi	48
4.1.4 Filogenetik analizler ve sonuçları	49
4.2 Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular.....	51

4.2.1 Bitki materyallerinin yetiştirilmesine ait sonuçlar	51
4.2.2 Bitkilerin stres uygulamalarına ait sonuçlar	51
4.2.3 Bitki materyalleri ve depolama.....	53
4.2.4 RNA izolasyonuna ait sonuçlar.....	54
4.2.5 Gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	55
4.2.5.1 WRKY transkripsiyon faktörlerinin gen ifade seviyeleri	56
4.2.5.2 bZIP transkripsiyon faktörlerinin gen ifade seviyeleri	61
4.2.5.3 HSP70 proteinlerine ait gen ifade seviyeleri.....	67
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	70
5.1 Buğday Çeşitlerinin Filogenetik Yakınlığı.....	70
5.2 Abiyotik Stres Sonrasında Çeşitlere Ait HSP, bZIP, WRKY TF'lerin Gen İfade Seviyeleri.....	73
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ.....	99



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bp	Baz çifti
dk	Dakika
M	Molarite
Mb	Mega baz çifti
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
°C	Celsius
pmol	Pikomol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
A	Absorbans değeri

Kısaltmalar

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
CAPS	Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	Deiyonize su
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asit
ISSR	Basit Ara Dizi Tekrarları
mRNA	Mesajcı RNA
NTC	Negatif kontrol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SCAR	Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
RNA	Ribonükleik asit
SSR	Basit Dizi Tekrarları
STS	Dizisi Etiketlenmiş Bölge
TBE	Tris-Borik asit-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Türkiye’de buğday üretimi yapılan bölgeler.....	6
Şekil 2.2 Türkiye’de hububat üretimine ait pasta grafiği.....	6
Şekil 2.3 Yüksek sıcaklık stresinin bitkide neden olduğu değişimler.....	15
Şekil 2.4 Çeşitli stres koşullarında HSP proteinlerinde meydana gelen değişimlerin sinyal iletim mekanizması.....	19
Şekil 2.5 WRKY transkripsiyon faktörünü protein konformasyonuna ait görünüm	23
Şekil 2.6 bZIP transkripsiyon faktörünün yapısına ait bölgelerin genel bir görünümü	24
Şekil 2.7 bZIP ve WRKY transkripsiyon faktörlerinin stres veya savunma durumuna ait sinyal yolları.....	26
Şekil 4.1 Çeşitlere ait genomik DNA örneklerinin jel görüntüsü	45
Şekil 4.2 Elektroforez işlemi sonrasında alınan jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.3 Elektroforez işlemi sonrasında alınan jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.4 Çeşitlerin genetik olarak yakınlıklarını gösteren soyağacı (dendogram)50	
Şekil 4.5 a) Steril tohumların petrilere alınması, b-c) Çimlenen tohumlara ait görüntüler	51
Şekil 4.6 MS ortamında gelişen bitki örneği, b-c) Bitkilerin MS ortamından alınması ve PEG6000 içeren MS ortamına aktarılması	52
Şekil 4.7 a-b-c) Bitkilerin bulunduğu magentaların iklim kabinine alınması.....	52
Şekil 4.8 a-b-c) Stres uygulaması sonrası bitkilerin genel görünümü	53
Şekil 4.9 a-b) Kontrol gruplarına ait bitki örnekleri, c-d) PEG6000 içeren ortamdan alınan bitki örnekleri	53
Şekil 4.10 Yaprak dokularına ait RNA örneklerinin jel görüntüsü.....	54
Şekil 4.11 Kök dokularına ait RNA örneklerinin jel görüntüsü.....	54
Şekil 4.12 A-B) Zubkov çeşidine ait yaprak ve kök dokularının WRKY17 gen ifade seviyeleri	56
Şekil 4.13 Atay 85 çeşidine ait yaprak ve kök dokularının WRKY17 gen ifade seviyeleri	57
Şekil 4.14 A-B) Karahan 99 çeşidine ait yaprak ve kök dokularının WRKY17 gen ifade seviyeleri	57
Şekil 4.15 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY24 gen ifade seviyeleri	57
Şekil 4.16 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY24 gen ifade seviyeleri	58
Şekil 4.17 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY24 gen ifade seviyeleri	58
Şekil 4.18 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY59 gen ifade seviyeleri	58
Şekil 4.19 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY59 gen ifade seviyeleri	59
Şekil 4.20 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY59 gen ifade seviyeleri	59
Şekil 4.21 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY61 gen ifade seviyeleri	59
Şekil 4.22 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY61 gen ifade seviyeleri	60

Şekil 4.23 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY61 gen ifade seviyeleri	60
Şekil 4.24 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY82 gen ifade seviyeleri	60
Şekil 4.25 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY82 gen ifade seviyeleri	61
Şekil 4.26 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY82 gen ifade seviyeler	61
Şekil 4.27 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP12 gen ifade seviyeleri	62
Şekil 4.28 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP12 gen ifade seviyeleri	62
Şekil 4.29 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP12 gen ifade seviyeleri	63
Şekil 4.30 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP15 gen ifade seviyeleri	63
Şekil 4.31 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP15 gen ifade seviyeleri	63
Şekil 4.32 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP15 gen ifade seviyeler	64
Şekil 4.33 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP30 gen ifade seviyeleri	64
Şekil 4.34 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP30 gen ifade seviyeleri	64
Şekil 4.35 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP30 gen ifade seviyeleri	65
Şekil 4.36 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP53 gen ifade seviyeleri	65
Şekil 4.37 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP53 gen ifade seviyeleri	65
Şekil 4.38 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP53 gen ifade seviyeleri	66
Şekil 4.39 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP55 gen ifade seviyeleri	66
Şekil 4.40 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP55 gen ifade seviyeleri	66
Şekil 4.41 A-B) Karaha99n çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP55 gen ifade seviyeleri	67
Şekil 4.42 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP16 gen ifade seviyeleri	68
Şekil 4.43 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP17 gen ifade seviyeleri	68
Şekil 4.44 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP25 gen ifade seviyeleri	68
Şekil 4.45 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP26 gen ifade seviyeleri	69
Şekil 4.46 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP33 gen ifade seviyeleri	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 SSR primer listesi	34
Çizelge 3.2 cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan komponentler	41
Çizelge 3.3 cDNA sentezi ikinci aşamada kullanılan komponentler	41
Çizelge 3.4 qRT-PZR reaksiyonları için kullanılan primerler	43
Çizelge 3.5 Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları için seçilen primerlere ait diziler	43
Çizelge 3.6 qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan komponentler	44
Çizelge 4.1 Çeşitlere Ait DNA konsantrasyon değerleri	46
Çizelge 4.2 SSR markörlerinin kromozom lokasyonları ve sahip oldukları motifler	48
Çizelge 4.3 Çeşitlere ait dokuların RNA konsantrasyonları	55



1. GİRİŞ

Buğday grubu olarak adlandırılan *Triticum*, *Poaceae* familyasının *Tritium* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Triticum* kromozom sayısına göre diploit ($2n=14$), tetraploit ($2n=28$) ve hekzaploit ($2n=42$) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Pestsova *et al.* 2000, Ling *et al.* 2013). Kültürü yapılan buğdaylar diploit buğdaylar; ($2n=14$, AA), tetraploit buğday; ($2n=28$, AABB) ve hekzaploit buğdaylar; ($2n=42$, AABBDD) olarak gruplandırılırlar (Marcussen *et al.* 2014). Kullanım alanlarına göre bu türler farklı şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Hekzaploit buğdaylar ekmek ve pasta yapımında, tetraploit buğdaylar ise makarna yapımında yoğun olarak kullanılmaktadır (Abouzied *et al.* 2013).

Buğday, dünya genelinde besin kaynakları arasında çok önemli bir yere sahip olup, insan beslenmesi için gerekli olan kalori miktarının yaklaşık %20'sini karşılamaktadır (Brenchley *et al.* 2012). Dünya nüfusunun %35'ini oluşturan yaklaşık 40 ülkenin temel gıda maddesidir. İnsanların değişen tüketim alışkanlıkları ve gelişen teknolojiye bağlı olarak, buğday ürünleri çeşitlilik kazanmıştır (Bushuk 1997).

Buğday türleri arasında yer alan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.), beslenmede alternatifsiz olması dolayısı ile önemi gün geçtikçe artmaktadır. Dünya nüfusundaki artış, besin kaynaklarında yaşanan yetersizlik, tarıma ayrılan alanların azalması, küresel iklim değişikliklerinin yarattığı olumsuzluklar, tüketici talebindeki değişiklikler ekmeklik buğdayın önemini arttırmıştır (Tester and Langridge 2010).

Bitki gelişimini ve verimini sınırlandıran, dolayısı ile tarımsal üretimi kısıtlayan şartlar bitki ıslahını vazgeçilmez kılmıştır. İslah çalışmaları yüzyıldan uzun bir süredir yapılan, temelini melezleme ve seleksiyonun oluşturduğu, çevresel şartlara uyumlu, hastalıklara dayanıklı ve daha verimli çeşitleri geliştirme sürecidir (Van den *et al.* 2010). Bitki ıslahı, klasik ıslah ve biyoteknolojik ıslah olarak ikiye ayrılmaktadır. Klasik ıslah melezleme ve seleksiyonu kapsarken biyoteknolojik ıslah, moleküler biyolojide ve biyoteknolojide kullanılan tekniklerin ıslah programlarına entegre edilmesini kapsamaktadır. PZR reaksiyonlarının kullanılması ile istenilen karakterin varlığının

tespit edilmesi, Markör Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection, MAS) yöntemleri gibi tekniklerin seleksiyon amacı ile kullanılması, doku kültürü ile kısa sürede ve laboratuvar şartlarında istenen miktarda saf hatların elde edilmesi modern ıslahı klasik ıslahtan daha güçlü kılmaktadır. Bu anlamda MAS, agronomik olarak önem arz eden ve birden fazla gen veya lokus tarafından kontrol edilen karakterlerin etkin bir şekilde taranmasını sağlamaktadır. Klasik ıslahta kullanılan fenotipik seleksiyon, özellikle abiyotik stres gibi çevresel faktörlerden etkilenen karakterlerin seleksiyonunda güvenilir değildir. Buna karşın moleküler markör destekli seleksiyon, çevresel faktörlerin neden olduğu olumsuzluklardan etkilenmeyen güvenilir bir yöntemdir (Francia *et al.* 2005).

Bitki genetik kaynaklarının karakterizasyonunda MAS, morfolojik markörler, biyokimyasal markörler ve moleküler markörler olarak gruplandırılmaktadır (Staub *et al.* 1996). Özellikle morfolojik markörler, çevre koşullarının etkisi altında kalabildiklerinden dolayı karakterizasyon çalışmalarında kullanımı sınırlıdır. Aynı şekilde biyokimyasal markörlerin de polimorfizm seviyesinin düşük olması, bu markörlerin kullanımını da sınırlandırmaktadır. Bitki gen kaynaklarının karakterizasyonunda moleküler markörlerin kullanılmasının birçok avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlara birçok karakterin taranması, kolay olması ve en önemlisi çevresel faktörlerden etkilenmemesi örnek gösterilebilir (Smykal *et al.* 2008). Moleküler markörler birtakım avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Markör tekniklerinin karşılaştırılması sonucunda, polimorfizm oranının yüksek olması, maliyetin düşük olması, tekrarlanabilirlik bakımından uygun olması Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeat, SSR) markör tekniğini avantajlı kılmıştır (Powell *et al.* 1996). Birçok karakterin hızlı ve kolay bir şekilde taranmasına olanak sağlayan markör teknikleri bitki ıslahında zamandan ve maliyetten tasarruf sağlaması yönünden popüler teknikler olarak kullanılmaktadır (Francia *et al.* 2005).

Bitki ıslahında en önemli amaç, değişen koşullara uygun sağlayabilecek ve tüketici taleplerini karşılayabilecek ürünlerin geliştirilmesidir. Dünya nüfusunda meydana gelen artış nedeni ile gelecekte besin kaynaklarının yetersizliği endişesi, hızlı kentleşme ve imar sorunları nedeni ile tarımsal üretim yapılan alanların azalması, değişen iklim

koşulları nedeni ile tarımsal arazilerin ve tarım ürünlerinin olumsuz yönde etkilenmesi ve bu etkilerin birim alandan alınan ürün miktarını ve kalitesini düşürmesi gibi nedenler bitki ıslahını zorunlu hale getirmekle kalmamış aynı zamanda diğer alanlarda kullanılan tekniklerin ıslah programlarına entegresine olanak vererek bitki ıslahının çok hızlı bir şekilde ilerlemesine olanak tanımıştır (Ye *et al.* 2012).

Çevresel faktörlerden olan abiyotik ve biyotik stres faktörleri bitkilerde birçok olumsuzluklara neden olmaktadır. Kuraklık ve yüksek sıcaklık abiyotik stres faktörleri olup, bitkilerde gelişimi önemli oranda sınırlandıran çevresel faktörler arasında yer almaktadır (Johnson *et al.* 2014). Kuraklık ve yüksek sıcaklık, ekmeklik buğdayında dahil olduğu tahıllı bitkilerde özellikle verim kaybına ve ürün kalitesinde düşüslere neden olmaktadır (Teixeira *et al.* 2013). Bitkiler yaşadıkları ortamlarda karşılaştıkları olumsuzluklara karşı çeşitli cevaplar oluştururlar (Johnson *et al.* 2014). Bu cevaplar morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olmaktadır (Jaleel *et al.* 2009). Bitkilerin stres faktörlerine verdikleri cevaplar, metabolitler, enzimler ve gen ifade düzeyinde meydana gelen değişimler şeklinde olmaktadır (Rizhsky *et al.* 2002). Gen ifade düzeyinde oluşan değişimler, gen regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörleri (TF) tarafından sağlamakta ve bu proteinler bitkinin stres şartlarına uyum göstermesine yardımcı olmaktadır (Gill *et al.* 2016). TF'ler, transkripsiyonda etkili olan ve DNA dizisinde belli bağlanma bölgelerine bağlanarak genlerin ekspresyonlarında değişime neden olan DNA bağlanma proteinleridir (Latchman 1997). TF'ler, abiyotik ve biyotik stres faktörleri gibi birçok olumsuz koşulda, bitkilerde gen ifade düzeyinde değişimlere neden olup, bitkinin bulunduğu şartlara uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Örneğin WRKY transkripsiyon faktörleri kuraklık ve sıcaklık stresinin de dahil olduğu bir çok olumsuz koşulda gen regülasyonunda görevli olup, oluşturduğu moleküler cevaplarla bitkinin var olan olumsuz şartlara karşı uyumuna yardımcı olmaktadır (Rizhsky *et al.* 2002). Diğer bir transkripsiyon faktörü de bZIP transkripsiyon faktörüdür. Kuraklık dahil birçok streste gen regülasyonunda görev alan bZIP transkripsiyon faktörü, DNA'da kendine özgü olan bölgeye bağlanarak gen ifade düzeyinin değişimine neden olmakta ve böylelikle kuraklığın da dahil olduğu bir çok stres koşulunda bitkide çeşitli cevapların oluşumunu sağlamaktadır (Baloglu *et al.* 2014). Son yıllarda yapılan proteom çalışmaları ile stres koşullarında miktarsak olarak

değişen veya konformasyonlarında değişimler olan proteinler keşfedilmiş ve bu proteinlerin çeşitli görevlere sahip olduğu belirtilmiştir (Macková *et al.* 2013). Örneğin sıcaklık stresinde ısı-şoku proteinleri (Heat Shock Proteins, HSPs) olarak adlandırılan proteinler, bitkilerde sıcaklık stresinde veya abiyotik stres koşullarında önemli roller üstlenmekte ve bitkinin sıcaklık stresine karşı uyumuna yardımcı olmaktadır. Bitkide transkripsiyon faktörleri veya özel proteinler tarafından oluşturulan cevapların tümü karşılaşılan olumsuz koşullara karşı bitkinin uyumunu arttırmaktır. Bitki tarafından oluşturulan bu cevaplar büyüme ve gelişmenin sürdürülmesinin yanı sıra verim kaybı ve ürün kalitesinin düşüşünün önlenmesi amacı ile oluşan moleküler düzenlemelerdir (Gill *et al.* 2016). Bitkilerin sahip olduğu bu mekanizmaların aydınlatılması elde edilen verilerin özellikle ıslah çalışmalarında kullanılması çeşit ıslahının hızlı ve güvenilir olmasına katkı sunabilir. Ayrıca var olan sorunlara cevap verebilen yeni çeşitlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Ekmeklik buğdayın insan beslenmesine doğrudan, kuraklık ve yüksek sıcaklığın besin kaynaklarına dolaylı etkileri nedeni ile çalışmamızda, özellikle Anadolu'da ekimi yaygın olarak yapılan ekmeklik buğday çeşitleri kullanılmıştır. Tez kapsamında seçilen çeşitlerin kuraklığa dayanıklılık bakımından filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca belirlenen çeşitlerin yüksek sıcaklık, kuraklık, yüksek sıcaklık ve kuraklık koşullarında, çeşitlere ait yaprak ve kök dokularında meydana gelen gen ifade değişimleri incelenmiş ve belirlenen çeşitlerin uygulanan streslere karşı hassas veya dayanıklılık düzeyleri moleküler çalışma ile desteklenmeye çalışılmıştır.

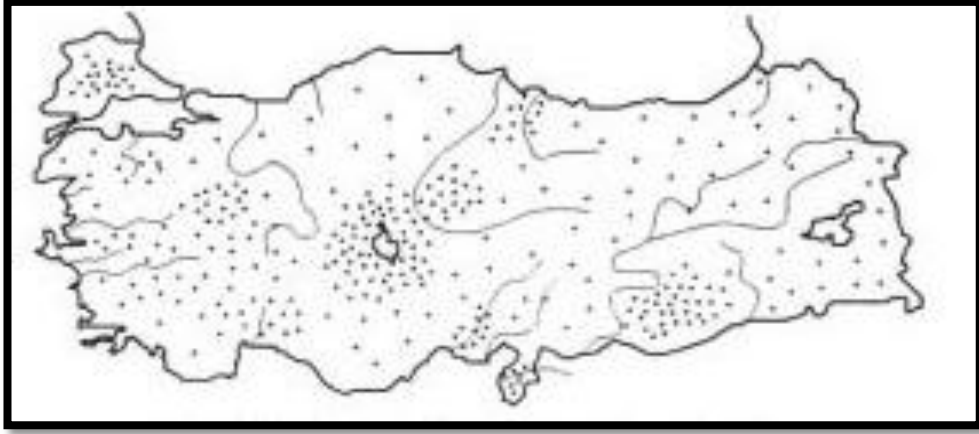
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) ve Önemi

Yaklaşık 8,000 yıl önce tetraploit (AABB) *Triticum dicoccoides* ile diploit (DD) *Aegilops tauschii*'nin melezlenmesi sonucu hekzaploit *Triticum aestivum* L. (2n=42, AABBDD) elde edilmiştir. Ekmeklik buğday, Kuzey Suriye'den Güneydoğu Türkiye, Kuzey Irak ve Batı İran'ında dahil olduğu bölgede kültüre alınmıştır (Zohary *et al.* 2012). Üç diploid genoma (A, B ve D) sahip olup (Gupta *et al.* 2008), yaklaşık 17 Gb bir genoma sahiptir (Flavell and Smith 1976).

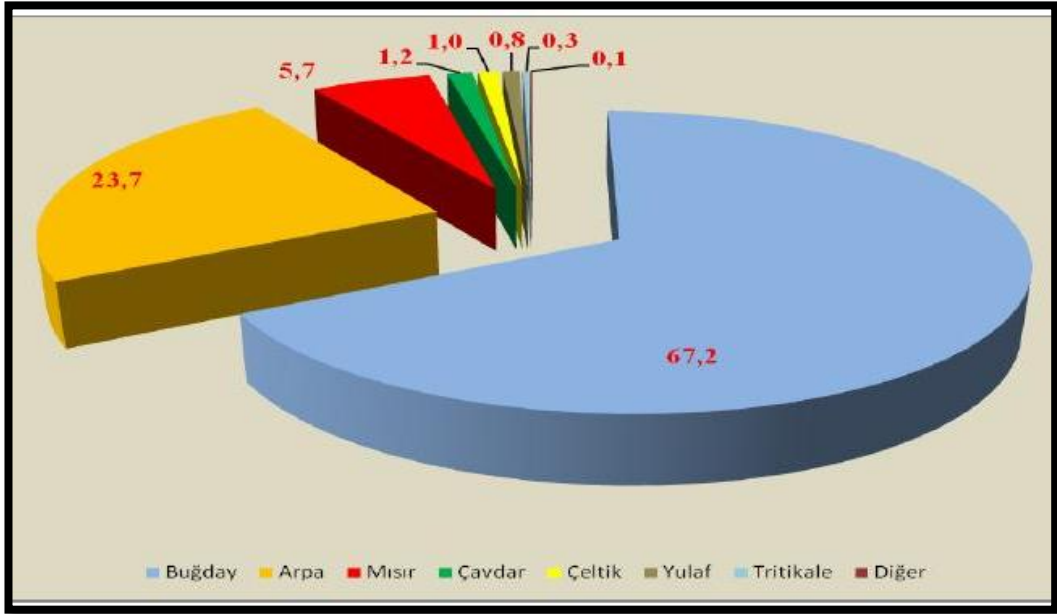
Buğday, önemli bir protein, vitamin ve mineral kaynağı olmasının yanı sıra karbonhidrat içeriği ile insanların kalori tüketiminin %20'sini karşılamaktadır. Buğday dünya nüfusunun %35'ini oluşturan yaklaşık 40 ülkenin temel gıda maddesini oluşturmaktadır (Bushuk 1997).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, FAO'nun (<http://www.fao.org>) verdiği veriler, dünyada 123 ülkenin buğday üretimi yaptığını fakat üretim miktarının ülkeler arasında değiştiğini göstermektedir. Yine aynı verilere göre yıllık toplam üretimin %75'inden fazlasının 13 ülke tarafından yapıldığı ve en fazla buğday üretimi yapan ilk 4 ülkenin Çin, ABD, Rusya ve Fransa olduğu görülmektedir. Ülkemizin birçok ilinde de buğday tarımı yapılmasına karşın, İç Anadolu bölgesinde üretimi daha yaygındır (Şekil 2.1) (www.chromeostr.com). Üretilen toplam miktarın yaklaşık %75'i de yine bu bölgeden karşılanmaktadır (Kızılaslan 2004).



Şekil 2.1 Türkiye’de buğday üretimi yapılan bölgeler (www.chromeostr.com)

Türkiye Ziraat Mühendisleri Odasının (TMMOB) açıkladığı verilere göre Türkiye’de üretilen hububat üretiminin %67,2’sini buğday oluşturmaktadır (Şekil 2.2). Aynı verilere göre 2014 yılında üretilen buğday miktarı 19 milyon ton olup bu oran her yıl düşüş göstermektedir. Verilen verilere göre 2000 yılında 94 milyon hektarlık arazide üretilen buğday miktarı 21 milyon ton iken 2014 yılında buğday üretimi 77 milyon hektarlık alanda yapılmış olup, üretilen ürün miktarı ise 19 milyon tondur.



Şekil 2.2 Türkiye’de hububat üretimine ait pasta grafiği (www.zmo.org.tr).

Dünya genelinde buğday üretimi, topoğrafik, iklimik, biyotik ve abiyotik birçok faktörün oluşturduğu olumsuzluktan etkilenmektedir. Bu faktörlerden dolayı üretim olumsuz yönde etkilenmekte ve birim alandan alınan ürün miktarı ve kalitesi düşmektedir (Ye *et al.* 2012).

Buğday üretimi yapılan arazilerin büyük bir kısmı, bitki büyümesinin belirli bir aşamasında kuraklık ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin dahil olduğu abiyotik streslere maruz kalmaktadır. Dünyada kullanılabilir tarım arazilerinin %26'sı kuraklık, %29'u ise yüksek sıcaklık stresine maruz kalmaktadır (Blum and Jordan 1985, Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Tarım alanlarının çevresel faktörlerden etkilenmesi bu alanlarda yapılan tarımsal üretimde sorunlara neden olup ürünlerin verimini ve kalitesini önemli derecede düşürmektedir (Babaoğlu vd. 2001).

2.2 Markör Destekli Seleksiyon (MAS)

Bitki genetik kaynaklarının karakterizasyonunda morfolojik markörler, biyokimyasal markörler ve DNA markörleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Morfolojik markörler çevre koşullarının etkisi altında kalabildiklerinden dolayı, karakterizasyon çalışmalarında güvenilirlikleri sınırlıdır (Torres *et al.* 2010). Aynı şekilde biyokimyasal markörlerin de polimorfizm seviyesinin düşük olması, sınırlı sayıda karakteri belirlemesi nedeni ile bu markörlerin kullanımını da sınırlandırmaktadır.

DNA markörleri polimorfizm seviyesinin yüksek olması, çok sayıda karakterin belirlenmesine olanak tanınması ve özellikle güvenilir olması nedeni ile ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır. Farklı tekniklere sahip DNA markör sistemlerinin ıslah programlarında kullanılması seleksiyon çalışmalarında zamandan ve maliyetten tasarruf edilmesine olanak tanımaktadır (Smýkal *et al.* 2008).

Bitki gen kaynaklarının karakterizasyonunda DNA markör sisteminin seçimi; araştırmanın amacına, populasyonun yapısına, çalışılan bitki türünün çeşitliliğine, markör sisteminin çalışılacak laboratuvarında bulunma durumuna, analiz için gerekli zamana ve maliyete bağlı olarak değişmektedir. Her bir markör sistemi avantaj ve

dezavantajlara sahiptir. Birçok bitki türünde çeşitler arasındaki genetik varyasyonu belirlemede moleküler DNA markör tekniklerinin polimorfizm, maliyet ve tekrarlanabilirlik gibi özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda, SSR moleküler markör tekniğinin diğer markör tekniklerine kıyasla öne çıktığı belirtilmiştir (Powell *et al.* 1996).

Genomda herhangi bir gen bölgesi yada gen bölgesi ile ilişkili DNA bölgesi olarak tanımlanan moleküler markörler, birçok alanda kullanılmaktadırlar. Genetik varyasyonun araştırılması, türlerin taksonomik sınıflandırılmasının yapılması, filogenetik akrabalıkların belirlenmesi, genetik haritalama ve markör yardımıyla seleksiyon çalışmaları örnek olarak verilebilir (Torres *et al.* 2010). Ayrıca genom düzeyinde yapılan analizlerde moleküler markörlerin kullanımı özellikle ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alandır. Moleküler markörler, genetik çeşitliliğin belirlenmesi, ebeveynlerin tayini, farklı türlerin arasındaki filogenetik ilişkilerin saptanması için önemli araçlardır (Barkley *et al.* 2006). Farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkan moleküler markörler, hibridizasyona ve PZR'a dayalı olmak üzere ikiye ayrılır (Gupta and Varshney 2000). Hibridizasyona dayalı olan moleküler markör: RFLP, PZR'a dayalı moleküler markörler: RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA), SCAR (sequence-characterized amplified regions), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) markörlerdir.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): İlk kez 1980 yılında Botstein ve ark. tarafından geliştirilen RFLP markörleri, genetik haritalamada DNA markörleri olarak kullanılmıştır (Qi and Lindhout 1997). Dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA fragmentlerinin elektroforez ile ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla işaretlenmesi esasına dayanır. RFLP markörleri ile türler arası ve tür içi farklılık kolayca belirlenebilir. Güvenilir ve eşbaskın (ko-dominant) özellikte olup, polimorfizm oranı orta düzeydedir (Gupta and Varshney 2000). En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman ve işgücü gerektirmesi, fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim

duyulmasıdır. RFLP markörlerinin polimorfik olmayan bitkilerde kullanılmaması, deneylerin uzun zaman alması ve yoğun emek gerektirmesi diğer dezavantajlardır (Powell *et al.* 1996).

RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA): PZR'ın keşfi ile DNA polimorfizmini araştıran araştırmacılar yeni markör sistemleri geliştirilmiştir. Williams ve ark. (1990), tarafından geliştirilen RAPD tekniği (Black and DuTeau 1997), basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır. Çoğaltma sonrasında oluşan amplifikasyon ürünleri, bir agaroz jel üzerinde elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, gümüş nitrat veya ethidium bromid boya ile bantlar görünür hale getirilir. RAPD markörleri, RFLP'nin aksine düşük kalitede ve miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden avantajlı olmasına rağmen dominant bir markör (Corazza-Nunes *et al.* 2002) olması, yorumlanmasının zor, güvenilirliğinin çok sınırlı olması, tekrarlanamaması (Sönmezoğlu vd. 2010), yoğun emek gerektiren, zaman alıcı bir teknik olması ve radyoaktif madde kullanımına ihtiyaç duyması (Fang *et al.* 1997) dezavantajları arasında yer almaktadır.

SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions): RAPD markörünün kullanılmasına benzetmekle birlikte, daha uzun primerlerin (20-25 nükleotid) kullanılmasını esas alan PZR tabanlı bir tekniktir. SCAR tekniği, RAPD tekniğine göre tekrarlanabilir ve daha hızlıdır (Koveza and Gostimsky 2005). SCAR markörleri dominant markörler olmalarına rağmen 4 baz çifti restriksiyon enzimleri ile parçalanmaları veya SSCP teknikleri ile tanımlanmaları nedeni ile kodominant markörlere dönüştürülebilirler.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat): ISSR tekniği, yakın aralıklı mikrosatellitlerin arasındaki bölgelerin (100–300 bp) amplifikasyonuna dayanan, birbirine yakın birçok türün akrabalık ilişkilerinin belirlenmesine olanak tanıyan ucuz bir tekniktir (Gajera *et al.* 2010). Tekrarlı bölgeler (SSR) arasında kalan kısmın amplifikasyonu için kullanılan 16-18 bp uzunluğunda primerleri içeren, çok sayıda basit dizi tekrarları herhangi bir SSR motifi ve 5' veya 3' ucuna bağlanmış tesadüfi seçilmiş nükleotidlere dayanabilir.

RAPD ile maliyeti yaklaşık olarak aynı olan ISSR tekniği, RAPD tekniğine göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PZR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, evrim ve genom haritası oluşturma (Filiz and İbrahim 2011) alışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism): PZR'a dayalı bir tekniktir. RAPD markörlerine benzemekle birlikte, DNA'daki açık okuma bölgelerin çoğaltılması esasına dayanır (Sun *et al.* 2006). SRAP primerleri geliştirirken ilk önce ORF bölgelerindeki eksonlar hedef alınır. İleri primeri 17 nükleotid, geri primeri 18 nükleotid uzunluğundadır. Geri primerleri DNA'nın intron ve promotor bölgelerini, ileri primeri ise DNA'nın ekzon bölgelerini amplifiye eder. İleri primerlerinde 5' ucundaki 14, geri primerlerinde 15 nükleotit aynıdır, 3' ucuna yakın olan üç nükleotid tesadüfi seçilim sonucu oluşturulmuştur (Ferriol *et al.* 2003). Primerin başındaki 10 veya 11 nükleotitten sonra gelen dört nükleotid dizini ileri primerinde CCGG dizinine; geri primerinde AATT primer dizinine sahiptir. SRAP markörleri, uyarlanması kolay, kullanımları etkili olmalarından dolayı bitki ışlah programlarında kullanılmaktadırlar (Sun *et al.* 2007).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): AFLP markörleri RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte karakterizasyonu yapılacak bireylere ait DNA rnekleri iki restriksiyon enzimi (4-6 baz) ile kesim yapılmaktadır. Enzim kullanılarak yapılan kesim sonucu elde edilen fragmentler, adaptörler yardımı ile birleştirme (ligasyon) işlemine tabi tutulmaktadır. Birleştirme işlemi sonrasında elde edilen fragmentler özel primerler kullanılarak PZR yardımı ile çoğaltılır. PZR rnleri poliakrilamid jelde ayırımı yapılır ve oluşan polimorfizme göre analiz yapılarak işlem sonuçlanır (Hill *et al.* 1996). Polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulanabilirliği RAPD tekniğine göre kolay olmasa da AFLP tekniğine göre çok kolaydır. Masraf, iç gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve AFLP arasında yer alır.

SNP (single nucleotide polymorphism): Tek nükleotid polimorfizmi olarak adlandırılan SNP, son zamanlarda kullanılan ileri genotipleme tekniklerindedir. Genom düzeyinde tek nükleotid polimorfizminin taranabildiği bir tekniktir (Ohashi and Tokunaga 2001).

SNP markörleri genetik markörler arasında en yoğun olanlardır. Bu markörlerin yoğun olması, genetik kalımlar üzerine yapılan çalışmalarda ideal markör olarak değerlendirilmesini sağlamıştır (Baird *et al.* 2008). Populasyonlardaki bireylerin genom dizilerinde meydana gelen tek nükleotid değişimleri olarak bilinen SNP, bitkilerin de dahil olduğu pek çok canlı türünde ortaya çıkan bir varyasyondur (Yan *et al.* 2009). SNP oluşmasında DNA'nın nükleotidlerden oluşan dizilerine nükleotid eklenme veya silinme (InDel), nükleotid dizisi değişimine sebep olan temel nedenlerdendir. Gen haritalamada, markörler yardımıyla ıslah ve harita temelli klonlama çalışmalarında etkili bir araç olarak kullanılmaktadır. SNP oluşumları genelde kodlama yapmayan DNA bölgelerinde yaygın olarak görülmektedirler. DNA'da kodlama yapan bölgelerde meydana gelen SNP markörleri, aminoasit dizisinin değişimine neden olabilirler.

Dizileme teknolojilerinin gelişmesine paralel olarak, EST kökenli DNA dizi temelli genetik varyasyon çalışmaları yaygın olarak yapılmaktadır. Özellikle son yıllarda SNP karakterizasyon çalışmalarında dizileme teknolojilerinden sıkça yararlanılmaktadır (Hayashi *et al.* 2004). Restriksiyon enzimi ile tanınan bölgelere sahip RAD (Restriksiyon bölgesi ile ilişkili DNA) markörleri (Baird *et al.* 2008) ve KASP markörleri tek nükleotid polimorfizmine dayanan SNP tabanlı markör sistemleridir (Babu *et al.* 2014).

