

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PAMUKTA YÜKSEK SICAKLIK STRESİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN
FARKLILIK GÖSTERİM YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Ufuk DEMİREL

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2008**

Prof. Dr. M. Atilla GÜR danışmanlığında, Ufuk DEMİREL'in hazırladığı "Pamukta Yüksek Sıcaklık Stresi İle İlişkili Genlerin Farklılık Gösterim Yöntemiyle Belirlenmesi" konulu bu çalışma 24/06/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. M. Atilla GÜR

Üye : Prof. Dr. Ahmet YILMAZ

Üye : Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Üye : Doç. Dr. Yüksel BÖLEK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ersin CAN

Bu Tezin Tarla Bitkileri Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma DPT Tarafından (Proje No:2003KL20590) Desteklenmiştir.
Ayrıca Bu Tez İkinci Danışman **Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON** Tarafından İncelenmiştir.

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	21
3.2. Stres Uygulamaları	22
3.3. Toplam RNA İzolasyonu ve Saflaştırma	23
3.3.1. RNA izolasyon hazırlıkları	23
3.3.2. RNA izolasyonu	24
3.3.3. Toplam RNA örneklerinin DNA'dan arındırılması	25
3.3.4. RNA izolasyonunun doğrulanması	27
3.4. Farklılık Gösterim	28
3.4.1. cDNA sentezi	29
3.4.2. Farklılık gösterim PZR (DD-PCR)	31
3.4.3. cDNA'ların jelde ayrıştırılması	33
3.4.3.1. Poliakrilamid jel kasetinin hazırlanması	33
3.4.3.2. Denatürleyici poliakrilamid jel'in hazırlanması	34
3.4.3.3. Denatürleyici poliakrilamid jel elektroforezi	35
3.4.4. Gümüş boyama	35
3.4.5. Farklılık gösteren bantların belirlenmesi cDNA izolasyonu ve çoğaltılması	37
3.4.5.1. Farklı bantların kesilmesi ve cDNA izolasyonu	37
3.4.5.2. İzole edilen cDNA'ların PZR ile çoğaltılması	38
3.4.5.3. PZR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü	39
3.5. cDNA'ların Klonlanması	40
3.6. Plazmidin Bakteri Hücrelerine Transformasyonu	43
3.6.1. Klonlanma kontrolü	44
3.6.1.1. Koloni parçalama	44
3.6.1.2. Koloni PZR	44
3.6.2. Transforme hücrelerin depolanması	45
3.7. Plazmit DNA İzolasyonu	45
3.8. Baz Dizi Analizi	47
3.9. Homoloji Araştırmaları ve <i>in silico</i> Mikrodizilim Analizi	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	48
4.1. RNA İzolasyonu	48
4.2. Farklılık Gösterim	49
4.3. cDNA'ların Jelden İzolasyonu ve PZR ile Çoğaltılması	50
4.4. cDNA'ların Plazmide Klonlanması ve Hücre Transformasyonu	52
4.5. Plazmit İzolasyonu	53
4.6. Baz Dizi Analizi ve Homoloji Araştırmaları	54
4.7. Gen Homolojisi Gösteren cDNA'lar	60
4.7.1. HSGh21 cDNA'sı	60
4.7.2. HSGh23 cDNA'sı	63
4.7.3. HSGh26 cDNA'sı	66
4.7.4. HSGh36 cDNA'sı	68
4.7.5. HSGh83 cDNA'sı	71
4.7.6. HSGh93 ve HSGh94 cDNA'ları	74
4.7.7. HSGh96 cDNA'sı	78
4.7.8. HSGh97 cDNA'sı	81

4.7.9. HSGh106 cDNA'sı	84
4.7.10. HSGh113 cDNA'sı	86
4.7.11. HSGh127 cDNA'sı	88
4.7.12. HSGh129 cDNA'sı	90
4.7.13. HSGh149 cDNA'sı	91
4.8. Gen Homolojisi Göstermeyen cDNA'lar	94
4.8.1. HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları	94
4.8.2. HSGh30 ve HSGh31 cDNA'ları	95
4.8.3. HSGh100 cDNA'sı	96
4.8.4. HSGh101 cDNA'sı	97
4.8.5. HSGh110 cDNA'sı	98
4.8.6. HSGh126 ve HSGh128 cDNA'ları	98
4.8.7. HSGh150 ve HSGh 151 cDNA'ları	99
4.9. Arabidopsis'te <i>in silico</i> Mikrodizilim (Microarray) Analizi	100
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	107
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	123
EKLER	124
ÖZET	130
SUMMARY	138

ÖZ

Doktora Tezi

PAMUKTA YÜKSEK SICAKLIK STRESİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN FARKLILIK GÖSTERİM YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Ufuk DEMİREL

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Atilla GÜR
Yıl: 2008, Sayfa: 150

Bitkilerin abiyotik strese karşı gösterdikleri tepkinin genetik, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını giderek daha iyi anlamamız, abiyotik stres koşullarına daha iyi uyum sağlayacak bitkiler geliştirmemizi kolaylaştıracaktır. Pamuğun sıcaklık stresine karşı moleküler düzeydeki tepkisiyle ilişkili sınırlı bilgi nedeni ile bu çalışmada, orta ve yüksek sıcaklık stresi koşullarında pamukta sıcaklıkla ilişkili bir kısım genleri tespit etmek ve anlatım düzeyleri hakkında fikir sahibi olmak amaçlanmıştır. Bugüne kadar stresle ilişkili olduğu tespit edilen genlerin çoğu, moleküler genetikte model bitki olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana*'da bulunmuştur. Fakat önemli bir tarım bitkisi olan pamuğun, sıcaklık stresi koşullarında moleküler düzeyde gen anlatımının nasıl düzenlendiği hakkında yetersiz bilgi bulunmaktadır. Bu çalışma, sıcaklık stresi koşullarında pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) farklı anlatım yapan bir kısım genlerin belirlenmesi ve belirlenen genlerin sıcaklık stresi koşullarında anlatımlarının kısmen anlaşılması amacıyla yürütülmüştür. Bu amaç doğrultusunda pamuklar iklim kontrollü bitki yetiştirme dolabında ortalama 28 °C sıcaklık ve 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık döngüde yetiştirilmiştir. 77 günlük pamuklara 38 °C ve 45 °C sıcaklık stresi uygulanmış ve *farklılık gösterim* tekniği kullanarak stres uygulanan bitkiler, kontrol bitkileri ile mRNA transkripsiyonu düzeyinde karşılaştırılmıştır. *Farklılık gösterim* tekniği aracılığıyla, sıcaklık stresi koşullarında anlatımları değiştiği belirlenen cDNA'lar izole edilmiş ve klonlanmıştır. Klonlanan cDNA'ların 13 tanesi doğrudan veya dolaylı olarak 14 gen ile homoloji oluşturmuş, 8 tanesi ise bilinen herhangi bir gen ile önemli benzerlik göstermemiştir. Bu bulgular ışığında, pamuktan izole edilen ve gen homolojisi göstermeyen 8 cDNA'nın yeni gen adayları oldukları söylenebilir. Sıcaklık stresi koşullarında izole edilen ve gen homolojisi gösteren 13 cDNA'dan 9 tanesinin anlatımı artmış, 1 tanesi azalmış, 1 tanesi baskılanmış, 2 tanesi ise 38 °C'de artarken, 45 °C'de baskılanmıştır. Yeni gen adayı olan 8 cDNA'nın 7 tanesinin transkripsiyonu, sıcaklık stresi ile şu şekilde değişmiştir; 4 tanesi artmış, 2 tanesi azalmış, 1 tanesi ise 38 °C'de artarken, 45 °C'de baskılanmıştır. 8 yeni gen adayı içerisinde yer alan 1 cDNA'nın, iki izoformu (HSGh 29 ve HSGh32) izole edilmiştir. İzofomlardan HSGh29'un anlatımı sıcaklık stresi ile azalırken, HSGh32'nin ise 38 °C'de artmış, 45 °C'de azalmıştır.

ANAHTAR KELİMELER : Pamuk, Sıcaklık Stresi, *Farklılık Gösterim*.

ABSTRACT

PhD Thesis

DETERMINATION OF HEAT STRESS RELATED GENES IN COTTON BY DIFFERENTIAL DISPLAY TECHNIQUE

Ufuk DEMİREL

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet Atilla GÜR
Year: 2008, Page: 150

Understanding plant response to different abiotic stresses such as heat, drought, cold and salinity at genetic, physiological and biochemical levels will make easier to improve more tolerant plants to abiotic stress conditions. At molecular level, most of the information for heat stress response was obtained from *Arabidopsis thaliana*, a model plant. But, little molecular research has focused on cotton about heat stress response. Our knowledge is insufficient on heat stress response of cotton at molecular level. This investigation was carried out to determine heat stress related genes and changing gene expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), which is one of the most economical cash crops in Turkey and World. For this purpose, cottons were grown at 28 °C mean temperature and 14/10 hours light/dark period in plant growth chamber until 77 days after emergence. A 77 days old plants were exposed to moderate (38 °C) and high (45 °C) heat stresses. Heat stressed cottons were compared to control cottons at mRNA expression level through differential display technique. cDNAs determined expression changes at heat stress were isolated and cloned. As a result of homology search, the thirteen of cDNAs isolated from cotton showed direct or indirect similarity to fourteen known genes, but it was not observed any similarity between 8 cDNAs and known genes. According to these results, a 8 cDNAs that isolated from cotton and no shown homology might be possibly new genes. A 9 of the 13 cDNA were up-regulated, a 1 of the 13 cDNA was down-regulated and other a 1 cDNA was suppressed by heat stress, and the other 2 were up-regulated by 38 °C, while suppressed by 45 °C heat stress. Transcriptions of 6 cDNAs of 8 cDNAs that may be possibly new genes were changed such that a 4 cDNAs were up-regulated, a 2 cDNAs were down-regulated by heat stress, but a 1 cDNA was up-regulated by 38 °C while, suppressed by 45 °C. It was isolated two isoforms (HSGh29 and HSGh32) of 1 cDNA involved in 8 possible new genes. Expression of HSGh29 was down regulated by heat stress. HSGh32 was up-regulated by 38 °C and down-regulated by 45 °C.

KEY WORDS : Cotton, Heat Stress, *Differential Display*

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren, akademik olarak geldiğim konuma ulaşmamda büyük katkıları olan danışmanım ve HR. Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Başkanı Prof. Dr. M. Atilla GÜR'e;

Tez çalışmamın planlama ve uygulama sürecinde bilimsel katkılar sağlayan, bilgiye ve kaynaklara ulaşmamda teşvik edici, yol gösterici, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsünde Baş Uzman Araştırmacı olan ikinci danışmanım Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON'a;

Doktora tezimi yürüttüğüm Tarla Bitkileri Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarının kurulmasında maddi desteği sağlayan T.C. Devlet Planlama Teşkilatı kurumuna;

Tez çalışmamın çeşitli aşamalarında bilimsel ve manevi destekleri dolayısıyla Dr. Birsen CEVHER KESKİN, Dr. Bayram YÜKSEL, Dr. Mehmet KARAKUŞ, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Latif TEK ve Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN'a;

Şu anki konumuma ulaşmamda sonsuz emekleri olan, kayıtsız şartsız destekleriyle beni güçlendiren ve bilimsel ahlakımın temellerini atan annem Nilgün DEMİREL ve babam Mikail DEMİREL'e;

Her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, karşılıksız desteği ile yılmıy düştüğüm, ümidimin zayıfladığı anlarda beni güçlendiren, tezimin yazımında bilimsel katkıları olan, yaşamımızı birleştirmemizden mutluluk ve onur duyduğum eşim Dr. Sevgi DEMİREL'e;

Varlığı ile benim gelecek umudumu arttıran, sevgisiyle yaşam kaynağım kızım Nilsu DEMİREL'e sevgilerimi, saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. <i>Farklılık gösterim</i> yönteminin şematik gösterimi	28
Şekil 3.2. PCR TRAP klonlama vektörünün kısmi haritası.....	42
Şekil 3.3. PCR TRAP klonlama sisteminin çalışma mekanizması.....	42
Şekil 4.1. Toplam RNA agaroz jel analizi.....	48
Şekil 4.2. cDNA'ların agaroz jel analizi ile kontrolü	49
Şekil 4.3. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü	51
Şekil 4.4. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü	51
Şekil 4.5. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü	51
Şekil 4.6. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü	51
Şekil 4.7. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü	51
Şekil 4.8. Koloni PZR agaroz jel analizi	52
Şekil 4.9. Koloni PZR agaroz jel analizi	52
Şekil 4.10. Koloni PZR agaroz jel analizi	52
Şekil 4.11. Koloni PZR agaroz jel analizi	53
Şekil 4.12. Koloni PZR agaroz jel analizi	53
Şekil 4.13. Plazmit izolasyonu agaroz jel analizi	53
Şekil 4.14. Plazmit izolasyonu agaroz jel analizi	54
Şekil 4.15. Plazmit izolasyonu agaroz jel analizi	54
Şekil 4.16. HSGh21'in <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	60
Şekil 4.17. HSGh23'ün <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	63
Şekil 4.18. HSGh26'nın <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	66
Şekil 4.19. Tiamin biyosentezi	68
Şekil 4.20. HSGh36'nın <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	69
Şekil 4.21. Çinko parmak motifinin yapısı.....	69
Şekil 4.22. HSGh83'ün <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	72
Şekil 4.23. <i>Gossypium hirsutum</i> kloroplast genomu ve psaA/psaB/rps14 operonu	73
Şekil 4.24. HSGh93, 94, 96 ve 97'nin <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	75
Şekil 4.25. GS-X pompasının işlevinin şematik gösterimi.....	77
Şekil 4.26. HSGh106, 110, 113'ün <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	84
Şekil 4.27. KAS işlevinin şematik gösterimi.....	87
Şekil 4.28. HSGh126, 127, 128 ve 129'un <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	89
Şekil 4.29. Tetrahidrofolat poliglutam (H ₄ PteGlu _n) sentezi	89
Şekil 4.30. HSGh149, 150 ve 151'in <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	92
Şekil 4.31. Sitokrom c redüktaz kompleksi ve 7.8 kDa proteini (altünite 6).....	93
Şekil 4.32. HSGh29 ve 30'un <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	95
Şekil 4.33. HSGh31 ve 32'nin <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	95
Şekil 4.34. HSGh100 ve 101'in <i>farklılık gösterim</i> jel görüntüsü	97
Şekil 4.35. <i>in silico</i> mikrodizilim analiz sonucu	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri	36
Çizelge 4.1. cDNA kümeleme sonuçları	55
Çizelge 4.2. Pamukta sıcaklık stresi uygulamalarından elde edilen cDNA'ların homoloji araştırmaları özeti	57
Çizelge 4.3. Abiyotik stres koşullarında log ₂ tabanında genlerin değişen sinyal oranları	102

SİMGELER DİZİNİ

μ l	Mikro litre
μ g	Mikro gram
μ M	Mikro molar
∞	Sonsuz
AgNO ₃	Gümüş nitrat
APS	Amonyumpersülfat
cDNA	Tamamlayıcı DNA
cm	Santimetre
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
DD-PZR	<i>Farklılık gösterim</i> polimeraz zincir reaksiyonu
DEPC	Dietilpyrokarbonat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dH ₂ O	Damıtık su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
DTT	Ditiyotritol
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
EDTA	Etilen dinitrilo tetra asetik asit (disodyum tuz dihidrat)
EST	Anlatım olmuş dizi parçası
EtBr	Etidyum bromid
EtOH	Etanol
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KCl	Potasyum klorür
M	Molar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	milimetre
MOPS	3-[N-Morfolino] propan sülfonik asit
MPa	Mega paskal
NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	devir/dakika
rRNA	Ribozomal RNA
sn	Saniye
TBE	Tris Borat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetra metil etilen diamin
u	Ünite
upH ₂ O	Ultra saf su
UV	Mor ötesi
V	Volt

1. GİRİŞ

Pamuk, *Gossypium* cinsine ait bir bitki olup, yaklaşık 50 farklı tür içermektedir. Dünyada dört pamuk türünün (*Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. ve *G. herbaceum* L.) tarımı yapılmaktadır. *G. hirsutum* L. ve *G. barbadense* L., allotetraploid yapıdadırlar ve $2n=4x=52$ kromozoma sahiptirler. *G. arboreum* L. ve *G. herbaceum* L. ise diploid yapıda olup, $2n=2x=26$ kromozomludur. Dölleyici böceklerin yokluğunda pamuk çiçekleri kendine döllenebilir, *Bombus* sp. gibi dölleyicilerin varlığında ise önemli düzeyde (% 50-80'e kadar) yabancı döllenebilir meydana gelmektedir. Tarımı yapılan bu dört tür içerisinde, dünya genelinde en yaygın yetiştirilen tür *G. hirsutum*'dur. *G. hirsutum* yüksek lif verimi için yetiştirilirken, *G. barbadense* ise üstün lif uzunluğu, lif mukavemeti ve lif inceliği gibi kalite özellikleri için yetiştirilmektedir (Smith ve Cothren, 1999).

Beslenme ve giyinme insanın temel ihtiyaçlarındandır ve pamuk, bu iki temel ihtiyaca hizmet edecek hammaddeleri insanlığa sunmaktadır. Pamuk, birincil olarak insanların giyinmesi için gerekli hammadde olan lifin karşılandığı bir bitki olup, bunun yanında tohumlarından elde edilen yağ insan beslenmesinde kullanılmakta, küspesi ise hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir. Pamuk, ekonomik olarak dünyadaki en önemli lif bitkisi ve önemli ihracat ürünlerinden biridir. 2006 yılı verilerine göre, Dünyada 35 021 143 ha alanda pamuk ekimi yapılmakta ve 24 836 695 ton lif üretilmektedir. Türkiye, pamuk lifi üretimi bakımından dünyada önemli bir konuma sahiptir ve en çok pamuk lifi üreten 8. ülke konumundadır. Türkiye, 546 880 ha pamuk ekim alanına sahip olup, 900 bin ton lif üretimi yapmaktadır (Anonymous, 2008a). Türkiye'de pamuk üretiminin % 52'si Güneydoğu Anadolu bölgesinde, bu oranın % 62.22'si ise Şanlıurfa ilinde gerçekleştirilmektedir (Özüdoğru, 2006). Böylece, Türkiye'deki pamuk üretiminin % 33.6'sını, Şanlıurfa ili tek başına karşılamaktadır. 2005 yılı ithalat - ihracat verilerine göre Türkiye, 908 200

\$ değerinde, 775 510 ton pamuk lifi ithal etmiş ve 52 827 \$ değerinde 38 660 ton, pamuk lifi ihraç etmiştir (Anonymous, 2008a).

Dünyada artan insan nüfusuna paralel olarak lif üretiminde de artışa ihtiyaç duyulmaktadır. Lif üretiminin artırılması uygun ekim alanlarının artırılması, birim alanda ürün veriminin artırılması veya her ikisinin birlikte uygulanması ile mümkündür. Günümüzde kentleşme, sanayileşme v.b. sorunlar sebebiyle tarım alanlarını arttırmak mümkün görünmemektedir. Bitkisel üretimin artırılması ancak, birim alanda ürün veriminin artırılmasıyla etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Pamuk lif veriminin artırılması, bitki başına olgun koza sayısının ve koza başına lif miktarının yükseltilmesine bağlıdır. Pamuk strese en dayanıklı bitkilerden birisi olmasına rağmen, optimumun dışındaki çevre koşulları lif ve tohum verimi ile kalitesini olumsuz etkilemektedir. Çevresel stres faktörleri, pamukta tarak ve elma dökülmeleri ile fotosentetik üretimin azalmasına neden olmakta böylece tohum ve lif verimini azaltmaktadır. Çoğu durumda bir bitkinin üretkenliği doğrudan fotosentez oranı ile ilişkilendirilmektedir. Fotosentez, diğer fizyolojik olaylar gibi sıcaklığa bağlıdır. Her bitki türü için en yüksek düzeyde CO₂ tutmayı sağlayan optimum sıcaklık seviyesi vardır (Georgieva, 1999). Pamukta fotosentez için optimum yaprak sıcaklığı 28 °C'dir (Salvucci ve Crafts-Brandner, 2004), başka bir araştırmaya göre pamuk bitkisinin gelişimi için optimum sıcaklık 27–29 °C'dir (Reddy ve ark., 2004).

Yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, kuraklık, topraktaki yüksek tuz düzeyi ve yüksek ışık yoğunluğu gibi çevre faktörleri bitki gelişimini, sonuç olarak verimi olumsuz yönde etkilemektedir. Hatta meydana gelen aşırı (ekstrem) çevre faktörleri bitki türlerine göre ölüme dahi neden olmaktadır. Optimumun altında veya üstündeki cansız çevre faktörlerinin bitkiler üzerine yaptıkları olumsuz etkilere abiyotik stres denilmektedir. Bitkiler hareketsiz organizmalar olmaları nedeniyle sürekli olarak abiyotik stres koşullarına maruz kalmaktadırlar. Abiyotik stres faktörlerinden biri olan sıcaklık, birçok tarım bitkisinin üretimini sınırlayan temel çevre faktörlerinden biridir. Yüksek sıcaklık hücrede protein denatürasyonuna neden olmakta, zar akışkanlığını değiştirmekte, metabolik işlemlerin tüm dengesini bozabilmekte ve bitkide oksidatif strese yol açmaktadır (Hong ve ark., 2003). Sıcaklık stresi

fotosenteze, hücre ve organel zarlarının lipit bileşimine, hücredeki protein içeriğine ve antioksidan enzimler üzerine zararlı etkide bulunmaktadır (Georgieva, 1999). Özellikle kloroplastlarda fotosentezin ışık reaksiyonunun gerçekleştiği tilakoid zarlar sıcaklığa daha hassastır. Bu nedenle tilakoid zara yerleşmiş olan fotosistemler yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenmektedirler. Sıcaklık stresinde fotosistem 2 (PS II)'nin işlevleri, fotosistem 1 (PS I)'in işlevlerinden daha fazla engellenmektedir (Bukhov ve ark., 1999). Yüksek sıcaklık nedeniyle lipit yapısındaki değişim lipit-protein etkileşimini kararsız hale getirmekte ve PS II'nin organizasyonu ile işlevini bozmaktadır. Zarın hasar görmesi, bitkinin sıcaklık stresini algılamada ve cevap mekanizmasının başlatılmasındaki ilk olaydır. Sıcaklığın tilakoid zar bileşenlerinin kararlılığına etkisi, fotosentezin geri dönüşümsüz engellenmesi bakımından birincil etkiye sahiptir. Yüksek sıcaklık nedeniyle fotofosforilasyon işlemi de engellenmektedir. Bu durum karbon özümlemesi için gerekli ATP miktarında azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca PS II'de oluşan hasar direk olarak CO₂ tutma aşamasında kullanılan NADPH'ın miktarında azalmaya neden olmaktadır. Pamuk bitkilerinde yüksek sıcaklık nedeniyle net karbon özümlemesini azaltan bir diğer biyokimyasal olay fotorespirasyondur. CO₂ ve O₂ difüzyonu ve Rubilaz bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) enziminin karboksilasyon etkinliği sıcaklıktan etkilenmektedir (Georgieva, 1999). Sıcaklık stromadaki CO₂ ve O₂ konsantrasyonunun kontrolünde büyük bir rol oynamaktadır (Krieg, 1983). Sıcak koşullarda O₂ konsantrasyonundaki artış nedeniyle Rubisco'nun oksijenaz aktivitesi artmaktadır. Diğer bir deyişle pamukta 35 °C'lik yaprak sıcaklığından sonra, özellikle 40 °C'den itibaren Rubisco'nun CO₂ yerine O₂ tutma kapasitesi artmakta ve bunun sonucunda net fotosentez azalmaktadır.

Sıcaklık optimum sıcaklığın biraz üzerine çıktığında (orta sıcaklık stresinde), fotosentez engellenmesi geri dönüşümlü iken yüksek sıcaklık stresi koşullarında fotosentetik aygıtlarda oluşan hasar kalıcı olmaktadır (Berry ve Björkman, 1980). Sıcaklık optimumun üzerine çıktığında net fotosentez hızla azalmaya başlamaktadır. Yüksek sıcaklıklarda fotosentetik elektron aktarım reaksiyonu engellenmektedir. Su yetersizliği koşullarında stomalar kapandığından, yaprak sıcaklığı hava sıcaklığının üzerine çıkmaktadır.

Sıcaklık stresinin, bitki gelişimi ve bitkinin hayatta kalması üzerine etkisi sıcaklık stresinin yoğunluğuna ve süresine bağlıdır (Georgieva 1999; Sung ve ark., 2003). Uzun süreli orta sıcaklık stresi, kısa süreli yüksek sıcaklık stresi kadar zararlı olabilmektedir (Georgieva, 1999).