SSR (Simple Sequence Repeat): Basit dizi tekrarı veya mikrosatellit olarak da bilinen SSR, tekrarlı nükleotid dizilerinden oluşan ve PZR tabanlı olan bir tekniktir (Saal and Wricke 1999). Genomda tekrarlanan 1-6 nükleotidlik DNA bölgelerinden oluşan korunmuş bölgelerdir. Bu dizinler SSR primerlerini dizayn etmede kullanılırlar. Elde edilen 18-22 nükleotid uzunluğundaki primerler ile genomik DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon ürünleri poliakrilamid veya agaroz jelde yürütülerek ayrışım sağlanır. Polimorfizm kaynağını, tekrar sayısından alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil

eden her bant, farklı bir allele işaret eder. SSR markörlerinin, yüksek yapılı bitkilerin genomlarında çok yaygın olarak bulunmaları, bitki genomlarında yüksek oranda polimorfizm göstermeleri, tekrarlanabilmeleri, teknik olarak hızlı ve kolay olmasının yanı sıra ko-dominant olmaları avantajları arasında yer alır. SSR markörlerinin yüksek polimorfizme sahip olması ve kodominant olması genetik çalışmalarda kullanımını arttırmıştır. SSR markörleri dominant markörlerdir fakat geliştirilmeleri uzun zaman alan ve maliyetli markörlerdir (Li and Quiros 2001). Buğdayda mikrosatellit markör geliştirmek zor ve zaman alıcıdır. Bunun nedeni buğday genomunun büyük olması, poliploid bir organizma olması ve buğdayda tekrar bölgelerinin çok olmasıdır. Şimdiye kadar 570 yayınlanmış markör rapor edilmiştir (Song *et al.* 2005). Bitkilere ait SSR motifleri A/T yönünden zengin iken memeli, SSR motifleri G/C yönünden zengin olduğu bildirilmiştir (Iniguez-Luy *et al.* 2008). SSR markörleri, buğdayında dahil olduğu bir çok bitkide genetik farklılığın belirlenmesi amacı ile geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Ali *et al.* 2008) SSR markörleri genetik çalışmalarda tercih edilen bir tekniktir. Çünkü kodominant allellerin kolayca belirlenmesi, yüksek oranda tekrar edilebilir olması ve polimorfizm oranının yüksek olması nedeni ile çok tercih edilen moleküler markör tekniğidir (Ma *et al.* 2009).

2.3 Bitkilerin Maruz Kaldığı Stres Çeşitleri ve Etkileri

Çeşitli çevresel faktörler özellikle bitki gelişimini ve verin performansını olumsuz etkilemektedirler. Kuraklık, tuzluluk, besin dengesizlikleri (mineral eksikliği veya mineral toksisite) ve sıcaklık başlıca çevresel faktörler arasında yer almaktadır (Ashraf and Foolad 2007). Dünyanın ekilebilir alanlarının büyük bir kısmı çeşitli çevresel faktörlerin olumsuzluklarından etkilenmektedir. Dünyadaki toplam arazinin üçte biri tarım için uygundur fakat bunun sadece %10'u yani 13 milyon hektarında tarım yapılmaktadır. Bunun nedeni olarak abiyotik stres veya başka nedenler gösterilmektedir (Yadav 2010). Örneğin dünya nüfusunun %38'nin yaşadığı yerlerin %45'i sürekli veya sık sık çevresel faktörlerden kuraklığa tabidir (Ashraf and Foolad 2007).

Canlılar doğaları gereği içinde buldukları çevre ile sürekli etkileşim halindedirler. Canlıların buldukları çevre ile olan etkileşimleri canlıda, bir takım olumsuzluklara

neden olmaktadır. Canlılar karşılaştıkları olumsuzluklara karşı çeşitli adaptasyon mekanizmaları oluştururlar. Oluşturulan cevapların yetersiz kalması durumunda adaptasyon eksikliğine bağlı olarak bitkilerde, bir takım olumsuzluklar meydana gelir. (Greco *et al.* 2011). Çevre şartlarının bir canlının normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek derecede değişmesi halinde canlıda meydana gelen bu durum stres olarak tanımlanır. Bitkiler de yaşam döngüleri boyunca birçok çevresel stres faktörü ile karşılaşmaktadırlar (Makbul *et al.* 2011). Bu stres faktörleri biyotik ve abiyotik stres faktörleri olarak belirtilebilir (Stachowicz 2001). Biyotik faktörler mikroorganizma kökenli olan etkiler iken, abiyotik stres fiziksel ve kimyasal kökenli olan (kuraklık, yüksek sıcaklık, tuzluluk gibi) etkilerdir (Greco *et al.* 2011). Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açmaktadır. Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilemekte, özellikle steril polen oluşumuna neden olup üründe nicelik ve nicelik kaybına (ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına) yol açmaktadır (Suzuki *et al.* 2014).

Abiyotik stres faktörlerinden tuz stresi, bitkinin gövde ile kök uzunluğunda ve ağırlığında azalma; yapraklarda küçülme ve incelme ile yaprak sayısında azalma; yaprak yüzeyinde bulunan kutikula tabakasında incelme; vasküler doku farklılaşmasında ve gelişiminde azalma gibi değişikliklere neden olabilir. Ayrıca erken dönemde kökte lignifikasyon oluşumuna sebep olmaktadır (Çulha and Çakırlar 2011). Diğer olumsuz etkileri, enzim aktivasyon bozukluğu, besin dengesizliği, membran disfonksiyonu, genel metabolik süreçte aksamalar, ozmotik uyumsuzluk ve su alımında dengesizlik, oksidatif stres ve genel gelişim yetersizliği olarak özetlemek mümkündür (Yakıt and Tuna 2006).

Bir diğer abiyotik stres faktörü olan kuraklık stresi bitkide, kök gelişim hızında artma, kök/gövde oranında uyumsuzluk, sürgün gelişiminde zayıflama, köklerde mantara benzer kalın bir doku tabakasının oluşması yaprakların dökülmesi, total yaprak alanlarının azaltılması yaprak büyümesinin yavaşlaması, yaprakların üzeri sık tüylerle kaplanması, yaprak yüzeyinde mum üretiminin artması ve kutikula tabakası kalınlaşması, ozmotik düzenlemelerle turgoru sabit tutma, stoma hareketleri ile

terlemeyi düzenleme, protein metabolizmasının bozulması, hormonal düzenin değişmesi, fotosentezde azalma, gibi değişikliklere neden olmaktadır (Kutlu 2010).

Bir diğer abiyotik stres faktörü olan düşük sıcaklık, bitki büyüme hızının azalmasına, yaprak genişliğinin azalmasına, hücresel otolitin ve yaşlanmanın artmasına, programlanmış hücre ölümlerine, ışıpta klorofil kaybı nedeniyle klorozis oluşumuna, hücre zar yapılarının bozulmasına ve bunun sonucunda hücresel bütünlüğün bozulmasına, protoplazmik akışın en az düzeye inmesine ve nekroze yol açmaktadır (Turan and Ekmekçi 2008).

2.3.1 Sıcaklık stresi ve etkileri

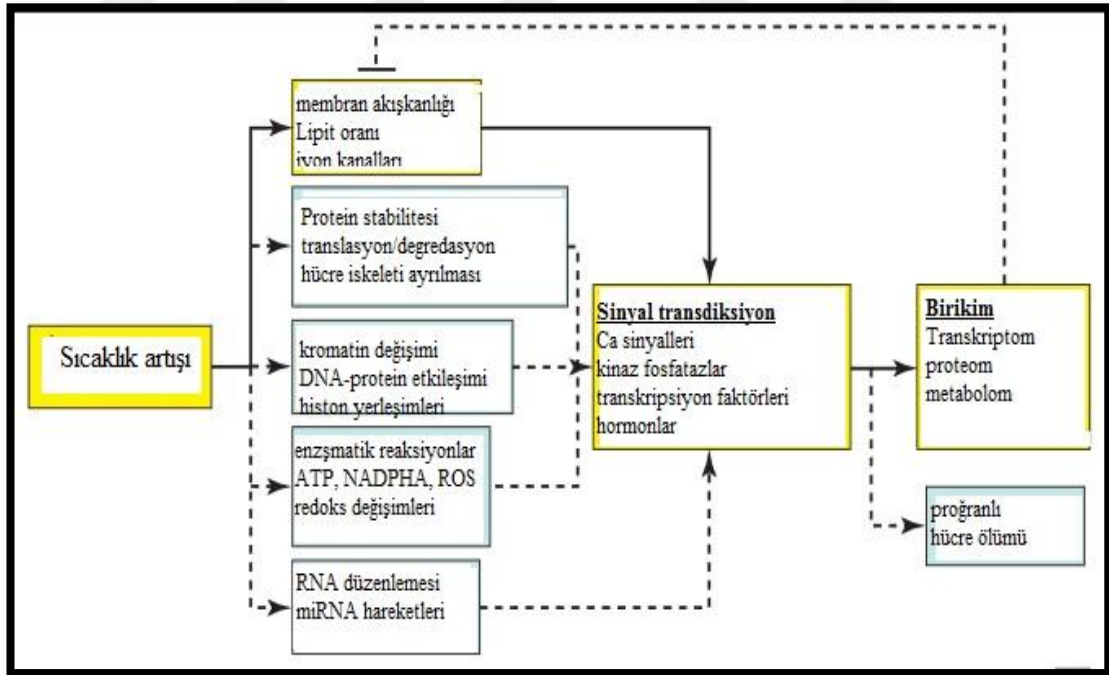
Abiyotik stresler arasında yer alan yüksek sıcaklık tüm bitkiler üzerinde önemli olumsuzluklara neden bir faktördür. Bitkilerde özellikle ürün verimliliğini ve bitki gelişimini önemli ölçüde sınırlandırmaktadır (Rollins *et al.* 2013). Bitkiler tozlaşma dönemlerinde kısa veya uzun süreli yüksek sıcaklığa maruz kalabilirler. Bu dönemde yüksek sıcaklıktan etkilenen tarım ürünlerinde, verim önemli oranda düşmektedir (Teixeira *et al.* 2013). Ürün veriminde yaşanan kayıplar tarımsal üretimi sınırlandırmakta, dolayısıyla tarımsal üretim doğrudan küresel sıcaklıklarla ilişkilendirmektedir (Schmidhuber and Tubiello 2007).

1971-2000 yılları baz alındığında, otuz yıllık peryod içinde sıcaklık stresi maksimum düzeyde artış göstermiştir. Bu artış Güney ve Orta Asya, Orta Kuzey Amerika'da en belirgin şekilde görülmüştür. En çok etkilenen alanlarda, %20'den daha azında sıcaklık değişmeleri daha azdır. 1971-2100 tarihleri arasında yaşanacak iklim değişikliği senaryolarına göre, geniş alanlarda yayılış gösteren tüm bitkiler bu durumdan etkileneceği yönündedir Özellikle yağmur suyu ile beslenen prinç, mısır, soya ve buğday gibi bitkilerin bu olumsuz durumdan daha fazla etkileneceği tahmin edilmektedir (Teixeira *et al.* 2013).

Yüksek sıcaklığın bitkilerde meydana getirdiği sıcaklık stresinin tarım arazilerine ve dolayısı ile tarımsal üretime olan etkileri göz önüne alındığında, sıcaklık stresine

dayanıklı çeşit ıslahının önemini ortaya çıkmaktadır. Islah çalışmaları sonucunda çeşit geliştirmek, özellikle abiyotik stres faktörlerine dayanıklı çeşit ıslahı ile ve stres koşullarında bitkide meydana gelen değişimleri bilmekle mümkündür.

Sıcaklık stresi, bitkinin gelişimi, büyümesi ve verimliliğinin de dahil olduğu bir çok sınırlamalara neden olmaktadır (Ahuja *et al.* 2010, Mittler and Blumwald 2010). Çünkü bitkiler, sesil organizmalardır ve buldukları ortamdaki olumsuzluklardan kaçamazlar. Dolayısı ile bitkiler, yüksek sıcaklık nedeni ile zarar görmemek için kendi metabolizmalarında bir takım değişiklikler yaparak buldukları ortama uyum sağlamaktadırlar. Tüm canlı organizmalar değişen sıcaklıklarda, metabolizmalarını ve hücre fonksiyonlarını düzenlemek için bir takım sinyal yollarına sahiptirler (Mittler *et al.* 2012). Bitkiler, alternatif olarak programlanmış hücre ölümü, yaprak, çiçek veya meyve dökümü gibi prosesler geliştirebilirler (Qi *et al.* 2011, Mittler *et al.* 2012). Sıcaklık değişimi sonucunda bitkilerde meydana gelen değişiklikler kısaca Şekil 2.3'de görülmektedir (Mittler, *et al.* 2012).



Şekil 2.3 Yüksek sıcaklık stresinin bitkide neden olduğu değişimler ve bu değişimlerin şematik olarak gösterimi (Mittler *et al.* 2012'den değiştirilerek alınmıştır)

Hücre metabolizması üzerindeki sıcaklık stresini minimize edebilmek için bitkiler ve diğer canlılar transkriptom, proteom, metabolom ve lipidom düzeyinde çeşitli cevaplar oluşturmakta böylelikle yeni ve kararlı bir metabolik denge oluşturulmasını hedeflemektedir (Mittler *et al.* 2012). Sıcaklık stresi çeşitli proteinlerin stabilitesini, membranları, çeşitli RNA'ları, hücre iskelet yapısını, enzim reaksiyonlarının etkinliğini, metabolik düzensizlikleri farklı bir şekilde etkilemektedir (McClung and Davis 2010).

Yüksek sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde meydana gelen metabolik değişikliklere reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturulması örnek verilebilir. Yüksek ROS düzeyi koruyucu yanıtların oluşması için sinyal oluşturmakta fakat onlarda hücrenel bileşenlere zararlı olan ve hücrenel süreçleri olumsuz etkileyen metabolitleri etkilemektedirler (Van Breusegem *et al.* 2001).

Yüksek sıcaklığın bitkilerde oluşturduğu proteomik değişikliklere ısı-şok proteinleri örnek olarak gösterilebilir. Isı şoku protein ailesi üyeleri ve moleküler şaperonlar sıcaklık stresinde bitki metabolizması üzerindeki ısı stresinin etkilerini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır (Queitsch *et al.* 2000).

Bitkiler buldukları ortamdaki ısı artışını tüm hücrelerinde aynı anda hissederler ve hücredeki makro moleküller örneğin protein kompleksleri, nükleik asitler aynı anda sıcaklığı algılamaktadırlar. Makro moleküllerin eş zamanlı hareketi geri dönüşümlü fiziksel değişikliklere neden olabilmektedir. Fiziksel değişikliklere membranların akışkanlığının artması, protein alt ünitelerinin ve protein hidrofobik çekirdeklerinin ayrılması örnek gösterilmektedir (Mittler *et al.* 2012). Sıcaklık stresi ile birlikte fotosentez veriminde ve tohum çimlenme yüzdeliğinde azalmalar görülmektedir. Ayrıca üreme organlarının gelişim periyodu boyunca anterlerin açılmasına, polen tanelerinin zayıf kalmasına ve polenlerin şişmesinin önlenmesi üzerine etkileri vardır (Qu *et al.* 2013). En önemli etkisi polen tanelerinin çimlenmesini etkilemekte buda başakçık ve tane verimini azaltmaktadır (Jagadish *et al.* 2010). Sıcaklık stresi bitki fizyolojisi ve moleküler mekanizmalar üzerinde geniş çapta olumsuzluklara neden olmaktadır. Bu olumsuzlukların en önemli sonucu verim kaybının yaşanması ve doğrudan dünya nüfusunun besin kaynakların azalmasıdır.

2.3.2 Isı şok proteinleri

Isı şoku proteinleri, molekül ağırlıkları 100 kD'dan az olan ve temel olarak hücrelerin yüksek ısıya maruz kalmasıyla üretimini artıran bir grup proteindir. Bu proteinler moleküler ağırlıklarına göre HSP90 ailesi, HSP70 ailesi, HSP60 ailesi ve küçük HSP'ler olarak dört ana gruba ayrılmaktadırlar. İlk kez 1962 yılında maya hücrelerinde tanımlanan ısı şok proteinleri, organizmalara ait hücrelerin yüksek ısıya maruz kalmasıyla üretimini artıran bir protein grubudur (Aufricht 2005).

Stres koşullarında normal şartlarda üretilen tüm proteinlerin sentezinde belirgin bir azalma yaşanırken bir grup protein sentezinin arttığı görülmüştür (Christians *et al.* 2002). Isı artışı ile sentezi artan ve bundan dolayı ısı-şoku proteinleri olarak adlandırılan HSP'ler, prokaryotik canlılardan insana kadar tüm canlı hücrelerinde bulunmaktadır (Petrof *et al.* 2004).

Fizyolojik koşullarda HSP, protein katlanmasının doğru yürütülmesinden sorumludurlar (Mayer and Bukau 2005). Hücrede yeni üretilen proteinlerin doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olan maddelere "moleküler şaperon" denmektedir (Deocaris *et al.* 2006). Prokaryotlarda posttranslasyonel katlanma ön planda iken yüksek canlılarda katlanma translasyon düzeyinde oluşmaktadır. Bunun sonucunda proteinler sentez aşamasında iken özellikle katlanma hataları sonucu hücrede çökerek devre dışı kalmaya açık hale gelirler. Moleküler şaperonlar özellikle bu noktada devreye girip yeni üretilen proteinlerin yanlış katlanmasını ve çökmesini engeller (Macario and de Macario 2005). Katlanma hataları en çok ısı artışı ile fazlaştığından moleküler şaperonların çoğu HSP'dir. Bu moleküllerin bir araya gelerek oluşturdukları proteinler "moleküler şaperonin" olarak adlandırılmaktadır (Möbius *et al.* 1997). Bunlar daha çok 6-9 proteinden oluşan yapılardır ve genellikle 400-1000 kDA ağırlığındadırlar. Protein sentezi esnasında yeni üretilen proteinlerin çökmeden katlanarak olgunlaşması, çoğu HSP proteini olan birçok molekülün oluşturduğu bir şaperon ağıyla sağlanmaktadır (Macario and de Macario 2005).

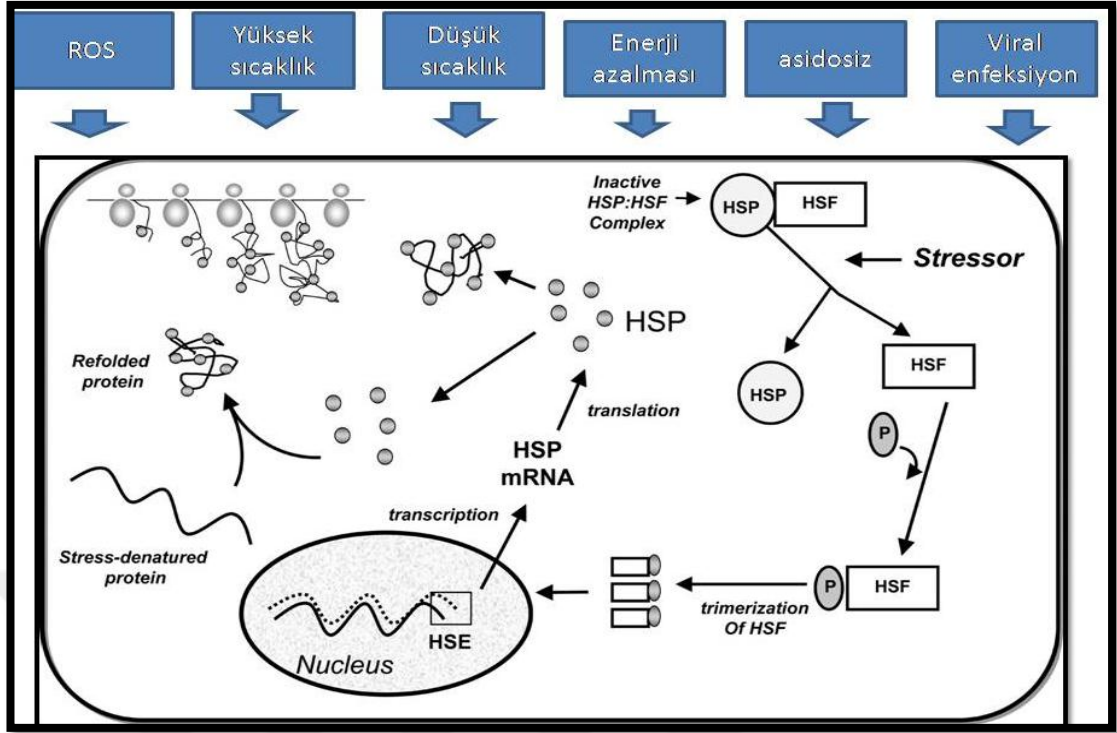
2.3.2.1 HSP70 proteinleri

Son zamanlarda bitkilerde sıcaklık stresine duyarlı genlerin ve proteinlerin tanımlanmasında transkriptom ve proteom çalışmalarından yararlanılmaktadır. Bunlar iki gruba ayrılmaktadırlar. Birinci grup, sinyal bileşenlerini kapsayan protein kinazlar ve transkripsiyon faktörleridir. İkinci grup ise ısı şoku proteinleri ve katalazın dahil olduğu fonksiyonel gruplardır (Qu *et al.* 2013).

Isı şoku proteinleri bitkilerde yüksek sıcaklık stresinde, sıcaklığa toleransı arttırmada merkezi role sahiptir. Dört gruba ayrılan ısı şoku proteinlerinin bir üyesi de 70 kD ağırlığına sahip olan HSP70 ailesidir. HSP70 ailesi yardımcı şaperonları ile birlikte hücrel mekanizmaların kurulmasını ve hücre bölümlerinin tamamında protein katlanması işlevini destekler. HSP70 normal şartlarda ve stres şartlarında proteinlerin kümelenmesi ve yeniden paketlenmesi fonksiyonlarına sahiptir (Frydman 2001).

HSP70 ailesi, önemli protein ve translokasyon işlevine sahiptir. Proteinleri lizozomlara hedefleyerek kararsız proteinlerin proteolitik bozulmasına yardımcı olurlar (Hartl 1996). HSP70 ailesi üyelerinin bir kısmı koruyucu olarak tanımlanmış ve bunlar HSP70 olarak (70 kD heat shock cognate) kaynak gösterilmiştir. Bu üyeler genellikle yeni sentezlenen polipeptitlerin transport ve translokasyon öncül proteinlerin katlanmasına yardımcı olmaktadır. Diğer üyeler ise çevresel şartların oluşturduğu olumsuzluklarla mücadele ederler. Böylelikle daha fazla protein yıkımı bozukluklarına ve daha fazla protein katlanmasına yardımcı olurlar (Miemyk *et al.* 1997) (Şekil 2.4).

HSP70 ailesinin bazı üyeleri, ısı şoku faktörlerinin olumsuz baskılarının biyolojik aktivitesinde rol oynarlar. (Wang, Vinocur *et al.* 2004). HSP70 üyelerinin yapısında korunmuş N-terminal ATPaz domainleri bulunmaktadır. HSP içinde en korunmuş olanlar HSP70 ailesi olduğu düşünülmektedir, *Escherichia coli* ile ökaryotik HSP70 yaklaşık olarak %50 benzerlik görülmektedir.



Şekil 2.1 Çeşitli stres koşullarında HSP proteinlerinde meydana gelen değişimlerin sinyal iletim mekanizması (Miemyk *et al.* 1997'den değiştirilerek alınmıştır)

HSP70 ailesinin bir üyesi olan HSP16.6 bitkilerde *in vitro* şartlar altında, katlanmış proteinlerde ve HSP70/100 komplekslerinde proteinlerin yeniden katlanmalarını sağlar (Wang *et al.* 2004).

HSP70 ailesi üyesi HSP17, hücre sitozolünde bulunur ve stabilize olmayan yeni proteinlerin katlanmasını önleme fonksiyonuna sahiptir (Wang *et al.* 2004). HSP70 ailesinin bir diğer üyesi olan HSP25, proteinlerin ara katlanmasını ve onların kümelenmelerini önlemede görevlidir (Ehrensperger *et al.* 1997).

HSP26, ısı düzenlemesinde görev alan oligomerik bir komplekstir. Isı düzenleyici şaperon olan HSP26, proteinlerin yeniden organizasyonu ile ilişkili görülmektedir (Haslbeck *et al.* 1999). Prokaryotlarda oksidatif stres ile uyarılan HSP33, indirgeyici koşullarda aktif olmayan ve sitozolde bulunan bir HSP70 üyesidir (Scarpeci *et al.* 2008).

2.3.3 Kuraklık stresi ve bitkilere olan etkileri

Kuraklık, tarım alanlarının büyük bir bölümünde görülen ve tarımsal üretimi sınırlandıran en önemli çevresel faktörlerden biridir (Zhu 2002). Küresel iklim değişiklikleri ve dünya nüfusunda ki artış kullanılabilir su kaynaklarını yetersiz kılmaktadır. 2025 yılı itibari ile yaklaşık 1,8 milyar insan su sıkıntısı ile yüzleşeceği ve dünya nüfusunun %65'inin bu sıkıntı ile karşılaşacağı tahmin edilmektedir (Nezhadahmadi *et al.* 2013). Su kaynaklarında yaşanacak yetersizlikler sulanabilir arazilerin azalmasına ve tarımsal üretimin önemli şekilde zarar görmesine neden olacaktır. Bu durum kuraklık sorununun ne denli önemli olduğunu ve ilerde kuraklık nedeni ile yaşanacak sıkıntıların boyutunu göstermektedir.

Eksik veya yetersiz su alımı tüm canlılarda olduğu gibi bitkilerde de çeşitli olumsuzluklara neden olmaktadır. Su yokluğu ve ya yetersizliği sonucunda ortaya çıkan kuraklık stresi, bitkinin çeşitli performanslarını etkileyen karmaşık bir parametredir (Ingram and Bartels 1996). Kuraklık stresine adaptasyonda ve stres toleransını arttırmada, bitkiler tarafından yeni yöntemlerin geliştirilmesi hayati önem taşımaktadır (Rizhsky *et al.* 2002). Bitkilerin kuraklık stresine karşı oluşturdukları cevaplarda birçok faktör etkilidir. Bitkilerin oluşturacağı cevaplarda bitkinin genotipi, büyüme sürecinde stresin şiddeti ve süresi (Chaves *et al.* 2003), farklı bitkilerin gen düzeyi (Denby and Gehring 2005), farklı bitkilerin terleme aktivitesi i(Ribas-Carbo *et al.* 2005) ve fotosentez mekanizması (Flexas *et al.* 2004) ile çevresel faktörler (McDonald and Davies 1996) etkilidir. Kuraklık stresi boyunca genlerin ekspresyonunda kritik cevaplar gözlenmektedir. Bu anlamda kuraklığa cevap oluşturan çeşitli genler belirlenmiştir (Szegletes and. 2000). Gen ekspresyonunda meydana gelen değişimler ile fizyolojik değişimler, kuraklık stresine karşı toleransı arttıran uyum mekanizmalarıdır. Kuraklık stresinin bitkilerde meydana getirdiği morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere birçok örnek verilebilir. Protein değişikliklerine, antioksidan üretimine, ozmotik ayarlamalara, hormon düzenin değişimine, kök derinliği ve uzunluğu artışına neden olması örnek gösterilebilir (Szegletes *et al.* 2000). Özellikle stoma hareketleri, kutikula kalınlığı, fotosentezin engellenmesi, klorofil miktarı, terlemenin azalması ve büyüme inhibisyonu üzerine etkileri bulunmaktadır (Yordanov *et al.* 2000). Kuraklık

stresi ayrıca polen steriliasyonu, absisik asit birikimine neden olabilmektedir (Ji *et al.* 2010). Kuraklık stresinin, hücre duvarı bütünlüğüne etkileri, metabolit sentezi, turgor basıncı, membran bütünlüğüne olan etkileri (Dat *et al.* 2000), kuraklık ile ilişkili proteinlerin ve dehidrin içeren enzimlerin sentezinin artması, vakuoler asit invertaz, glutasyon S-transferaz (GST) ve geç embriyogenez (LEA) proteinleri ekspresyonu, Rubisko, helikaz ve prolin üretimi üzerine etkisi bulunmaktadır (Nezhadahmadi *et al.* 2013).

Kuraklık stresinin neden olduğu morfolojik değişiklikler bitki boyunda kısalmalar, yaprak alanında (ayasında), yaprak uzunluğunda ve yaprak sayısında meydana gelen değişiklikler, kök uzantısındaki değişimler, erken olgunluk ve senesens sayılabilir (Jaleel *et al.* 2009).

Diğer tarımsal ürünlerde olduğu gibi buğday veriminde ve kalitesinde yıllara göre farklılıkların ortaya çıkmasının en önemli nedeni kuraklıktır. Farklı gelişme dönemlerindeki kuraklığın, buğdayın verim ve kalitesini ne şekilde etkilediğinin iyi anlaşılması, kuraklık stresi boyunca bitkide meydana gelen tüm fizyolojik ve moleküler değişikliklerin bilinmesi kuraklık stresine dayanıklı çeşit ıslahını önündeki engelleri kaldırabilecek ve yeni çeşitlerin geliştirilmesine de imkan sunabilecektir.

2.3.4 Transkripsiyon faktörleri

Bitkiler maruz kaldıkları değişikliklerin olumsuzluklarını tolere eden, çok yönlü moleküler cevaplar oluşturmaktadırlar. Bu değişiklikler, genellikle morfolojik ve fizyolojik değişikliklere uyum cevaplarıdır (Wang *et al.* 2013). Bu uyum tepkileri, transkripsiyonel veya dış uyaranların iletimi ve sinyal algılayan genlerin baskılanması şeklinde kullanılır (Wang *et al.* 2007).

Bitkilerdeki uyum mekanizması genellikle transkripsiyon faktörleri ile sağlanmaktadır (Pandey and Somssich 2009). Transkripsiyon faktörleri, transkripsiyonda veya genlerin düzenlenmesinde etkili olan, DNA dizisinde belli bölgelere (domain) bağlanan ve

genlerin ekspresyonunu arttıran ya da azaltan diziye özgü DNA bağlanma proteinleridir (Latchman 1997).

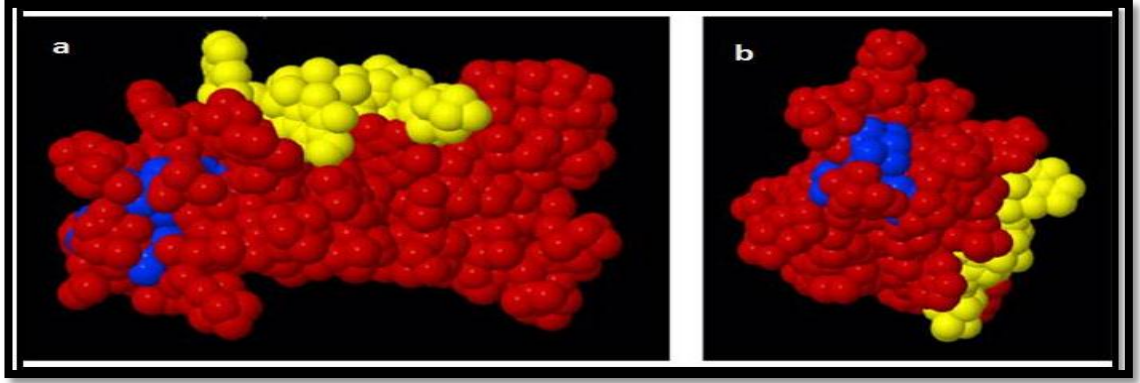
Transkripsiyon faktörleri karakteristik DNA bağlanma bölgelerine göre tanımlanmaktadır. Örnek olarak WRKY, AP2/ERF, NAC, B3 verilebilir. Transkripsiyon faktörlerine spesifik DNA bağlanma bölgelerinin çoğunun, transpozon elementler ile ilişkili endonükleazlardan köken aldığı tahmin edilmektedir (Yamasaki *et al.* 2013).

Transkripsiyon faktörleri spesifik DNA bağlanma bölgelerinin yanında, transkripsiyonu aktive eden bölgeler ve 30 ile 100 aminoasitlik bir kısım içermektedir. Aminoasitlerden oluşan protein kısım, farklı transkripsiyon faktörleri ile veya doğrudan RNA polimeraz ile etkileşime girebilir. DNA dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre, genlerin oranı ile kompleks organizmalar arasında olumlu bir uyum görülmüştür. Yine dizileme çalışmaları sonucunda, proteinlerin %20'sinin transkripsiyonda ve sinyal iletiminde rolü olduğu belirtilmiştir (Eulgem *et al.* 2000).

2.3.4.1 WRKY tipi transkripsiyon faktörleri

WRKY transkripsiyon faktörü, 100 temsilcisi olan transkripsiyon faktörlerinin bir üst ailesidir. WRKY transkripsiyon faktörü ailesinin karakteristik özelliği WRKY domainine, 60 aminoasit içeren katlanmış protein kısmına ve N terminalinde WRKYGQK motifine sahip olmasıdır (Wang *et al.* 2013).

WRKY TF'lerin belirleyici özelliği, WRKY domaini olarak adlandırılan DNA bağlanma bölgeleri ile N-terminal bölgede yer alan ve hemen hemen hiç değişmeyen aminoasit dizisidir (Rushton *et al.* 2010). WRKY transkripsiyon faktörü, DNA bağlanma bölgesi, WRKY domaini ve protein dizisinden oluşmaktadır. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi, sarı renkli kısımlar WRKY transkripsiyon faktörüne ait motif yapısı, mavi renkli kısımlarda bağlanma bölgesini belirtmektedir. Diğer kısım ise protein yapısını belirtmektedir (Rushton *et al.* 2010).



Şekil 2.2 WRKY transkripsiyon faktörünü protein konformasyonuna ait görünümü WRKY üyelerine ait WRKY domaini genel görünümü (a) ve WRKY domaini yapısal formu (b). Sarı bölgeler WRKY'ye ait motif bölgesi, mavi kısımlar DNA bağlanma bölgesi ve kırmızı kısım protein bölgesidir (Rushton *et al.* 2010).

WRKY transkripsiyon faktörleri bir transkripti aktive etmede veya baskılamada ya da bir transkripsiyonel aktiviteyi arttırmada veya baskılamada rol oynayabilir. Bazı WRKY transkripsiyon faktörleri ise her iki aktiviteyi de göstermektedir (Miao *et al.* 2008).

Çeşitli fizyolojik düzenlemelerde görev alan WRKY transkripsiyon faktörleri oldukça geniş işlevlerde görev alabilen farklı gruplar halinde sınıflandırılmaktadır (Eulgem *et al.* 2000).

İlk olarak tatlı patatesten tanımlanan WRKY transkripsiyon faktörü ailesi, özellikle strese dayanıklılık cevaplarının oluşturulmasında, bitki büyüme ve gelişmesinde düzenleyici olarak görev aldığı, tohum gelişiminde, çiçeklenmede, embriyogenezde, trikom gelişiminde ve hormon dahil sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Wang *et al.* 2013). WRKY transkripsiyon faktörlerinin patojen savunmasında, senesense ve daha pek çok işlevde etkili olduğu rapor edilmiştir (Eulgem *et al.* 2000).

WRKY transkripsiyon faktörlerinin en önemli özelliklerinden birisi de abiyotik strese verdikleri cevaplardır. Özellikle kuraklık stresine karşı oluşturduğu cevaplar bitkiye stres şartlarında dayanıklılık sağladığı belirtilmiştir (Rushton *et al.* 2010). Bitkilerin evrim süreci boyunca farklı WRKY'lerin, hücre yapısının gelişmesinde çeşitli

fizyolojik aktiviteleri kolaylaştırmada rol oynadığı ve bitkilerin savunma sisteminin merkezi bileşenleri olduğu belirtilmiştir (Wan *et al.* 2013).

2.3.4.2 bZIP tipi transkripsiyon faktörleri

bZIP transkripsiyon faktörlerinin tümü biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmektedir. Temel bölge olarak adlandırılan DNA bağlanma bölgesi ve lösin aminoasitlerinin ihtiva ettiği dimerlerin bulunduğu yapı ile tanınmaktadır (Jakoby *et al.* 2002) (Şekil 2.6).