Bitkiler ışık, sıcaklık, kuraklık gibi çevresel stres faktörlerinden kaçamamaları ve daha iyi toprak koşullarına taşınamamaları nedeniyle, maruz kaldıkları bu koşullara uyum sağlamak zorundadırlar. Bitkilerin maruz kaldığı yüksek sıcaklık stresi, hücresel düzeyde zarara ve hücre ölümlerine neden olurken, ölümcül düzeyde olmayan sıcaklık stresi ise hücresel seviyede sıcak-şoku tepkisini uyarmaktadır. Sıcak-şoku tepkisi; a) hücreleri şiddetli zarardan korumakta, b) normal hücresel ve fizyolojik aktivitelerin devam etmesini sağlamakta, c) bitkileri daha yüksek düzeyde sıcaklık toleransına ulaştırmaktadır (Schöffl ve ark., 1998). Moleküler düzeyde sıcak-şoku tepkisi, sıcak-şoku proteinlerinin (HSP'ler) sentezlenmesiyle hücresel aktivitelerin geçici olarak yeniden düzenlenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. En iyi karakterize edilmiş yüksek sıcaklık tepkilerinden birisi, HSP'lerin uyarılmasıdır. Sıcaklık stresi koşullarında hücreleri korumak için yeterli miktarda HSP'ler üretilmekte ve bu proteinler bitkiye daha yüksek düzeyde sıcaklık toleransı sağlamaktadırlar. Bilinen temel sıcaklık stresi protein grupları; HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 ve küçük HSP'lerdir (Schöffl ve ark., 1998; Georgieva, 1999; Gurley, 2000; Waters, 2003). Farklı HSP'ler değişik işlevlere sahip olabildikleri gibi hepsinin ortak özelliği, diğer proteinlerin katlanmalarına yardımcı olmaları ve geri dönüşümü olmayan çökelti (agregasyon) oluşturmalarını engellemeleridir. Hsp genleri, sıcak şoku transkripsiyon faktörünün (HSF) kontrolü altında anlatım yapmaktadırlar. HSF, Hsp genine ait promotör bölgesinde yer alan sıcak şoku elementine (HSE) bağlanarak, Hsp genini aktif hale geçirmekte ve bunun sonucunda HSP sentezi başlamaktadır (Schöffl ve ark., 1998; Sun ve ark., 2002). Sıcak şoku transkripsiyon faktörleri (HSF), bitkilerde HSP'lerin strese bağımlı ve gelişim dönemlerine bağımlı anlatımlarında merkezi bir role sahiptir. Bitkilerde hayvanlardan daha fazla çeşitte HSF bulunmaktadır ve bunun nedeni bilinmemektedir. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde DNA dizi seviyesinde 20 den fazla Hsf geni tanımlanmıştır (Panchuk ve ark., 2002).

Sıcaklık şoku, bitkilerde geçici olarak hücrelerin kalsiyum seviyesinde artışa neden olmaktadır (Gong ve ark., 1998). Kalmodilin (CaM) proteini, kalsiyum aracılığıyla yapılan sinyal iletiminde önemli bir ara moleküldür (Liu ve ark., 2003). Mısır fidelerinde sıcak şoku vasıtasıyla kalmodilin proteinin sentez düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir (Gong ve ark., 1997).

Yüksek sıcaklığın bitkilerde oksidatif stresi uyardığı daha önce belirtilmiştir. Oksidatif stres, süperoksit radikalleri (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH) gibi toksik oksijen türlerinin ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi radikal türevinin hücre içerisinde üretimi ve birikimi sonucunda meydana gelmektedir. Bu toksik oksijen türlerine, aktif oksijen türleri (AOS veya ROS) denilmektedir (Breusegem ve ark., 2001). Bitki kloroplastlarında yer alan PS I ve PS II’de süperoksit (O_2^-) radikalleri üretilmektedir. H_2O_2 ya kendiliğinden oluşabilmekte ya da (O_2^-)’nin katalizlenmesi sonucunda oluşmaktadır. Normal koşullarda aktif oksijen türlerinin zararı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları sayesinde en az düzeyde tutulmaktadır (Payton ve ark., 2001). Antioksidanlar oksidatif hasarı önlemede kritik bir rol oynamaktadırlar ve çevre stresinden önemli ölçüde etkilenmektedirler (Georgieva, 1999). Stres koşullarında AOS’nin üretiminin artması, hücrel bileşiklerde oksidatif hasara sebep olmaktadır (Panchuk ve ark., 2002). Üretilen AOS lipitleri, proteinleri, karbonhidratları ve nükleik asitleri kapsayan birçok hücrel bileşeni oksidasyona uğratarak hasar verebilmektedir. Oksidatif stres fotosentez ve solunum işlemlerinin engellenmesine yol açabilmekte ve böylece bitkinin gelişimini engelleyebilmektedir.

Bitkiler, AOS hasarını engellemek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir (Vranova ve ark., 2002a). Enzimatik sistemlerde süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit (O_2^-) radikalini H_2O_2 ve O_2 ’ye dönüştürmektedir (Breusegem ve ark., 2001). Askorbat peroksidaz (APX) bitkilerin en önemli antioksidanlarından birisidir. APX askorbatı kullanarak H_2O_2 ’yi monodihidroaskorbat (MDHA) ve H_2O ’ya dönüştürerek, H_2O_2 ’nin toksik etkisini ortadan kaldırmaktadır (Payton ve ark., 2001, Panchuk ve ark., 2002). Aynı zamanda glutatyon redüktaz (GR) da indirgenmiş askorbatın kloroplastlardaki yüksek seviyesini korumak için H_2O_2 ’yi askorbat glutatyon döngüsünden uzaklaştırmaktadır

(Jiang ve Huang, 2001). Gossett ve ark. (1994), tuza toleranslı pamuk çeşitlerinin tuz stresi koşullarında yetiştirildiğinde tuza hassas çeşitlere göre daha yüksek düzeyde katalaz, APX ve GR bulunduğunu ortaya koymuşlardır. AOS'nin düzeyi ve türü bitkilerin tepki tipini belirlemektedir. H_2O_2 ve O_2^- farklı genleri uyarabilmektedir. AOS birikimi hücrelerde sadece negatif etkiye neden olmazlar, buna ilave olarak stres sinyal iletiminde de yer almaktadırlar (Vranova ve ark., 2002a). Düşük konsantrasyonlarda AOS, savunma genlerini ve çevre koşullarına uyum tepkisini uyarmaktadır (Vranova ve ark., 2002a). Öldürücü olmayan düzeydeki AOS, bitkilerin biyotik ve abiyotik stres koşullarına alışabilmelerini sağlayabilmekte, fakat bu arada bitki gelişimini azaltmaktadırlar. Yüksek konsantrasyondaki AOS ise genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümlerine (apoptozis) neden olmaktadır (Breusegem ve ark., 2001).

Bitkiler yüksek sıcaklığa hızlı şekilde alışmamakta, alışmak için belirli bir zamana ihtiyaç duymaktadırlar. Stres koşullarında bitkiler ilk olarak kararsızlaşmakta, daha sonra normalleşmekte ve tolerans sınırı aşılmazsa bitkilerin stres koşullarındaki kararlılıkları artmaktadır. Bitkilerin yüksek sıcaklığa dayanma yeteneği, yaprak sıcaklığını azaltmak için terlemenin artırılması, fotoengellemenin (fotoinhibisyon) ve serbest radikal hasarından kaçınmak için fotosentetik sistemin değişikliğe uğratılması ve sıcak-şoku proteinlerinin sentezlenmesi şeklinde gelişmiştir. Kloroplastta, sıcaklıktaki orta düzey değişikliği algılayan bir uyum mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizma PS II'nin sıcaklığa hassasiyet halinin, sıcaklığa dirençli hale dönüştürülmesini sağlar. Sıcaklığa bu şekildeki kısa süreli uyumun moleküler temeli bilinmemektedir (Georgieva, 1999).

Pamuk bitkisinin gelişimi için optimum sıcaklık 27–29 °C (Reddy ve ark., 2004) olmakla beraber, pamuk genellikle dünyanın sıcak ve yarı kurak bölgelerinin bir bitkisi olarak ele alınmaktadır. Pamuk yaz döneminde sıcaklıkların 48–50°C ye ulaştığı alanlarda yetiştirilmekte, fakat haziran, temmuz ve ağustos aylarındaki yüksek sıcaklıklar, bitkilerin vejetatif gelişimini ve elma oluşumunu olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Ashraf ve ark., 1994; Rahman ve ark., 2004). Günlük en yüksek sıcaklıkta meydana gelen her 1 °C'lik artışla, lif verimi 11 kg/da azalmaktadır. Sonuç olarak yüksek sıcaklık ile lif verimi arasında güçlü ve negatif bir

ilişki olduğu kanıtlanmıştır (Singh ve ark., 2007). Pamukta özellikle 40 °C'den itibaren Rubisco'nun CO₂ yerine O₂ tutma kapasitesi artmakta ve bu fotorespirasyon sonucunda, net fotosentez önemli ölçüde azalmaktadır. En nihayetinde tohum ve lif verimi azalmaktadır.

Bitkiler abiyotik strese maruz kaldıklarında, stres koşullarına uyum sağlamak amacıyla tepki olarak bazı genlerin anlatımlarında değişimler meydana gelmektedir (Seki ve ark., 2001; Singh ve ark., 2002.). Stres koşullarında anlatımı değişen genler a) sadece stres koşullarında anlatım yapanlar, b) anlatımı artanlar, c) anlatımı azalanlar, d) anlatımı duranlar şeklinde dört grupta toplanmaktadır. Özellikle sadece stres koşullarında anlatım yapan ve streste anlatımı artan genlerin, stres tepki mekanizmasının stres toleransını artırma, gen anlatımının düzenlenmesi ile sinyal iletimi kısımlarında işlevlerinin olduğu düşünülmektedir (Yamaguchi-Shinozaki ve ark., 2002). *Farklılık gösterim* tekniği, stresle ilişkili genlerin bulunmasında iyi bir araçtır (Bohnert ve ark., 1995). *Farklılık gösterim* tekniği, farklı koşullarda yetişen aynı organizmanın anlatımında değişim olan genlerinin tespit edilmesi ve belirli koşullarda yetişmiş bir organizmanın değişik dokularında farklı anlatım gösteren genlerinin bulunması için kullanılmaktadır (Liang ve Pardee, 1992).

Farklı koşullarda yetişen aynı genotipteki iki bitkinin gen anlatımında değişiklikler meydana gelmektedir. Örneğin, sıcaklık stresi koşullarında yetiştirilen bitkiler, sıcaklığın olumsuz etkilerini gidermek için gen anlatımlarında değişiklikler oluşturmaktadırlar. Böylece bitki sıcaklık stresine karşı savunma mekanizması geliştirmiş olmaktadır. Stres koşullarında yetişen bir bitkide bu savunma mekanizmalarının ortaya çıkması; stres altındaki bitkide, normal koşullarda yetişen bitkideki anlatım yapan genlerden ayrı genlerin anlatım yapmaya başlamasından veya normal koşullarda anlatım yapan genlerin, anlatım düzeyinde değişiklik meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Gen anlatımı, transkripsiyon ve translasyon olmak üzere iki aşamalı işlem vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Transkripsiyon aşamasında, sentezlendiği genin baz dizisine özgü olan tek iplikçikli bir RNA üretilmektedir. Translasyonda ise mRNA'nın nükleotid dizisi protein sentezi için amino asit dizisine dönüştürülmektedir. mRNA, protein kodlayan DNA dizisinin kopyasını taşıması nedeniyle gen anlatımında merkezi bir role sahiptir.

Farklılık gösterim tekniği, gen anlatımında meydana gelen değişikliklere dayanan bir yöntemdir. Bu teknik, gen anlatımının transkripsiyon aşamasını temel alarak geliştirilmiştir. Normal koşullardaki bitkilerle kıyas edildiğinde, stres koşullarındaki bitkilerin gen anlatımında bir farklılık oluştuğunda ilk olarak, üretilen mRNA'nın miktarında değişim olmaktadır. *Farklılık gösterim* tekniği aracılığıyla abiyotik stres koşullarında farklı miktarda üretilen mRNA'lar, dolayısıyla ilişkili genler belirlenebilmektedir.

Küresel ısınma nedeniyle yakın gelecekte tarımın ciddi şekilde olumsuz etkileneceğinden bahsedilmektedir. Eğer tarımsal uygulamalar bugünkü uygulamalara benzer şekilde kalırsa, belirtilen sıcaklık stresinin de etkisiyle tarımsal üretimde önemli düşüşler yaşanabilir. Sıcak bölgelerde erken ekim veya uygun çeşit seçimi gibi kültürel uygulamalarda yapılacak değişiklikler, pamuk üreticilerinin yaz döneminde meydana gelecek yüksek sıcaklıklardan kaçmalarına imkan sağlayabilir (Reddy ve ark., 1995). Sıcak bölgelere uygun çeşitlerin geliştirilebilmesi için pamuğun yüksek sıcaklıklara uyum yeteneğinin artırılması gerekmektedir. Pamuğun yüksek sıcaklıklara uyumunun artırılabilmesi için öncelikle yüksek sıcaklık koşullarında bitkide meydana gelen değişimler bilinmelidir. Günlük yüksek sıcaklığın ürün verimini etkileyen çeşitli fizyolojik işlevler üzerine olan zararlı etkisi karmaşıktır. Bu karmaşık etki, sorunu sistematik bir biçimde çözmek ve sıcaklık stresine toleransı artırmak için fizyolojik ve genetik yaklaşımları birleştirme ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

Bitkilerin sıcaklığa uyumunun artırılması ile ilgili yaklaşımlar ve çalışmalar yeni olup (Iba, 2002), küresel ısınma tehdidinin fark edilmesiyle başlamıştır. Bitkilerin abiyotik strese karşı gösterdikleri tepkinin genetik, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını giderek daha iyi anlamamız, abiyotik stres koşullarına daha iyi uyum sağlayacak bitkiler geliştirmemizi kolaylaştıracaktır. Bitkilerin stres koşullarında oluşturdukları biyokimyasal yolların bilinmesi kadar, bu yollarda görev alan enzimlerin ve diğer metabolitlerin ilişkili olduğu genlerin anlatım düzeyleri hakkında bilgi sahibi olmak da önem arz etmektedir. Bugüne kadar stresle ilişkili olduğu tespit edilen genlerin çoğu, moleküler genetikte model bitki olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana*'da bulunmuştur. Fakat önemli bir tarım bitkisi olan pamuğun,

sıcaklık stresi koşullarında moleküler düzeyde gen anlatımının nasıl düzenlendiği hakkında az bilgi bulunmaktadır.

Pamuğun sıcaklık stresine karşı moleküler düzeydeki tepkisiyle ilişkili bilgi azlığı nedeni ile bu çalışmada, orta ve yüksek sıcaklık stresi koşullarında pamukta sıcaklıkla ilişkili bir kısım genleri tespit etmek ve anlatım düzeylerini belirlemek amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Spadoro-Tank ve Etzler (1988), *Dolichos biflorus* bitkisinin hücre kültürüne uygulanan yüksek sıcaklık sonucu, DB57 lektin proteinin sentezinde artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir.

Somerville ve Browse (1991), yüksek sıcaklık stresi koşullarında yetiştirilen *Arabidopsis* bitkilerinde, zarlardaki toplam lipid içeriğinin yarıya düştüğünü, doymuş yağ asidi oranının arttığını, doymamış yağ asidi oranının ise düştüğünü bildirmişlerdir.

Raikhel ve Lee (1993), yetersiz su koşullarında buğday bitkisinin köklerinde, hem ABA hem de lektin içeriğinde artış meydana geldiğini ve dışarıdan ABA uygulaması ile buğday lektin miktarının 2–3 saat içerisinde en üst düzeye ulaştığını ortaya koymuşlardır.

Luan ve ark. (1994), sıcaklık stresi uygulanan bakla bitkilerinde, siklofilinin kloroplast formu olan pCyP B geninin transkripsiyonunda yüksek artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Margis-Pinheiro ve ark. (1994), fasulye’de sıcaklık stresi ile sınıf IV kitinaz genin anlatımının arttığını ve 4. saatte ise anlatım düzeyinin en üst seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir.

Joshi ve Nguyen (1996), 12 üyesi olan bir sıcak şoku proteini (HSP16.9) gen ailesinin 3’ şifrelenmeyen bölgesinden, ilgili gene özgü problemler belirlemek için *farklılık gösterim* tekniğini kullanmışlardır. Araştırmacılar buğday bitkisini bitki materyali olarak seçmişlerdir. Bu çalışmada 16 adet cDNA parçasının nükleotid dizisini tespit etmişler ve 12 üyeli bir gen ailesinin 8 farklı üyesini ortaya koymuşlardır.

Shakirova ve ark., (1996) 40 °C sıcaklık koşullarında buğday hücre kültüründeki hücrelerde ABA miktarının 7 kat, lektin miktarının ise 10 kat arttığını belirlemişlerdir.

Joshi ve ark. (1997), Moleküler ve klasik genetik yöntemleri bir arada kullanarak sıcaklık stresinin buğday bitkileri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bitki materyali olarak sıcaklığa toleranslı Mustang çeşidini, sıcaklığa hassas Sturdy çeşidini ve bu çeşitlerin melezlenmesinden elde edilen hatları kullanmışlardır. Araştırma sonucunda, plastid HSP26 gen ailesine ait iki adet cDNA dizisi belirlemişlerdir. HSP26'nın bir izoformu, denemeye alınan tüm sıcaklığa toleranslı hatlarda ve Mustang çeşidinde sentezlenmiş fakat denemeye alınan tüm sıcaklığa hassas hatlarda ve Sturdy çeşidinde sentezlenmemiştir. Belirlenen ikinci cDNA'da, anlatım bakımından HSP26'nın birinci izoformuna benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Araştırmacılar bu araştırma sonucunda ayrıca, kazanılmış sıcaklık tolerans karakteri ile HSP26 gen ailesinin özgün üyesinin anlatımı arasında genetik bir bağlantı olduğunu bildirmişlerdir.

Song ve Allen (1997) pamukta lif gelişimi sırasında anlatım yapan genlerin, *farklılık gösterim* yöntemiyle belirlenmesi ve izolasyonu üzerine bir araştırma yapmışlardır. Materyal olarak pamuğun olgunlaşmamış lifleri ile lifleri uzaklaştırılmış ovullerini kullanarak, ilgili hücrelerdeki gen anlatımını karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar pamuk lifine özgü 8 adet cDNA izole etmişlerdir. Bu cDNA'lardan bir tanesi, açıl taşıyıcı proteinle (ACP) yüksek düzeyde dizi benzerliği göstermiştir. Araştırmacılar, pamuk lifine özgü olan ACP'nin zar lipidlerinin sentezinde payı olması nedeniyle, pamuk lifinin hızlı uzamasında önemli bir rolü olabileceğini tahmin etmektedirler.

Titarenko ve ark. (1997), *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, yaranma stresi sonucu belirledikleri ve JR3 olarak adlandırdıkları bir cDNA klonu izole etmişlerdir. Araştırmacılar, yaranma stresi, jasmonik asit (JA) ve ABA uygulamaları sonucunda, *Arabidopsis* yaprak dokularında JR3 cDNA klonunun anlatımının arttığını gözlemlemişlerdir.

Visioli ve ark. (1997), *Arabidopsis thaliana*'da sıcaklık toleransının uyarılmasını ve gen anlatımını belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada, *farklılık gösterim* yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmanın sonucunda, düşük moleküler ağırlığa sahip mitokondriyal sıcak-şoku proteinini (LMW HSP) şifreleyen yeni bir genomik klon (*Athsp23.5*) belirlemişlerdir. Hücredeki AtHSP23.5 seviyesinin uygulamalara göre önemli düzeyde değiştiğini bildirmişlerdir. *Arabidopsis thaliana* bitkileri 22 °C'den 37 °C'ye aktarıldıklarında, artan sıcaklıkla beraber *Athsp23.5* geninin anlatımında da artış olduğunu, fakat bitkiler 22 °C'den 45 °C'ye aktararak ani sıcaklık şoku uygulandığında, bu genin anlatım düzeyinin düşük kaldığını belirtmişlerdir.

Zholkevich ve ark. (1997), sıcak şoku ve kuraklığın ardı sıra uygulanması ile pamuk bitkilerinin uyumunu araştırmışlardır. Toprak nem kapasitesi % 70'den % 20'ye düştüğünde yaprak hücre özsuyu ozmotik basıncı nerdeyse iki katına çıktığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ozmotik basıncın artmasını sağlayan bileşiklerin aminoasitler ve amidler olduğu belirlenmiştir. En fazla artış gösterenlerin arjinin, prolin ve asparagin olduğu bulunmuştur.

Jagtap ve ark. (1998) su, sıcaklık ve ışık stresinin, kuraklık toleransı bakımından değişiklik gösteren 5 farklı *Sorghum bicolor* (L.) Monech varyetesinin fotosentetik reaksiyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Her üç stres bileşeninin de PS II'nin fotokimyasal etkinliğini azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca E 36-1 varyetesinin PEPkaz aktivitesi, Rubisco içeriği ve PSII'nin fotosentez etkinliğinin diğer varyetelere göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Davies ve ark. (1999) yaptıkları homoloji analizi sonucunda, Titarenko ve ark., (1997) tarafından izole edilen JR3 cDNA'sı ile IAR3 geninin nükleotid dizileri bakımından % 96 benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Law ve Crafts-Brander (1999), pamukta ve buğdayda sıcaklık stresi ile fotosentez arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, artan sıcaklıklarda CO₂ tutma oranı bakımından pamuğun buğdaydan daha toleranslı olduğunu ortaya koymuşlardır. 35 °C'nin üzerindeki yaprak sıcaklığında pamuğun

CO₂ tutma oranının engellendiğini, buğday için ise bu sıcaklığın 30 °C olduğunu belirtmişlerdir. Kontrol (28 °C) pamuk bitkilerinde CO₂ tutma oranının 100 birim iken sıcaklığın dakikada 1 °C artmasıyla yaprak sıcaklığının 42.5 °C'ye ulaşması sonucunda pamukta CO₂ tutma oranının 50 birim civarına, yaprak sıcaklığının 45 °C'ye ulaşması sonucunda ise 20 birime düştüğünü saptamışlardır. Sıcaklığın dakikada 2.5 °C artmasıyla yaprak sıcaklığının 45 °C'ye ulaşması durumunda ise pamukta CO₂ tutma oranı 0 birime yaklaşmıştır. Araştırmacılar bu sonuçların, Rubisco aktivaz enziminin işlevinin engellenmesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Saito ve ark. (1999), siklofilin genlerinin stres koşullarında tetiklendiğinin belirlenmiş olmasına rağmen fizyolojik işlevleri bilinmediğini belirtmişlerdir. *Arabidopsis*'te ATCYP1 (siklofilin) genin transkripsiyonunun yapraklarda çok zayıf sinyal oluşturduğunu, çiçek ve kökte ise güçlü sinyal oluşturduğunu, ATCYP2 (siklofilin) geninin ise sadece çiçekte nispeten güçlü sinyal oluşturduğunu bildirmişlerdir. *Arabidopsis*'e uyguladıkları bazı stres etmenleri sonucunda, ATCYP1 ve ATCYP2'nin mRNA seviyelerinde değişiklikler belirlenmiş ancak, uygulanan stres etmenleriyle bu genlerde önemli bir tetiklenme belirlenmemiştir.

Tullberg ve ark. (2000), PSI tarafından emilen 650 nm dalga boyu ışıkta yetiştirdikleri bezelye bitkisinde, psaB geninin transkripsiyonunun kontrole göre % 45 azaldığını, PII tarafından emilen 560 nm dalga boyunda yetiştirilen bezelyede ise psaB genin transkripsiyonu kontrole göre % 119 arttığını belirlemişlerdir. Ayrıca, psaB gen transkripsiyonunun değişen çevre koşullarına hızlı biçimde tepki verdiğini bildirmişlerdir.

Jain ve ark. (2001), *farklılık gösterim* yöntemini kullanarak yerfıstığında su stresi ile ilişkili genleri tanımlamak için yaptıkları çalışmada, 21 adet primer kombinasyonu kullanmışlar ve bunun sonucunda toplam 43 adet kuraklıkla ilişkili transkript belirlemişlerdir. Araştırmacılar su stresi uygulamasından sonra yerfıstığında bazı mRNA'ların sentezinde artış, bazı mRNA'ların sentezinde ise azalış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Law ve ark. (2001), kontrol ve sıcak stresi koşullarında pamuk yapraklarında Rubisco aktivaz mRNA ve proteininin sentezini ölçmüşlerdir. Çalışma sonucunda aktivaz transkript miktarının ve 47 kDa ile 43 kDa yapısal aktivaz polipeptitlerinin seviyelerinin sıcaklık stresinden etkilenmediğini gözlemlemişlerdir.