Bitkilerde patojen savunması, tohum gelişi, çiçek oluşum sinyalizasyonu, ışık ve kuraklık streslerinin de dahil olduğu birçok biyotik ve abiyotik stres faktöründe düzenleyici olarak görev almaktadırlar. Sayılan tüm biyolojik düzenlemeler, on grup altında karakterize edilen bZIP (basic-domain leucine-zipper) transkripsiyon faktörleri tarafından yapılmaktadır (Jakoby *et al.* 2002).



Şekil 2.3 bZIP transkripsiyon faktörünün yapısına ait bölgelerin genel bir görünümü (Mavi bölge korunmuş bağlanma bölgesi diğer kısım ise protein bölgesi (Jakoby *et al.* 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

bZIP proteinleri temel bölgelerinin benzerliğine göre gruplara ayrılmıştır. Aynı grupta bulunan proteinler lösin aminoasidi içeren dimer kısmının büyüklüğüne göre ek özellikler taşıyabilmektedir. Sadece üç bZIP proteini hiç bir gruba dahil edilememiştir. CsbZIP12, CsbZIP15 üyelerinin de dahil olduğu grup üyeleri, bitkisel dokularda stres sinyallerinin veya absisik asit (ABA) sinyallerinin oluşumunda (Choi *et al.* 2000) rol aldığı belirtilmiştir.

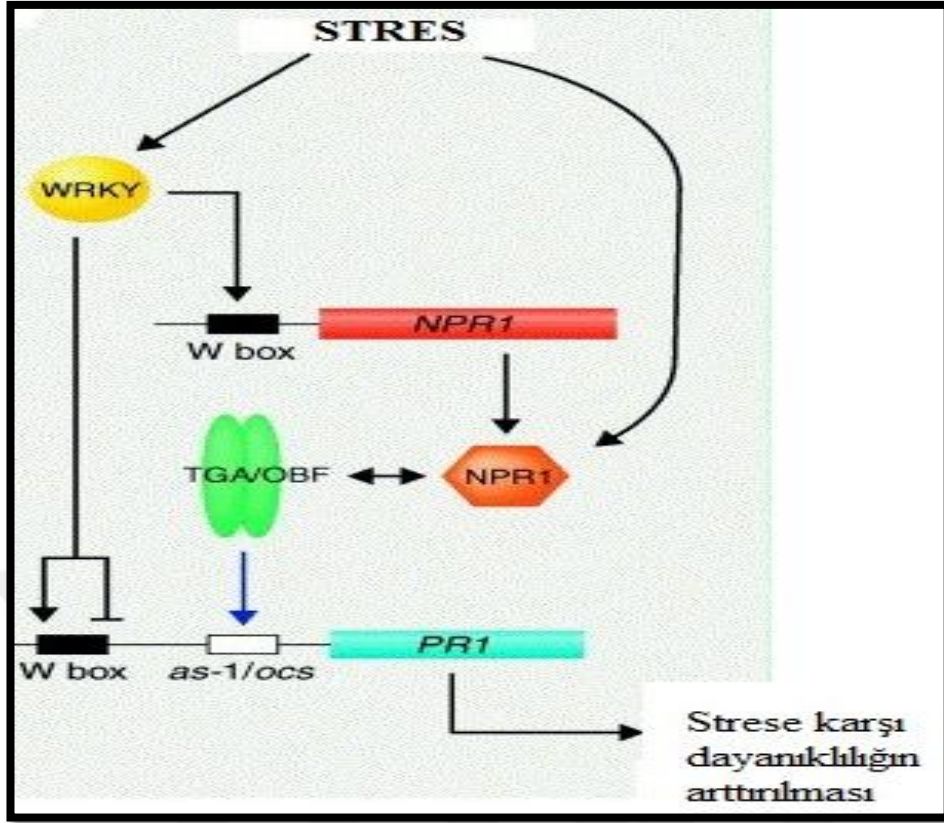
Vejetatif dokularda, ABA ve abiyotik stres faktörlerine ABA karşıtı elementler içeren CİS elementler ile gen ekspresyonunu arttırmayı sağlarlar. Bundan dolayı ABA ve stres,

bZIP üyelerinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen düzenlemelerine neden olur (Choi *et al.* 2000). ABA bitkisel dokulardaki işlevinin yanında geç embriyogenezde işlev gösteren LEA proteinlerinin promotör bölgesi için aktivatör olarak rol oynadığı tahmin edilmektedir (Nakamura *et al.* 2001). Böylelikle bZIP proteinleri, hem tohum oluşumunda hem de bitkisel dokularda ABA sinyal iletiminde önemli bir işlev göstermektedir. (Kircher *et al.* 1998).

CsbZIP30 üyesinin dahil olduğu grubun karakteristik özelliği, transkripsiyon faktörünün korunmuş kısımda lösin aminoasitleri ile birlikte lizin aminoasitinin de bulunmasıdır. Aminoasit değişimi, bZIP proteinin bu grubu için özel bağlanma bölgesi gerektirmektedir. Palindromik olamayan bu kısmın DNA'ya daha yüksek bir affinite ile bağlanmaya neden olduğu tahmin edilmektedir (Fukazawa *et al.* 2000). CsbZIP30'un da dahil olduğu grup, giberillin biyosentez yolunun aktivasyonunda, vasküler doku gelişiminin regülasyonunda rol oynamaktadır (Ringli and Keller 1998).

bZIP54 ve CsbZIP55 üyelerinin dahil olduğu bir diğer grubun özelliği, N terminal bölgesinde korunmuş ve prolince zengin bölgenin bulunmasıdır. Bu bölgenin transkripsiyonel aktivasyon potansiyelinin olduğu düşünülmektedir (Terzaghi *et al.* 1997). Bu grup üyeleri, ultraviyole ve mavi ışık sinyal iletimi ile diğer ışık duyarlı proteinlerin regülasyonunda işlev göstermektedir (Kircher *et al.* 1998).

Transkripsiyon faktörleri arasında 75 üyeye sahip geniş bir aileden oluşan bZIP proteinleri, özellikle ksenobiyotik stres faktörüne karşı düzenleyici olarak görev almaktadır. Bu grup üyeleri, stres ile bağlantılı yanıtları Giberillin/oktopin sentaz element bağlayıcı proteinleri (OBF) kapsamaktadır (Singh *et al.* 2002). Bu aktivatör sekans bağlayıcı elementler strese duyarlı PR-1 ve Glutatyon-S-transferaz gibi genlerin ekspresyonlarını düzenler (Subramaniam *et al.* 2001). Şekil 2.7'de stres durumunda oluşturulan mekanizmanın basit bir gösterimi yer almaktadır (Singh *et al.* 2002).



Şekil 2.4 bZIP ve WRKY transkripsiyon faktörlerinin stres veya savunma durumuna ait sinyal yolları (NPR-1 geni bZIP proteinlerini aktive ederek savunmada görevli PR1 geninin aktivitesini artırır) (Singh *et al.* 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinin elit ve kuraklık ile yüksek sıcaklığa dayanıklı veya hassas olan çeşitler arasından seçilmesine önem verilmiştir.

Çalışmada materyal olarak, Orta Anadolu ve Geçit bölgelerinde yaygın olarak ekimi yapılan **Bayraktar 2000**, **Demir 2000**, **Bezostaja-1**, **Sönmez-01**, **Karahan-99** ve **İkizce-96** çeşitleri, kuraklığa toleransı yüksek olduğu bilinen **Sivas 111/33** ve **Gerek 79** çeşitleri ile kuraklığa hassas **Atay 85** çeşidi kullanılmıştır. Ayrıca kuraklığa ve yüksek sıcaklığa tolerans bakımından öne çıkan yabancı orijinli **Zubkov** (Kırgızistan) ve **OK-00421** (ABD) çeşitleri de kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan ekmeklik buğday çeşitleri, TÜBİTAK tarafından desteklenen 113O016 nolu proje kapsamında ekimi yapılan ve kuraklık, sıcaklık, kuraklık ve sıcaklık streslerine maruz bırakılan çeşitlerdir. Çalışma kapsamında kullanılan çeşitlerin özellikleri kısaca aşağıda belirtilmiştir;

Bayraktar 2000; Alternatif gelişme özelliğine sahip ve erkenci bir çeşittir. Soğuğa, kurağa dayanıklı ve gübreye verdiği cevap yüksek olup, tane dökmeyen, harman olma kabiliyeti iyi olan bir çeşittir. Hektara 300-400 kg verim kabiliyetine sahiptir. İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinin buğday tarımı yapılan kıraç alanlarına tavsiye edilmektedir.

Demir 2000; Alternatif gelişme özelliğine sahip olup orta erkencidir. Soğuğa, kurağa ve yatmaya dayanıklı, gübreye verdiği cevap iyi olan ve tane dökmeyen bir çeşittir. Hektara 300-400 kg ürün verebilme potansiyeline sahiptir. İç Anadolu ve Geçit bölgesinin taban ve destek sulama yapılan alanlarına önerilmektedir.

Bezostaja-1; Orta erkenci olup, kışlık tabiatlı ve yağışı yüksek veya sulu alanlara ekimi tavsiye edilmektedir. Yatmaya dayanıklı olup, kardeşlenme seviyesi orta düzeydedir. Verim düzeyi kuru tarımda 150 kg/da iken sulu tarımda 600 kg/da'a ulaşmaktadır.

Çeşide ait 1000 dane ağırlığı 38-44 g, ve hektolitre ağırlığı 80-84 kg,'dır. Protein %12-15, Mikro SDS Sedimentasyonu >16 ml ve yumuşama derecesi 70-100 BU olup ekmeklik kalitesi yüksektir. Bu çeşit kahverengi pasa dayanıklı, diğer paslara, sürme ve rastığa orta dayanıklıdır.

Sönmez-01; Erkenci ve kışlık olup, kuru tarım için tavsiye edilmektedir. Ek sulama ile verimi yüksek oranda artan bir çeşittir. Yatmaya dayanıklı olup kardeşlenme özelliği orta derecededir. Sap verimi yüksektir. Verim düzeyi kuru tarımda 250 kg/da, sulu tarımda 600 kg/da'a kadar ulaşmaktadır. Yumuşama derecesi 120-150 BU'dur.

Gerek 79; Bu çeşit, Türkiye'de kuru tarım yapılan alanlar için en geniş adaptasyona sahiptir. Sap verimi yüksek olup tane dökmeyen ve kardeşlenme yeteneği kuru tarım yapılan alanlarda en yüksek olan çeşittir. Verim düzeyi kuru tarımda 250 kg/da ve ek sulama ile 500 kg/da'a ulaşmaktadır. Çeşidin 1000 dane ağırlığı 32-38 g, hektolitre ağırlığı 79-82 kg, protein %11-13 ve yumuşama derecesi 150-200 BU olup ekmeklik kalitesi ortadır.

Atay 85; Bu çeşidin kışa dayanıklılığı iyi olup, kardeşlenme düzeyi orta-seviyededir. Erkenci bir çeşittir ve yatmaya dayanıklıdır. Hektara verimi ortalama 850 kg'dır. Protein oranı %11-13 olan bu çeşit, kuraklığa hassastır.

Sivas 111/33; Bu çeşit kışa, kuraklığa dayanıklı; sürme, rastık, kahverengi ve kara pasa zayıf, sarı pasa orta dayanıklıdır. Tane yapısı oval ve unlu; bin tane ağırlığı yaklaşık 40 g, ekmeklik kalitesi orta düzeydedir.

Karahan 99; Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1999 yılında tescil edilmiş, kılçıklı ve tane rengi beyazdır. Bitki boyu 80-100 cm'dir. Kışlık gelişme özelliğine sahip olan bu çeşidin soğuğa kurağa dayanıklılığı iyidir. Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde kuru tarım için tavsiye edilmektedir.

İkizce 96; Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından 1996 yılında tescil edilen, beyaz başaklı ve kılçıklıdır. Taneleri kırmızı ve sert olup orta boylu ve sağlam

saplıdır. Çeşit, orta erkencidir. Soğuğa, kurağa ve yatmaya dayanıklı olup gübreye reaksiyonu iyi olan, tane dökmeyen bir çeşittir. Kuru tarımda dekara 250-350 kg verim verme kabiliyetine sahiptir.

Zubkov; Bu çeşit Kırgızistan orijinelidir. CIMMTY Türkiye Ofisi tarafından sulu tarımda ve kuru tarımda yapılan 3 yıllık denemelerde sıcaklığa ve kuraklığa dayanıklılık bakımından öne çıkmıştır.

OK-00421; Oklahama'da (ABD) tescil ettirilmiş ve CIMMTY Türkiye ofisi tarafından sulu ve kuru tarım şartlarında yapılan 3 yıllık deneme sonucunda sıcaklığa ve kuraklığa dayanıklı olarak öne çıkmıştır

Yapılan çalışmada 11 ekmeklik buğday çeşidi kullanılmış ve kuraklık stresi uygulamaları sonucunda kuraklığa dayanıklı ve hassas çeşit tespiti yapılmaya çalışılmıştır.

11 ekmeklik buğday çeşidinden yerli çeşitlere ait tohumlar Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilirken, yabancı orijinli olan çeşitlere ait tohumlar ise Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü aracılığıyla CIMMTY Türkiye ofisinden temin edilmiş ve ekim dönemine kadar serin ve kuru bir ortamda saklanmıştır. Çeşitlere ait DNA örneklerinin elde edilmesi amacı ile 11 çeşit ekmeklik buğday çeşidi Mayıs 2015 tarihinde Çankırı Karatekin Üniversitesi bünyesinde bulunan serada yetiştirilmiştir. Çalışmada kullanılacak buğday çeşitleri saksılarda yetiştirilmiştir. Torf ve perlit kullanılarak (1:1 oranında) hazırlanan karışım saksılara eşit oranda doldurulmuştur. Her saksıya eşit oranda tohum ekilmiş ve tohum sayısı her saksıda 4-6 tane olacak şekilde hesaplanmıştır. Saksılarda bulunan tohumların çimlenip bitkiler oluşuncaya kadar gerekli bakımlar yapılmıştır. Bitkilerin yaprakları ortalama 10-15 cm olunca genomik DNA izolasyonu için çeşitlere ait yaprak dokuları alınmış ve sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra -80°C'de saklanmıştır.

Çeşitlere ait stres uygulamaları, 1130016 nolu proje kapsamında Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait iklim odalarında yapılmıştır. Proje kapsamında yapılan

stres denemeleri sonucunda elde edilen bitki materyali, RNA-Seq analizinde kullanılmış ve analiz sonucunda seçilen Transkripsiyon Faktörlerine ait bazı genler qRT-PZR 'da kullanılmıştır. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılacak çeşitlerin stres uygulamaları Temmuz 2015 tarihinde Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda bulunan iklim kabinlerinde yapılmıştır. Seçilen çeşitlere sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık olacak şekilde üç farklı stres uygulaması yapılmıştır. Stres uygulaması, stres uygulanmış uygulama grubu ve stres uygulanmamış kontrol grupları şeklinde oluşturulmuştur. Seçilen çeşitler için, her çeşitten üç tekerrür olacak şekilde uygulama grubu ve kontrol grubu oluşturulmuştur. Tohumların çimlendirilmesi petrielerde ve oda sıcaklığında yapılırken, bitkilerin yetiştirilmesi MS ortamında ve kontrollü iklim kabinlerinde yapılmıştır. Yetiştirilen bitkilerin stres uygulamaları yine kontrollü iklim kabinleri kullanılarak yapılmıştır. Stres uygulamalarının tamamlanması sonucunda bitkilere ait kök ve yaprak dokuları alınmış ve sıvı azot içerisinde dondurularak RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Buğday çeşitlerinin SSR markörler ile taranması

3.2.1.1 Buğday çeşitlerinin ekimi ve yetiştirilmesi

Torf ve perlit karışımından oluşan (1:1 oranında) toprak bir yığın haline getirildikten sonra 25 cm çapında ve 30 cm derinliğindeki saksılara eşit miktarlarda doldurulmuştur. Her bir saksıda 4-6 bitki olacak şekilde tohumlar 5 cm derinliğe ekilmiştir. Her bir çeşit için 3 tekerrür olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tohumların çimlenmesi için saksılar oda ısısında bekletilmiştir. 15-20 gün boyunca gerekli bakımları yapılan bitkiler (sulama vb.) genomik DNA izolasyonunda kullanılmak üzere yaprak materyali alınacak şekilde hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.2 Buğday materyallerinin toplanması

Saksılarda yetiştirilen buğday çeşitlerinden 15-20 günün sonunda genomik DNA izolasyonu için yaprak dokuları alınmıştır. Bitkilerin ilk 2-3 yaprağı, steril bisturi yardımı ile kesilmiş ve önceden etiketlenmiş alüminyum folyolara sarılarak sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Dondurulan dokular -80°C’de saklanmıştır.

3.2.1.3 Materyallerin genomik DNA izolasyonu için hazır hale getirilmesi

Yetiştirilen buğday çeşitlerinden toplanan yaprak dokuları, DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyonu CTAB (Saghai-Maroo *et al.* 1984, Doebley and Stec 1991) protokolüne göre yapılmıştır. 150 mg polyvinilprilydon tartılarak steril 2 ml’lik ependorf tüplere alınmıştır. Polyvinilprilydon bulunan tüplere bir adet 0.7 cm çapında çelik boncuk ilave edilerek hazır hale getirilmiştir. Buğday yaprakları hazırlanan tüplere aktarıldıktan sonra tekrar bir adet boncuk ilave edilmiş ve örneklerin bulunduğu tüpler hemen sıvı azot içerisine alınarak dondurulmuştur. Örneklerin bulunduğu tüpler homojenizatör (TissueLyser II, QIAGEN) cihazına yerleştirilmiştir. Yapraklar, tüplerde bulunan boncuklar yardımı ile fiziksel parçalanmaya tabi tutulmuştur. Örnekler cihazda 30 frekans (1/S) dalga boyunda 45 saniye boyunca tutulmuştur. Cihazdan alınan tüpler hemen sıvı azot içerisine alınarak tekrar dondurulmuştur. İzolasyon öncesi tüplerde bulunan boncuklar çıkarılarak örnekler, genomik DNA izolasyona hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.4 Genomik DNA izolasyonu

Öncelikle süzkroz çözeltisinin hazırlanması için, 50 mM EDTA, 120 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 M süzkroz, %2 TRİTON-X 100 bir tüpe alınmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH’sı 8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan karışıma en son aşamada %0.2 β-merkaptotanol eklenerek 60°C’de bekletilmiş ve böylelikle hazırlanan karışımın taze olarak kullanılması sağlanmıştır.

CTAB çözeltisinin hazırlanması için, 20 mM EDTA, 100 mM TRİS, HCl 1.5 M NaCl ile %2 CTAB bir tüpe alınmış, 121°C'de 1atm basınçta otoklav edilerek steril hale getirilmiştir. Hazırlanan karışımın %1 oranında β-merkaptoetanol en son aşamada kullanılacak şekilde hazırlanmış ve 60°C'de bekletilmiştir. CTAB ve Sükroz çözeltileri her bir örneğe 1.2 ml konacak şekilde hesaplanarak hazırlanmıştır. %100 etanol her bir örneğe 2 ml konacak şekilde hazırlanmış, %70 etanol her bir örnek için 1 ml olacak şekilde hazırlanmış, %100 izopropanol (2-propanol) her bir örnek için 1 ml olacak şekilde hazırlanmış, 24 ml chloroform, 1 ml izoamilalkol (24:1 v/v) karışımı hazırlanmış ve her bir örneğe 1 ml olacak şekilde hesaplanarak -20°C'ye alınmıştır.

2 ml'lik ependorf tüplere 150 mg polyvinylpyrrolidone (PVP) tartılıp konulmuştur. Her bir tüp için 150 mg yaprak dokusu PVP bulunan tüplere alınmış ve homojenizatör (Tissulyzer II, QIAGEN)) cihazı yardımı ile ezilerek toz haline getirilmiştir. Her tüpte bulunan yaprak dokusu üzerine 1.2 ml 60°C'de bulunan sükroz çözeltisi eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Tüpler 10 dk aralıklarla karıştırılmak üzere 1 saat boyunca 60°C'de bekletilmiştir. Bir saatin sonunda tüpler 10.000 rpm'de oda sıcaklığında 20 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra üsteki sıvı faz (süpernatant) dikkatli bir şekilde yeni tüplere alınmıştır. Süpernatantların bulunduğu her bir tüpe CTAB çözeltisi 1.2 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımların bulunduğu tüpler 40 dakika 60°C'de inkübe edilmiş ve 10 dakika da bir karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Dikkatli bir şekilde her bir tüp iki yeni tüpe bölünerek dağıtılmıştır. Tüplere 1 ml kloroform-izoamilalkol (24/1 v/v) eklenip yumuşakça 15-20 kez karıştırıldıktan sonra 12.500 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. 1 ml izopropanol eklenen tüpler -20°C'de bir gece bekletilmiştir. -20'den alınan tüpler 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmış ve sıvı kısmı dikkatlice dökülmüştür. Pellete %100 saf etanol'den 2 ml eklenmiş ve dikkatlice pellet yüzdürülmüştür. 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmış ve daha sonra etanol dikkatli bir şekilde dökülmüştür. %70 etanolden 1 ml eklenmiş, 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmış ve sonrasında etanol dikkatlice dökülmüştür. Tüpler oda ısısında 3 dakika ve tüplerin kapakları açık şekilde kurumaya bırakılmıştır. Tüplerde bulunan pelletin üzerlerine 50 µl didistile (ddH₂O) su eklenmiştir. Tüpler ısı bloğunda

60°C’de 2 dakika pelletin çözünmesi sağlanacak şekilde bekletilmiştir. Böylelikle izole edilen DNA örnekleri PZR reaksiyonu için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Herhangi bir DNA örneğinin PZR reaksiyonlarında kullanılması, izolasyon sonucunda elde edilen DNA’nın kalitesine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Bu amaçla izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve kalitesi belirlenmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonunu, NanoDrop Spektrofotomere cihazı (Thermo, 2000c) kullanılarak belirlenmiştir. İzole edilen DNA örneklerinden 1 µl alınıp NanoDrop cihazının haznesine aktarılmıştır. Cihaz mikrolitrede var olan DNA konsantrasyonunu nanogram değerini okumaktadır (µl/ng). DNA örneğinin kalitesini belirlemek için 2 µl DNA örneği 0.2 ml’lik eppendorf tüplere alınmış, üzerine 1 µl boya (Loading dye) eklenmiştir. Hazırlanan örnek TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) solüsyonu içerisinde bulunan %0.8’lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jele yüklenen bu örnekler 100 voltta, 60 dakika yürütülmüştür. Yürütme süresi bitiminde agaroz jel UV transilluminatör ışığı altında görüntülenmiştir. Örneklerin DNA kalitesini belirlemek için agaroz jele standart olarak 1 kb uzunluğa sahip markör de (Gene Ruler) yüklenmiş ve diğer örneklerle birlikte yürütülmüştür.

3.2.1.5 PZR reaksiyonları (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR reaksiyonları için çeşitlere ait DNA örnekleri kalıp olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda literatür araştırmaları sonucunda kuraklık stresi ile ilişkili polimorfik 26 SSR primeri belirlenmiştir. Belirlenen primerler ‘Buğday Genome Database’ (GenBank) sitesi kullanılarak, seçilen SSR primer çiftlerinin kuraklıkla ilişkili olduğu teyit edilmiştir. PZR reaksiyonu 25 µl hacminde hazırlanmıştır. PZR reaksiyonu, 75 mM Tris-HCl, pH: 8.8, 20 mM (NH₄)₂ SO₄, 2.0 mM MgCl₂, %0.1 Tween 20, 200 mM dNTP, 50 nM ileri ve geri primer, 1 ünite Taq DNA polymerase ve DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR döngü koşulları olarak ön denatürasyon, 94°C’de 5 dk, 36 döngü boyunca denatürasyon aşaması, 94°C’de 1 dakika, primerin DNA’ya yapışma safhası 50-60°C’de (primer çiftine göre değişmek üzere) 1 dakika, uzama safhası, 72°C’de 1 dakika ve son uzama safhası da döngü boyunca 72°C’de 5 dakika şeklinde

gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonlarında kullanılan SSR primerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 SSR primer listesi

Primerler	İleri Primer	Geri Primer	Referanslar
Wmc63	GTGCTCTGGAAACCTTCTACGA	CAGTAGTTTAGCCTTGGTGTGA	(Bousba <i>et al.</i> 2012)
Wmc89	ATGTCCACGTGCTAGGGAGGTA	TTGCCTCCCAAGACGAAATAAC	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Wmc48	GAGGGTTCTGAAATGTTTTGCC	ACGTGCTAGGGAGGTATCTTGC	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Wmc420	ATCGTCAACAAAATCTGAAGTG	TTACTTTTGTGAGAAAACCTT	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Wmc601	ACAGAGGCATATGCAAAGGAGG	CTTGTCTCTTTATCGAGGGTGG	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Gwm192	GGTTTCTTTCAGATTGCGC	CGTTGTCTAATCTGCGCTTGC	(Quarrie <i>et al.</i> 2003)
Gwm30	ATCTTAGCATAGAAGGGAGTGGG	TTCTGCACCCTGGGTGAT	(Quarrie <i>et al.</i> 2003)
Gwm382	GTCAGATAACGCCGTCCAAT	CTACGTGCACCACCATTTTG	(Macovei <i>et al.</i> 2007)
Gwm11	GGATAGTCAGACAATTCTTGTG	GTGAATTGTGTCTTGTATGCTTCC	(Barakat <i>et al.</i> 2011)
Gwm295	TACTGGTTCACATTGGTGGC	TCGCCATCACTCGTTCAAG	(Dodig <i>et al.</i> 2010)
psp3200	GTTCTGAAGACATTACGGATG	GAGAATAGTGGTTTTGTGG	(Quarrie <i>et al.</i> 2003)
Gwm136	GACAGCACCTTGCCCTTTG	CATCGGCAACATGCTCATC	(Nitta and Nasuda 2008)
Gwm148	GTGAGGCAGCAAGAGAGAAA	CAAAGCTTGACTCAGACCAA	(Nitta and Nasuda 2008)
Barc108	GCGGGTCTGTTTCTGAAATTCATCTAA	GCGAAATGATTGGCGTTACACCTGTTG	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Barc121	ACTGATCAGCAATGTCAACTGAA	CCGGTGTCTTTCCTAACGCTATG	(Ciucă and Petcu 2009)
Gwm260	GCCCCCTTGACAATC	CGCAGCTACAGGAGGCC	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Gwm484	ACA TCG CTC TTC ACA AAC CC	AGT TCC GGT CAT GGC TAG G	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Wmc9	AACTAGTCAAATAGTCGTGTCGG	GTCAAGTCATCTGACTTAACCCG	(Marmar <i>et al.</i> 2013)
Gwm46	GCACGTGAATGGATTGGAC	TGAACCCAATAGTGGTGGTCA	(Dodig <i>et al.</i> 2010)
Gwm160	TTCAATTCAGTCTTGGCTTGG	CTGCAGGAAAAAAGTACACCC	(Quarrie <i>et al.</i> 2003)
Gwm165	TGCAGTGGTCAGATGTTTCC	CTTTTCTTTCAGATTGCGCC	(Quarrie <i>et al.</i> 2003)
Wmc596	TCAGCAACAAACATGCTCGG	CCCGTGTAGGCGGTAGCTCTT	(Ciucă and Petcu 2009)
Wmc603	ACAAACGGGTGACAATGCAAGGA	CGCCTCTCTCGTAAGCCTCAAC	(Ciucă and Petcu 2009)
Gwm369	CTGCAGGCCATGATGATG	ACCGTGGGTGTTGTGAGC	(Dodig <i>et al.</i> 2010)
Gwm539	CTGCTCTAAGATTATGCAACC	GAGGCTGTGCCCTCTGTAG	(Dodig <i>et al.</i> 2010)

3.2.1.6 Analiz

SSR analizlerinde elde edilecek bantların büyüklüklerinin birbirine çok yakın olması ve bu bantları ayırmada güçlüklerin olması nedenleriyle bant ayırımı Agoroz jel Elektroforez yöntemi kullanılarak yapılmıştır. PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülmeden önce, her PZR ürünü üzerine 3µl yükleme boyasından (loadig dye) ilave edilmiş ve PZR ürünleri agaroz jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir. Elektroforez için %2’lik konsantrasyona sahip agaroz jel

kullanılmıştır. PZR ürünleri 10 µl olacak şekilde jele yüklenmiş olup 100 V'ta ve ortalama 120 dakika yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrasında UV transilluminatör altında jele ait görüntü alınmıştır. Görüntülenme sonucunda elde edilen bantlara skorlama yöntemine göre 0 ve 1 değerleri verilerek analiz dosyası hazırlanmıştır. Kullanılan buğday çeşitlerinin birbirlerine olan genetik benzerlikleri PHYLIP Version 3.68 (Phylogeny Inference Package) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır (Felsenstein 2005). Aynı paket programında yer alan Seqboot programı kullanılarak çeşitlere ait sonuçlar 1000 kez karıştırılmak suretiyle bir benzerlik matrisi oluşturulmuştur. Pars programı kullanılarak elde edilen matris ile çeşitlere ait genetik benzerlik katsayıları elde edilmiş ve bu katsayılar kullanılarak kümeleme (cluster) analizi yapılmıştır. Çeşitlere ait genetik yakınlığın belirlenmesi amacı ile TreeWiew (Page 2002) programı kullanılmış ve Neighbor-Joining Tree (Komşu birleştirme ağacı) metoduna göre dendogram çizilmiştir.

3.2.2 Çeşitlere ait HSP70 proteinlerinin bazı üyelerinin ve bZIP, WRKY TF'lerinin bazı üyelerinin gen ifade seviyelerinin belirlenme

Kuraklık, yüksek sıcaklık, kuraklık ve yüksek sıcaklık stres uygulaması sonucunda çeşitlere ait yaprak ve kök dokularındaki gen ifade seviyelerinde meydana gelen değişimleri belirlemek amacı ile Real Time kantitatif PZR (qRT-PCR) çalışmaları yapılmıştır. Kuraklık, yüksek sıcaklık, kuraklık ve yüksek sıcaklık stresleri ile ilişkili genler 113O016 nolu proje kapsamında yapılan RNA-Seq analizi sonucunda belirlenmiş ve bu genlerin stres süresince değişimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece seçilen çeşitlerin uygulanan streslere karşı dayanıklı veya hassas oldukları moleküler çalışma ile desteklenmeye çalışılmıştır.

3.2.2.1 Stres uygulamaları

Çalışmada, TÜBİTAK 113O016 nolu proje kapsamında yapılan stres uygulamaları sonucunda kuraklığa ve sıcaklığa dayanıklı olduğu belirlenen Zubkov, kuraklığa ve sıcaklığa hassas olduğu belirlenen Atay 85 ile kuraklığa ve sıcaklığa orta dayanıklı olarak belirlenen Karahan 99 çeşidi seçilmiştir. Çeşitlere sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık stresleri uygulanmıştır.

Çeşitlere ait tohumların sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlar çimlendirilmeye alınmıştır. Çimlenen tohumların MS ortamında (Clough and Bent 1998) büyümeleri sağlanmış ve her üç çeşide sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık stresi uygulanmıştır. Kuraklık uygulaması PEG6000 kullanılarak yapılmıştır (Okay *et al.* 2014). Stres uygulaması sonucunda çeşitlere ait yaprak ve kök dokuları toplanarak -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2.2 Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Tohumlar ön sterilizasyon amacıyla %70’lik etanolde 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar %5 sodyum hipoklorit (NaOCl) içeren ticari çamaşır suyunun %10’luk (v/v) dozunda manyetik karıştırıcı üzerinde 10 dakika süreyle sterilizasyona tabi tutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, 3 kez 5’er dakika steril saf su ile durulanmıştır. Steril tohumlar petriler içerisinde, her petride 5 tohum olacak şekilde, tohumlar 2 tabaka otoklav edilmiş filtre kağıdı arasına yerleştirilmiştir. Tohumların bulunduğu petriler, her çeşit için 3 tekrerrür olacak şekilde hazırlanmıştır. Oda ısısında bekletilen ve su kontrolü yapılan tohumların çimlendirilmesi sağlanmıştır.

3.2.2.3 Bitkilerin büyütülmesi

Çimlendirilen tohumlar, %4,4 oranında MS (Murashige ve Skoog) mineral tuzları ve vitaminleri ile %5 sükröz içeren ve %5’lik agar ile katılaştırılan temel besin ortamına aktarılmıştır. Besin ortamının pH’sı 1N NaOH ya da 1N HCl kullanılarak 5.7’ye ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 121°C’ de 20 dakika otoklav edilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Bitkiler 10 gün boyunca, MS besin ortamında gündüz ve gece sıcaklığı 25°C olacak şekilde, 16/8 fotoperiyotta nispi nem ise %70 oranında 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foresan ışığında iklim dolabında (POL-EKO Apartura SP.J) büyütülmüştür.

3.2.2.4 Bitkilere stres uygulanması

Bitkiler 10. günün sonunda 24 saatlik (1 gün) sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık stresi uygulamasına tabi tutulmuştur.

Kuraklık stresi uygulaması: Kuraklık stresi için %20 konsantrasyona sahip PEG6000 içeren MS besin ortamı hazırlanmıştır. Çeşitlere ait bitkiler üç tekerrür olacak şekilde PEG6000 içeren MS ortamına alınmıştır. Bitkilerin bir kısmı üç tekerrürlü olmak üzere kontrol grubu şeklinde gruplandırılmıştır. Kontrol grubuna ait bitkiler PEG6000 ihtiva etmeyen normal MS ortamına aktarılmıştır. Kontrol grubu ve uygulama grubuna ait bitkiler gündüz ve gece sıcaklığı 25°C ve 16/8 fotoperiyotta, nispi nem ise %70 oranına sahip iklim kabinine alınmıştır.

Sıcaklık stresi uygulaması: On gün süre ile yetiştirilen bitkilerin bir bölümü sıcaklık stresi uygulaması için normal MS ortamına aktarılmıştır. Her çeşit için üç tekerrür ve kontrol grubu için üç tekerrür olacak şekilde bitkiler gruplandırılmıştır. Bitkilerin bulunduğu magentalar, gündüz 32°C, gece sıcaklığı 18°C ve 16/8 fotoperiyotta, nispi nem ise %70 oranına sahip iklim kabinine alınmıştır.

Kuraklık ve sıcaklık stresi uygulaması: On gün boyunca yetiştirilen bitkiler her çeşit için üç tekerrür olacak şekilde gruplandırılmıştır. Aynı zamanda kontrol grubu için de çeşitlere ait üçlü tekerrürler oluşturulmuştur. Sıcaklık ve kuraklık stresinin uygulanabilmesi için %20 konsantrasyona sahip PEG6000 içeren MS ortamı hazırlanmıştır. Yetiştirilen bitkiler 24 saat için PEG6000 bulunan MS ortamına aktarılmıştır. Çeşitlere ait üç tekerrürden oluşan kontrol grupları PEG6000 ihtiva etmeyen normal MS ortamına aktarılmıştır. Kuraklık stresi ile birlikte sıcaklık stresinin uygulanması için PEG6000 içeren ortama alınmış bitkiler, gündüz 32°C, gece sıcaklığı 18°C ve %70 nispi nem oranına sahip iklim kabinine alınmıştır. Çeşitlere ait kontrol grupları ise gündüz ve gece sıcaklığı 25°C'de ve %70 nispi nem oranına programlanmış iklim kabinine alınmış ve burda 24 saat boyunca tutulmuştur.