Pavoncello ve ark. (2001) hasat sonrası greyfurt meyvelerine 62 °C sıcak su püskürtülmesi sonucunda, kitinaz proteini sentezinde artış olduğunu ve ek olarak yeşil küf (*Penicillium digitatum*)'e direncin arttığını ortaya koymuşlardır. Greyfurt meyvesinde yapılan bu çalışmada, sentezi artan kitinaz proteinin hangi sınıfta yer aldığı bilinmemektedir.

Gong ve ark. (2002a), *Arabidopsis thaliana*'da CIPK9 geninin, kök haricinde hemen hemen tüm dokularda anlatım yaptığını ve ABA uygulamasıyla anlatımında büyük ölçüde artış olduğunu, buna karşın NaCl ile kuraklık stresinde CIPK9 geninin anlatımında artışın az olduğunu tespit etmişlerdir.

Gong ve ark. (2002b) CIPK8 geninin, CIPK9'dan farklı olarak kökte anlatım yaptığını ve transkripsiyon düzeyinin, uygulanan stres etmenlerinden etkilenmediğini belirlemişlerdir.

Hong ve Hwang (2002) ABA, NaCl ve kuraklık uygulamaları ile biberde yaprak ve özellikle sap dokularında sınıf II kitinaz geninin anlatımının fazla miktarda arttığını tespit etmişlerdir.

Rizhsky ve ark. (2002), sıcaklık stresi ile kuraklık stresinin bir arada bütün bitkisinin gen anlatımı üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda tek başına kuraklık stresinin fotosentez ve solunumu azalttığını, buna karşın sıcaklık stresinin solunumu artırdığını gözlemlemişlerdir. Kuraklık ile sıcaklığın bir arada olan etkisi, fotosentezin baskılanması bakımından tek başına kuraklık stresine benzer, solunumun artması bakımından ise sıcaklık stresine benzer etkiyi göstermiştir. Kuraklık stresi ile sıcaklık stresinin bir arada uygulandığı bitkilerde, sıcak-şoku proteinlerinin tek başına kuraklık stresi uygulanmış bitkilerdeki veya tek

başına sıcaklık stresi uygulanmış bitkilerdeki sıcak-şoku proteinlerinin miktarından daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Sıcaklık stresi sırasında stoplazmik APX ve thioiredoksin peroksidazın baskın olduğu, kurak stresi sırasında özellikle katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX)'in uyarıldığı, sıcak stresi ile kurak stresi kombinasyonunda ise alternatif oksidaz (AOX), GPX, glutatyon redüktaz (GR), CuZn-SOD ve glutatyon-S-transferazın uyarıldığı sonuçlarını ortaya koymuşlardır.

Savchenko ve ark. (2002), Hücre zarlarının bütünlüğü ve işlevinin yüksek sıcaklığa karşı hassasiyet gösterdiğini, stres koşullarında bitki hücre zarlarının işlevlerini devam ettirebilmesinin, fotosentez ve solunum işlemleri için çok önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara ilave olarak, sıcaklık stresinin moleküllerinin zardan geçişini hızlandığını, böylece zardaki moleküllerin kimyasal bağlarını gevşettiğini iletmişlerdir. Sonuç olarak, sıcaklık stresinin zardaki proteinlerin denatürasyonuna ve doymamış yağ asitlerinin artmasına, böylece zarların çift katmanlı lipid yapısının daha akışkan olmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Shindo ve Sasakuma (2002) *farklılık gösterim* tekniği ile ekmeklik buğdayda, genotipe özgü olan vernalizasyonla ilişkili gen anlatımını araştırmışlardır. Bitki materyali olarak bir yazlık, bir de kışlık ekmeklik buğday hattı kullanmışlardır. Değişik gelişim dönemlerindeki farklı süreli vernalizasyon uygulamalarından sonra, *farklılık gösterim* tekniğinden yararlanarak 110 cDNA parçası izole etmişlerdir. 7 tane genin vernalizasyonla ilişkili olarak anlatım yaptığını ve bu genlerin genotipe özgü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaptıkları istatistiksel analiz sonucunda, çalışılan iki buğday hattında 4 genin de başaklanma faktörüyle önemli ölçüde ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Ueda ve ark. (2002), *farklılık gösterim* yöntemiyle arpada tuza tolerans mekanizması ile ilişkili genleri belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, tuzlulukla ilişkili 218 cDNA klonu belirlemişlerdir. 218 cDNA'nın dizi analizi yapılmış ve bunların 133'ünün bilinen proteinlerle homoloji gösterdiğini ortaya koymuşlardır. 24 adet tuzlulukla ilişkili cDNA klonunun, sinyal iletiminde görev alan genler olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca stresle ilişkili glutatyon redüktaz,

trehaloz 6-fosfat sentetaz ve sıcak şoku proteinlerini şifreleyen genleri belirlemişlerdir.

Hong ve ark. (2003), sıcaklık tolerans yoksunluğu gösteren *Arabidopsis hot2* mutanları üzerine yaptıkları araştırma sonucunda, bu mutantın sıcaklık toleransı yoksunluğu göstermesine rağmen, sıcaklık stresi koşullarında küçük sıcak şok proteinleri (sHSPs) ve sıcak şok proteini 101 (HSP101) seviyelerinin normal düzeyde olduğu tespit etmişlerdir.

Kim ve ark. (2003) soğuk, NaCl stresi, ABA uygulaması, kuraklık ve yaralanma ile *Arabidopsis*'te CIPK3 geninin transkripsiyonunun arttığını ve hem ABA hem de stresle tetiklenen kalsiyum sinyali ile hücredeki gen anlatımı arasında moleküler bir köprü olarak görev aldığını ortaya koymuşlardır.

Park ve ark. (2003), acı biberde kuraklıkla uyarılan genleri *farklılık gösterim* yöntemiyle izole etmek ve karakterize etmek amacıyla bir araştırma yürütmüşlerdir. Su stresi uyguladıkları acı biberlerden *farklılık gösterim* yöntemiyle 7 adet cDNA izole etmişlerdir. Araştırmacılar özellikle *Ca-LEAL1* geninin yapısal özelliğini ve anlatım modelini detaylı olarak incelemişlerdir. Yaptıkları dizi homolojisi sonucunda, *Ca-LEAL1*'in geç embriyogenezis proteinlerine benzer olduğunu fakat değişik ve yeni bir gen ailesinden olduğunu ortaya koymuşlardır. *Ca-LEAL1*'in anlatım analizi sonuçları, bu genin kurak koşullarda yüksek düzeyde aktif olduğunu doğrulamış ayrıca *Ca-LEAL1* geninin tuzluluk ve mekanik zararlanmaya karşı da anlatım yaptığı sonucuna ulaşmışlardır.

Batistic ve Kulda (2004) CBL proteininin, hücrede Ca^{+2} değişikliğini algıladığını ve bu sinyalleri, fosforilasyon şelaleleri ve gen anlatımının düzenlenmesi gibi alt basamaktaki cevaplara ilettiğini bildirmişlerdir. Bu özellikleri sebebiyle CBL proteininin, Ca^{+2} algılayıcı iletişim aracı olarak sınıflandırıldığını iletmışlerdir.

Crafts-Brander ve Salvucci (2004), yüksek sıcaklık ve CO_2 'in pamuk bitkisinde net fotosentez üzerine etkisini analiz etmişlerdir. Pamuk bitkilerine 37 °C

ve 40 °C olmak üzere iki sıcaklık stresi uygulamışlardır. Uygulanan her iki sıcaklığın yapraklarda ve dallarda kuru madde birikimini azalttığını fakat kök gelişiminin sadece 40 °C sıcaklıkta engellendiğini bildirmişlerdir. 32 °C'nin üzerindeki yaprak sıcaklıklarında, pamuk yapraklarındaki net fotosentez azalmış ve bu azalma Rubisco'nun aktivasyon durumundaki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamasından 3 saat sonra Rubisco'nun küçük alt ünitesini sentezleyen geninin transkripsiyonunda azalma meydana gelmiştir.

Larkindale ve Huang (2004), bataklık tavus otu (*Agrostis stolonifera*) bitkisinde sıcaklık stresi ile doymuş yağ asidi oranında artış meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Umezawa ve ark. (2004), *Arabidopsis thaliana*'da ozmotik stresle SnRK2.8 (CIPK) geninin aktive olduğunu ve bu genin kuraklık toleransını arttırdığını bildirmişlerdir.

Agarwal ve Grover (2005), köklerine yetersiz oksijen stresi uyguladıkları çeltik bitkisinde, tetrahidrofolat sentaz ile homoloji gösteren SA-DSL-85 klonunun ekspresyonunun çok önemli düzeyde azaldığını tespit etmişlerdir.

Ribeiro ve ark. (2005) ışık koşullarında ve tuz stresi, aşırı su stresi ve bitkilerin şekersiz suni ortamda bulunması gibi abiyotik stres koşullarında, tiamin geninin anlatımının arttığını belirlemişlerdir.

Zhang ve ark. (2005), sıcağa toleranslı ve sıcağa hassas iki *Festuca* genotipinde baskılayıcı eksiltici melezleme (suppression subtractive hybridization) yöntemi kullanarak, yüksek sıcaklığa cevapta rol alan gen transkriptleri klonlamışlardır. Bitkilerin bulunduğu büyütme kabinindeki sıcaklık 24 °C'den 44 °C'ye 2 haftalık sürede kademeli olarak yükseltilmiştir. Toplam 2495 EST oluşturulmuş, bunların 1800 tanesinin kendi içinde nükleotid benzerliği oluşturduğunu, bu 1800 EST'nin bir birine benzerlik gösteren 434 cDNA parçası olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca kendi içinde nükleotid benzerliği göstermeyen 656 EST'nin olduğunu ve bunların her

birinin birbirinden ayrı EST'ler olduğunu tespit etmişlerdir. Seçtikleri 17 gen transkriptinin anlatım analizlerini RT-PCR kullanarak yapmışlardır. Bu genlerin en az 11 tanesinde meydana gelen gen anlatım farklılığının sıcaklık stresine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Lee ve ark. (2006b), U5 snRNP ile ilişkili olduğu belirlenen *sta1* geninin, soğuk stresinde transkripsiyonun arttığını ve *Arabidopsis thaliana*'nın soğuk stresine toleransta bu gene ihtiyaç duyduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, *sta1* mutasyonunun öldürücü olması nedeniyle, STA1'in işlevinin *Arabidopsis* için zaruri olduğunu belirtmişlerdir.

Sakuma ve ark. (2006), yüksek düzeyde DREB2A CA transkripsiyon faktörü anlatımı yapan transgenik *Arabidopsis*'e mikrodizilim (microarray) analizi yapmışlar ve sonuç olarak, anlatımı artan DREB2A CA'nın sadece kuraklık ve tuz cevap genlerini tetiklemediğini, bununla birlikte sıcak şoku ile ilişkili genleri de tetiklediğini belirlemişlerdir. Ayrıca sıcak şoku stresi ile DREB2A'nın kısa süreli olarak tetiklendiğini ve sıcak şoku stresi uygulanmış hücrelerin çekirdeklerinde sGFP-DREB2A proteinin biriktiğini bulmuşlardır. Araştırmadan elde edilen genel sonuçlar doğrultusunda DREB2A'nın hem su hem de sıcak şoku stresine tepkide işlevsel olduğunu belirtmişlerdir.

Schuller ve Ludwig-Müller (2006), kök hastalık etmeni olan *Plasmodiophora brassicae* ile bulaştırılan *Brassica rapa* bitkilerinde, IAR3 geninin ortoloğu Br – IAR'ın transkripsiyonunun düştüğünü tespit etmişlerdir.

Sotirios ve ark. (2006), Pamuk bitkisinden (*G. hirsutum* L.) HSPCB (Heat-shock protein calmodulin binding) karakteri ile ilgili geni, kromozom-yürüme tekniğini kullanarak izole ederek karakterize etmişlerdir. HSPCBcDNA'sının 1374 baz çifti uzunluğunda tek bir ORF içerdiğini ve bu genin 5 ekzonunun olduğunu belirlemişlerdir. Bu genin Lipaz/HSPCB ile benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Gen anlatım analizleri sonucunda, bu gen çalıştıkları tüm bitki dokularında anlatım gerçekleştirmiştir.