3.2.2.5 Çeşitlere ait doku örneklerinin toplanması

Üç stres ortamında 24 saat süre ile tutulan çeşitlere ait yaprak ve kök dokuları alınarak -80°C’de depolanmıştır. Bunun için MS ortamında bulunan bitkiler steril pens yardımı ile ortamdan alınmıştır. Alkol ile tenizlenmiş bistüri kullanılarak bitkiye ait yaprak ve kök dokuları kesilerek alınmış ve hemen etiketlenmiş alüminyum folyoya sarılarak sıvı azot içerisinde atılmıştır. Sıvı azot içerisinde dondurulan doku örnekleri RNA izolasyonu için -80°C’de depolanmıştır.

3.2.2.6 Total RNA izolasyonu

Buğday çeşitlerine ait yaprak ve kök dokuları kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu TRIzol (Ambion) reaktifi kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle her bir örnek için 1ml %75’lik etanol çözeltisi, 500 µl 2-propanol, 200 µl kloroform kimyasalları daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de bekletilmiştir. 2 ml’lik ependorf tüplere 1 ml TRIzol reaktifi eklenmiştir. Çeşitlere ait dokulardan yaklaşık 100 mg alınarak havanda, sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş, toz haline gelen numuneler hızlıca TRIzol reaktifi bulunan tüplere aktarılmış ve hızlıca çalkalanarak iyice karışması sağlanmıştır. Örneklerin bulunduğu tüpler oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüplerin üzerine 0.2 ml kloroform çözeltisi eklenmiştir. Tüpler iyice karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 15 dakika 4°C’de 15.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üstteki süpernatant yeni 2 ml’lik ependorf tüplere alınmıştır. Üzerine 500 µl 2-propanol eklenmiş ve yumuşakça karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 15.000 rpm’de 10 dakika 4°C’de santrifüj edilmiştir. Tüplerde biriken süpernatant atılmış, pellet bırakılmıştır. Tüplerde bulunan pellete 1 ml %75’lik etanol eklendikten sonra tüpler, 5 dakika 8000 rpm’de 4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda etanol dökülmüş ve tüpler alkolün uçması için 10 dakika ağzı açık bir şekilde bekletilmiştir. Tüpler kuruduktan sonra oluşan pelletin büyüklük durumuna göre yaklaşık 40-50 µl steril su (ddH₂O) eklenerek pellet çözülmüştür. Çözüm işlemi için ısı bloğundan yararlanılmıştır. Tüpler 57°C’de 2-3 dakika bekletilerek RNA örneklerinin daha iyi çözünmesi sağlanmış, kalitatif ve kantitatif değerlerin elde edilmesi için yapılacak ölçümlere hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.7 İzole edilen RNA örneklerine ait kalitatif ve kantitatif ölçümler

Çeşitlerden alınan yaprak ve kök dokularına ait RNA örneklerinin saflık derecelerini ve konsantrasyon değerlerini belirlemek amacı ile NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Spektrofotometre olarak Thermo Scientific NanoDrop (ND-2100c, Thermo) cihazından yararlanılmıştır. NanoDrop (ND-2100c, Thermo) spektrometresinin ölçümünde, 260/230 absorbans oranının 2.0-2.2 ve 260/280 absorbans oranının 1.8-2.1 arasında olması izole edilen RNA örneklerinin istenilen saflık değer aralığını göstermektedir. Böylelikle ölçüm sonunda RNA örneklerine ait konsantrasyon değerleri elde edilmiştir.

İzole edilen RNA örnekleri kalitatif değerlendirilmeye tabi tutulmak amacı ile agaroz jelde yürütülmüştür. Elektroforez için %2'lik konsantrasyona sahip agaroz jel hazırlanmıştır. İzole edilen RNA örneğinden 3 µl ve yükleme boyasından 3 µl alınarak hazırlanan karışım agaroz jele yüklenmiştir. RNA örneklerini kıyaslamak amacı ile 50 bp aralığa sahip markörde (Gene Ruler) jele yüklenmiştir. Örnekler 100 volt enerjiyle 40 dakika koşturulmuş ve işlem sonrasında UV transluminatör ışık altında görüntülenerek bant analizi yapılmıştır.

3.2.2.8 İzole edilen RNA örneklerinin yıkanması

Buğday çeşitlerine ait yaprak ve kök dokularından izole edilen RNA örneklerinin yıkanması için QIAGEN RNeasy Mini Kit (74104, Valencia, CA) kullanılmıştır. Burada amaç izole edilen RNA örneklerinden istenmeyen kalıntıları (DNA gibi) uzaklaştırmaktır. Kit protokolüne göre en fazla yıkama yapılabilecek RNA miktarı 100 µl'dir.

Yıkama işleminde (her bir örnek için) 2 ml'lik ependorf tüp içerisine 10 µl RDD çözeltisi, 2.5 µl DNAaz ve yıkanması istenen RNA örneği eklenmiştir. Hazırlanan karışımın üzerine, toplam hacmi 100 µl olacak şekilde steril su ilave edilmiştir. 100 µl olacak şekilde hazırlanan numuneler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tüp içerisine 350 µl RLT çözeltisi eklenip iyice karıştırılmıştır. Üzerine 250 µl %100

etanol eklenip pipet yardımı ile karıştırılmıştır. Bu tüpte toplanan sıvının tamamı RNeasy Mini spin kolon içine yerleştirilmiştir. Tüpler 15 saniye 8000 g 'de santrifüj edilmiştir. Kolon (Spin column) altında toplanan sıvı atılmıştır. RNeasy Mini spin kolon üzerine 500 µl RPE çözültisi eklenmiştir. Tüpler tekrar 15 saniye 8000 g'de santrifüj edilmiş ve tüplerin alt kısmında toplanan sıvı atılmıştır. Tekrar RNeasy Mini spin kolon üzerine 500 µl RPE çözültisi eklenip 2 dakika 8000 g'de santrifüj edilmiştir. Tüplerin alt kısmında toplanan sıvı atılmıştır. Tüplerde kalan sıvıların uzaklaştırılması için tüpler, tekrar 1 dakika 8000 g'de santrifüj edilmiş ve RNeasy Mini spin kolon 1.5 ml'lik tüp içine yerleştirilmiştir. Tüplere 30-50 µl su (RNase-free water) eklenip 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler 1 dakika 8000 g'de santrifüj edilerek yıkanmış ve RNA örneği 1.5 ml'lik tüpde toplanarak 1.yıkama (elüsyon) bitmiştir. Kolonda kalan RNA kalıntılarını toplamak için tekrar RNeasy Mini spin kolon yeni 1.5 ml'lik tüp içine yerleştirilmiş, 30-50 µl su (RNase-free) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 dakika 8000 g 'de santrifüj edilerek, RNA örnekleri 1.5 ml'lik tüpde toplanmış ve 2. yıkama (elüsyon) işlemi de tamamlanmıştır.

3.2.2.9 cDNA sentez aşaması

Eş zamanlı PZR analizlerinin yapılabilmesi için kalıp cDNA örneklerine ihtiyaç vardır. Bu amaçla izole edilen RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi Fermentas First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen RNA örnekleri 1500 nanogram olacak şekilde hesaplanmıştır. Hesaplama sonucunda kullanılacak RNA miktarı belirlenmiştir. Hesaplanan RNA miktarı, OligodT 18 primer ve diğer bileşenlerle birlikte toplam hacim 11 µl olacak şekilde su ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler 65°C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezinin ilk aşaması tamamlanmıştır. Kullanılan komponentler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan komponentler

Komponentler	1X
RNA	1-5 µl
OligodT 18 primer	1 µl
Su	Toplam hacmi tamamlayacak miktarda
<u>Toplam hacim</u>	11 µl

65°C’de 5 dakika inkübe edilen örneklere, dNTP, reaksiyon tampon çözeltisi, RNase inhibitörü ve "reverse transcriptase" enzimi ilave edilmiş ve 37°C’de 60 dakika, 70°C’de 5 dakika ve 10°C’de sonsuz olacak şekilde PZR protokolü uygulanarak cDNA sentezi tamamlanmıştır. cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan komponentler ve oranları Çizelge 3.3’de verilmiştir

Çizelge 3.3 cDNA sentezi 2. aşamada kullanılan komponentler

Komponentler	1X
5x Reaksiyon tamponu	4 µl
Ribolock RNA inhibitör	1 µl
M-MuLv Reverse Transcriptase	2µl
10mM dNTP mix	2 µl
<u>Toplam hacim</u>	9 µl

Sentezlenen cDNA örnekleri 1/5, 1/10, 1/20 oranında sulandırılmış (ddH₂O) ve evrimsel süreçte korunmuş (housekeeping) bir gen olan 18S Ribosomal RNA primeri kullanılarak, örneklere ait PZR reaksiyonu yapılmıştır. PZR reaksiyonu; her bir örnek için 200 µl hacimli ependorf tüplere 0,5 µl 10 mM dNTP, 4 µl MgCl₂, 2,5 µl 10x Taq tamponu (Buffer), 0,25 µl (1 ünite) Taq DNA polimeraz enzimi, 13,75 µl su (ddH₂O), ileri ve geri primerlerden 1 µl (100 pmol) µl ve sulandırması yapılmış cDNA örneklerinden 2 µl eklenerek toplam 25 µl hacimde hazırlanmış ve karışım BIO-RAD T100 Thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. PZR protokolü 94°C’de 3 dakika, 95°C’de 30 saniye, 55°C’de 30 saniye, 72°C’de 30 saniye, 72°C’de 10 dakika, 4°C’de sonsuz olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon sonucunda oluşan her bir ürünün üzerine 2 µl yükleme boyası (loading dye) ilave edilmiştir. Hazırlanan örneklerden 10 µl alınarak

%2'lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jele yüklenmiş PZR ürünleri TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) tamponu içerisinde 100V't akımda yaklaşık 60 dakika yürütülmüş, jele ait görüntü UV ışığı altında görüntülenmiş ve elektroforez işlemi tamamlanmıştır.

3.2.2.10 Primer optimizasyonu

Her bir gen için tasarlanan primerlerin optimum sıcaklığının belirlenmesi için, PZR reaksiyonları yapılmıştır. Her bir primer örneği için PZR tüpüne 0.5 µl 10 mM dNTP, 3 µl MgCl₂, 2.5 µl 10X Taq Buffer, 0.25 µl Taq polimeraz enzim, su, ileri ve geri primerlerden 0.1 µl (100 pmol) 1/10 sulandırması yapılmış cDNA örneğinden 2 µl eklenerek toplam hacim 20 µl olacak şekilde BIO-RAD T100 Thermocycler cihazına yerleştirilmiştir. PZR protokolü 94°C'de 3 dakika, her döngü için 95°C'de 30 saniye, 50-60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye, son döngü için 72°C'de 10 dakika ve 4°C'de sonsuz olacak şekilde programlanmıştır. PZR ürünlerine 2 µl yükleme boyası eklenerek yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan üründen 10 µl alınarak %2'lik konsantrasyona sahip agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 V'ta ve 60 dakika olacak şekilde yapılmıştır. Elektroforez işlemi sonunda agaroz jel, UV transilüminatör ışığı altında görüntülenmiş ve oluşan bantlar analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda primerlere ait bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.2.2.11 Gerçek zamanlı RT-PZR (Real Time PZR/ qRT-PZR)

Kuraklık, sıcaklık, kuraklık ve sıcaklık stres uygulamaları sonucunda, Atay 85, Karahan 96 ve Zubkov çeşitlerinin yaprak ve kök dokularındaki gen ifade seviyeleri gerçek zamanlı PZR analizi ile belirlenmiştir. Kuraklık, sıcaklık, kuraklık ve sıcaklık stresinde kullanılmak üzere primerler belirlenmiştir. Bu primerler Çizelge 3.4'de verilirken, primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 qRT-PZR reaksiyonları için kullanılan primerler

Kuraklık	Sıcaklık	Kuraklık ve Sıcaklık
1- bZIP 12	1- HSP 16.6	1- WRKY17
2- bZIP 15	2- HSP 17	2- WRKY 24
3- bZIP 30	3- HSP 25	3- WRKY 59
4- bZIP 53	4- HSP 26	4- WRKY 61
5- bZIP 55	5- HSP 33	5- WRKY 82

Çizelge 3.5 Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları için seçilen primerlere ait diziler

Primer Adı	İleri Primer	Geri Primer	Referanslar
PtHSP70-16	CGATAAGGGAAGGCTGTCCAA	GCACCGTCGCCCTGATAC	(Yer <i>et al.</i> 2016)
PtHSP70-17	CTAGGCACCACCTACTCATGC	GCTTTTCAGCAGGACCTGGA	(Yer <i>et al.</i> 2016)
PtHSP70-25	GAAGCAGTTTTCCGCCGAGG	AACTCCAGCGTCCTTTGTGG	(Yer <i>et al.</i> 2016)
PtHSP70-26	ATGCGGTAGTTACTGTCCCTG	TCTTCTCGCCAACACTCGTT	(Yer <i>et al.</i> 2016)
PtHSP70-33	GGTGGTGAGTGATGCTGACA	CTTCAGGTTCTGGGTTGGCT	(Yer <i>et al.</i> 2016)
TaWRKY17	AGGGTGAAGAACGATATGATG	GACTCTAAATCCTCCTCTCT-	(Okay <i>et al.</i> 2014)
TaWRKY24	TGCAACGTGAAGAAGCAGG	AGCGCAATCCATGAGCTTC	(Okay <i>et al.</i> 2014)
TaWRKY59	TTCCAGCTAGTTAGTGGCTC	ATTGCAGGGACTTTGATAGAC	(Okay <i>et al.</i> 2014)
TaWRKY61	TCAGGTGTTAGGAGAGATCAG	CTCACTGGTTGTTTGTACAATG	(Okay <i>et al.</i> 2014)
TaWRKY82	ATAGAGGAGCACACAGTCATG	CAATCACTTGAGCAAAAAGAGCT	(Okay <i>et al.</i> 2014)
CsbZIP-12	TTCTCGGGAGGGTCAAAGGA	TCTCTCCCTTGCTTGCTGTG	(Baloglu <i>et al.</i> 2014)
CsbZIP-15	GCTGTCATCCCATTGGCAAC	CGCCCCAATAGTCCATTCCA	(Baloglu <i>et al.</i> 2014)
CsbZIP-30	GTCTGCGCTCCTGAACTCT	GAAGTGGGCGAGAGAACTCC	(Baloglu <i>et al.</i> 2014)
CsbZIP-53	CTCCAACCTCCGACCCTTAC	GGATGGGCATAAACTCCCCC	(Baloglu <i>et al.</i> 2014)
CsbZIP-55	CCCATTTCGTGATTCCCCA	ACTGGCATCCCTATCCTCCA	(Baloglu <i>et al.</i> 2014)

Stres sonrası çeşitlere ait yaprak ve kök dokularının gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için oluşturulan cDNA örnekleri, primerler ve SYBRGreen Master Mix Kit (Roche) kullanılarak özel karışım hazırlanmıştır. Kullanılan kimyasallar ve oranları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan komponentler

Komponentler	1X
Syber Green Master Mix	10 µl
İleri primer	0.1 µl
Geri primer	0.1µ
Su	7,8µl
<u>Toplam Hacim</u>	20 µl

Hazırlanan karışım, 96 kuyucuğa sahip özel qRT-PZR aparatına 3 tekerrür olacak şekilde dağıtılmıştır. Dağıtılan örneklere, çeşitlere ait cDNA örnekleri ilave edilmiştir. Aparat, özel jelatin film ile kapatılmıştır. Hazır hale getirilen qRT-PCR aparatı, Roche LightCycler®480 II cihazına yerleştirilmiştir.

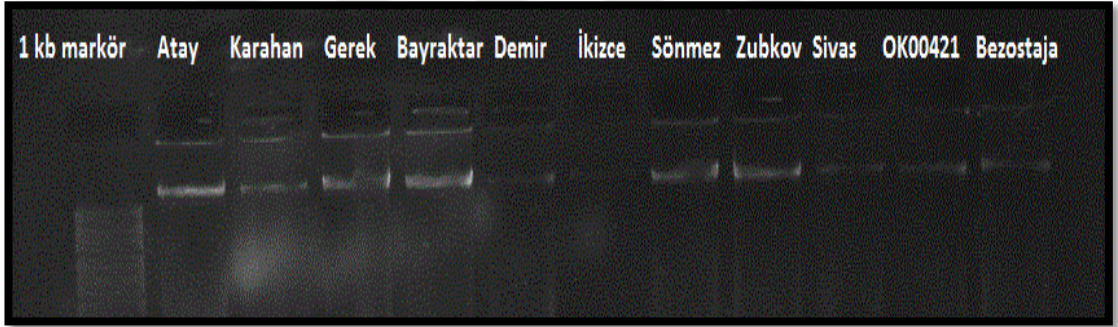
PZR reaksiyonunun bitiminde, her bir döngüsünün ardından oluşan ürün, miktarı ile orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyaller analiz edilmiştir. Analiz sonucunda her üç stres ortamında yetiştirilen çeşitlere ait gen ifade seviyeleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar her üç stres ortamında yetiştirilen çeşitlere ait yaprak ve kök dokularının gen ifade seviyelerindeki değişimleri vermektedir. Yapılan hesaplamalar sonucunda yaprak ve kök dokularına ait gen ifade seviyeleri grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Filogenetik Analizlere Ait Bulgular

4.1.1 Buğday çeşitlerine ait DNA izolasyon sonuçları

Buğday çeşitlerine ait yaprak dokuları kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforez işleminden yararlanılmıştır. Agaroz jele yüklenen genomik DNA örnekleri belirlenen akımda yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrasında jel, UV translüminatör ışık altında görüntülenmiştir. Alınan görüntülerin değerlendirilmesi sonucunda DNA örneklerinin, kalitesi belirlenmiştir. Genomik DNA örneklerine ait jel görüntüsü Şekil 4.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Çeşitlere ait genomik DNA örneklerinin jel görüntüsü

İzole edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop (ND-2100c, Thermo) spektrometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrasında örneklere ait konsantrasyonların yanı sıra örneklerin, saflık dereceleri Absorbans (A) 260-280 ve 260/230 değerleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Örneklere ait NanoDrop sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çeşitlere ait DNA konsantrasyon değerleri

Çeşitler	DNA Konsantrasyonu	A (260/280)	A (260/230)
Bezostaja-1	1,1	-4,26	0,64
Bezostaja-2	6,1	3,24	0,1
Sivas-1	8,8	2,9	0,13
Sivas-2	46,9	2,46	0,11
Gerek-1	15,3	2,57	0,17
Gerek-2	10,7	2,77	0,16
İkizce-1	6,9	2,94	0,18
İkizce-2	10,5	2,95	0,1
Bayraktar-1	12,9	2,95	0,08
Bayraktar-2	5,3	3,87	0,1
OK00421-1	18,1	2,56	0,2
OK00421-2	43,7	2,47	0,11
Sönmez-1	17,8	2,6	0,23
Sönmez-2	30,8	2,33	0,28
Zubkov-1	3,7	4,46	0,16
Zubkov-2	7,5	3,11	0,09
Karahan-1	2,9	1,4	0,53
Karahan-2	5,6	1,83	0,24
Demir-1	14,4	2,39	0,34
1Demir-2	29,5	2,24	0,63
Atay-1	126,6	3,14	0,18
Atay-2	10,6	3,26	0,2

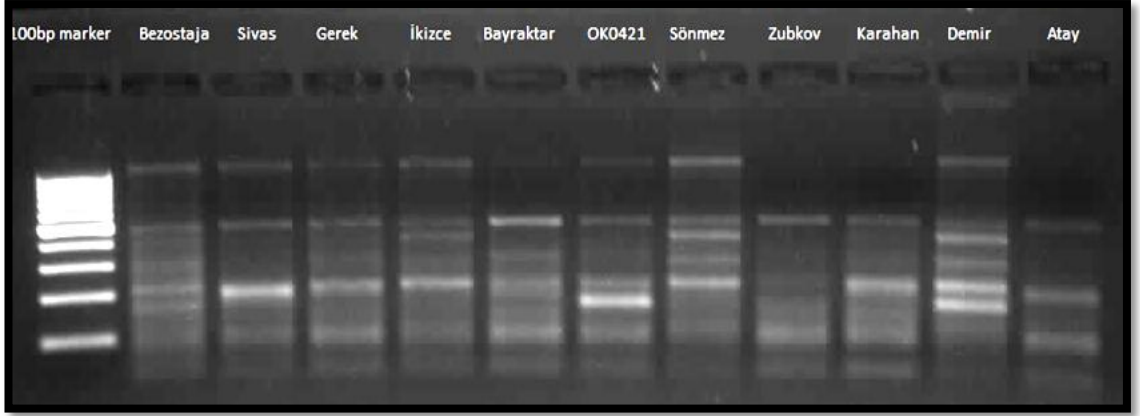
4.1.2 PZR reaksiyonlarına ait sonuçlar

Çeşitlere ait genetik yakınlığın analiz edilmesi ve analizler sonucunda çeşitlerin akrabalık ilişkilerinin belirlenebilmesi elektroforez işlemi sonrasında alınan ve çeşitlere ait bant görüntülerine bağlıdır. Bu amaçla çeşitler, belirlenen kuraklıkla ilişkili markörlerle taranmış ve sonrasında PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek jel

görüntüleri elde edilmiştir. Elde edilen çeşitli jel görüntüleri Şekil 4.2 ve 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.2 Elektroforez işlemi sonrasında alınan jel görüntüsü



Şekil 4.3 Elektroforez işlemi sonrasında alınan jel görüntüsü

Jel görüntüleri sonrasında markörlere ait polimorfik bant sayıları ve elde edilen bant uzunlukları değerlendirilmiştir.

4.1.3 Kullanılan markörlerin kromozom lokasyonlarının ve motiflerinin belirlenmesi

Literatür taramaları sonucunda kullanılan markörlerin dahil olduğu genom ve lokalize oldukları kromozomlar belirlenmiştir. Kullanılan SSR markörlerinin sahip olduğu motifler, Gramene (GrameneGenes Database) data bankasından temin edilmiştir. Bazı markörlere ait kromozom lokasyonları ve markörler Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 SSR markörlerinin kromozom lokasyonları ve sahip oldukları motifler

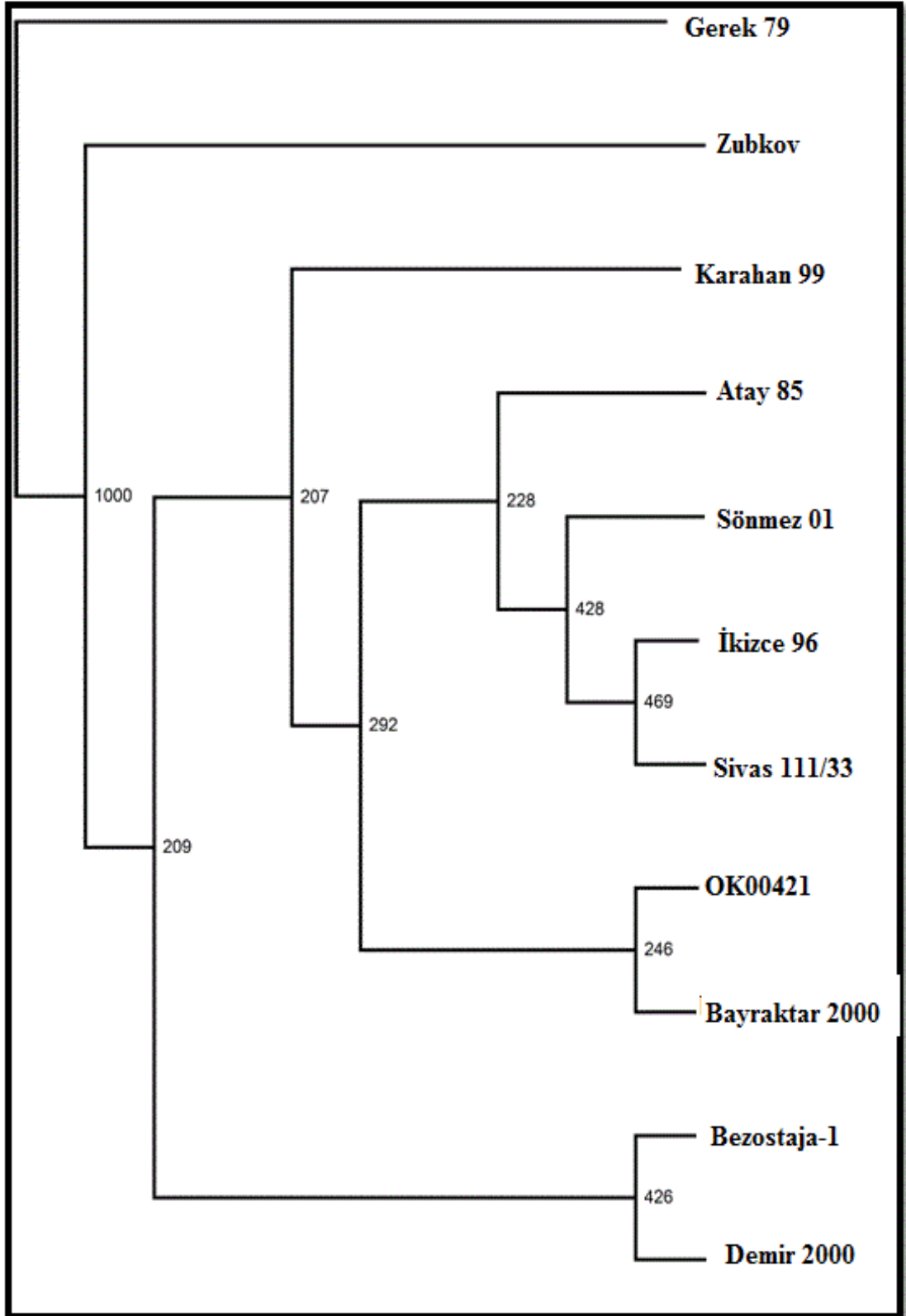
SSR Markörleri	Lokasyon	Motif
wmc63	2A-195 2B-180 2D-185	(AG)12
wmc48	4B 4A,4D	
Wmc420	1B-4A	(GT)5---(GA)9
wmc601	2D	
Tassip 2C	2D	
gwm382	2A-2B-2D	(GA)26
gwm11	1B	(TA)6CATA(CA)19(TA)6
gwm295	7D	(GA)25
gwm136	1A	(CT)58
gwm148	2B	(CA)22
GWM260	7A	(GA)20
GWM484	2D	(CT)29
GWM46	7B	
GWM160	4A	(GA)21
GWM165	4A-4B-4D	(GA)20
GWM369	3A	(CT)11(T)2(CT)21
GWM539	2D	
GWM192	5D	(CT)46
GWM30	3A	
WMC89	4A-4B-4D	(CA)19, (CT)8
WMC9	1A-7A	
WMC596	7A	
WMC603	7A	
barc108	7A	(ATT)17
barc121	7A-7D	(CT)17
psp3200	6D	(AAG)16

4.1.4 Filogenetik analizler ve sonuçları

Alınan jel görüntülerindeki bantların değerlendirilmesi skorlama yöntemine göre yapılmıştır. Kullanılan 26 SSR marköründen yalnızca dört tanesi monomorfik olup diğer markörler polimorfik olarak belirlenmiştir. Çeşitlere ait genetik yakınlığı belirten dendogramın elde edilmesi için analiz dosyası oluşturmuştur. Yapılan analizler sonucunda toplamda 80 bant elde edilmiştir. Markörlere ait ortalama bant sayısı 3.07 olarak hesaplanmıştır.

4.1.5 Kullanılan programlar

Buğday çeşitlerinin birbirlerine olan genetik yakınlıkları PHYLIP Version 3.68 (Phylogeny Inference Package) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır. TreeWiew (Page 2002) programı ile Neighbor-Joining Tree, (Komşu birleştirme ağacı) metoduna göre çeşitlere ait yakınlık soyağacı (dendogram) çizilmiştir. Çeşitlere ait dendogram Şekil 4.4’de verilmiştir

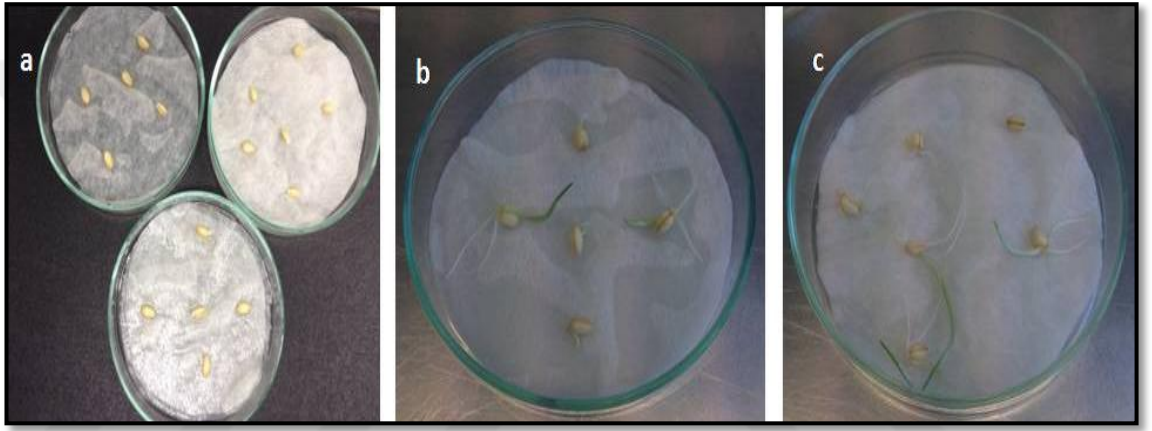


Şekil 4.4 Çeşitlerin genetik olarak yakınlıklarını gösteren soyağacı (dendrogram)

4.2 Gen İfade Seviyelerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

4.2.1 Bitki materyallerinin yetiştirilmesine ait sonuçlar

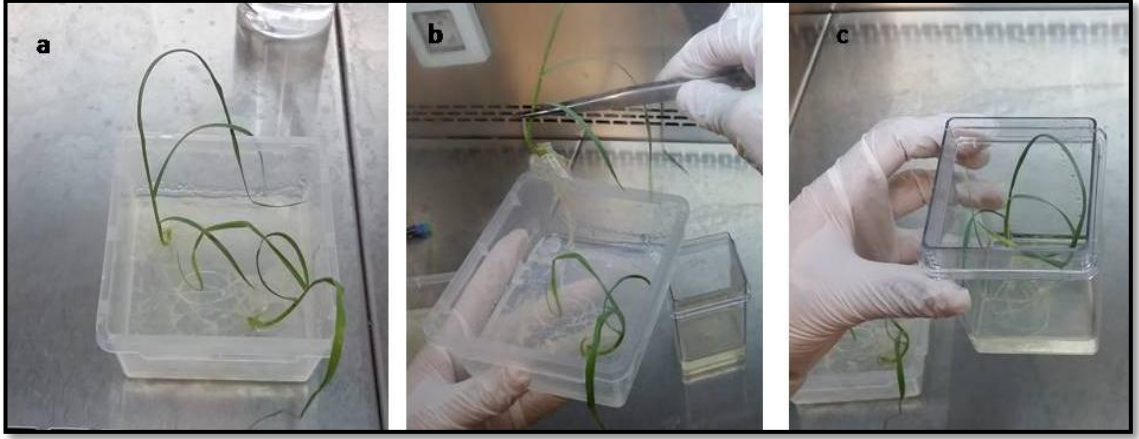
Kuraklık, sıcaklık, kuraklık ve sıcaklık stresi sonrasında bitki dokularına ait gen ifade seviyelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi amacı ile bitkiler yetiştirilmiştir. Bu amaçla çimlendirilen tohumlar MS ortamına aktarılmış ve bitkiler besin ortamında büyütülmüştür. Çimlendirilen tohumlara ait görüntüler Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 a) Steril tohumların petrilere alınması, b-c) Çimlenen tohumlara ait görüntüler

4.2.2 Bitkilerin stres uygulamalarına ait sonuçlar

Çimlendirilip MS ortamında büyütülen bitkiler, stres uygulamaları için yeni ortamlara aktarılmış ve sonrasında iklim kabinlerine alınmıştır. Besin ortama aktarılan bitkilere ait görüntüler Şekil 4.6'da verilirken, iklim kabinlerine alınan bitkilere ait görüntüler Şekil 4.7 'de verilmiştir.