Volkov ve ark. (2006), sıcaklık stresi ve sıcak şoku faktörü bağımlı genlerin anlatımında oksidatif stres ve özellikle H₂O₂'ye ihtiyaç duyulup duyulmadığının anlaşılması üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Orta sıcaklık stresi (38 °C) veya oda sıcaklığında H₂O₂, bütül peroksit ve diamid uygulamaları sonucunda sıcak şoku protein genlerinin ve iki askorbat peroksidaz geninin mRNA seviyelerinin benzer düzeye ulaştığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları denemeler sonucunda H₂O₂'nin, sıcak stresi sinyal iletiminde çok önemli bir bileşen olduğunu ortaya koymuşlardır ve oksidatif stresin sıcak şoku faktörünü aktif hale getirerek gen anlatımını etkilediği belirtmişlerdir.

Cheong ve ark. (2007), Kalsinörin B-benzeri (calcineurin B-like: CBL) protein ailesinin, birçok biyotik ve abiyotik stres etkenini ile bitki hücrelerinde Ca⁺² konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri algılayıcı proteinler içerisinde yer aldığını, bununla birlikte CBL proteininin, Ca⁺²'ye bağımlı farklı işlemlerde kritik işleve sahip olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca CIPK'nin, bitkilerin birçok strese cevabına aracılık eden CBL proteini ile etkileşime girdiğini bildirmişlerdir.

Kwon ve ark., (2007) Arabidopsis *hot2* mutantının sıcaklık toleransı yoksunluğuna sahip olduğunu, bunun yanında tuz ve kuraklık streslerine de direncinin zayıf olduğunu belirlemişlerdir. *hot2* lokusundaki genin, kitinaz 19 ailesinin üyeleri ile yüksek homoloji gösteren bir proteini kodladığı bulunmuştur. Aynı çalışmada, belirlenen kitinaz proteinin (ATCTL1) orta sıcaklık stresi (38 °C) koşullarında anlatımının değişmediği ve kitinaz proteinin, yapısal özelliği sebebiyle sınıf II alt ailesine sınıflandırılabilirdiği bildirilmiştir.

Bezrukova ve ark., (2008) dışarıdan uyguladıkları buğday lektin proteinin, tuz stresi koşullarında buğday fidelerinde oluşan oksidatif stres düzeyini azalttığını bulmuşlardır.

Liu ve ark. (2008), Arabidopsis *thaliana* Ku geninin (AtKu) sıcaklık stresi koşullarında nasıl düzenlendiğini belirlemek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. RT-QPCR, GUS ve western emdirme analizleri sonucunda 3 haftalık genç bitki

fidelerinde sıcaklık stresiyle AtKu gen anlatımının azaldığını belirlemişlerdir. Sıcaklık stresi ile baskılanan AtKu'nun etilen sinyali, DNA tamir mekanizması ve yağ asidi sentezinde yer aldığını bildirmişlerdir. 4-5 haftalık bitkilerde saptanmış, rozet yapraklarda ve gerçek yapraklarda sıcaklık stresi ile AtKu gen anlatımı baskılanırken, köklerde artış veya azalış yönünde her hangi bir değişimin olmadığını gözlemlemişlerdir.

Simoës-Araujo ve ark. (2008), börülce bitkisinin nodüllerinde sıcaklık stresine cevapta yer alan genleri belirlemek amacıyla cDNA-AFLP'den oluşturulmuş problemlerle bir cDNA kütüphanesini taramışlardır. Araştırma sonucunda bir tanesi küçük sıcak şoku proteini (VuHSP17.7) ile bir diğeri ise Nodulin 26 (VuNIP1) ile ilişkili iki adet tam uzunlukta cDNA izole etmiş ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. VuHSP17.7'nin yüksek sıcaklık stresi ile nodülde, yapraklarda, çiçekte ve çiçek tomurcuğunda anlatımının yüksek düzeyde tetiklendiğini ve VUNIP1'in sıcaklık stresinden sonra nodülde baskılandığını tespit etmişlerdir.

Xu ve ark. (2008), iki *Agrostis* (*A. scabara*, *A. stolonifera*) türünde gövde ve kökte sıcaklık toleransı ile ilgili farklı anlatım yapan genleri mukayese etmek ve sıcaklık stresinde anlatımı artan genleri belirlemek amacıyla farklılık gösterim yöntemini kullanmışlardır. Yaprak örnekleri ile yapılan farklılık gösterim analizi sonucunda, *A. stolonifera*'da sıcaklık stresi ile 21 gen parçasının anlatımının azaldığını 18 gen parçasının anlatımının ise arttığını tespit etmişlerdir. *A. scabara* türünde ise 38 gen parçasının anlatımı azalmış, 22 gen parçasının anlatımı ise artmıştır. Sıcaklık stresi koşullarında 4 gen parçasının kökte anlatımının arttığı belirlenmiştir. RT-PCR analizi sonucunda yapraktaki bir gen parçasının (AsL9) ve kökteki iki gen parçasının (AsR1 ve AsR2) yalnızca sıcaklığa toleranslı *A. scabara* türünde anlatım yaptığını belirlemişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Denemede bitki materyali olarak, Stoneville 453 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşidi kullanılmıştır. Stoneville 453 çeşidi, erkenci ve adaptasyon yeteneği çok iyi olan bir çeşittir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi için tescil edilmiş olan Stoneville 453, orta uzunlukta olup, bitki şekli konik yapıdadır. Yaprakları orta büyüklükte, derin yırtmaçlı, orta tüylü ve palmiye şeklindedir. Kozaları orta büyüklükte ve ovaldır (Harem, 2007). Stoneville 453, Şanlıurfa ilinde en yaygın yetiştirilen pamuk çeşididir ve Şanlıurfa koşullarında, 393.25 – 450.25 kg/da kütlü verimine, 71.15 – 90.00 cm bitki boyuna, % 36.93 – % 40.24 çırçır randımanına ve 29.00 – 30.75 mm lif uzunluğuna sahiptir (Gür ve ark., 2000).

Pamuk bitkileri sıcaklık, ışık ve nem kontrollü bitki yetiştirme dolabında (DigiTech DP16C) yetiştirilmiştir. Stoneville-453 çeşidine ait tohumların ekimi, hacimsel olarak 2:1 oranında tarla toprağı ve torf karışımı içeren 3 litrelik saksılara yapılmıştır. Bitki büyütme dolabının aydınlatma döngüsü; 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olarak ayarlanmıştır (Crafts-Brandner ve Salvucci, 2004). Işık kaynağı olarak, bitkilere özel kırmızı ve mavi ışık oranı artırılmış flüoresans lambalar (OSRAM flora) kullanılmış ve bitkiler 350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sn}$ ışık yoğunluğunda yetiştirilmiştir. Bitki büyütme dolabının günlük ortalama sıcaklığı yaklaşık 28 °C olmak üzere, aydınlık evrede 32 °C, karanlık evrede ise 22 °C olarak ayarlanmıştır (Reddy ve ark., 2004; Salvucci ve Crafts-Brandner, 2004). Kabindeki nem oranı sürekli % 60 düzeyinde tutulmuştur. Bitkilere çıkıştan itibaren hasada kadar, haftada iki defa ve her uygulamada 250 ml % 50 seyreltilmiş Hoagland besin çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1950) verilmiştir. Çıkıştan 5 hafta sonra ortalama sıcaklık (≈ 28 °C) değişmeyecek biçimde, gece gündüz sıcaklık farkı azaltılmış ve aydınlatma döngüsü değiştirilmiştir. Ortam koşulları, 14 saat aydınlık evrede 30 °C ve 10 saat karanlık evrede 26 °C şeklinde

düzenlenmiştir. Bitkiler sıcaklık stresi uygulama dönemine kadar bu koşullarda yetiştirilmiştir. Çıkiştan 77 gün (yaklaşık 2.5 ay) sonra bitkilere 38 °C ve 45 °C sıcaklık stresi uygulanmış ve genç yaprak hasadı yapılmıştır. Kontrol bitkileri ise strese maruz bırakılmamış ve 30 °C’de hasat yapılmıştır. Sıcaklık stresi uygulamaları ve hasat aydınlık evrede yapılmıştır. Hasat edilen yapraklar, zaman kaybetmeden hızlı bir biçimde sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Sıvı azotta dondurulan yaprak örnekleri, sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla derin dondurucuda (- 85 °C) muhafaza edilmiştir. Bitkilerin maruz bırakıldıkları sıcaklık koşulları “Stres Uygulamaları” başlığı altında ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

3.2. Stres Uygulamaları

Kontrol bitkileri: Kontrol olarak kullanılan pamuk bitkilerine sıcaklık stresi uygulanmamıştır. Kontrol bitkilerden yaprak hasadı, aydınlık evrede ve 30 °C’de yapılmıştır.

Orta sıcaklık stresi: Bu uygulamada, bitkiler 2 saat 38 °C sıcaklığa maruz bırakılmışlardır. Sıcaklık stresi uygulaması, kademeli olarak yapılmıştır. Bitkiler normal koşullarda yetişirken, ortam sıcaklığı 30 °C’den 38 °C’ye yükseltilmiş ve ortam sıcaklığı 38 °C ye 45 dakikada ulaşmıştır. Bu uygulama ile doğal ortam koşullarına benzer şekilde kademeli sıcaklık artışı sağlanmıştır. Bitkilere 38 °C’de 2 saat sıcaklık stresi uygulanmasının ardından, genç yaprakların hasadı yapılmıştır.

Yüksek sıcaklık stresi: Bu uygulamada bitkiler, 45 °C’de 2 saat sıcaklık stresine maruz bırakılmışlardır. Ancak bitkiler 30 °C’den 45 °C’ye doğrudan konulmamış, doğada olduğu gibi kademeli sıcaklık artışı sağlanmış ayrıca, bitkiler sıcaklığa alıştırmıştır. Sıcaklık artışı iki kademede gerçekleştirilmiştir. Birinci kademede, ortam sıcaklığı 30 °C’den 38 °C’ye yükseltilmiş ve ortam sıcaklığı 45 dakikada 38 °C ye ulaşmıştır. Pamuk bitkileri 38 °C’de 2 saat bekletilerek sıcaklığa alıştırmışlardır. Bitkilerin sıcaklığa alıştırılmasının ardından, ikinci kademede ortam sıcaklığı 38 °C’den 45 °C’ye yükseltilmiş ve ortam sıcaklığı 45

°C ye 50 dk'da ulaşmıştır. Ortam sıcaklığı 45 °C'ye ulaştığında, bitkiler 2 saat bu sıcaklığa maruz bırakılmış ve ardından genç yaprakların hasadı yapılmıştır.

3.3. Toplam RNA İzolasyonu ve Saflaştırma

Kontrol ve stres (38 °C ve 45 °C) uygulanmış bitkilerden ayrı ayrı RNA izolasyonları yapılmıştır. İzolasyon, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA çalışmalarında ön koşul, RNA'nın yapısını korumuş biçimde parçalanmadan izole edilmesidir. RNA parçalanmasına sebep olan en büyük etken ribonükleaz (RNaz) bulaşmasıdır. Çok az miktarda RNaz bulaşması dahi sağlam RNA izolasyonunu engellemektedir. RNA izolasyonu aşamasında ortama RNaz bulaşmasını önlemek için denemede kullanılan bütün plastik ve cam malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler, RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC muamelesine ilave olarak malzemeler, 121 °C ve 0.1 MPa basınçta 15 dakika otoklavlandıktan sonra 105 °C'de en az gece boyu bekletilmiştir. Havan ve havan kolları ise 300 °C'de gece boyu bekletilmiştir. RNA izolasyonu RNaz bulaşmasını engellemek için steril kabin içerisinde yapılmıştır.

3.3.1. RNA izolasyon hazırlıkları

DEPC-dH₂O hazırlanması: Ultra saf suya % 0.1 oranında DEPC ilave edilmiş ve DEPC tam çözünene kadar karıştırılmıştır. DEPC uygulanmış su, 37 °C'de gece boyu bekletilmiş ve ardından otoklavlanarak steril edilmiştir.

RNA eldesinde kullanılacak çözeltilerin kullanıma hazırlanması: RNA eldesinde kullanılacak olan tüm çözeltiler, % 0.1 (v/v) DEPC içeren dH₂O ile hazırlanmış ve otoklav yapılarak steril edilmiştir.