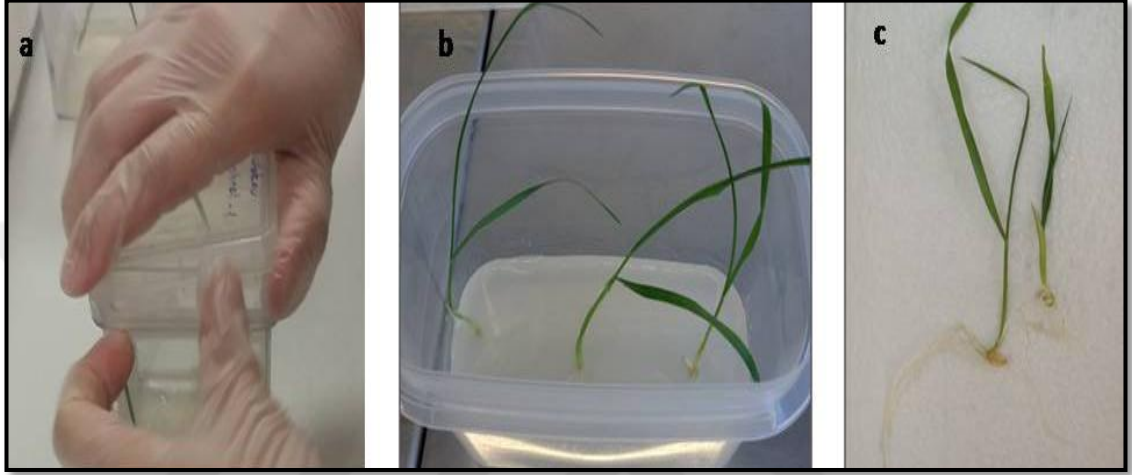
Şekil 4.6 MS ortamında gelişen bitki örneği, b-c) Bitkilerin MS ortamından alınması ve PEG6000 içeren MS ortamına aktarılması



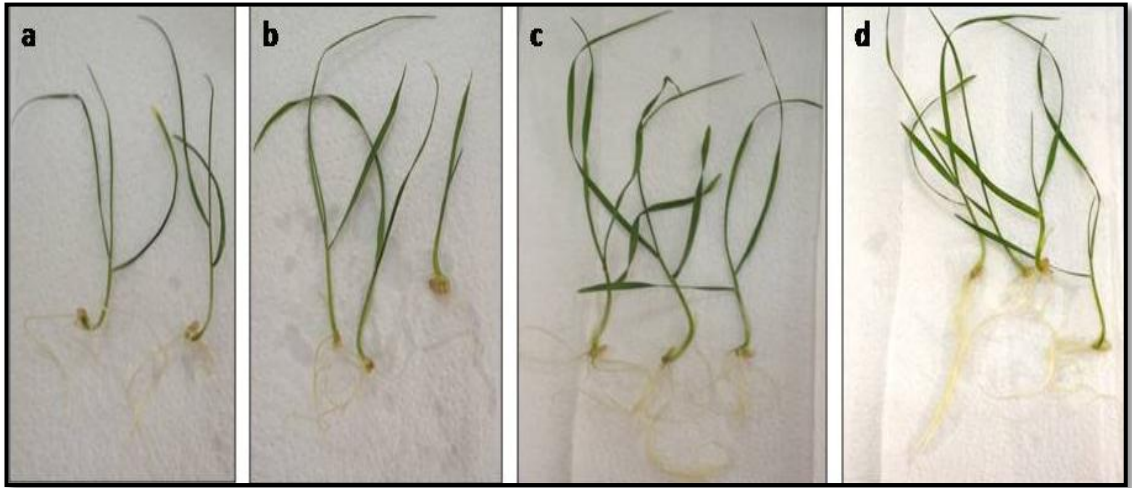
Şekil 4.7 a-b-c) Bitkilerin bulunduğu magentaların iklim kabine alınması

4.2.3 Bitki materyalleri ve depolama

Stres uygulaması sonrasında çeşitlere ait dokular toplanmış ve doku örnekleri -80°C 'de saklanmıştır. Uygulama sonrasında bitkilerin ortamdaki alınması ve çeşitlere ait bitki örnekleri Şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.8 a-b-c) Stres uygulaması sonrası bitkilerin genel görünümü



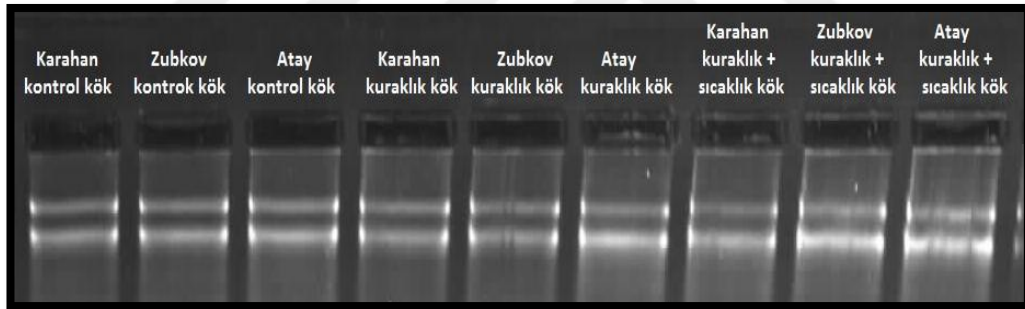
Şekil 4.9 a-b) Kontrol gruplarına ait bitki örnekleri, c-d) PEG6000 içeren ortamdan alınan bitki örnekleri

4.2.4 RNA izolasyonuna ait sonuçlar

Çeşitlere ait doku örnekleri TRİzol reaktifi kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacı ile örnekler agaroz jelde yürütülmüştür. RNA örneklerine ait jel görüntüsü Şekil 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.10 Yaprak dokularına ait RNA örneklerinin jel görüntüsü



Şekil 4.11 Kök dokularına ait RNA örneklerinin jel görüntüsü

Çeşitlere ait RNA örneklerinin konsantrasyonunu belirlemek için nanodrop spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. İzolasyonu yapan RNA örneklerine ait konsantrasyon değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Çeşitlere ait dokuların RNA konsantrasyonları

Çeşitler ve dokuları	RNA Konst.	260/280	260/230
Karahan kontrol-yaprak	1320	2,05	1,94
Zubkov kontrol-yaprak	1668,3	2,04	1,97
Atay kontrol-yaprak	1119,1	2,01	2,07
Karahan sıcaklık- yaprak	556,7	1,93	1,34
Zubkov sıcaklık-yaprak	4692,0	2,02	2,03
Atay sıcaklık-yaprak	693,5	1,98	1,24
Karahan kuraklık-yap	4203,3	2,04	1,72
Zubkov kuraklık-yaprak	3057,0	2,1	2,23
Atay kuraklık-yaprak	4131,1	2,09	1,77
Karahan sıcaklık+kuraklık yap.	1671,6	2,0	1,45
Zubkov sıcaklık+kuraklık-yap.	2193,2	2,0	2,02
Atay sıcaklık+kuraklık-yap.	2027,0	2,03	2,13
Karahan kontrol kök	550,6	1,89	0,6
Zubkov kontrol kök	148,0	1,82	0,26
Atay kontrol-kök	494,7	1,92	1,83
Karahan kuraklık-kök	1309,0	2,05	1,92
Zubkov kuraklık-kök	822,3	1,87	0,9
Atay kuraklık kök	1158,2	2,0	1,8
Karahan sıcaklık+kuraklık-kök	464,3	1,92	0,71
Zubkov sıcaklık+kuraklık-kök	1512,9	1,97	0,77
Atay sıcaklık+kuraklık-kök	2889,2	2,04	1,93

4.2.5 Gerçek zamanlı PZR sonuçları

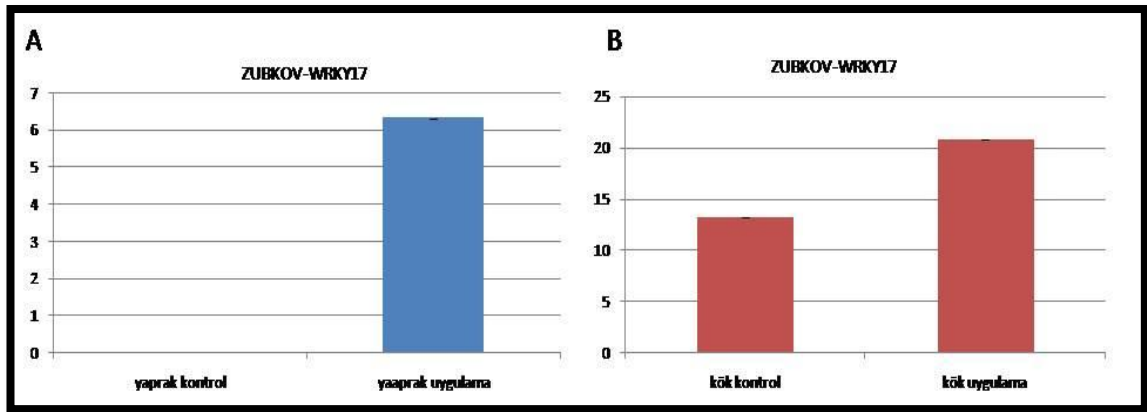
Sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık stresinde, çeşitlerde meydana gelen gen ifade değişimleri, qRT-PZR sonuçları ile belirlenmiştir. Çalışmada farklı stras koşullarında ve çeşitlere ait yaprak ve kök dokuları arasındaki gen ifade farklılıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Sıcaklık stresinde çeşitlere ait yaprak dokusunda oluşan ifade farklılıkları ısı-şok protein (HSP) ailesine ait genlerle, kuraklık stresi sonucunda oluşan gen ifade

seviyeleri bZIP TF ailesine ait genlerle, sıcaklık ve kuraklık stresi sonucunda oluşan ifade seviyeleri WRKY TF ailesi üyesi genlerle belirlenmeye çalışılmıştır.

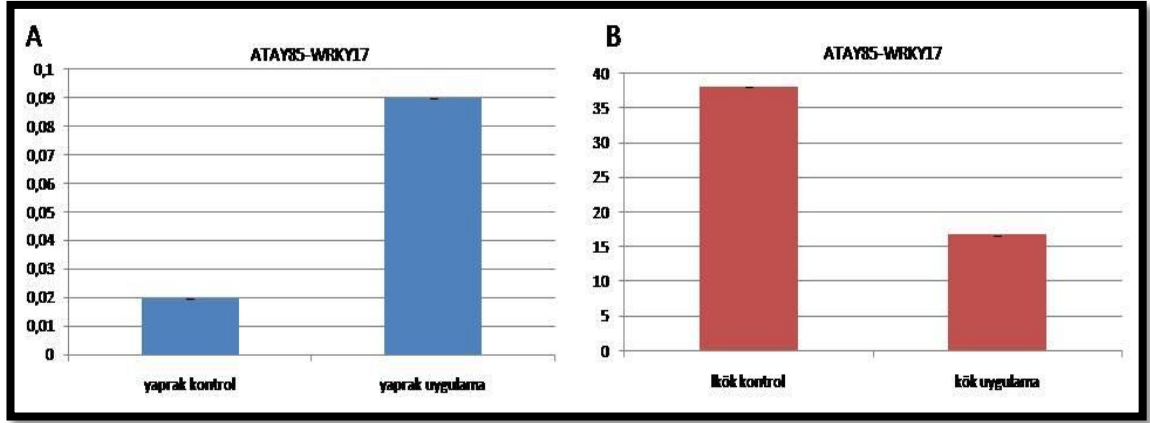
4.2.5.1 WRKY transkripsiyon faktörlerinin gen ifade seviyeleri

Skuraklıkve kuraklık stresi, bitkilerin hem kök hem de yaprak dokularını etkileyen bir stres türü olmasından dolayı, çeşitlere ait yaprak ve kök kullanılmış ve dokularda oluşan WRKY TF gen ifade seviyeleri grafiklerle gösterilmiştir. Çeşitlere ait dokuların gen ifade seviyelerini belirten grafikler, stres uygulanmayan kontrol grubu ile stres uygulanmış uygulama grubu olarak belirtilmiştir. Stres sonrasında çeşitlere ait yaprak ve kök dokularında meydana gelen değişimler farklı grafikler halinde verilmiştir.

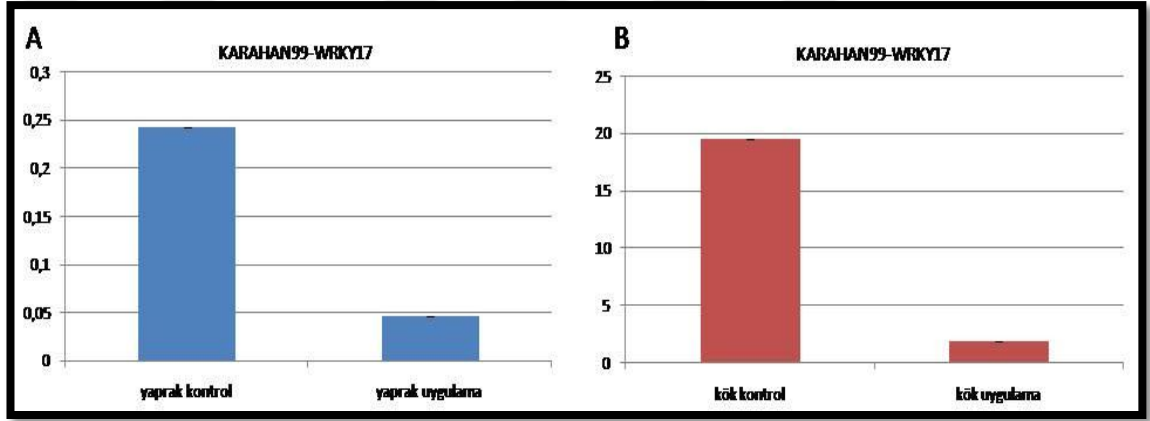
Çeşitlere ait grafiklerin değerlendirilmesi sonucunda Zubkov çeşidinde, yaprak dokusunda oluşan en yüksek ifade kontrole göre yaprak uygulamada 60 kat artışla WRKY61'e (Şekil 4.21) ait iken, en düşük ifade artışı 1 kat ile WRK24 kök dokusunda olmuştur (Şekil 4.18). Karahan 99 çeşidine ait gen ifade seviyelerine bakıldığında yaprak ve kök dokusunda WRKY61'de yaklaşık olarak bir katlık bir artış görülmüştür (Şekil 4.23).



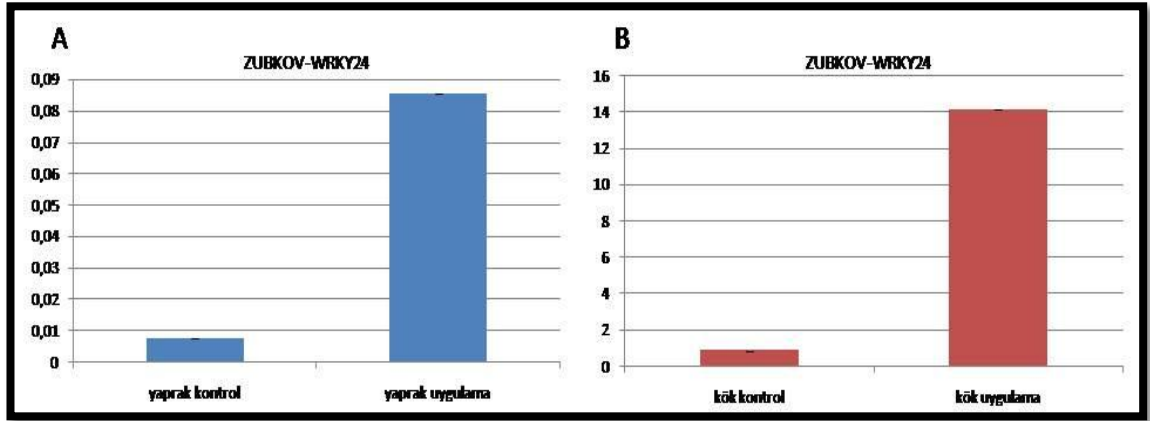
Şekil 4.12 A-B) Zubkov çeşidine ait yaprak ve kök dokularının WRKY17 gen ifade seviyeleri



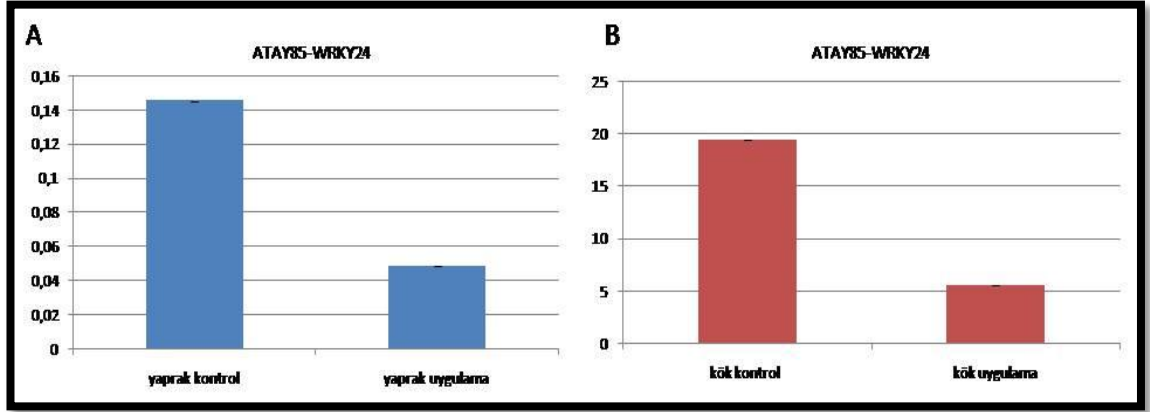
Şekil 4.13 Atay 85 çeşidine ait yaprak ve kök dokularının WRKY17 gen ifade seviyeleri



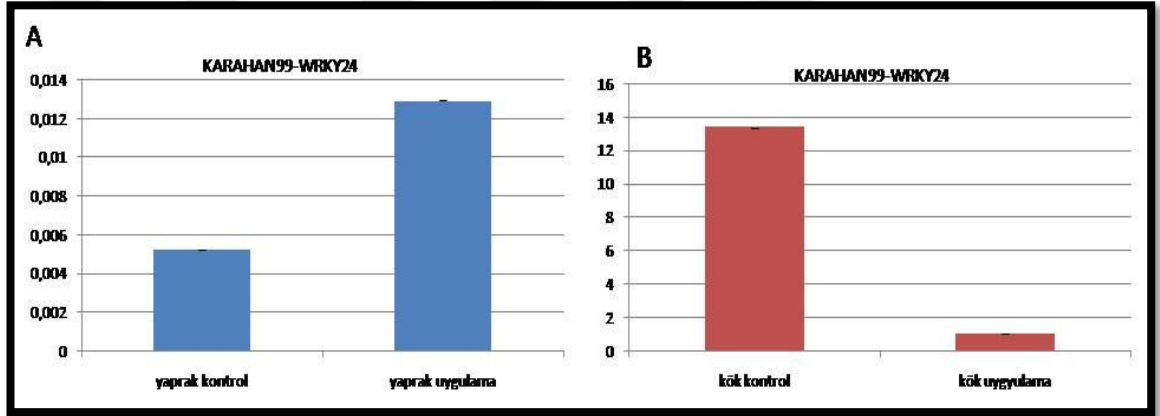
Şekil 4.14 A-B) Karahan 99 çeşidine ait yaprak ve kök dokularının WRKY17 gen ifade seviyeleri



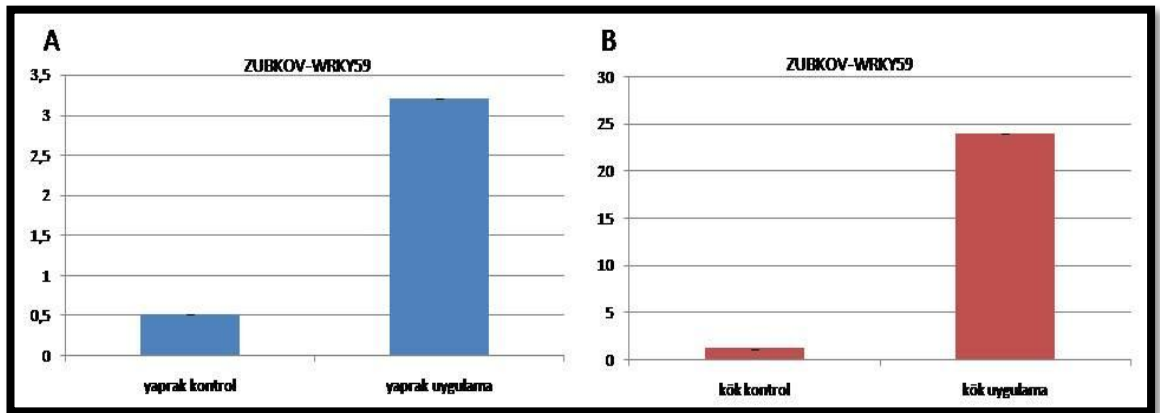
Şekil 4.15 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY24 gen ifade seviyeleri



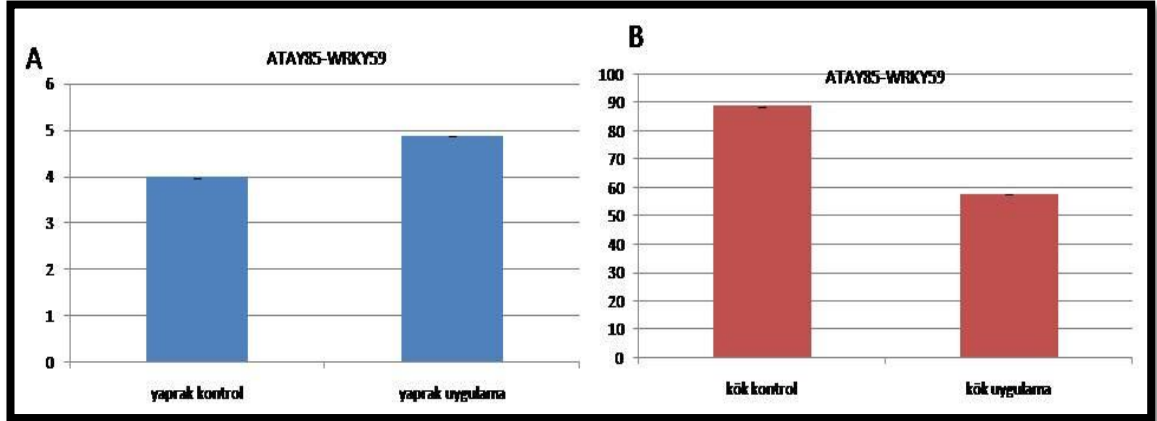
Şekil 4.16 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY24 gen ifade seviyeleri



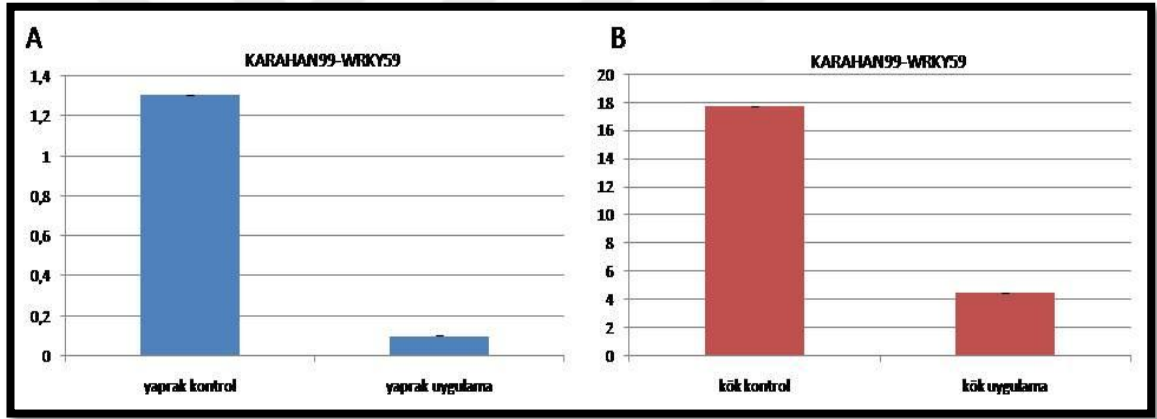
Şekil 4.17 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY24 gen ifade seviyeleri



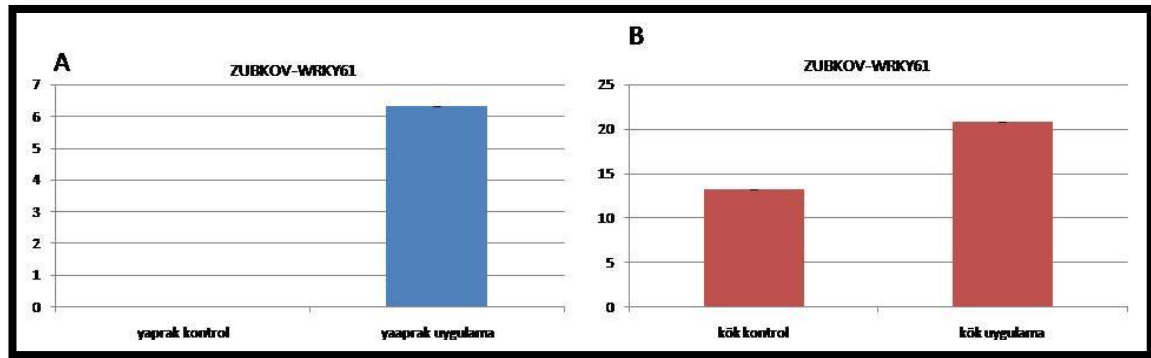
Şekil 4.18 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY59 gen ifade seviyeleri



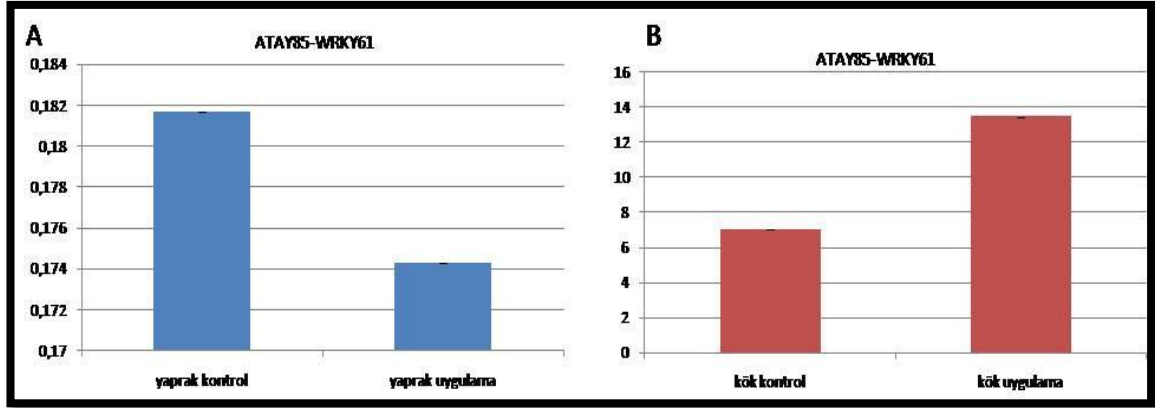
Şekil 4.19 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY59 gen ifade seviyeleri



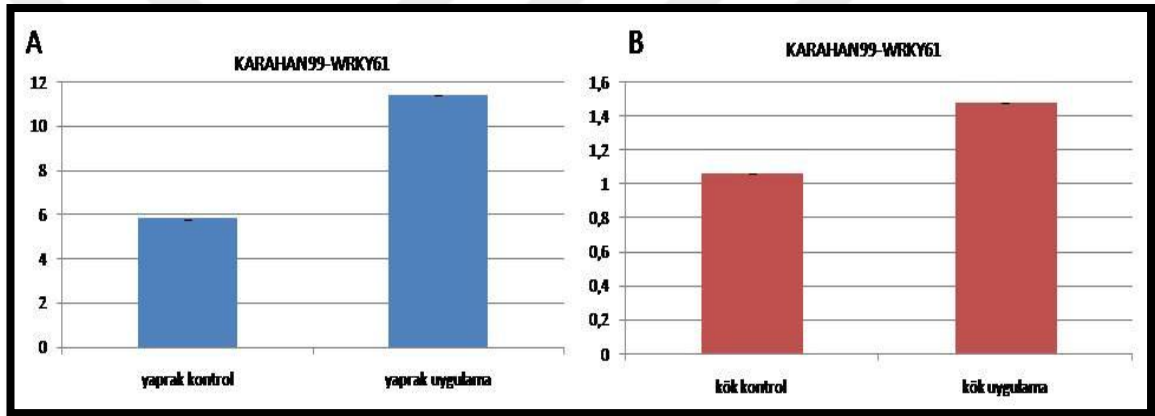
Şekil 4.20 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY59 gen ifade seviyeleri



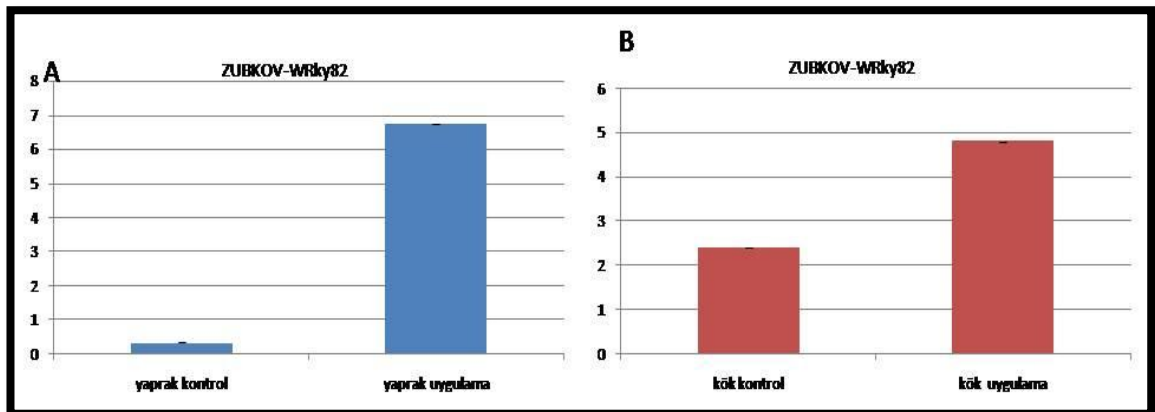
Şekil 4.21 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY61 gen ifade seviyeleri



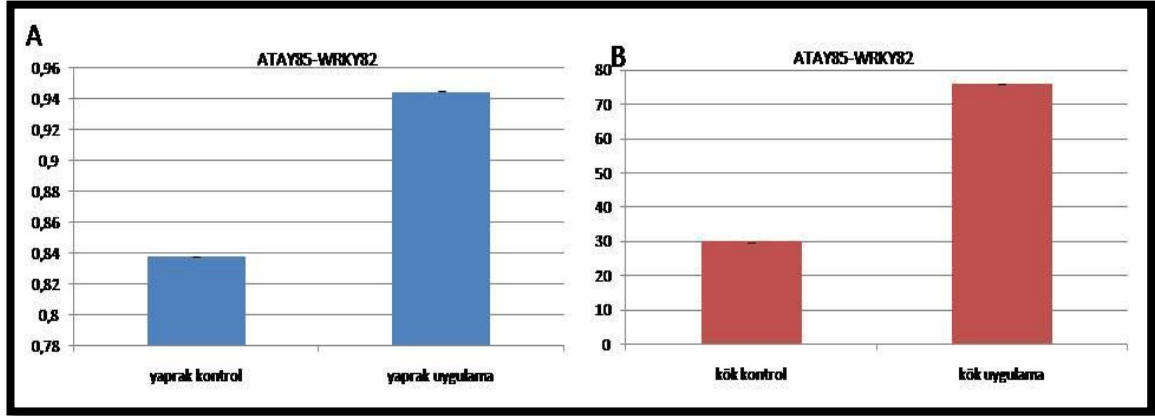
Şekil 4.22 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY61 gen ifade seviyeleri



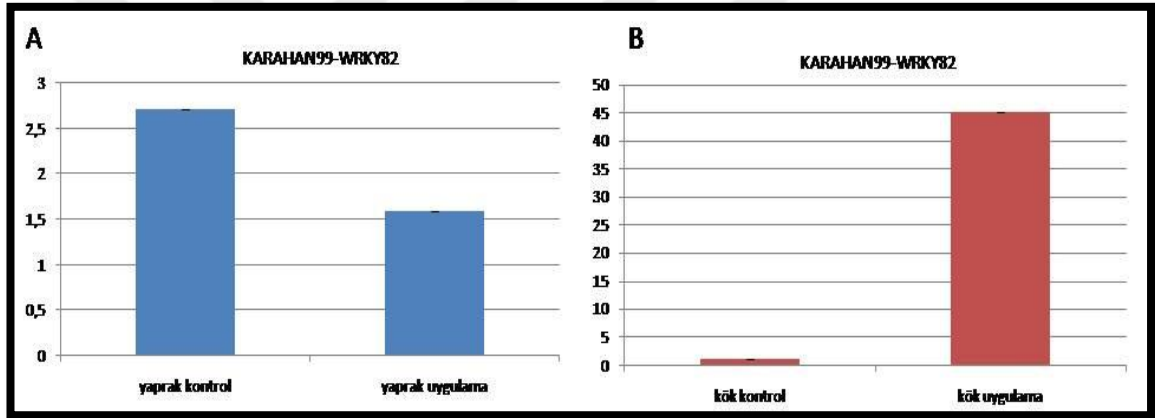
Şekil 4.23 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY61 gen ifade seviyeleri



Şekil 4.24 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY82 gen ifade seviyeleri



Şekil 4.25 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY82 gen ifade seviyeleri

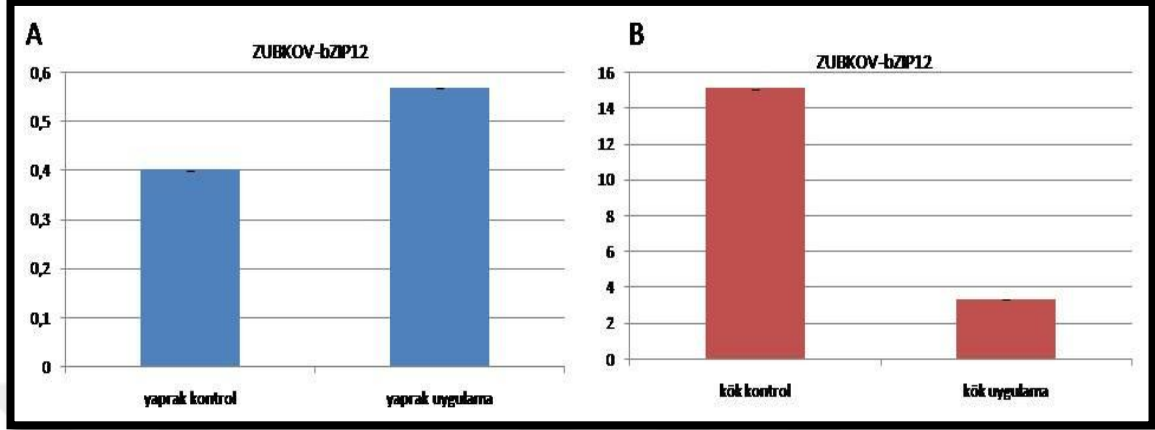


Şekil 4.26 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının WRKY82 gen ifade seviyeleri

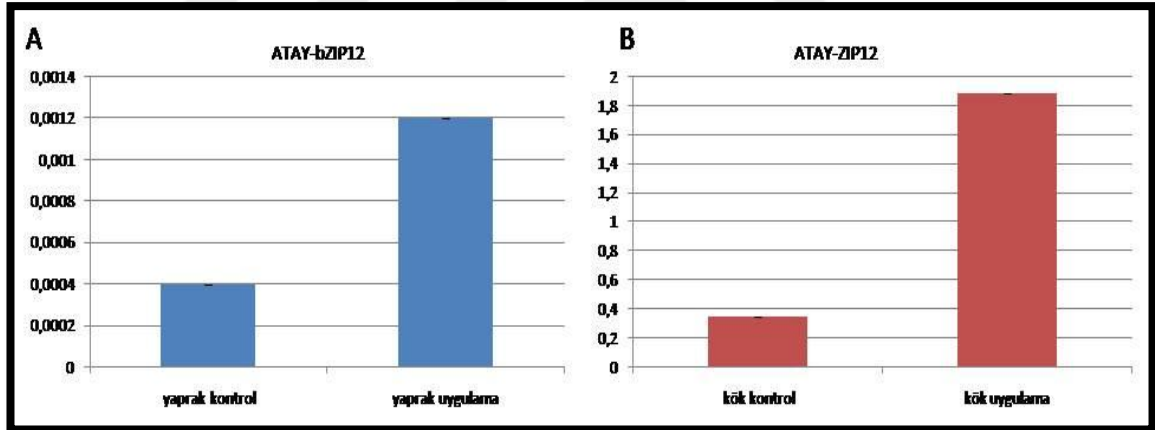
4.2.5.2 bZIP transkripsiyon faktörlerinin gen ifade seviyeleri

Kuraklık stresi, özellikle kök dokularını etkileyen abiyotik bir stres olmasına rağmen bu çalışmada, kuraklık stresinin yaprak dokusunda oluşturduğu değişimleri de belirlemek amacı ile hem kök hem yaprak dokusuna bakılmış ve yaprak ile kök dokusunda meydana gelen değişimler ilişkilendirilmiştir. Çeşitlere ait yaprak dokularının ifade seviyelerine bakıldığında genellikle Zubkov çeşidinde artışlar gözlenirken, kök dokularında Atay 85 çeşidine ait ifade seviyeleri artış göstermiştir. Karahan 99 çeşidine ait yaprak dokularında oluşan ifade seviyeleri, Atay 85 çeşidine ait ifade seviyelerine

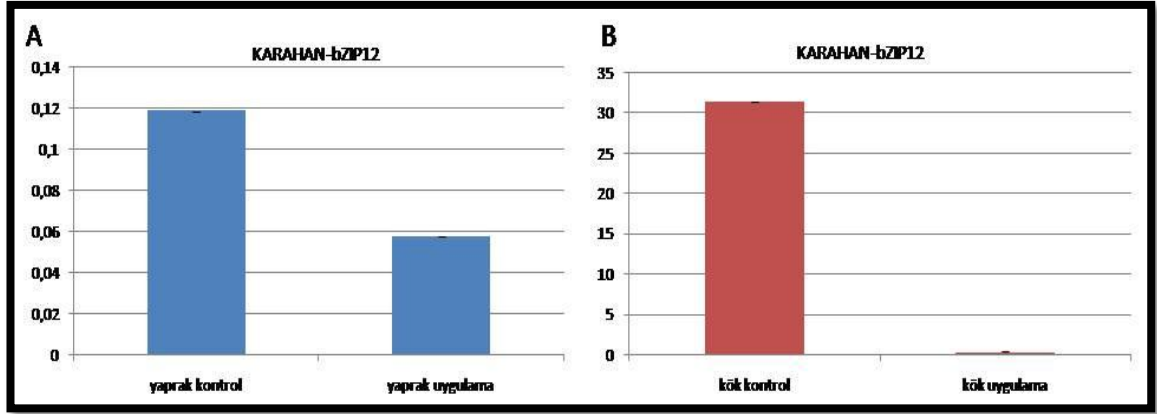
yakın iken,, kök dokularında Zubkov çeşidinin verdiği cevaplara benzer cevaplar verdiği görülmektedir.