Pipet uçlarının kullanıma hazırlanması: Pipet uçları % 0.1'lik (v/v) DEPC çözeltisi içerisinde 37 °C'de gece boyu bekletilmiştir. Ardından pipet uçları 20 dakika otoklavlanmış ve 105 °C'de 16 saat bekletilerek kurutulmuştur.

Porselen havan ile havan kolunun kullanıma hazırlanması: Havan ve havan kolu, alüminyum kağıt ile sarılmış ve 300 °C'de en az gece boyu bekletilmiştir.

RNA elektroforezinde kullanılacak tankların hazırlanması: Elektroforez tankları deterjanlı su ile yıkandıktan sonra destile su ile durulanmıştır. Tankların içine % 3'lük (w/v) H₂O₂ çözeltisi doldurulmuş ve oda sıcaklığında en az 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, tanklar % 0.1'lik (v/v) DEPC'li destile su ile durulanmıştır.

3.3.2. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak, kit kitapçığı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Anonymous, 2001). RNA izolasyonun tüm aşamaları oda sıcaklığında yapılmıştır. Yöntem temel olarak; a) doku parçalama ve homejenizasyon, b) toplam RNA'yı kolona tutturma, c) RNA haricindeki maddelerin kolondan yıkanması ve d) RNA'nın DEPC-H₂O ile kolondan toplanması aşamalarından oluşmaktadır. Uygulanan RNA izolasyon protokolünün aşamaları aşağıda maddeler halinde verilmiştir. RNA izolasyonuna başlanmadan önce guanidin izotiosiyanat içeren RLT tamponuna, 1 ml tamponda 10µl olacak şekilde merkaptotanol ilave edilmiştir.

RNA izolasyon protokol aşamaları:

- 1) —80 °C'de saklanan bitki yaprak örneğinden yaklaşık 100 mg alınmış, porselen havan ve havan kolu kullanılarak sıvı azot içerisinde yaprak örnekleri toz haline gelene kadar öğütülmüştür. Öğütülmüş yaprak, 50 ml'lik RNaz DNaz ari steril plastik tüp içerisine aktarılmıştır.
- 2) Öğütülmüş yaprak üzerine, hücrelerin parçalanması için 450 µl RLT tamponu eklenmiştir. Karışım yüksek frekansta vortekste karıştırılmıştır.
- 3) Karışım QIAshredder kolonuna aktarılmış ve 13 000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak homojenize edilmiştir. RNA içeren üst sıvı faz,

dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Çökelti fazdaki hücre artıklarının alınmamasına dikkat edilmiştir.

- 4) Homojen karışıma % 50 hacminde (225 µl) saf etanol ilave edilmiş ve pipetle karıştırılmıştır.
- 5) Etanol içeren karışım (650 µl) RNeasy mini spin kolona aktarılmıştır. 13 000 rpm'de 15 sn santrifüj yapılarak RNA kolona tutturulmuştur. Alt tüpe geçen sıvı atılmıştır.
- 6) Kolona 700 µl RW1 yıkama tamponu ilave edilerek 13 000 rpm'de 15 sn santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpüne geçen sıvı ve toplama tüpü atılmıştır.
- 7) RNeasy mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve kolona 500 µl RPE yıkama tamponu eklenmiştir. 13 000 rpm'de 15 sn santrifüj yapılmış ve alt tüpe geçen sıvı atılmıştır.
- 8) Kolona ikinci kez 500 µl RPE yıkama tamponu eklenmiş ve 13 000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak kolondan etanol uzaklaştırılmıştır.
- 9) Kolonda kalması muhtemel etanolu uzaklaştırılmak için kolon yeni bir tüpe aktarılmış ve kolona hiçbir şey eklemeyen 13 000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- 10) Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kolona 35 µl DEPC-dH₂O eklenmiş ve 13 000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak kolona bağlı halde bulunan RNA'nın çözülerek tüpe geçmesi sağlanmıştır.
- 11) İkinci 35 µl DEPC'li su ile aynı işlem tekrar edilmiş ve toplam 70 µl RNA içeren çözelti elde edilmiştir.

3.3.3. Toplam RNA örneklerinin DNA'dan arındırılması

Farklılık gösterim tekniğinin başarısı, RNA'nın güvenilirliğine ve DNA'dan arı olmasına bağlıdır. Bu nedenle, izole edilen toplam RNA örnekleri DNaz I enzimi (GenHunter) ile muamele edilerek, olması muhtemel DNA'dan arındırılmıştır. RNA örneklerinin DNA'dan arındırılması için MessageClean Kit (GenHunter) kullanılmış ve DNA temizleme işlemi, kit kullanım kitapçığı doğrultusunda yapılmıştır (Anonymous, 2000).

RNA'dan DNA Uzaklaştırılması Protokolü:

- 1) 10–50 µg toplam RNA içeren RNA çözeltisi, son hacim 57.0 µl olacak şekilde DEPC-dH₂O, 5.7 µl 10X reaksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ ve % 0.01 jelatin) ve 1.0 µl DNaz I (10 u/µl) belirtilen sırayla 1.5 ml'lik bir tüpe ilave edilmiştir.
- 2) Reaksiyon çözeltisi iyice karıştırılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- 3) İnkübasyon bittikten sonra DNaz ile kesimi yapılan RNA örneğine 40 µl fenol:kloroform (3:1) karışımı eklenerek vorteksle 30 saniye karıştırılmıştır.
- 4) Karışım buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
- 5) 4 °C'de 5 dakika 13 000 rpm'de santrifüj yapılmış ve üst faz temiz bir tüpe alınmıştır.
- 6) Üst faza 5 µl 3M sodyum asetat pH 5.5 ve 200 µl saf etanol eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- 7) Karışım -80 °C'de 1 gün bekletilmiştir.
- 8) Ertesi gün karışım 4 °C'de 10 dakika santrifüjlenerek RNA çöktürülmüştür.
- 9) Üst sıvı atıldıktan sonra RNA peleti yerinden oynatılmadan 0.5 ml % 70'lik etanolla (DEPC-dH₂O ile hazırlanmış) yıkanmıştır. Alkolü uzaklaştırmak amacıyla 5 dakika santrifüj yapılmış ve alkol pipetle uzaklaştırılmıştır. Kalan alkolün uçması için tüp, kapağı açık olarak 10 dk oda sıcaklığında ters çevrilerek bekletilmiştir.
- 10) Oda sıcaklığında kurutulan RNA peleti, 20 µl DEPC-dH₂O ile çözülmüştür.

Elde edilen RNA'nın miktarını belirlemek için RNA'lar 1:250 oranında seyreltilmiştir. 1 ml hacimli ve 10 mm ışık yollu kuartz küvetler kullanılarak spektrofotometrede (Shimadzu UV–1601) 260 nm ışık dalga boyunda seyreltik RNA'ların absorbans değerleri ölçülmüştür. RNA miktarı, ölçülen absorbans değeri ve Denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{RNA miktarı } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyreltme katsayısı (1:250)} \times 40 \quad (3.1)$$

3.3.4. RNA izolasyonunun doğrulanması

RNA izolasyonunun ve DNA'nın uzaklaştırıldığıının doğrulanması için DNaz I uygulanmış toplam RNA örnekleri % 1.2 agaroz, % 7 formaldehit jelde ayrıştırılmıştır. RNA örnekleri jele yüklenmeden önce denatürleme karışımına eklenmiş ve 65 °C de 10 dk inkübe edilmiştir. Her bir uygulama için 7 µl RNA örneği 20 µl denatürleme karışımına ilave edilmiştir. Denatürasyonun ardından, örnekler buzda 5 dk bekletilmiş ve ardından jele yükleme yapılmıştır. RNA'lar 45 dk süreyle 90 V gerilimde elektroforez yapılarak jelde ayrıştırılmıştır. RNA'lara ait bant görüntüleri, Kodak GL 200 jel görüntüleme sistemi ile 304 nm ışık dalga boyunda ve 590 nm filtre kullanılarak elde edilmiştir. RNA elektroforezi için kullanılan malzemeler aşağıda sunulmuştur.

RNA denatürleme karışımı:

Formamit	10.0 µl
Formaldehit(% 37)	1.5 µl
5 X MOPS	2.0 µl
EtBr (200 µg/ml)	3.0 µl
Yükleme tamponu	3.0 µl

RNA yükleme tamponu: % 50 gliserol, 1 mM EDTA (pH 8.0), % 0.25 (w/v) bromofenol mavisi

% 1 Agaroz % 7 Formaldehit jel (50 ml):

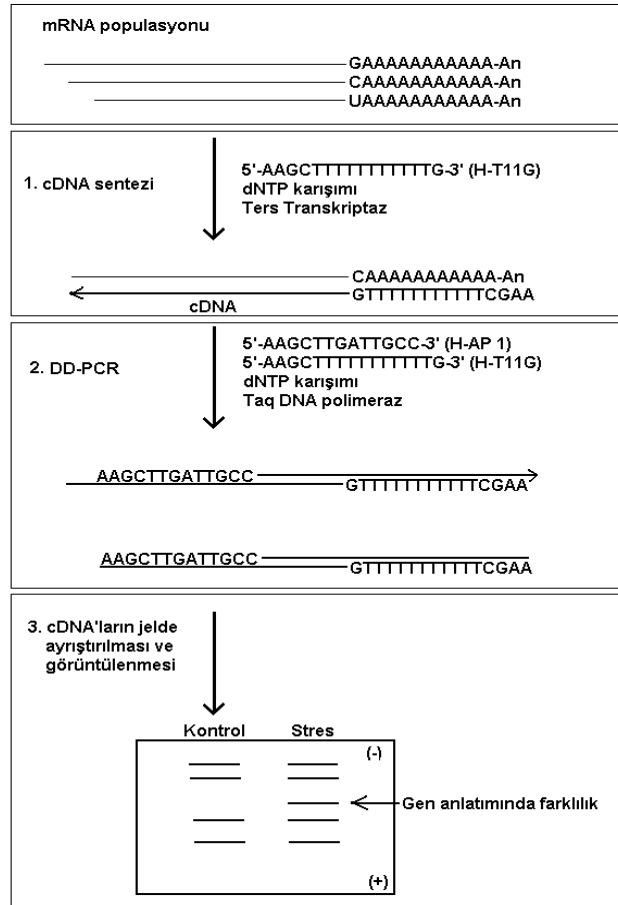
DEPC-dH ₂ O	36.5 ml
5x MOPS	10.0 ml
Agaroz	0.5 g
Formaldehit (% 37)	3.5 ml

Elektroforez koşturma tamponu: 1x MOPS ve % 7 Formaldehit (% 37)

5 X MOPS: 0.1 M MOPS (pH 7.0), 40 mM Na asetat ve 5 mM EDTA (pH 8.0) içerir. 20.6 gr MOPS 800 ml 50 mM sodyum asetat içinde çözülmüştür. 2 N NaOH ile pH'sı 7.0'a ayarlanmış ve 10 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) eklenmiştir. Tamponun hacmi 1 litreye getirildikten sonra 1 ml DEPC ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.4. Farklılık Gösterim

Farklılık gösterim yöntemi, stres koşullarında oluşan gen anlatım farklılıklarını tespit etmek amacıyla dört temel aşamada gerçekleştirilmiştir. Bunlar; cDNA sentezi, *farklılık gösterim* PZR (DD-PCR), cDNA'ların jelde ayrıştırılarak gümüş boyama ile görüntülenmesi ve son olarak kontrole göre farklı cDNA'ların jelden izolasyonu aşamalarından oluşmuştur. *Farklılık gösterim* yöntemi şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *Farklılık gösterim* yönteminin şematik gösterimi (Anonymous, ---)