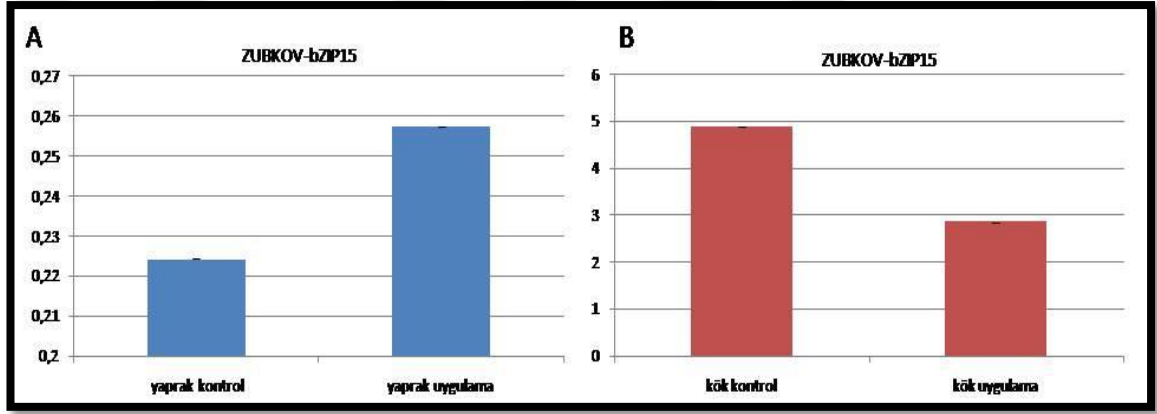
Şekil 4.27 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP12 gen ifade seviyeleri



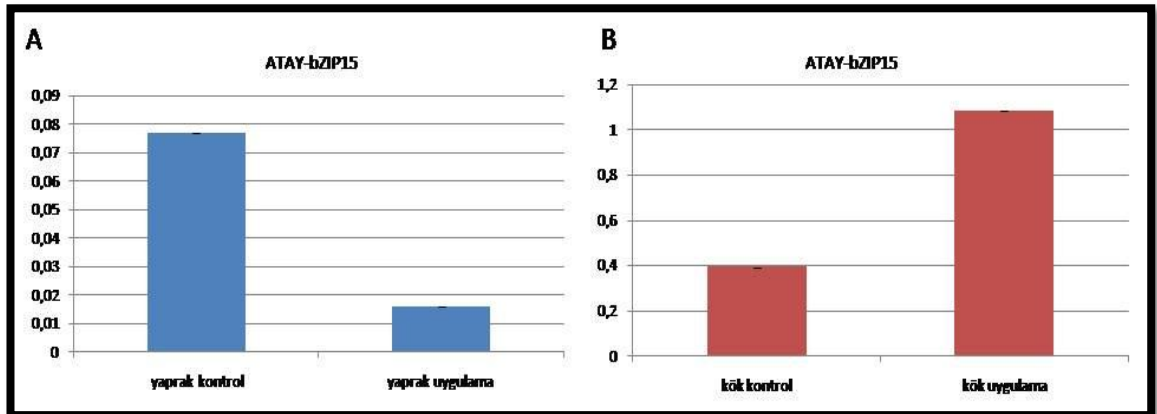
Şekil 4.28 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsbZIP12 gen ifade seviyeleri



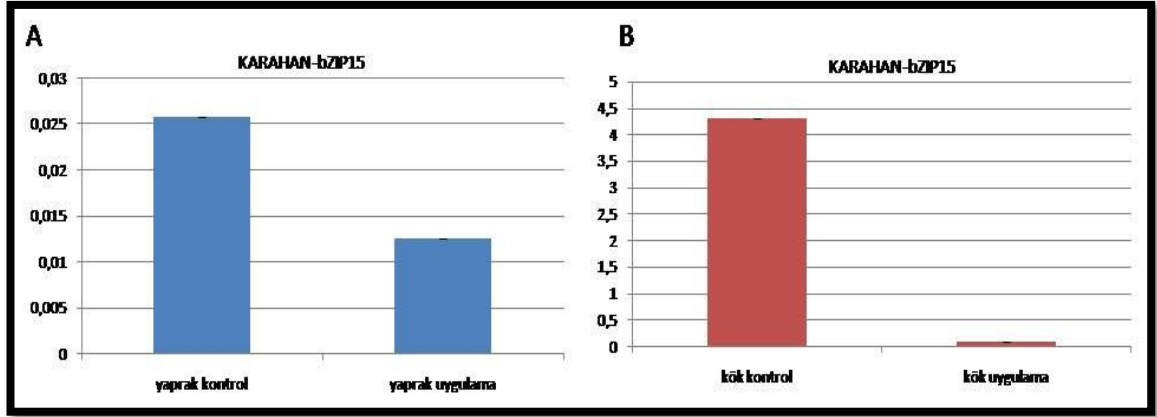
Şekil 4.29 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP12 gen ifade seviyeleri



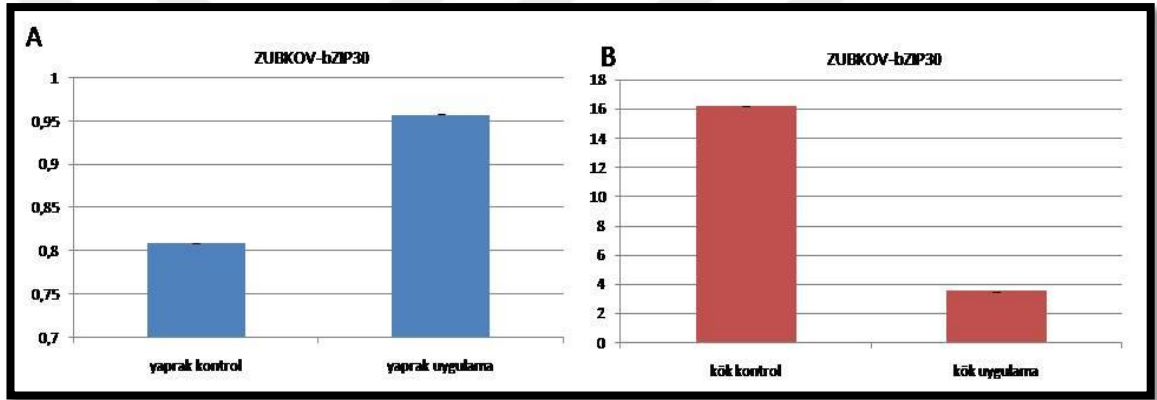
Şekil 4.30 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP15 gen ifade seviyeleri



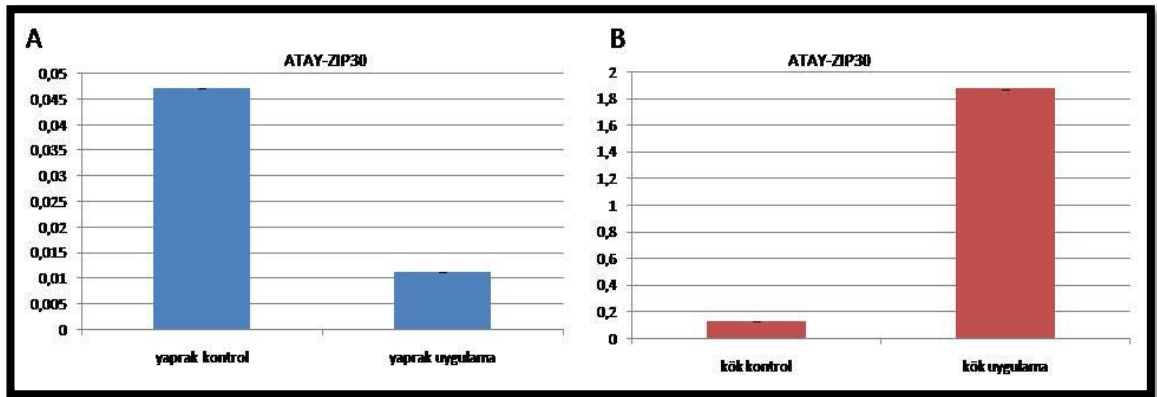
Şekil 4.31 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP15 gen ifade seviyeleri



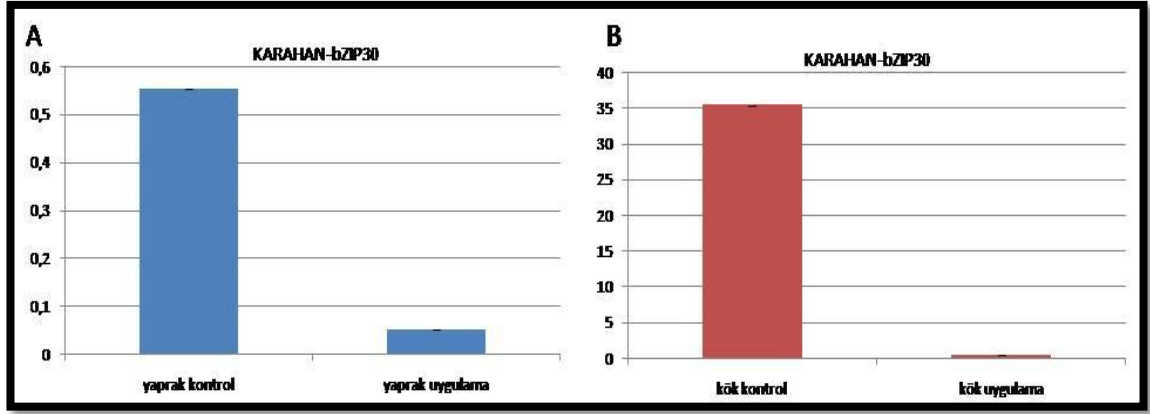
Şekil 4.32 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP15 gen ifade seviyeleri



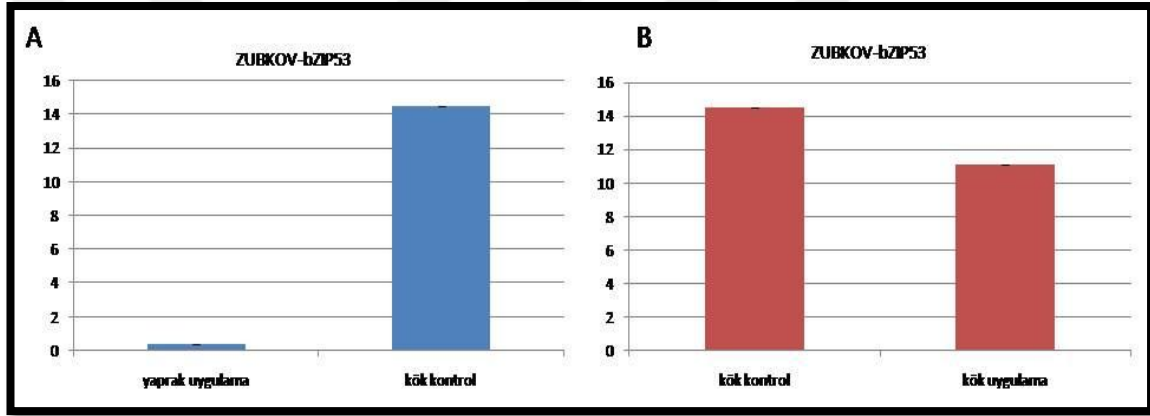
Şekil 4.33 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP30 gen ifade seviyeleri



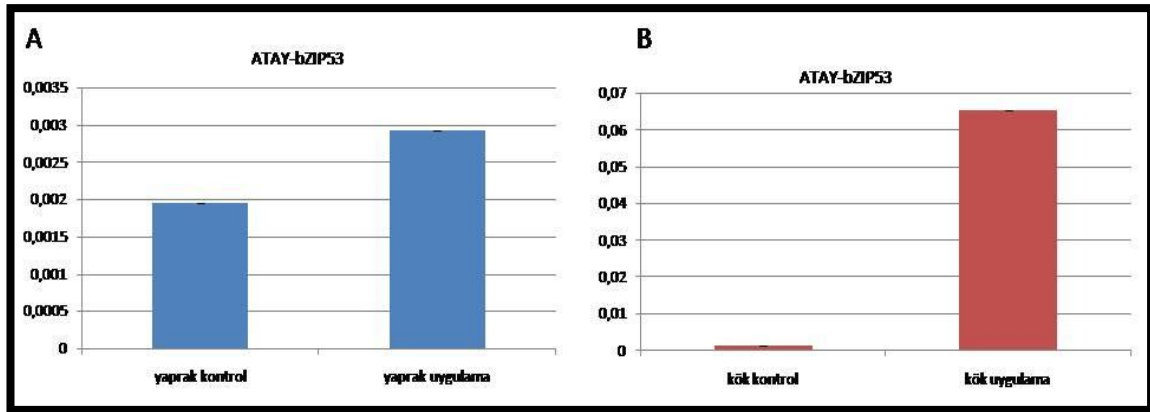
Şekil 4.34 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP30 gen ifade seviyeleri



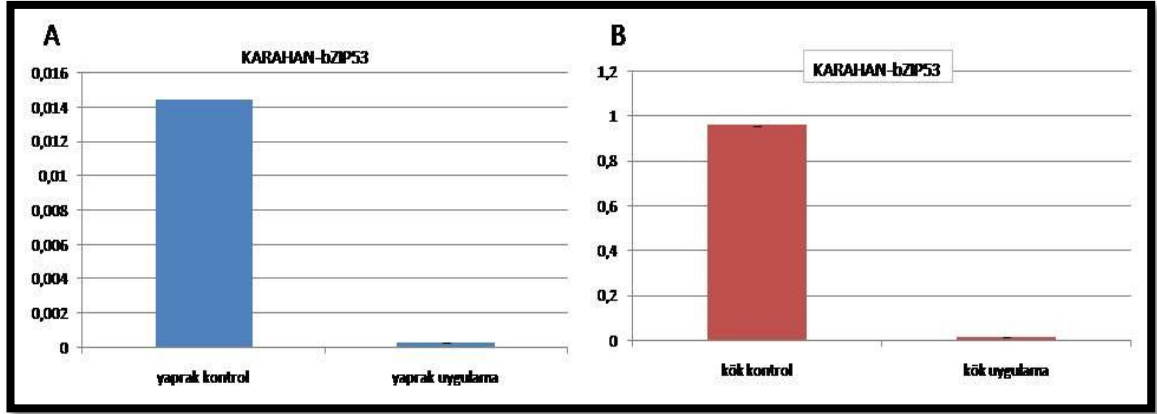
Şekil 4.35 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsZIP30 gen ifade seviyeleri



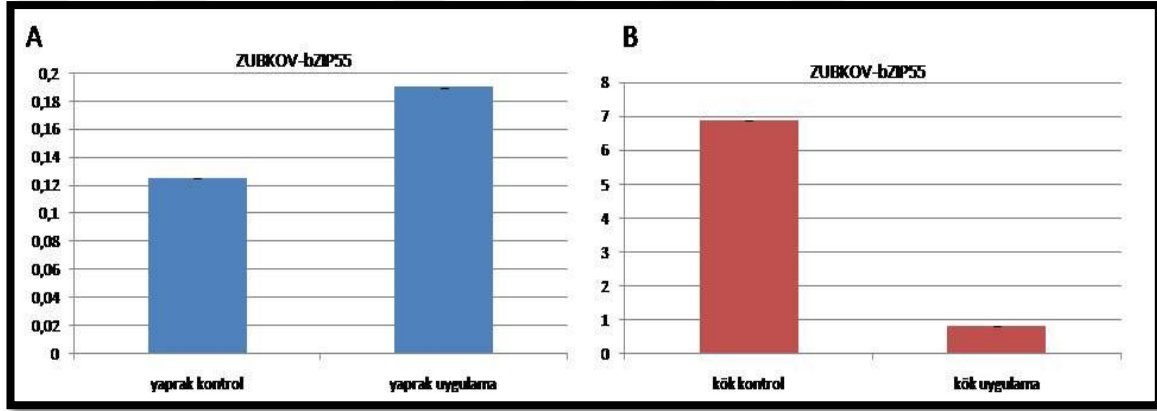
Şekil 4.36 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsZIP53 gen ifade seviyeleri



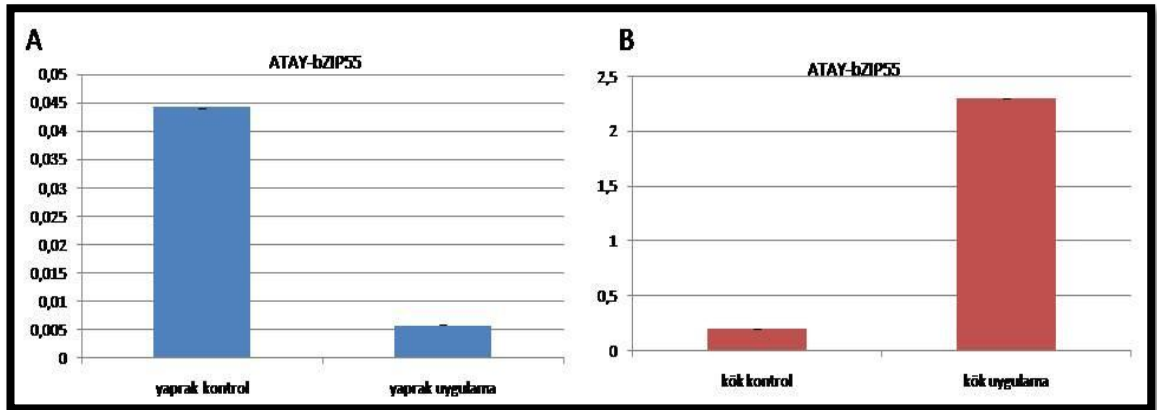
Şekil 4.37 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsZIP53 gen ifade seviyeleri



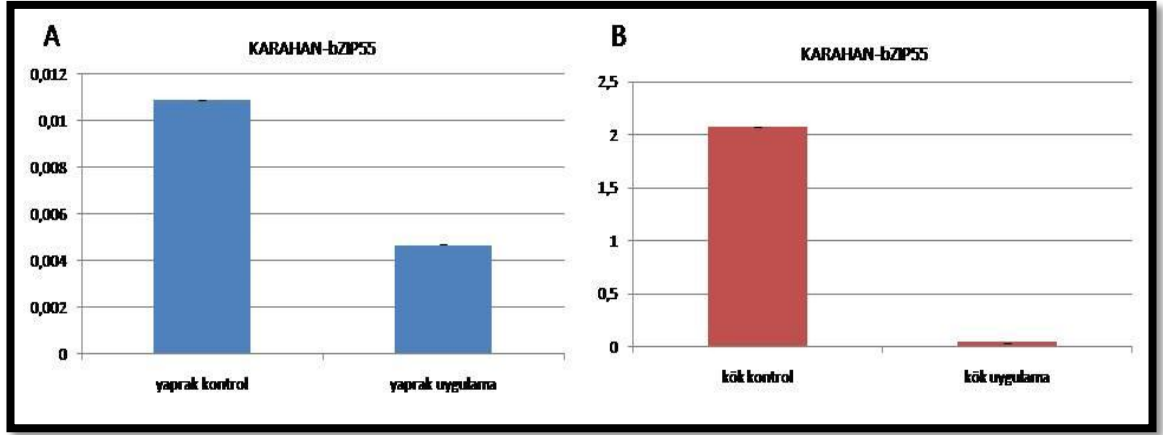
Şekil 4.38 A-B) Karahan 99 çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP53 gen ifade seviyeleri



Şekil 4.39 A-B) Zubkov çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP55 gen ifade seviyeleri



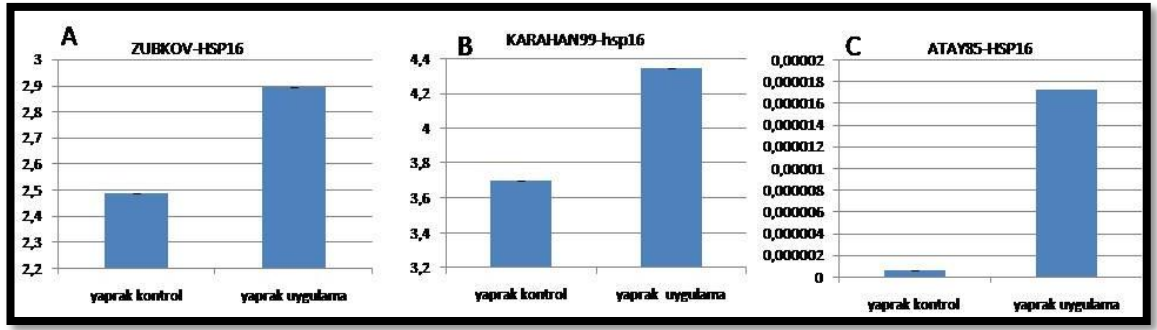
Şekil 4.40 A-B) Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının Cs bZIP55 gen ifade seviyeleri



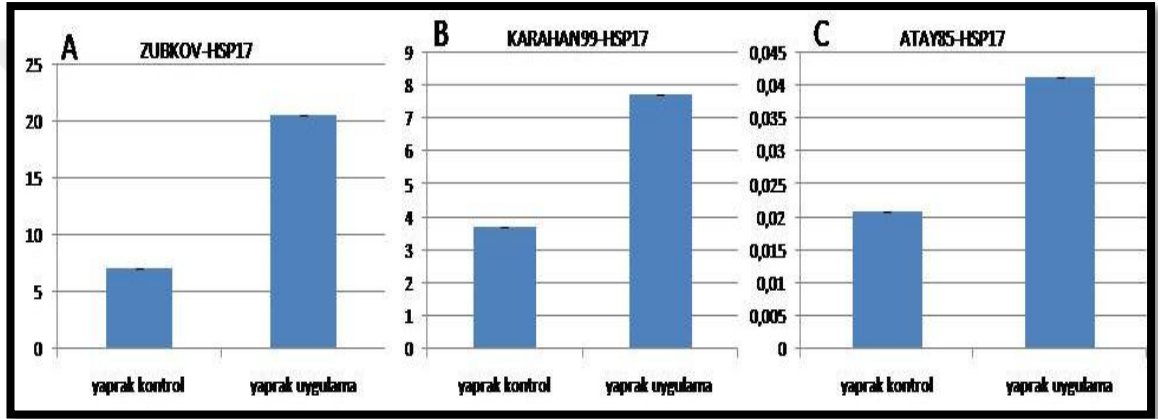
Şekil 4.41 A-B) Karaha99n çeşidinin yaprak ve kök dokularının CsZIP55 gen ifade seviyeleri

4.2.5.3 HSP70 proteinlerine ait gen ifade seviyeleri

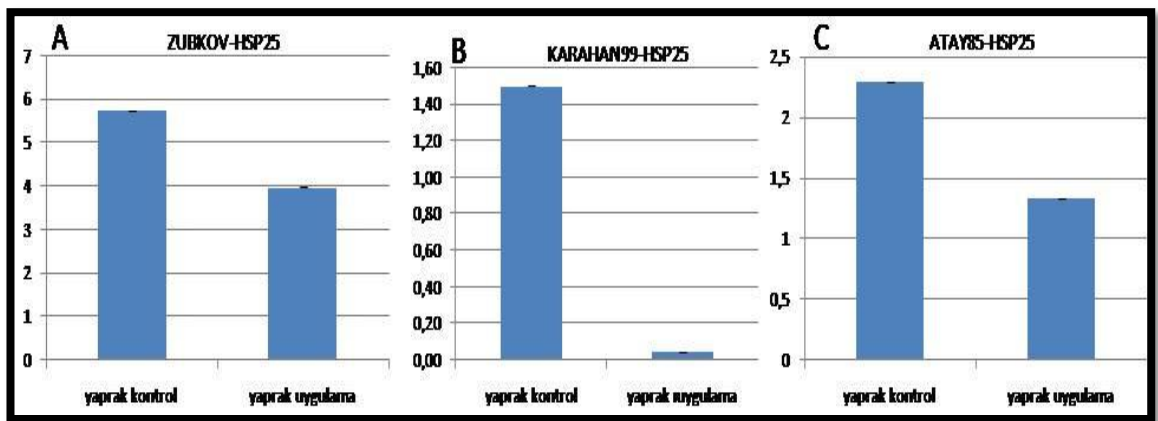
Sıcaklık stresi sonucunda çeşitlerde meydana gelen değişimler, HSP proteinleri ile belirlenmiştir. Yüksek sıcaklık özellikle yaprak dokularını olumsuz etkilediği için çalışmamızda da çeşitlere ait yaprak dokuları kullanılmıştır. Sıcaklık stresi sonucunda çeşitlere ait yaprak dokularında oluşan değişimler grafiklerde verilmiştir. Tüm çeşitlerde sıcaklık stresi sonucunda HSP üyesi genlerde meydana gelen değişimler artış şeklindedir. Zubkov çeşidine ait gen ifade seviyeleri genel olarak kontrole göre uygulama grubunda artış göstermiştir. Atay 85 ve Karahan 99 çeşitlerine ait ifade seviyelerinde artışlar gözlenmiştir fakat bu artışlar sadece üç gende olmuştur. Tüm çeşitlere ait artışların görüldüğü durumlarda ise gen ifade artış oranının genel olarak yüksek olduğu görülmektedir.



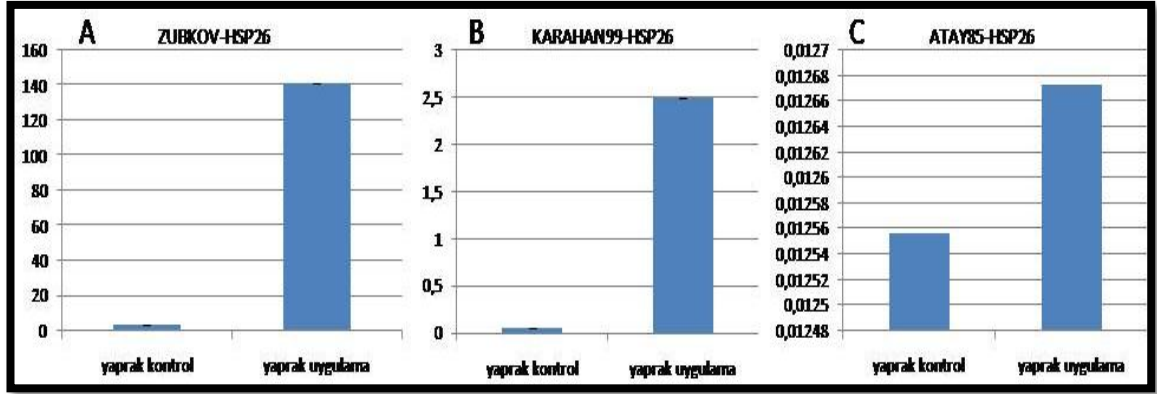
Şekil 4.41 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP16 gen ifade seviyeleri



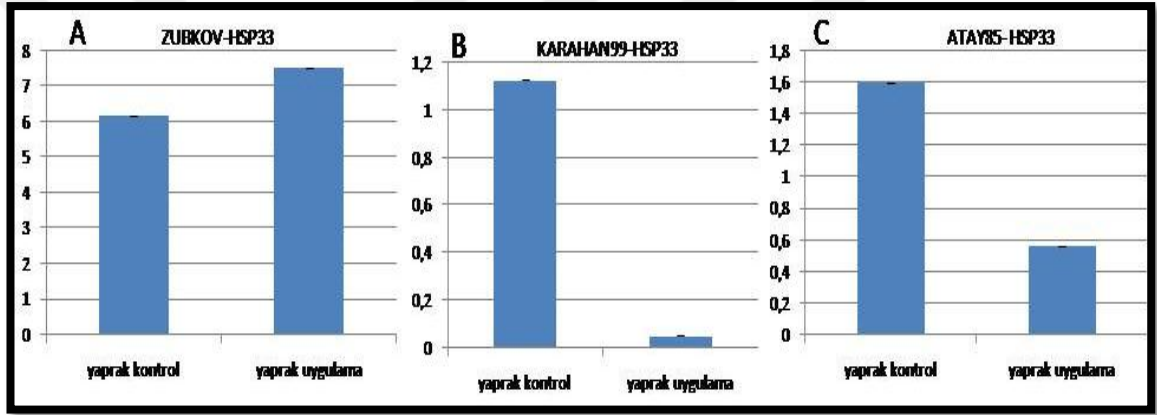
Şekil 4.42 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP17 gen ifade seviyeleri



Şekil 4.43 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP25 gen ifade seviyeleri



Şekil 4.44 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP26 gen ifade seviyeleri



Şekil 4.45 A-B-C) Zubkov, Atay 85 ve Karahan 99 çeşidinin yaprak dokularının HSP33 gen ifade seviyeleri

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1 Buğday Çeşitlerinin Filogenetik Yakınlığı

Kuraklık stresi, suyun eksit veya sınırlı olduğu durumlarda oluşan ve buğdayın da dahil olduğu birçok bitkide ürün veriminde düşümlere neden olan bir çevresel faktördür (Iqbal, *et al.* 2015). Dünyada kullanılabilir alanların %26'sı bu çevresel faktörün neden olduğu olumsuzluktan etkilenmektedir (Sade vd. 2013).

Besin değeri nedeni ile dünya nüfusunun üçte birinden fazlasının yararlandığı bundan dolayı ekimi yaygın olarak yapılan buğday, ekonomik değere olan sahip önemli bir bitkidir. 2013 yılında dünya buğday üretimi yaklaşık 7000 milyon ton olup, dünya ihracatında ki değeri 48 milyar dolardır (www.fao.org FAO,).

Kuraklık stresinin neden olacağı olumsuzluklar, buğday tarımının dünya ekonomisine olan önemli katkısı ve insan beslenmesindeki alternatifsiz yeri nedeni ile çalışmamızda, Anadolu'da ekimi yaygın olarak yapılan ekmeklik buğday çeşitleri kuraklıkla ilişkili 26 SSR markörü ile taranmıştır. Kullanılan SSR markörlerinin yüksek polimorfizm değerine sahip olmasına özen gösterilmiş, böylelikle çeşitler arasındaki genetik yakınlığının daha net olarak ortaya çıkması amaçlanmıştır. SSR markörleri GWM, GDM, WMC, BARC, CFD, CFA, PSP isimlerinin verildiği seriler şeklinde dizayn edilmiştir (Zhang *et al.* 2011). Çeşitlerde daha geniş bir taramaya olanak vermek amacı ile GWM, WMC, BARC ve PSP serilerine ait markörler seçilerek çalışma kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen toplam bant sayısı 80'dir ve bu bantların 76'sı polimorfiktir. Çalışmada kullanılan markörlerin polimorfizm oranı %95 olarak hesaplanmıştır. Arpa bitkisinde (*Hordeum vulgare* L.) yapılan bir çalışmada SSR markörleri kullanılmış ve bu çalışmada kullanılan SSR markörlerinin polimorfizm oranı %54 olarak belirlenmiştir (Thiel *et al.* 2003). Çalışmamızda kullanılan 26 SSR marköründen yalnızca 4 tanesi monomorfik olarak belirlenmiştir. Bazı buğday çeşitleri kullanılarak yapılan farklı bir çalışmada, kullanılan 76 SSR markörünün 11 tanesinin monomorfik olduğu bildirilmiştir (Dreisigacker *et al.* 2005). Çalışmamızda elde ettiğimiz polimorfizm değeri ve monomorfik markör sayısının düşük olmasından dolayı kullanılan markörlerin polimorfik olduğunu düşündürmektedir.

Çalışma sonucunda elde edilen ve çeşitlerin kuraklık stresi dayanıklılığı bakımından yakınlığını ifade eden dendogram Şekil 4.4'te verilmiştir. Dendogramda 11 ekmeklik buğday çeşidinin kuraklığa dayanıklılık bakımından yakınlıkları görülmektedir.

Dendogramda, Gerek 79 çeşidi diğer çeşitlere köken oluşturmuş ve kalan 10 çeşit ise iki gruba ayrılmıştır. Gerek 79 çeşidi geçit bölgesi orjinli bir çeşittir. Çalışmamızda kullandığımız diğer çeşitlerin de geçit bölgei orjinli olması kuraklık dayanıklılığı bakımından benzer genetik karakterler taşımasına olanak tanıyabilir. Bu nedenle aynı bölgeden köken alan yerli çeşitlere Gerek 79 çeşidinin köken oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir.

Köken oluşturan Gerek 79 haricindeki çeşitler iki gruba ayrılmışlardır. Zubkov çeşidi diğer çeşitlerden ayrılarak tek başına bir grup oluştururken, diğer çeşitler ikinci grup altında toplanmışlardır. Zubkov çeşidinin diğer çeşitlerden farklılık gösterdiği ve kuraklık stresi dayanıklılığı bakımından diğer çeşitlere kıyasla öne çıktığı düşünülmektedir. İkinci grup altında birleşen diğer çeşitler ise yine kendi aralarında iki gruba ayrılmışlardır. Beszostaja 1 ve Demir 2000 çeşitleri aynı grupta yer alırken, geri kalan çeşitlerin tamamı bir grup oluşturmuş ve Karahan-99 çeşidi grup üyelerinden farklılık göstererek ayrı bir kola ayrılmıştır. Aynı grup içerisinde OK00421 ve Bayraktar-2000 benzerlik göstererek aynı grupta yer almışlardır.

Kuraklık stresi dayanıklılığı bakımından genetik yakınlıkların ifade edildiği dendogramda, Zubkov çeşidinin tüm çeşitlerden farklılık gösterdiği görülmektedir. Zubkov çeşidinin diğer çeşitlerden farklı olarak tek başına bir grup oluşturması kuraklık stresine karşı dayanıklılığı ile ifade edilebilir. Nitekim Zubkov çeşidinde dahil olduğu bir çalışmada kuraklık indeksi kullanılan diğer çeşitlere oranla daha yüksek çıkmıştır.(Mursalova *et al.* 2015). Çalışmamızda kullandığımız diğer çeşitlerin aynı grupta yer alması, kuraklığa dayanıklılık bakımından benzerlik gösterdiklerini bundan dolayı aynı grubun üyelerini oluşturduklarını düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, bazı ekmeklik buğday çeşitlerinin buldukları ekolojik çevreden etkilenme düzeyleri incelenmiş ve Demir 2000 ile İkizce 96 çeşidinin orta düzeyde sulama yapılan arazilere

uygun olduğu ve orta düzeyde suya sahip bölgelere ekiminin yapılması tavsiye edilmiştir (Aydemir vd. 2009) Başka bir çalışmada ise Gerek-79, Karahan-99 ve Bezostaja 1 çeşitlerinin de dahil olduğu bazı çeşitler kullanılarak, kuru tarım koşullarında çeşitlere ait verim ve kalite değerleri ölçülmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmada kuru tarımda Gerek79, Karahan 99 ve Bezostaja-1 çeşidinin verim bakımından birbirine yakın olduğunu ve Gerek 79 çeşidine Karahan 99 çeşidinin alternatif olabileceği bildirilmiştir (Şahin vd. 2006).

Yalnızca yağmur suyu ile beslenen bazı ekmeklik buğday çeşitlerinin kuraklığa tolerans indekslerinin belirlenmeye çalışıldı bir çalışmada, Gerek79, Karahan 99, Bayraktar, Bezostaja 1, Sönmez 01, Demir 2000OK00421 ve Zubkov çeşidi kullanılmıştır. Yapılan çalışmada Zubkov çeşidinin diğer çeşitlere göre öne çıktığı belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada kurak şartlarda Gerek 79, Bayraktar 2000 ve Karahan 99 çeşitlerinin benzer özellik göstererek çiçek sapı uzunluklarının aynı nitelikte olduğu bildirilmiştir (Mursalova, Akparov *et al.* 2015). Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar bizim sonuçlarımızla örtüşmekte ve Zubkov çeşidinin diğer çeşitlerden farklılık gösterdiği desteklenmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız çeşitlerin dahil edildiği bir diğer çalışmada, çeşitlere ait kuraklık stresi indeksleri hesaplanmış ve elde edilen indeksler kullanılarak çeşitlere ait kümeleme analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda çeşitler iki ana gruba ayrılmış ve Zubkov çeşidi diğer çeşitlerden ayrılarak farklı bir grupta yer alırken, çalışmamıza dahil olan diğer çeşitlerin tümü aynı grupta yer almıştır (Mursalova *et al.* 2015). Bizde çalışmamızda benzer sonuçlara ulaşarak Zubkov çeşidinin diğer çeşitlerden ayrılarak farklı bir grup oluşturduğunu belirttik. Zubkov çeşidinin farklılık göstermesindeki nedenin kuraklık stresi dayanıklılığı ile ilişkili olduğunu ifade edebiliriz. İRapor edilen sonuçlarda Zubkov çeşidinin kuraklığa dayanıklı olduğunu ve dayanıklılık bakımından diğer çeşitlerden nitelikçe farklılık gösterdiğini göstermektedir

Mursalova ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada, kuraklık stresi dayanıklılık indeksi bakımından yakınlıkların ifade edildiği kümeleme analizinde Gerek-79, Karahan 99, Bayraktar 2000, Bezostaja 1, Sönmez 01 ve Demir 2000 çeşitleri aynı

grupta yer alarak kuraklığa karşı benzer tepkiler geliştirdiklerini ve kuraklık tolerasyonlarının benzer olduğu göstermişlerdir. Yapılan çalışmada alınan sonuçlar bizim çalışmamızla örtüşmekte ve benzer sonuçları bizde çalışmamızda görmekteyiz. Çalışmamızda kuraklık stresine dayanıklılık bakımından çeşitlerin filogenetik yakınlıklarını belirlemek amaçlanmış ve çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar amacımızı destekler niteliktedir. Nitekin dayanıklı olan Zubkov çeşidinin diğer çeşitlerden ayrılarak farklılık gösterdiğini ve kuraklığa dayanıklılık bakımından farklı karaktere sahip olduğu görülmüştür.

SSR markörlerinin ıslah çalışmalarında kullanılarak seleksiyona yardımcı olması ve bunun moleküler düzeyde güvenilir bir şekilde kullanılması bu markörlerinin ıslah programlarında yoğun olarak kullanılmasına yol açmıştır. Markör destekli seleksiyonun ıslah programlarında, maliyeti düşürmesi, zamandan tasarruf sağlaması, seleksiyonu kısa zamanda ve kolay bir şekilde gerçekleştirmesi açısından çok önemli bir tekniktir. Bundan dolayı çeşit ıslahında markörlerden yararlanmak çok avantajlıdır. Bu avantajın sürdürülebilir tarımda özellikle çeşit ıslahında verimli bir şekilde kullanılmasının yolu yeni markörlerin geliştirilmesi ve bu geliştirilen markörlerin ıslah programlarına entegresini sağlamakla mümkündür.

5.2 Abiyotik Stres Sonrasında Çeşitlere Ait HSP, bZIP, WRKY TF'lerin Gen İfade Seviyeleri

Çevresel faktörlerin tarımsal üretimi etkilemesi, tarımsal üretimdeki istikrarsız durumun ise dünya nüfusunun beslenme kaynaklarını olumsuz yönde etkilemesi önemli bir sorundur ve bu soruna neden olan çevresel etkilerin, bitkilerde meydana getirdiği etkilerin bilinmesi, bu sorunlar göz önüne alınarak çeşit ıslahının yapılması son derece önemlidir (Ergen *et al.* 2009). Bu anlamda, bitkilerde moleküler mekanizmaları, stres sonrası oluşturulan cevapları, ekstrem koşullara dayanıklılığın belirlenmesi ve bu koşullarda düzenleyici görevler yapan WRKY, bZIP gibi transkripsiyon faktörlerinin, Isı şoku proteinleri (HSP) gibi çeşitli proteinlerin işlevlerinin bilinmesi ve bu bilgilerin ıslah çalışmaları için kullanılması son derece önemli olabilir.

WRKY transkripsiyon faktörü ailesi üyeleri birçok bitkide, transkripsiyonel düzenlemede rol alan (Rushton *et al.* 2010) ve abiyotik stres şartlarında bitkide meydana gelen değişikliklerde düzenleyici görev yapan transkripsiyon faktörleridir (Okay *et al.* 2014). Bu nedenle stres koşullarına hasas Atay 85 (Okay *et al.* 2014), orta dayanıklı Karahan 99 ve dayanıklı Zubkov (Rushton *et al.* 2010) çeşidinde kuraklık ve yüksek sıcaklık stresinde WRKY genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler kıyaslanmaya çalışılmıştır. Abiyotik bir stres olan yüksek sıcaklık, bitkilerde özellikle yaprak dokusunu etkileyen bir çevresel faktördür. Kuraklık stresi ise tuzluluk stresi gibi özellikle kök dokularını etkileyen bir çevresel faktördür (Sa'idu and Mohammed 2013). Bu nedenle kuraklık ve yüksek sıcaklık stresinde bitkiye ait yaprak ve kök dokularında WRKY transkripsiyon faktörü ailesine ait bazı üyelerinin gen ifade değişimlerini ölçmeye çalıştık.

WRKY17'nin de dahil olduğu bazı WRKY üyeleri, özellikle savunma sinyalizasyonunda rol oynayan ve fonksiyonel olarak artış gösteren transkripsiyon faktörleridir (Pandey and Somssich 2009). Yaptığımız çalışmada WRKY17 transkripsiyon faktörünün Atay 85, Karahan 99 ve Zubkov çeşitlerine ait yaprak ve kök dokularındaki gen ifade seviyeleri incelenmiş, Zubkov çeşidine ait yaprak ve kök dokusunda diğer çeşitlere göre gen ifade seviyesinde önemli artışlar görülmüştür (Şekil 4.12). Kuraklık ve yüksek sıcaklık stresi uygulanmış Zubkov çeşidine ait yaprak dokusunda, WRKY17 geninin ifade seviyesi artışı 10 kat olarak belirlenmiştir. Aynı durum Zubkov çeşidine ait kök dokusunda da görülmekte olup (Şekil 4.12) artış yaklaşık 100 kat olarak belirlenmiştir. Buna karşın Atay 85 yaprak dokusunda (Şekil 4.13) oluşan artış miktarı düşük olurken, kök dokusunda azalma görülmüştür. Karahan 99 çeşidine ait tüm dokularda ise düşüş gözlenmiştir. Zubkov çeşidine ait dokuların gen ifade seviyelerinin Atay 85 çeşidine ait dokuların ifade seviyelerinden yüksek olması, Karahan 99 çeşidine ait ifade seviyesine göre artış profiline sahip olması, Zubkov çeşidinin kuraklık ve yüksek sıcaklık stresine karşı Atay 85 ve Karahan 99 çeşidine göre daha tolerant olduğunu düşündürmektedir. Atay 85 çeşidinin kuraklığa karşı hassas bir çeşit olarak belirlendiği bir çalışmada özellikle yaprak dokusunda WRKY17 gen ifade seviyesi, dayanıklı çeşide göre daha düşük olmuştur (Okay *et al.* 2014). Kavakta (*Populus sp.*), WRKY17 transkripsiyon faktör geninin abiyotik stres koşullarında,

meydana gelen gen ifade seviyesindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada abiyotik stres şartlarından salisilik asit stresine karşı WRKY17 gen ifadesinin özellikle kök dokusunda fazla ifade olduğu bildirilmiştir (Jiang, *et al.*). Zubkov çeşidine ait kök dokusundaki ifade seviyesine bakıldığında yaprak dokusuna oranla kök dokusundaki ifade seviyesinin fazla olduğu görülmektedir. Abiyotik stres şartlarında kuraklık ve kimyasal şartlardan ilk olarak kök dokularının etkilendiği bundan dolayı kök dokularında meydana gelen gen ifade artışın, yaprak dokusuna oranla daha fazla olduğu düşünülmektedir.

WRKY genleri özellikle bitkilerin savunma mekanizmalarını kontrol eden, ifade artışları ile savunma mekanizmasında aktif rol oynayan transkripsiyon faktörleri olarak bildirilmişlerdir (Nishizawa 2009). Yaptığımız alışmada WRKY24 transkripsiyon faktörünün gen ifade seviyeleri incelendiğinde Zubkov çeşidine ait yaprak ve kök dokularında artış olduğu (şekil 4.15) yaprak dokusunda yaklaşık 8 kat, kök dokusunda ise yaklaşık 7 kat artış olduğu görülmektedir. Karahan 99 eşidinde (şekil 4.17) yaprak dokusunda bir kat artış olurken, kök dokusunda gen ifade seviyesinde düşüş olmuştur. Atay 85 çeşidine ait ifade seviyesinde yaprak ve kök dokularında azalma görülmüştür (şekil 4.16). Zubkov eşidinde yaprak ve kök dokularında gen ifade seviyesinde artış gösterirken, Atay 85 çeşidine ait yaprak ve kök dokularında gen ifade seviyelerinde düşüş olması çeşitlerin stres koşullarına karşı uyumlarının farklı olduğunu düşündürmekte ve Nishizawa (2009)'nın bildirdiği gibi Zubkov eşidinin stres koşullarına karşı oluşturduğu cevapların daha güçlü olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada kuraklığa dayanıklı ekmeklik buğday çeşidinde özellikle kök dokusunda WRKY24 geninin ifade seviyesi yüksek çıkmıştır (Okay *et al.* 2014). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla paralellik göstermekte ve gen ifade artışının dayanıklılık göstergesi olduğunu desteklemektedir. Diploit pamuk bitkisinde (*Gossypium raimondii*) yapılan bir çalışmada yaprak, kök, gövde, anter, ovaryum ve petal yaprağı gibi dokular kullanılarak tuz ve kuraklık stresinde WRKY transkripsiyon faktör ailesinin çeşitli yeleri kullanılarak gen ifadelerinde meydana gelen değişimler gözlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan WRKY24 geninin ifadesindeki değişim özellikle kök dokusunda olmuştur. Yaprak dokusuna oranla kök dokusundaki

artış, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Cai *et al.* 2014).

WRKY59, çeşitli stres faktörlerine karşı savunma mekanizmasında aktif olan NPR1 geninin aktivasyonunu sağlayan ve NPR geninin ifade düzeyi ile ilişkili bir gen olduğu bildirilmiştir (Pandey and Somssich 2009). Çalışmamızda da WRKY59 geninin çeşitlerdeki gen ifade seviyeleri incelendiğinde yine en yüksek artışın Zubkov çeşidinde olduğu görülmüş (Şekil 4.18), çeşide ait yaprak ve kök dokularında gen ifade seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Atay 85 çeşidinde yaprakta artış, kökte düşüş olurken (Şekil 4.19) çeşide ait yaprak dokusunda meydana gelen gen ifade artış oranı, Zubkov çeşidine ait ifade seviyesinden düşük olduğu görülmüştür. Alınan sonuçlara göre kuraklık ve sıcaklık stresine karşı Zubkov çeşidinin Atay 85 çeşidine kıyasla daha fazla cevap oluşturduğu görülmekte ve Pandey ve Somssich'ın (2009) bildirdiği gibi WRKY59 geninin NPR1 geninin artışına olanak tanıyarak, Zubkov çeşidinin savunma mekanizmasını diğer çeşitlere göre daha dayanıklı kıldığı söylenebilir. Ekmeklik buğdayda yapılan bir çalışmada, hassas olan Atay 85 çeşidine ait yaprak dokusunda WRKY59 geninde artışlar gözlenmesine rağmen, artış oranının dayanıklı çeşidin oluşturduğu gen ifade seviyesinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada dayanıklı çeşide ait kök dokusunda meydana gelen WRKY59 gen ifade seviyesi Atay 85'ten düşük olduğu gözlenmiştir (Okay *et al.* 2014). Bu durum çalışmada kullandığımız Zubkov çeşidinin kuraklık ve yüksek sıcaklık stresine karşı daha toleran olduğunu düşündürmektedir. WRKY59 geninin kuraklık stresinde, kavak bitkisindeki gen ifade seviyelerine bakıldığında yaprak dokusuna oranla kök dokusunda meydana gelen ifade seviyesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Jianghu *et al.*). Bizim çalışmamızda özellikle Zubkov çeşidinde yaprak dokusunda meydana gelen ifade seviyesindeki artış, kök dokusunda meydana gelen artıştan daha düşük olmuştur. Bu durum kök dokularının yaprak dokularına oranla daha yüksek cevaplar oluşturduğunu göstermektedir.

WRKY61 geni MAPK ile etkiye girerek bitkide kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi çevresel faktörlerin sinyalizasyonunda görev almakta ve bitkideki ifade artışları bu çevresel uyarılara karşı dayanıklılıkta kitit rol oynamaktadır (Pathak *et al.*

2013). Çalışmamızda WRKY61 gen ifade seviyelerine bakıldığında, Zubkov çeşidine ait yaprak dokusunda artış 60 kat olurken, kök dokusunda artış yaklaşık 2 kat olmuştur (Şekil 4.21). Atay 85 çeşidine ait yaprak dokusunda düşüş olurken, kök dokusunda yaklaşık 2 kat artış olmuştur (Şekil 4.22). Karahan 99 çeşidine ait yaprak ve kök dokularında ise artış olmuştur (Şekil 4.23). Yaprak dokularına ait ifade seviyeleri karşılaştırıldığında en yüksek artış Zubkov'da, en düşük artış Atay 85'te gözlenmiştir. Karahan 99 çeşidine ait ifade seviyesi ise Zubkov ve Atay 85 çeşitlerine ait ifade seviyeleri arasında bir değer almıştır. Alınan bu sonuçların Zubkov çeşidinin daha dayanıklı, Karahan çeşidinin ise dayanıklılık anlamında Zubkov'dan daha düşük, fakat Atay 85'ten daha yüksek olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, kışlık ekmeclik buğday çeşitleri kullanılarak çeşitlerin hassasiyet ve tolerans indeksleri belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada su ihtiyacını yalnızca yağmur suyu ile karşılayan çeşitler arasında ürün veriminin en yüksek olduğu çeşidin Zubkov olduğu bildirilmiştir (Mursalova *et al.* 2015). Bu çalışmada Zubkov çeşidinin kuraklığa dayanıklı olduğu bundan dolayı verim kaybının diğer çeşitlere göre daha düşük olduğu bildirilerek dayanıklılığı desteklenmiştir.

WRKY82 geni bitkilerde yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve yaralanma gibi faktörler tarafından uyarılan ve bitkide bu faktörlere karşı düzenleyici olarak rol oynayan transkripsiyon faktörüdür. WRKY82 geni, bitki dokularında farklı seviyelerde ifade edilebilir (Peng *et al.* 2011). Bizim çalışmamızda çeşitlere ait gen ifade seviyeleri karşılaştırıldığında Zubkov çeşidinde WRKY82 gen ifade seviyesi (Şekil 4.24) yaprakta yaklaşık 11 kat, Atay 85 çeşidine ait yaprak dokusunda ise (Şekil 4.25) yaklaşık bir kat artış olmuştur. Kök dokularına ait ifade seviyeleri kıyaslandığında Atay 85 çeşidine ait kök dokusunda artış yaklaşık 2 kat olurken, Zubkov çeşidindeki değişim 2,5 kat olmuştur. Peng ve ark.'nın (2011) belirttiği gibi stres ile uyarılan ve transkripsiyonu artıran WRKY82 geni, Zubkovda kuraklık ve yüksek sıcaklık şartlarında yüksek düzeyde eksprese olarak bitkiye bu streslere karşı dayanıklılığı kazandırdığı düşünülmektedir. Ayrıca Zubkov dokuları arasında görülen ifade seviyesindeki farklılıklar stres cevaplarının dokular arasında farklılık gösterebildiği vurgulanmıştır (Peng *et al.* 2011). Bu durumun çeşitlerimize ait yaprak dokularına oranla kök dokularında gen ifade seviyesinin daha yüksek olduğunu ve kök dokularına ait bu yüksek gen ifade

seviyesinin oluşumunda, kök dokularının stresten daha fazla etkilendiği bundan dolayı gen ifade seviyesinin artış miktarının yüksek olduğunu düşündürmektedir.

bZIP (basic-domain leucine-zipper)

Bitkiler, kuraklık stresine maruz kaldıklarında canlılıklarını devam ettirmek için birçok farklı gen tarafından uyarılan moleküler düzenlemelere sahiptir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). bZIP transkripsiyon faktörü ailesine ait üyelerde, kuraklık stresinde gen düzenlenmesinde rol oynamakta ve bitkide kuraklık stresinde çeşitli genleri aktive ederek strese karşı dayanıklılığı sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kuraklık stresinde, bZIP transkripsiyon faktörü üyesi olan beş genin ekspresyon profili incelenmiştir. Kuraklık stresi özellikle bitki kök dokusunu etkileyen bir çevresel faktör (Sa'idu and Mohammed 2013) olmasına karşın, yaprak dokularında oluşan değişimleri de gözlemlemek için Zubkov, Karahan 99 ve Atay 85 çeşitlerinin hem yaprak hem de kök dokularına ait ekspresyon profili incelenmiştir.

bZIP12 geni bitkilerde stres sinyallerinin veya absisik asit (ABA) sinyallerinin oluşumunda rol oynamaktadır. Absisik asit, özellikle stres koşullarında bitkide dayanıklılık cevaplarını oluşturan genlerin ekspresyonunda ve bu genlerin uyarılmasını kontrol eden sinyallerin oluşumunda görev aldığı bildirilmiştir (Kang *et al.* 2002). Çalışmada Zubkov, Karahan 99 ve Atay 85 çeşidinin yaprak ve kök dokularının verdiği cevaplar incelenmiştir. Atay 85 (Şekil 4.28) ve Zubkov (Şekil 4.27) çeşidine ait yaprak dokusunda CsbZIP12 gen ifadesinde artış olduğu, Karahan 99 (Şekil 4.29) çeşidinde düşüş olduğu görülmüştür. Aynı genin kök dokusunda meydana gelen değişimlerinde Atay 85 çeşidinde artış, Zubkov ve Karahan 99 çeşidinde azalış şeklinde olurken Karahan 99' daki düşüşün daha yüksek olduğu görülmüştür. Atay 85'te yaprak ve kökte ifade seviyesinin diğer çeşitlere göre daha yüksek olması hassas Atay 85'te direnci arttırıcı çabalar olarak düşünülebilir. Dayanıklı Zubkov ve orta dayanıklı Karahan 99'da yaprakta oluşan ifade artışı bZIP12 geninin ABA sinyallerini oluşumunu arttırdığı, ABA'nın ise özellikle yaprakta sentezlenen glikozun sentezini inhibe ederek (Kim *et al.* 2004) gen regülasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

CsbZIP15 geninin ekspresyon seviyesi tüm çeşitlere ait yaprak dokularında azaldığı görülmüştür. Azalış oranlarına bakıldığında en az düşüşün Zubkov (Şekil 4.30) çeşidinde en fazla düşüş ise Atay 85 çeşidinde olduğu görülmüştür. Kök dokularına ait ekspresyon seviyesinde Atay 85 (Şekil 4.31) çeşidinde artış olurken, Zubkov ve Karahan 99'da (Şekil 4.32) düşüş olmuştur. bZIP15 geninin ABA sinyalleri üzerinde arttırıcı etkisi olduğu (Kim *et al.* 2004) bilindiğinden yaprak dokularında bZIP15 gen ifade artışının ABA artışına neden olabileceği, ABA'nın ise yaprakta stres şartları süresince artış gösteren Reaktif Oksijen türlerinin birikimini önleyerek hücrenin degradasyonunu önlediği (Kim *et al.* 2004) ve böylelikle yaprak dokusunda dayanıklılık cevaplarını arttırdığı düşünülebilir. Baloğlu ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada kuraklık stresi uygulanmış salatalık (*Cucumber sp.*) bitkisi yaprak ve kök dokularında bZIP15 geninin ifade seviyesi belirlenmeye çalışılmıştır. Yaprak dokusunda 24. saatte bZIP15 geni ifade seviyesi düşerken, kök dokusunda 24. saatte artış gözlenmiştir (Baloglu *vd.*, 2014). Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Atay 85 çeşidine ait yaprak ve kök dokusunda oluşan ifade seviyelerine çok benzemektedir ve kuraklığa hassasiyet bakımından salatalık bitkisine ait cevaplara benzer cevaplar verdiği düşünülmektedir

CsbZIP30 geni bitkilerde stres koşullarında dayanıklılık cevaplarının oluşumuna neden olmasının yanı sıra, özellikle giberillin biyosentezi ve vakuoller doku gelişimi düzenlenmesini düzenleyen transkripsiyon faktörüdür. Çalışmamızda CsbZIP30 genine ait ekspresyon profili incelendiğinde Atay 85 (Şekil 4.34) ve Karahan 99 (Şekil 4.35) çeşitlerine ait yaprak dokularında önemli düşüşlerin olduğu, düşüş oranlarının Atay 85'te 45, Karahan 99'da 30 kat olduğu görülmüş ve Atay 85'te düşüş oranının yüksekliği Atay 85'in Karahan 99'dan daha hassas olmasından kaynaklandığını düşünülmektedir. Zubkov (Şekil 4.33) ve Karahan 99 kök dokularında düşüş gözlenmiş ve düşüş oranı Karahan 99'da 35 kat, Zubkov'da 4 kat şeklinde olmuştur. Düşüş oranının Zubkov çeşidinde daha az olması Zubkov çeşidinin Karahan 99 çeşidine göre daha dayanıklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Karahan 99 ve Zubkov çeşitlerinin de dahil olduğu birçok ekmeklik buğday çeşidinde dayanıklılık indeksleri hesaplanmış ve Zubkov çeşidinin Karahan 99 çeşidine göre daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir (Mursalova *et al.* 2015). Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar, bizim elde

ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Baloğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bZIP30 geni ifade seviyesi yaprakta azalmış, kökte ise artmıştır (Baloglu *et al.* 2014). Dayanıklı Zubkov ve orta dayanıklı Karahan 99 çeşitlerine ait ifade seviyeleri salatalık bitkisinin bZIP30 genine verdiği cevaplardan farklılık gösterirken, hassas olan Atay 85 çeşidinin ifade profili salatalık bitkisinin ifade profili ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir. Bu durum Atay 85 çeşidinin kuraklık stresine karşı dayanıklılığının salatalık bitkisinin dayanıklılığına yakın olduğunu düşündürmektedir.

CsbZIP53 ve CsbZIP55 genlerinin dahil olduğu bZIP transkripsiyon faktörü grubu kuraklık stresi düzenleyici olarak görev yapmasının yanı sıra, bitkide ultraviyole ve mavi ışık sinyallerinin oluşumunu düzenlemektedir (Terzaghi *et al.* 1997). CsbZIP53 gen Zubkov (Şekil 4.36) ve Atay 85 (Şekil 4.37) çeşitlerine ait yaprak dokusunda artarken, Karahan 99'da (Şekil 4.38) düşmüştür. Atay 85 çeşidine oranla Zubkov çeşidinde ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu görülmekte olup, bu durumun Zubkov çeşidinin Atay 85'e göre daha güçlü cevaplar oluşturduğunu ve Zubkov'un daha dayanıklı olduğunu düşündürmektedir. Kök dokularına ait ekspresyonda Zubkov ve Karahan 99 çeşidinde gen ifade seviyesinde düşüş olmuştur. Düşüş miktarlarının Zubkov'a göre Karahan 99'da daha yüksek olması Zubkov çeşidinin dayanıklı Karahan 99 çeşidinin orta dayanıklı olması ile açıklanabilir. Atay 85 çeşidine ait yaprak ve kök dokusunda oluşan bZIP53 gen ifade profili, kuraklık stresinde salatalık bitkisinde oluşan ifade profili ile benzerlik gösterdiği görülmüştür (Baloglu *et al.* 2014).

CsbZIP55 geninin çeşitlerdeki ekspresyon profiline bakıldığında Zubkov'a ait yaprak dokusunda artış olurken, Karahan 99 ve Atay 85'te düşüş olmuştur. Azalış miktarlarına bakıldığında Atay 85'te 9 kat, Karahan 99'da 4 kat olmuştur. Bu sonuç Atay 85 çeşidinin Karahan 99'dan daha hassas olduğunu desteklemektedir. Çeşitlere ait kök dokularındaki ekspresyon seviyesine bakıldığında Atay 85 çeşidinde artış, Zubkov ve Karahan 99'da azalış olmuş ve artış miktarların Karahan 99'da 20 kat, Zubkov'da 7 kat olduğu görülmüştür. Zubkov'un dayanıklı olduğu, Karahan 99'un ise orta dayanıklı olduğu bilindiği ve alınan sonuçların dayanıklılık ve orta dayanıklılık ile paralellik gösterdiği düşünülmektedir.

Genel olarak yaprakta gen ifade seviyesi değişimlerine bakıldığında Zubkov çeşidine ait gen ifade düzeyi diğer çeşitlere kıyasla daha yüksek olarak gözlenmiştir. Artışlarda miktarsal kıyaslamada yine Zubkov çeşidinin ekspresyon miktarının oransal olarak diğer çeşitlerden fazla olduğu görülmektedir. Kök dokuları arasında oluşan farklılıkların genel olarak değerlendirilmesinde ise, Zubkov çeşidine ait ekspresyon seviyesinin diğer çeşitlere kıyasla azaldığı görülmektedir. Kuraklık stresine dayanıklılığı bilinen Zubkov çeşidinin ekspresyon profilinin artışta en yüksek miktara ve azalışta en düşük miktara sahip olması Zubkov çeşidinin dayanıklılığı ile cevaplandırılabilir. Yine kuraklık stresine hassas olan Atay 85 çeşidinin beş gen düzeyindeki ekspresyon seviyelerine bakıldığında yaprak dokusunda artışlar ve azalışlar göstermesine karşın, artışlarda miktarsal olarak diğer çeşitlerden daha az bir ekspresyon oranı gösterdiği, düşüşlerde ise yine miktarsal olarak diğer çeşitlerden daha fazla düşüş oranına sahip olduğu görülmüştür. Özellikle kök dokusunda beş gene ait ekspresyon seviyesinde artışlar görülmüş, kuraklık stresinde köklerin yaprağa göre daha fazla etkilendiği ve bundan dolayı bu dokudaki ekspresyon seviyesinde artış olduğu düşünölmektedir. Artış miktarlarının diğer çeşitlerle kıyaslanması durumunda orta dayanıklı Karahan 99 çeşidine ait ifade seviyesini aşmadığı görülmektedir.

Karahan 99 çeşidine ait yaprak ve kök dokularına ait ekspresyon seviyelerinin diğer çeşitlere ait ifade seviyeleri ile kıyaslanması durumunda yaprak dokusunda genel olarak Zubkov çeşidine ait profile benzer bir profil izlenmiş ve ifade seviyesindeki artış miktarı Zubkov çeşidine ait ifade seviyesinden daha düşük olmuştur. İfade seviyesindeki oransal azalış ise Atay 85 çeşidinden daha düşük olmuştur. Kök dokularında Karahan 99 çeşidine ait genel profil Zubkov çeşidine ait profile benzerlik göstermiş ve Karahan 99 çeşidine ait oransal düşüşün Zubkov çeşidine ait oransal düşüşten daha yüksek olduğu görülmüştür. Orta dayanıklı olan Karahan 99 çeşidinin gen ifade seviyelerindeki farklılığın oransal olarak hassas olan Atay 85 ve dayanıklı olan Zubkov çeşidine ait gen ifade seviyeleri arasında bir değer izlemesi, orta dayanıklı olması ile paralellik gösterdiği ve moleküler çalışma ile desteklendiğini düşündörmektedir.

Çay (*Camellia sinensis*) bitkisinde, bZIP12 geninin kuraklık, düşük sıcaklık, yüksek tuzluluk ve ABA stresinde ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimlerin

incelendiği bir çalışmada CsbZIP12 geninin kuraklık stresinde yapraktaki ekspresyonunda önemli bir değişikliğin olmadığı buna karşın kök dokusunda kontrole göre artışların olduğu gözlenmiştir (Weltmeier *et al.* 2009). Kök dokusundaki ekspresyon profili çalışmamızda elde ettiğimiz ve Atay 85 çeşidine ait ekspresyon profili ile örtüşmektedir. Yine aynı çalışmada (Weltmeier *et al.* 2009) kullanılan CsbZIP15 genine ait ekspresyon düzeyi, kuraklık stresinde yaprak ve kök dokularında artışla sonuçlanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda Atay 85 çeşidine ait kök dokusunun ekspresyon düzeyi kontrole göre artan bir profil göstermiştir. ay bitkisi, yetişme koşullarında özellikle sulamaya ihtiyaç duyan bir bitki olması itibari ile, bizim çalışmamızda kullandığımız ve kuraklığa hassas olan Atay 85 çeşidine ait ekspresyon profiline benzer bir profil çizdiği düşünülmektedir

Salatalık bitkisinde, kuraklık stresi ile ilişkili bZIP transkripsiyon faktörü üyelerinde meydana gelen gen ifade değişimleri incelenmiştir. Bu çalışmada bZIP12, bZIP15, bZIP30, bZIP53 ve bZIP55 genlerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir (Baloglu *et al.* 2014). Rapor edilen çalışmada PEG6000 uygulaması sonrasında, özellikle kök dokularında gen ifade seviyesinde artış görülürken, yaprak dokusunda düşüş olduğu ve bZIP genlerinin dokuya spesifik olarak ifade edildiği bildirilmiştir (Baloglu *et al.* 2014). Bizim çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarda çeşitlere ait yaprak ve kök dokularında ifade değişimleri farklılık göstermekte ve bu değişimin çeşitlerin sahip olduğu dayanıklılık derecesine göre olduğu düşünülmektedir. Yine Atay 85 eşidinin kuraklıktan daha fazla etkilendiği için kök dokularındaki ifade düzeyinde artışların olduğu düşünülmektedir.

HSP (High shock protein)

Yüksek sıcaklık bitkilerde, özellikle yaprakları etkileyen ve ilk etkilerini yaprak dokusunda gösteren bir stres faktörüdür (Sa'idu and Mohammed 2013). Bu nedenle yaprak dokusunda oluşan ifade değişimleri analiz edilmiştir. Sıcaklık stresi sonrasında Atay 85, Karahan 99 ve Zubkov çeşitlerine ait HSP protein ailesi yelerinden HSP16, HSP17, HSP25, HSP26 ve HSP33 genlerinin ekspresyon profili analiz edilmiştir. Yüksek sıcaklık stresi sonrasında çeşitlere ait gen ifade seviyelerinde, genel anlamda artış gözlenmiştir. İfade düzeyi incelenen beş genden yalnızca HSP25 (şekil 4.44)

geninde azalma gözlenirken, diğer dört üyeye ait gen ifade düzeyi artış ile sonuçlanmıştır. Çeşitlere ait ifade düzeylerindeki değişimler incelendiğinde, sıcaklık stresine dayanıklı olan Zubkov çeşidine ait yaprak dokusunda HSP16, HSP17, HSP26 ve HSP33 genlerine ait gen ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir. Özellikle HSP17 ve HSP26 genlerine ait ekspresyon düzeyinde önemli artışlar gözlenmiştir. Artışların HSP17’de (Şekil 4.43) yaklaşık üç kat, HSP26’da (Şekil 4.45) yaklaşık 20 kat olduğu görülmektedir. Zubkov çeşidinde HSP25 genine ait gen ifade düzeyi azalma gösterirken (Şekil 4.44), HSP33 genine ait ekspresyon düzeyi diğer çeşitlerin aksine artış göstermiştir (Şkil 4.46). Zubkov çeşidinin HSP genlerine verdiği cevapların genel olarak artış şeklinde olması, artış oranlarının diğer çeşitlere ait ifade düzeyinden farklılık göstermesi önemlidir. Zubkov çeşidi, genlerin çoğunluğuna verdiği cevapların artış şeklinde olması ve artış miktarının diğer çeşitlerden farklı olarak yüksek düzeylerde olması, sıcaklık stresine dayanıklılığının bir sonucu olarak kabul edilebilir. Zubkov özellikle HSP33 geninde stres sonrasında diğer çeşitlerden farklı bir profil göstermiş ve diğer çeşitlerde azalış şeklinde görülen ifade düzeyi Zubkov’da artış şeklinde olmuştur. HSP33 geninde oluşan genel profilden sıcaklığa hassas Atay 85 ve sıcaklığa orta dayanıklı Karahan 99 çeşidinin benzer cevaplar oluşturmasına karşın, sıcaklığa dayanıklı Zubkov çeşidinin farklı bir cevap vererek sıcaklığa dayanıklılığını temellendirdiği düşünülebilir.

Karahan 99 çeşidine ait gen ifade düzeyleri incelendiğinde HSP16, HSP17 ve HSP26 genlerine verdiği cevaplar artış şeklinde olurken, HSP25 ve HSP33 genlerine ait ifade düzeyleri azalış şeklinde olmuştur. Karahan 99’un bu genlere verdiği cevapların oransal değişimine bakıldığında HSP16’da (Şekil4.42) yaklaşık 0,15 kat, HSP17’de yaklaşık 1 kat ve HSP26’da yaklaşık 25 kat artış gözlenmiştir. Gen ifade düzeyindeki artış oranlarının diğer çeşitlere ait gen ifade düzeyleri ile kıyaslandığında Karahan 99 çeşidine ait gen ifade düzeyinin Zubkov çeşidine ait gen ifade düzeylerinden düşük olduğu görülmektedir. Aynı zamanda Karahan 99 çeşidine ait gen ifade düzeyleri Atay 85 çeşidine ait gen ifade düzeyleri ile karşılaştırılmıştır. Karahan 99 çeşidine ait gen ifade düzeylerinde oluşan artışın, Atay 85 çeşidine ait gen ifade düzeylerinden yüksek olduğu ve oransal artışında yine Karahan 99 çeşidinde daha yüksek olduğu görülmektedir. Karahan 99’a ait gen ifade değişimleri, dayanıklı olan Zubkov çeşidine

ait ifade düzeyi ile hassas olan Atay 85 çeşidine ait ifade düzeyi arasında bir profil göstermesi, sıcaklık stresinde orta dayanıklı olduğunu destekler niteliktedir. Karahan 99 çeşidin HSP25 ve HSP33 genlerine ait ifade seviyesinde meydana gelen değişimlere bakıldığında gen ifade düzeyleri azalmıştır. Karahan 99 çeşidinin bu genlere verdiği cevaplar, Atay 85 çeşidine ait cevaplarla benzerlik göstermektedir. Karahan 99 çeşidine ait gen ifade profiline genel olarak bakıldığında HSP16, HSP17 ve HSP26 genlerinde artan cevapların Zubkov ve Atay 85 çeşitlerine ait gen ifade düzeyleri arasında değerler aldığı, HSP25 ve HSP33 genlerine ait ekspresyon düzeyinde ise Atay 85 çeşidine ait cevaplara benzer cevaplar oluşturduğu görülmüştür.

Atay 85 çeşidine ait ifade düzeylerine bakıldığında HSP16, HSP17 ve HSP26 genlerinde meydana gelen değişimler artış şeklindedir. Fakat artış oranları Zubkov ve Karahan 99 çeşidine oranla çok düşük olmuştur. Sıcaklık stresine hassas olan çeşidin gen ifade düzeyinde meydana gelen artış oranlarının diğer çeşitlere kıyasla daha düşük olması, sıcaklık stresinde diğer çeşitler kadar güçlü cevaplar oluşturamadığını ve sıcaklık stresinde dayanıklılık seviyesinin diğer çeşitler kadar yüksek olmadığını düşündürmektedir.

Kavak (*Populus*) bitkisinde yapılan transkriptom analizi sonucunda HSP70 protein ailesi üyelerinin stres sonrasında oluşan ekspresyon düzeyindeki değişimleri incelenmiştir. Çalışmada dayanıklı ve hassas klonlar kullanılarak stres sonrasında gen ifade değişim düzeyleri kıyaslanmıştır. Çalışmada HSP16, HSP26 ve HSP 33 genlerinde, strese dayanıklı klonda gen ifade düzeyleri strese hassas olan klondan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Yer *et al.* 2015). Bizim çalışmamızda da strese dayanıklı olan Zubkov çeşidinde gen ifade seviyeleri artış göstermiştir. Yine artış oranları kıyaslandığında hassas olan Atay 85'te artış oranı çok düşük olurken, dayanıklı Zubkov çeşidinde artış oranı çok yüksek düzeyde olmuştur.

Kavak bitkisinde yapılan bir çalışmada, HSP26 gen ifade düzeyi dayanıklı kavak bitkisinde çok yüksek düzeyde artış gösterirken, hassas olan bitkide ifade seviyesi artışı fazla olmamıştır (Yer *et al.* 2015). Bizim çalışmamızda da HSP26 gen ifade düzeyi

özellikle dayanıklı Zubkov çeşidinde yüksek düzeyde artış gösterirken, hassas olan Atay 85 çeşidinde artış oranının yüksek olmadığı görülmüştür. Bu sonuç HSP26 geninin dayanıklı olan bitkilerde güçlü cevaplar oluşturduğunu düşündürmektedir. Çalışmada elde edilen bir diğer benzer sonuç ise, HSP25 genine ait ifade düzeyinde olmuştur. HSP25 gen ifade düzeyi dayanıklı kavak bitkisinde fazla bir artış göstermemekte, fakat hassas olan kavak bitkisinde azalmaktadır. Alınan bu sonuçlarda bizim çalışmamızda aldığımız sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Yaptığımız çalışmada HSP25 gen ifade düzeyi dayanıklı olan Zubkov çeşidinde artış göstermiş, fakat artış düzeyi çok yüksek olmamıştır. Hassas olan ve orta dayanıklı olan çeşitlerde gen ifade seviyesi azalmıştır.

HSP33 gen ifade düzeyinde meydana gelen değişim yine kavak bitkisi ile yapılan çalışmaya ait verilerle uyum göstermektedir. Dayanıklı kavak bitkisinde artan HSP33 gen ifade düzeyi, hassas kavak bitkisinde azalmıştır (Yer *et al.* 2015). Bizim çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular; dayanıklı olan Zubkov çeşidinde gen ifade düzeyinin arttığı, hassas olan ve orta dayanıklı olan çeşitlerde ise ifade düzeyinin kontrole göre azaldığı görülmüştür. Alınan sonuçların değerlendirilmesinden anlaşılacağı gibi Zubkov çeşidinin sıcaklık stresine tolerant olduğu ve strese karşı dayanıklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. Atay 85 çeşidinin ise sıcaklık stresine adaptasyonda Zubkov çeşidi kadar uyumlu olmadığı, Karahan 99 çeşidinin ise Zubkov ve Atay 85 çeşitleri arasında bir adaptasyona sahip olduğu söylenebilir.

Sıcaklık ve tuzluluk stresinde arpa bitkisinin (*Hordeum. vulgare cv. haruno nijo*) bir çeşidinde HSP genlerine ait gen ifade düzeyinde meydana gelen değişimlerin incelendiği bir çalışmada, HSP17 ve HSP26 genlerinin ifade düzeyinde meydana gelen değişimler incelenmiştir (Shagimardanova *et al.* 2010). Çalışmada arpa bitkisinde stres sonrasında HSP17 ve HSP26 genlerinin kontrole göre sıcaklık stresi uygulanmış grupta daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Yapılan bu çalışmada alınan sonuçlar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla aynı profili göstermektedir. Yaptığımız çalışmada bu iki gene ait ifade düzeylerinin her üç çeşitte artış gösterdiği görülmüştür.

HSP70 genlerinin aşırı ifade edilmesi sıcaklık toleransı ile pozitif paralellik gösterdiği ifade edilmiştir (Lee and Schöfl 1996). Bundan dolayı Zubkov çeşidinin gen ifade düzeyinin diğer çeşitlerden yüksek olması Zubkov çeşidinin Karahan 99 ve Atay 85 çeşidinden daha dayanıklı olduğunu ifade etmemize neden olurken, Karahan 99 çeşidine ait ifade düzeyinin Atay 85 çeşidinden yüksek olması Karahan 99 çeşidinin sıcaklık stresine Atay 85 çeşidinden daha dayanıklı, Atay 85 çeşidinin ise hassas olduğunu ifade etmemize neden olmaktadır. Alınan sonuçların çeşitlere ait dayanıklılık düzeylerini de destekler niteliktedir.

Sonuç olarak çalışmamızda stres koşullarına dayanıklı olan Zubkov, orta dayanıklı olan Karahan 99 ve stres koşullarına hassas olan Atay 85 çeşidinin sıcaklık, kuraklık, sıcaklık ve kuraklık streslerine verdikleri cevaplar birçok gen düzeyinde incelenmiştir. Gen ifade düzeylerinin analizi Zubkov çeşidinin stres koşullarına karşı Karahan 99 ve Atay 85 çeşidinden daha dayanıklı olduğunu göstermiştir. Yine analiz sonuçları Karahan 99 çeşidinin orta dayanıklı olduğunu, Atay 85 çeşidinin ise hassas olduğunu desteklemiştir. SSR markörleri ile ekmeçlik buğday çeşitlerin, kuraklık stresine dayanıklılık bakımından yakınlıkları belirlenmeye çalışılmış ve çeşitlere ait genetik ayırım yapılmıştır. Yapılan ayırım sonucunda kuraklık stresine dayanıklı ve hassas çeşitler arasında gruplar oluşturularak, dayanıklılık toleransları aynı olan çeşitlerin aynı gruplarda toplanması sağlanmıştır. Analiz sonucunda Zubkov çeşidi dayanıklı olarak tek bir grup oluştururken, diğer çeşitler aynı grupta toplanarak kuraklık dayanıklılıkları benzer olarak görülmüştür. Çeşitlere ait gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişimler çeşitlerin dayanıklı veya hassas olarak ayrılmasına olanak tanımış ve SSR markörleri ile elde edilen ayrışımı destekler nitelikte olmuş ve Zubkov çeşidinin kuraklığa ve sıcaklığa dayanıklı olduğunu desteklemiştir.

Çalışmamızda seçilen çeşitlerin özellikle beslenmede, tarımsal üretimde ve ekonomide önemli bir yere sahip olması, çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçların kullanılabilir olduğunu ve özellikle ıslah çalışmalarında kullanılmasına kaynak teşkil edeceğini düşünmekteyiz. Seçilen çeşitlerin tarımsal değerinin yüksek olması ve özellikle beslenmedeki önemi dikkate alınarak seçilmiştir. Bu nedenle seçilen çeşitlerin kuraklık ve yüksek sıcaklık şartlarında gen ifade değişimleri ve filogenetik yakınlıkları

önemlidir. Gelecekte özellikle küresel iklim değışikliklerinden bitkilerin daha fazla etkilenecekleri dikkate alınır (Sa'ıdu and Mohammed 2013) seçilen çeşitlerin kuraklık ve yüksek sıcaklık streslerine karşı oluşturdukları cevaplarının bilinmesini, strese karşı dayanıklı çeşitlerin seçilimine yardımcı olması ayrıca önemlidir (Sa'ıdu and Mohammed 2013).

Azalan tarım alanlarına karşı daha verimli çeşitlerin geliştirilmesi, hastalıklara, biyotik ve abiyotik stres şartlarına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ileride yaşanacak besin yetersizliklerine karşı kaynak oluşturabilecektir. Aynı zamanda tarımsal üretimi çok kısıtlı olan ülkelerde yaşanan besin yetersizliği sorunlarının giderilmesi amacı ile besin değeri yüksek, çeşitlerin geliştirilmesi var olan ve gelecekte oluşabilecek sorunların giderilmesine olanak tanıyacaktır.

KAYNAKLAR

- Abouzied, H.M., Eldemery, S.M. and Abdellatif, K.F. (2013). SSR-Based genetic diversity assessment in tetraploid and hexaploid wheat populations. *British Biotechnology Journal*, 3(3), 390.
- Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.S. and Said, T.M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive biomedicine online*, 8(6), 616-627.
- Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A.M. and Hall, R.D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in plant science*, 15(12), 664-674.
- Aktaş, B., Aydemir, T., Yılmaz, K. and İkincikarakaya, S. (2009). Bazı tritikale (x Triticosecale Witt.) genotiplerinin kuru koşullarda tane verimi stabilitesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 18(1-2).
- Ali, M., Rajewski, J., Baenziger, P., Gill, K., Eskridge, K.M. and Dweikat, I. (2008). Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. *Molecular breeding*, 21(4), 497-509.
- Anonymous. 2015a. Web Sitesi: <http://www.fao.org>, Erişim Tarihi: 11/04/2016.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter*, 9(3), 208-218.
- Ashraf, M. and Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.
- Aufricht, C. (2005). Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatric Nephrology*, 20(6), 707-713.
- Aydoğan, M.Ş.S. and Göçmen, A. Kurak Şartlarda Bazı Ekmeklik Buğday (T. aestivum L.) Genotiplerinin Dane Verimi ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *alatarım*, 50.
- Babaoğlu, M., Gürel, E. and Özcan, S. (2001). Bitki Biyoteknolojisi. Doku kültürü ve uygulamaları. *Konya, Turkey: Selçuk University Press (in Turkish)*.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker E.U., Cresko, W.A. and Johnson, E.A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One*, 3(10), e3376.
- Baloglu, M.C., Eldem, V., Hajyzadeh, M. and Unver, T. (2014). Genome-wide analysis of the bZIP transcription factors in cucumber. *PLoS One*, 9(4), e96014.
- Barakat, M.N., Al-Doss, A.A., Elshafei, A.A. and Moustafa, K.A. (2011). Identification of new microsatellite marker linked to the grain filling rate as indicator for heat tolerance genes in F² wheat population. *Australian Journal of crop science*, 5(2), 104.
- Bernier, J., Kumar, A., Ramaiah, V., Spaner, D. and Atlin, G. (2007). A large-effect QTL for grain yield under reproductive-stage drought stress in upland rice. *Crop Science*, 47(2), 507-516.
- Bezerra, M.M., de Lima, V., Alencar, V.B., Vieira, I.B., Brito, G.A.C., Ribeiro, R.A. and Rocha, F.A.C. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*, 71(6), 1009-1014.

- Black IV, W.C. and DuTeau, N.M. (1997). RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors* (pp. 361-373): Springer.
- Bousba, R., Baum, M., Djekoune, A., Labadidi, S. and Djighly, A. (2012). Screening for drought tolerance using molecular markers and phenotypic diversity in durum wheat genotypes. *World Appl Sci J*, 16, 1219-1226.
- Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G.L., D'Amore, R., Allen, A.M., Mckenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y., Hou, N., Luo, M., Sehgal, S., Gill, B., Kianiyan, S., Anderson, O., Kersey, P., Dworak, J., McCombie, W. R., Hall, A., Mayer, K. F. X., Edwards, K.J., Bevan, M.W. and Hall, N. (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, 491(7426), 705-710.
- Bushuk, W. (1997). Wheat breeding for end-product use *Wheat: Prospects for global improvement* (pp. 203-211): Springer.
- Cai, C., Niu, E., Du, H., Zhao, L., Feng, Y. and Guo, W. (2014). Genome-wide analysis of the WRKY transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* and the expression of orthologs in cultivated tetraploid cotton. *The Crop Journal*, 2(2), 87-101.
- Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 521-530.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. and Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Choi, H.-i., Hong, J.-h., Ha, J.-o., Kang, J.-y. and Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1723-1730.
- Christians, E.S., Yan, L.-J. and Benjamin, I.J. (2002). Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Critical care medicine*, 30(1), S43.
- Ciucă, M. and Petcu, E. (2009). SSR markers associated with membrane stability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Romanian Agricultural Research*, 26, 21-24.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743.
- Corazza-Nunes, M., Machado, M., Nunes, W., Cristofani, M. and Targon, M. (2002). Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 126(2), 169-176.
- Craita, E. and Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops.
- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H. (2011). Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları (021002)(11-34). *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2).
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5), 779-795.

- Denby, K. and Gehring, C. (2005). Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in Arabidopsis. *Trends in biotechnology*, 23(11), 547-552.
- Deocaris, C.C., Kaul, S.C. and Wadhwa, R. (2006). On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell stress & chaperones*, 11(2), 116-128.
- Dodig, D., Zorić, M., Kobiljski, B., Šurlan-Momirović, G. and Quarrie, S.A. (2010). Assessing drought tolerance and regional patterns of genetic diversity among spring and winter bread wheat using simple sequence repeats and phenotypic data. *Crop and Pasture Science*, 61(10), 812-824.
- Dreisigacker, S., Zhang, P., Warburton, M., Skovmand, B., Hoisington, D. and Melchinger, A. (2005). Genetic diversity among and within CIMMYT wheat landrace accessions investigated with SSRs and implications for plant genetic resources management. *Crop Science*, 45(2), 653-661.
- Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M. and Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal*, 16(2), 221-229.
- El-Maghraby, M., Moussa, M., Hana, N. and Agrama, H. (2005). Combining ability under drought stress relative to SSR diversity in common wheat. *Euphytica*, 141(3), 301-308.
- Ergen, N.Z., Thimmapuram, J., Bohnert, H.J. and Budak, H. (2009). Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 9(3), 377-396.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. and Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5(5), 199-206.
- Fang, D., Roose, M., Krueger, R., & Federici, C. (1997). Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and applied genetics*, 95(1-2), 211-219.
- Ferriol, M., Pico, B., & Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and applied genetics*, 107(2), 271-282.
- Filiz, E. ve Koç, İ. (2011). Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler.
- Flavell, R.B. and Smith, D.B. (1976). Nucleotide sequence organization in the wheat genome. *Heredity*, 37(2), 231-252.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. and Sharkey, T. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6(03), 269-279.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E. and Vale, G. (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(3), 317-342.
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 603-647.
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y. and Takahashi, Y. (2000). Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *The Plant Cell*, 12(6), 901-915.

- Gajera, B.B., Kumar, N., Singh, A.S., Punvar, B.S., Ravikiran, R., Subhash, N. and Jadeja, G. (2010). Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 491-498.
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Gill, R. and Tuteja, N. (2016). Abiotic Stress Signaling in Plants—An Overview. *Abiotic Stress Response in Plants*, 3.
- Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L. and Bitonti, M. B. (2011). In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *Journal of experimental botany*, err313.
- Gupta, P., Mir, R., Mohan, A. and Kumar, J. (2008). Wheat genomics: present status and future prospects. *International journal of plant genomics*, 2008.
- Gupta, P.K. and Varshney, R. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163-185.
- Habben, J.E., Bao, X., Bate, N.J., DeBruin, J.L., Dolan, D., Hasegawa, D., Helentjaris, T.G., Lafitte, R.H., Lovan, N., Mo, H.Reimann, K. and Schussler, J.R. (2014). Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant biotechnology journal*, 12(6), 685-693.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-580.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H.E., Chen, S., Saibill, H.R. Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *The EMBO journal*, 18(23), 6744-6751.
- Hayashi, K., Hashimoto, N., Daigen, M., & Ashikawa, I. (2004). Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. *Theoretical and applied genetics*, 108(7), 1212-1220.
- Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R. and Michelmore, R. (1996). PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(8), 1202-1210.
- Hopf, M. and Zohary, D. (2001). *Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*: Oxford University Press.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 377-403.
- Iqbal, M.J., Maqsood, Y., Abdin, Z.U., Manzoor, A., Hassan, M. and Jamil, A. (2016). SSR Markers Associated with Proline in Drought Tolerant Wheat Germplasm. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(5), 1042-1052.
- Jagadish, S., Muthurajan, R., Oane, R., Wheeler, T.R., Heuer, S., Bennett, J. and Craufurd, P.Q. (2010). Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany*, 61(1), 143-156.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 7(3), 106-111.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on

morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol*, 11(1), 100-105.

- Ji, X., Shiran, B., Wan, J., Lewis, D.C., Jenkins, C.L., Condon, A.G., Richards, A. and Dolferus, R. (2010). Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant, Cell & Environment*, 33(6), 926-942.
- Jiang, M. and Zhang, J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of experimental botany*, 53(379), 2401-2410.
- Jiang, Y., Zhu, J., Ma, Y., Duan, Y., Yin, J., Ye, S., Ye, S., Lu, W., Fan, D. and Luo, K. Genome Wide Analysis of the Populus WRKY Transcription Factor Family Allows the Identification of Poplar PtrWRKY89 Gene Participating in SA Signaling Pathway.
- Johnson, S.M., Lim, F.L., Finkler, A., Fromm, H., Slabas, A.R. and Knight, M.R. (2014). Transcriptomic analysis of Sorghum bicolor responding to combined heat and drought stress. *Bmc Genomics*, 15(1), 1.
- Kang, J.-y., Choi, H.-i., Im, M.-y. and Kim, S.Y. (2002). Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 14(2), 343-357.
- Kim, S., Kang, J. y., Cho, D. I., Park, J.H. and Kim, S.Y. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal*, 40(1), 75-87.
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schäfer, E. and Frohnmeyer, H. (1998). CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Molecular and General Genetics MGG*, 257(6), 595-605.
- Kirigwi, F., Van Ginkel, M., Brown-Guedira, G., Gill, B., Paulsen, G. and Fritz, A. (2007). Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Molecular Breeding*, 20(4), 401-413.
- Kızılaslan, H. (2004). Dünya’da ve Türkiye’de Buğday Üretimi ve Uygulanan Politikaların Karşılaştırılması.
- Koveza, O. and Gostimsky, S. (2005). Development and study of SCAR markers in pea (*Pisum sativum* L.). *Russian Journal of Genetics*, 41(11), 1254-1261.
- Kutlu, İ. (2010). Tahıllarda Kuraklık Stresi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3(1), 35-41.
- Latchman, D.S. (1997). Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(12), 1305-1312.
- Lee, J. H. and Schöffl, F. (1996). AnHsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(1-2), 11-19.
- Li, G., and Quiros, C.F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping

and gene tagging in Brassica. *Theoretical and applied genetics*, 103(2-3), 455-461.

- Ma, K.H., Kim, N.S., Lee, G.A., Lee, S.Y., Lee, J.K., Yi, J.Y., Kim, T.S., Gwang, G.J. and Kwon, S.J. (2009). Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(7), 1247-1254.
- Macario, A.J., and de Macario, E.C. (2005). Sick chaperones, cellular stress, and disease. *New England Journal of Medicine*, 353(14), 1489-1501.
- Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., Motyka, V., Haisel, D., Hajek, T., Prasil, I. T., Gaudinova, A., Storchova, H., Ge, E., Werner, T., Schmulling, T. and Vankova, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of experimental botany*, ert131.
- Macovei, V.A., Andersen, S., Banga, D., Ardelean, M., and Torp, A.M. (2007). Genetic mapping of wheat 2BL chromosome using SSR markers. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 64(1-2), 48-53.
- Makbul, S., Güler, N.S., Durmuş, N. ve Güven, S. (2011). Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. *Turkish Journal of Botany*, 35(4), 369-377.
- Marmar, A., Baenziger, S., Dweikat, I. and El Hussein, A.A. (2013). Preliminary screening for water stress tolerance and genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Sudan. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(2), 87-94.
- Mayer, M. and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), 670-684.
- McClung, C.R. and Davis, S.J. (2010). Ambient thermometers in plants: from physiological outputs towards mechanisms of thermal sensing. *Current Biology*, 20(24), R1086-R1092.
- McDonald, A. and Davies, W. (1996). Keeping in Touch: Responses of the Whole Plant to Deficits. *Advances in Botanical Research*, 22, 229.
- Mehmood, Z., Ashiq, M., Noorka, I.R., Ali, A., Tabasum, S. and Iqbal, M.S. (2014). Chemical Control of Monocot Weeds in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *American Journal of Plant Sciences*, 2014.
- Miao, Y., Smykowski, A. and Zentgraf, U. (2008). A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 10(s1), 110-120.
- Miemyk, J. (1997). The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends in plant science*, 2(5), 180-187.
- Mittler, R. and Blumwald, E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology*, 61, 443-462.
- Mittler, R., Finka, A. and Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in biochemical sciences*, 37(3), 118-125.
- Morcuende, R., Bari, R., Gibon, Y., Zheng, W., Pant, B.D., BLÄSING, O., Usadel, B., Szechowski, T., Udvardi, M.K. and Stitt, M. (2007). Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell & Environment*, 30(1), 85-112.

- Möbius, J., Groos, S., Meinhardt, A. and Seitz, J. (1997). Differential distribution of the mitochondrial heat-shock protein 60 in rat gastrointestinal tract. *Cell and tissue research*, 287(2), 343-350.
- Mursalova, J., Akparov, Z., Ojaghi, J., Eldarov, M., Belen, S., Gummadov, N. and Morgounov, A. (2015a). Evaluation of drought tolerance of winter bread wheat genotypes under drip irrigation and rain-fed conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(5), 817-824.
- Nakamura, S., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 26(6), 627-635.
- Nezhadahmadi, A., Prodhan, Z. H. and Faruq, G. (2013). Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Nishizawa, N.K. (2009). Time course analysis of gene regulation under cadmium. *Plant Soil*, 325197, 108.
- Nitta, M. and Nasuda, S. (2008). Amplification profiles of the SSR markers in cultivars of hexaploid wheat and their relatives.
- Ogawa, I., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2009). Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice. *Plant and soil*, 325(1-2), 97-108.
- Ohashi, J. and Tokunaga, K. (2001). The power of genome-wide association studies of complex disease genes: statistical limitations of indirect approaches using SNP markers. *Journal of human genetics*, 46(8), 478-482.
- Okay, S., Derelli, E. and Unver, T. (2014). Transcriptome-wide identification of bread wheat WRKY transcription factors in response to drought stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(5), 765-781.
- Pandey, S.P. and Somssich, I.E. (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiology*, 150(4), 1648-1655.
- Pathak, R.K., Giri, P., Taj, G. and Kumar, A. (2013). Molecular modeling and docking approach to predict the potential interacting partners involved in various biological processes of MAPK with downstream WRKY transcription factor family in Arabidopsis thaliana. *International Journal of Computational Bioinformatics and In Silico Modeling*, 2, 262-268.
- Peng, X.-x., Tang, X.-k., Zhou, P.-l., Hu, Y.-j., Deng, X.-b., Yan, H. and Wang, H.-h. (2011). Isolation and expression patterns of rice WRKY82 transcription factor gene responsive to both biotic and abiotic stresses. *Agricultural Sciences in China*, 10(6), 893-901.
- Petrof, E.O., Ciancio, M.J. and Chang, E.B. (2004). Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chinese journal of digestive diseases*, 5(2), 45-50.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225-238.
- Qi, X. and Lindhout, P. (1997). Development of AFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(3), 330-336.
- Qi, Y., Wang, H., Zou, Y., Liu, C., Liu, Y., Wang, Y. and Zhang, W. (2011). Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS letters*, 585(1), 231-239.
- Qu, A.-L., Ding, Y.-F., Jiang, Q. and Zhu, C. (2013). Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and biophysical research communications*, 432(2), 203-207.

- Quarrie, S., Dodig, D., Pekić, S., Kirby, J. and Kobiljski, B. (2003). Prospects for marker-assisted selection of improved drought responses in wheat. *Bulg. J. Plant Physiol*, 2003, 83-95.
- Queitsch, C., Hong, S.W., Vierling, E. and Lindquist, S. (2000). Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(4), 479-492.
- Ribas-Carbo, M., Taylor, N.L., Giles, L., Busquets, S., Finnegan, P.M., Day, D.A., Lambers, H., Medrana, H., Barry, J. A. and Flexas, J. (2005). Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology*, 139(1), 466-473.
- Ringli, C. and Keller, B. (1998). Specific interaction of the tomato bZIP transcription factor VSF-1 with a non-palindromic DNA sequence that controls vascular gene expression. *Plant molecular biology*, 37(6), 977-988.
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*, 130(3), 1143-1151.
- Rollins, J., Habte, E., Templer, S., Colby, T., Schmidt, J. and Von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany*, 64(11), 3201-3212.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P. and Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15(5), 247-258.
- Sa'idu, H. and Mohammed, S. (2013). Plant Response to Abiotic Stresses: From the Perspectives of Gene Expression. *Research Journal of Biotechnology Vol*, 8(9).
- Saal, B. and Wricke, G. (1999). Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). *Genome*, 42(5), 964.
- Sade, B., Soyulu, S. and Soyulu, E. (2011). Drought and oxidative stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11102-11109.
- Scarpeci, T.E., Zanol, M.I. and Valle, E.M. (2008). Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. *Plant signaling & behavior*, 3(10), 856-857.
- Schmidhuber, J. and Tubiello, F.N. (2007). Global food security under climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19703-19708.
- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S. and Olsen, M. (2014). Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular breeding*, 33(1), 1-14.
- Shagimardanova, E., Gusev, O., Sychev, V., Levinskikh, M., Sharipova, M., Il'inskaya, O. and Sugimoto, M. (2010). Expression of stress response genes in barley *Hordeum vulgare* in a spaceflight environment. *Molecular biology*, 44(5), 734-740.
- Sharma, V. (2009). *Identification Of Drought-Related Quantitative Trait Loci*. Texas A&M University.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58(2), 221-227.
- Singh, K. B., Foley, R.C. and Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Smýkal, P., Horáček, J., Dostálová, R. and Hýbl, M. (2008). Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *Journal of applied genetics*, 49(2), 155-166.

- Song, Q., Shi, J., Singh, S., Fickus, E., Costa, J., Lewis, J., Gill, B. S., Ward, R. and Cregan, P. (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and applied genetics*, 110(3), 550-560.
- Sönmezoğlu, Ö.A., Yıldırım, A., Güleç, T.E. ve Kandemir, N. (2010). Markör Destekli Seleksiyonun Buğday Islahında Kullanımı.
- Stachowicz, J.J. (2001). Mutualism, Facilitation, and the Structure of Ecological Communities Positive interactions play a critical, but underappreciated, role in ecological communities by reducing physical or biotic stresses in existing habitats and by creating new habitats on which many species depend. *Bioscience*, 51(3), 235-246.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gupta, M. (1996). Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31(5), 729-741.
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S. W. and Brisson, N. (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nature biotechnology*, 19(8), 769-772.
- Sulaiman, M. (2013). Plant response to abiotic stresses: from the perspective of gene expression. *Research Journal of Biotechnology Vol*, 8, 9.
- Sun, S.J., Gao, W., Lin, S.Q., Zhu, J., Xie, B.G. and Lin, Z.B. (2006). Analysis of genetic diversity in Ganoderma population with a novel molecular marker SRAP. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(3), 537-543.
- Sun, Z., Wang, Z., Tu, J., Zhang, J., Yu, F., McVetty, P.B. and Li, G. (2007). An ultradense genetic recombination map for Brassica napus, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and applied genetics*, 114(8), 1305-1317.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. and Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43.
- Szegletes, Z., Erdei, L., Tari, I. and Cseuz, L. (2000). Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, 403-410.
- Şahin, M., Aydoğan, S. ve Akçacık, A.G. (2006). Bazı Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Konya Kuru Koşullarında verim ve Kalite Yönüyle Stabilite Yeteneklerinin Belirlenmesi Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü. *Bitkisel Araştırma Dergisi*, 1(3), 17-23.
- Teixeira, E.I., Fischer, G., van Velthuizen, H., Walter, C. and Ewert, F. (2013). Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170, 206-215.
- Terzaghi, W.B., Bertekap, R.L. and Cashmore, A.R. (1997). Intracellular localization of GBF proteins and blue light-induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured Arabidopsis and soybean cells. *The Plant Journal*, 11(5), 967-982.
- Tester, M. and Langridge, P. (2010). Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science*, 327(5967), 818-822.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R. and Graner, A. (2003). Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and applied genetics*, 106(3), 411-422.
- Torres, A., Avila, C., Gutierrez, N., Palomino, C., Moreno, M. and Cubero, J. (2010). Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.). *Field crops research*, 115(3), 243-252.

- Turan, Ö. ve Ekmekçi, Y. (2008). Soğuk Stresinin Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tolerans Mekanizmaları.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F. and Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414.
- Van den Broeck, H. C., de Jong, H. C., Salentijn, E. M., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R. J., Gilissen, L. J. W. J., Van der Meer, I. M. and Smulders, M. J. (2010). Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(8), 1527-1539.
- Verma, V., Foulkes, M., Worland, A., Sylvester-Bradley, R., Caligari, P. and Snape, J. (2004). Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments. *Euphytica*, 135(3), 255-263.
- Vranova, E., Van Breusegem, F., Dat, J., Belles-Boix, E. and Inzé, D. (2002). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant signal transduction*, 38, 45-56.
- Wang, C., Deng, P., Chen, L., Wang, X., Ma, H., Hu, W., Yao, N., feng, Y., Chai, R. and Yang, G.He, G. (2013). A wheat WRKY transcription factor TaWRKY10 confers tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic tobacco. *PLoS One*, 8(6), e65120.
- Wang, H., Hao, J., Chen, X., Hao, Z., Wang, X., Lou, Y., Prag, Y. and Guo, Z. (2007). Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant molecular biology*, 65(6), 799-815.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science*, 9(5), 244-252.
- Weltmeier, F., Rahmani, F., Ehlert, A., Dietrich, K., Schütze, K., Wang, X., Chaban, C., Hamson, J., Teige, M., Harter, K., Vicente-Carbajose, J., Smekeens, S. and Droge-laser, W., (2009). Expression patterns within the Arabidopsis C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant molecular biology*, 69(1-2), 107-119.
- Yadav, S.K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development*, 30(3), 515-527.
- Yakit, S. ve Tuna, A.L. (2006). Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) stres parametreleri üzerine Ca, Mg ve K'nın etkileri. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1), 59-67.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yokoyama, S. (2013). DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends in plant science*, 18(5), 267-276.
- Yan, J., Shah, T., Warburton, M.L., Buckler, E.S., McMullen, M.D. and Crouch, J. (2009). Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS One*, 4(12), e8451.
- Ye, C., Argayoso, M.A., Redoña, E.D., Sierra, S.N., Laza, M.A., Dilla, C.J., Mo, Y., Thomson, M.J., Chin, J., Delaviña, C.B., Diaz, G.Q. and Hernandez, J.E. (2012). Mapping QTL for heat tolerance at flowering stage in rice using SNP markers. *Plant Breeding*, 131(1), 33-41.

- Yer, E.N., Baloglu, M.C., Ziplar, U.T., Ayan, S. and Unver, T. (2016). Drought-Responsive Hsp70 Gene Analysis in Populus at Genome-Wide Level. *Plant molecular biology reporter*, 34(2), 483-500.
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186.
- Zhang, X., Shen, X., Hao, Y., Cai, J., Ohm, H.W. and Kong, L. (2011). A genetic map of *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E, harboring resistance genes to Fusarium head blight and leaf rust. *Theoretical and applied genetics*, 122(2), 263-270.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247.
- Zohary, D., Hopf, M. and Weiss, E. (2012). *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*: Oxford University Press on Demand.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Emine AÇAR
Doğum Yeri :Adana
Doğum Tarihi :24/01/1981
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans: Anadolu Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Maliye Bölümü (2009)

Siirt Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2013)

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
(2016)

Ulusal kongrelerde sunulan sözlü ve poster bildirileri

1) **Emine Açar**, Güray Akdoğan, Tuğba Gürkök, Mine Türktaş, Turgay Ünver. Sıcaklık ve Kuraklık Stresine Dayanıklı Buğday Çeşitlerinin Moleküler Markörler Kullanılarak Belirlenmesi. IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon. (Sözlü)

2) Turgay Ünver, Mine Türktaş, Behçet İnal, Tuğba Gürkök, Esmâ Özhüner, Ebru Derelli Tüfekçi, Yağız Alagöz, Yusuf Pekmezci, Ummügülsüm Zıplar Tanman, Günseli Babaoğlu, **Emine Açar**, Yeliz Özden. Bitki Biyoteknolojisi İçin Genomik ve Transkriptomik Yaklaşımlar. IV. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon. (Sözlü)