3.4.1. cDNA sentezi

RNA molekülleri çabuk parçalanabilir bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle, mRNA'ları çok daha kararlı bir yapıya sahip olan DNA'ya dönüştürmek için cDNA sentezi yapılmıştır. RNA'dan sentezlenen her bir DNA iplikçığı, kalıp olarak kullanılan mRNA'nın karşı iplikçığı özelliğinde olması nedeniyle bu DNA'lara tamamlayıcı DNA (complementer DNA) anlamına gelen cDNA denilmektedir. cDNA sentezi için RNAspectra™ Kit (GenHunter®) kullanılmış ve sentez, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Anonymous, ---). cDNA sentezi için DNaz I ile muamele sonrası elde edilen saf RNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılan RNA'ların miktarları 0.1 µg/µl olacak şekilde eşitlenmiştir. Belirtilen konsantrasyonun hazırlanması için spektrofotometre ölçümü sonucunda elde edilen toplam RNA konsantrasyon değerlerinden yararlanılmıştır. RNA'lardan cDNA sentezi, MMLV-Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üç RNA örneği (Kontrol, 38 °C ve 45 °C), üç farklı H-T₁₁M demirleyici (anchor) primer (H-T₁₁A, H-T₁₁G ve H-T₁₁C) ile kombine edilerek, her bir RNA örneği için üç ayrı reaksiyon tüpü hazırlanmış ve toplam dokuz RT-PZR reaksiyonu yapılmıştır. Pipet hatalarını en aza indirmek ve reaksiyonlar arasında en yakın benzerliği sağlamak amacıyla, her bir H-T₁₁M primeri için kalıp RNA haricindeki diğer reaksiyon girdilerinden oluşan birer öz karışım hazırlanmıştır. İçinde 2.0 µl kalıp RNA (0.1 µg/µl, taze seyreltilmiş) olan 0,2 ml ince duvarlı tüplere, hazırlanan öz karışımdan 17'şer µl ilave edilmiştir. RT-PZR programının 37 °C aşamasının 10. dakikasında, her reaksiyon tüpüne 1 µl MMLV-RTaz enzimi ilave edilerek inkübasyona devam edilmiştir. Bu şekilde her bir örnek için toplamda 20 µl cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentez reaksiyonunun içeriği, sıcaklık programı ve aşamaları aşağıdaki gibidir.

cDNA reaksiyonunun içeriği (1 tüp için):

DEPC-upH ₂ O	9.4 µl
5x Ters Transkriptaz Tamponu	4.0 µl
dNTP karışımı (625 µM)	1.6 µl
Toplam RNA (DNA içermeyen) (0.1 µg/µl, taze seyreltilmiş)	2.0 µl
H-T ₁₁ M Primer (2 µM)	2.0 µl
<u>MMLV-RTaz (100 u/µl)</u>	<u>1.0 µl</u>
Toplam Hacim	20 µl

5x Ters transkripsiyon tamponu: 125 mM Tris-Cl, pH 8.3, 188 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂, 25 mM DTT

dNTP Karışımı (her biri 625 µM): dATP, dTTP, dCTP, dGTP

H-T₁₁M Demirleyici Primerler:

H-T ₁₁ G	5' -AAGCTTTTTTTTTTTTG- 3'
H-T ₁₁ A	5' -AAGCTTTTTTTTTTTTA- 3'
H-T ₁₁ C	5' -AAGCTTTTTTTTTTTTC- 3'

Her bir reaksiyon tüpüne H-T₁₁M demirleyici primerlerinden sadece birisi eklenmiştir.

RT-PZR sıcaklık programı ve sentez aşamaları:

65 °C	→	5 dk (RNA denatürasyonu)
37 °C	→	60 dk (cDNA sentezi)
75 °C	→	5 dk (Enzim denatürasyonu)
4 °C	→	∞ (Reaksiyon durdurma ve depolama)

3.4.2. Farklılık gösterim PZR (DD-PCR)

Kontrol ve sıcaklık streslerine ait toplam üç cDNA popülasyonundan alt cDNA popülasyonları oluşturmak için “*Farklılık Gösterim PZR*” (DD-PCR) yöntemi uygulanmıştır. DD-PZR için RNAspectra™ Kit (GenHunter®) kullanılmış ve reaksiyon, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Anonymous, ---). Alt cDNA popülasyonun oluşturabilmesi amacıyla 16 nükleotid uzunluğunda 3 adet demirleyici primer (H-T₁₁M) ile 13 nükleotid uzunluğunda 16 adet rastgele primerden (H-AP Primer) oluşan 48 adet primer kombinasyonu kullanılmıştır. Oluşturulan 48 primer kombinasyonu kontrol, 38 °C ve 45 °C sıcaklık stresine ait 3 adet cDNA örneği ile birleştirilerek toplamda 144 adet DD-PZR yapılmıştır. DD-PZR için aşağıdaki reaksiyon içeriği ve sıcaklık döngüsü kullanılmıştır.

DD-PZR reaksiyon içeriği (1 tüp için):

dH ₂ O	10.2 µl
10X PZR tamponu	2.0 µl
dNTP karışımı (625 µM)	1.6 µl
H-AP Primer (2 µM)	2.0 µl
H-T ₁₁ M Primer (cDNA sentezinde kullanılan H-T ₁₁ M primeri ile aynı olmak zorundadır.)	2.0 µl
cDNA	2.0 µl
<u>Taq DNA polimeraz (5 u/µl) (Biorad)</u>	<u>0.2 µl</u>
Toplam	20.0 µl

10X PZR tamponu: 100 mM Tris-Cl, pH 8.4, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂,
% 0.01 jelatin

dNTP karışımı: dATP, dTTP, dCTP, dGTP

H-T₁₁M Primerleri:

H-T₁₁G 5' –AAGCTTTTTTTTTTTTG- 3'
 H-T₁₁A 5' –AAGCTTTTTTTTTTTTA- 3'
 H-T₁₁C 5' –AAGCTTTTTTTTTTTTC- 3'

Her bir reaksiyon tüpüne H-T₁₁M demirleyici primerlerinden sadece birisi eklenmiştir.

H-AP Primerleri:

<u>Primer Adı</u>	<u>Primerin Baz Dizisi</u>
H-AP 1	5' -AAGCTTGATTGCC- 3'
H-AP 2	5' -AAGCTTCGACTGT- 3'
H-AP 3	5' –AAGCTTTGGTCAG- 3'
H-AP 4	5' –AAGCTTCTCAACG- 3'
H-AP 5	5' –AAGCTTAGTAGGC- 3'
H-AP 6	5' –AAGCTTGCACCAT- 3'
H-AP 7	5' –AAGCTTAACGAGG- 3'
H-AP 8	5' –AAGCTTTTACCGC- 3'
H-AP 49	5' -AAGCTTTAGTCCA- 3'
H-AP 50	5' -AAGCTTTGAGACT- 3'
H-AP 51	5' –AAGCTTCGAAATG- 3'
H-AP 52	5' –AAGCTTGACCTTT- 3'
H-AP 53	5' –AAGCTTCCTCTAT- 3'
H-AP 54	5' –AAGCTTTTGAGGT- 3'
H-AP 55	5' –AAGCTTACGTTAG- 3'
H-AP 56	5' –AAGCTTATGAAGG- 3'

Her bir reaksiyon tüpüne H-AP primerlerinden sadece birisi eklenmiştir.

DD-PZR sıcaklık döngüsü:

94 °C'de	30 sn	}	40 Döngü
40 °C'de	2 dk		
72 °C'de	1 dk		
72 °C'de	5 dk	→	1 Döngü
+4 °C'de	∞		

3.4.3. cDNA'ların jelde ayrıştırılması

cDNA'ların ayrıştırılması amacıyla, % 5 denatürleyici poliakrilamid jel kullanılmıştır. Boyutlarına göre ayrıştırılan cDNA'lara ait bantların görüntülenmesi için gümüş boyama yöntemi kullanılmıştır. cDNA'ların jelde ayrıştırılması; jel levhalarının hazırlanması, denatürleyici poliakrilamid jelin yapılması ve elektroforez aşamalarından oluşmaktadır.

3.4.3.1. Poliakrilamid jel kasetinin hazırlanması

Jel, 33.5 cm (en) x 42 cm (boy) boyutunda hazırlanmıştır. Jel kalıbını hazırlamak amacıyla birisi uzun, birisi kısa olmak üzere iki cam levha kullanılmıştır. Cam levhalar deterjanla yıkanmış ve deiyonize su ile durulanmıştır. Yıkanan camlar % 70 EtOH'la hiç leke kalmayacak şekilde kağıt havlu kullanılarak temizlenmiştir. Elektroforez sonrasında, camları kolay açabilmek için uzun cam levhanın yüzeyine kayganlaştırıcı bir kimyasal olan SigmaCote uygulanmıştır. SigmaCote'un kuruması için uzun cam levha oda koşullarında 5 dk bekletilmiştir. Kısa cam levhanın yüzeyine, jelin yapışmasını ve böylece gümüş boyama aşamalarında jelin cam levhada sabit kalmasını sağlamak amacıyla taze hazırlanmış 1 ml yapıştırma çözeltisi uygulanmıştır. Yapıştırma çözeltisinin içeriği aşağıda belirtilmiştir.

Yapıştırma çözeltisi içeriği:

Etanol (% 96)	2 ml
Glasiyal asetik asit	10 µl
Bind Silane	3 µl

Yapıştırma çözeltisinin kurummasının (4–5 dk) ardından, kısa cam levha yüzeyi her defasında 2 ml % 96 Etanol ile üç kez temizlenmiştir. Kimyasal çözeltilerin uygulanmasının ardından, arada 0.4 mm kalınlığında ayraçlar olacak şekilde ve kimyasal uygulanmış yüzeyler içte kalacak biçimde cam levhalar üst üste yerleştirilmiş ve üç kenarı bantla kapatılarak, jel kalıbı kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.4.3.2. Denatürleyici poliakrilamid jel'in hazırlanması

Sıvı % 5 denatürleyici poliakrilamid jel, 33.5 cm x 42 cm boyundaki ve 0.4 mm aralıklı çift kat cam levha arasına, 60 ml'lik enjektör yardımıyla hava kabarcığı oluşturmadan dökülmüştür. Sıvı jel çözeltisi, polimerizasyon (jelleşme) için en az 2 saat oda koşullarında bekletilmiştir. Hazırlanan % 5 denatürleyici poliakrilamid jelin içeriği aşağıda verilmiştir.

% 5 Denatürleyici Poliakrilamid Jel (60 ml):

dH ₂ O	18.6 ml
Üre	21.6 g
% 40 Akrlamid:Bisakrilamid (19:1)	7.5 ml
5x TBE	12.0 ml
% 10 APS	300.0 µl
TEMED	40.8 µl

5x TBE:	
dH ₂ O	900.0 ml
Trizma-base	54.0 g
Borik asit	27.5 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	20.0 ml

3.4.3.3. Denatürleyici poliakrilamid jel elektroforezi

Polimerize olmuş denatürleyici poliakrilamid jele, DNA yüklemeye önce 60 watt elektrik gücünde (2 000 volt'u geçmeyecek şekilde) 30 dk ön koşturma yapılmıştır. Koşturma tamponu olarak 1x TBE kullanılmıştır. Kontrol ve stres gruplarına ait her 3.5 µl cDNA örneğine 2.0 µl FDD yükleme boyası eklenmiş ve 80 °C'de 2 dk denatüre edilmiştir. Denatüre edilen cDNA'lar 1–2 dk buzda bekletilmiş ardından jele yüklenmiştir. Jele yüklenen cDNA'lar 60 watt elektrik gücünde (2 000 volt'u geçmeyecek şekilde) 2.5 saat koşturularak ayrıştırılmıştır.

3.4.4. Gümüş boyama

Poliakrilamid jelde ayrıştırılan cDNA'ların görüntülenmesi amacıyla gümüş boyama yöntemi kullanılmıştır. Gümüş boyama yöntemi sabitleme, yıkama, boyama, durulama, geliştirme, durdurma ve durulama aşamalarından oluşmaktadır. Gümüş boyama için gerekli çözeltiler ve içerikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Sabitleme: Jel sıg bir plastik tepsiye yerleştirilmiş ve jelin üzerine kaplayacak kadar sabitleme/durdurma çözeltisi eklenmiştir. Jel sabitleme/durdurma çözeltisi içerisinde 20 dk veya yükleme boyası görünmeyene kadar çalkalanmıştır. Bazı çalışmalarda, jel sabitleme/durdurma çözeltisinde gece boyu çalkalamadan bekletilmiştir. Sabitleme/durdurma çözeltisi geliştirme reaksiyonunu durdurmak için saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Çözelti Adı	Çözelti İçeriği	İçerik Miktarı
Sabitleme/Durdurma Çözeltisi	Asetik asit Ultra saf su	200 ml 1800 ml
Boyama Çözeltisi	AgNO ₃ Formaldehit (% 37) Ultra saf su	3 g 4.5 ml 3 000 ml
Geliştirme Çözeltisi	Sodyum karbonat Formaldehit (% 37) Sodyum tiyosülfat (100 mg/ml) Ultra saf su	120 g 6 ml 80 µl 3 874 ml

Yıkama: Jel, 3 kez (her biri 2–3 dk) ultra saf su ile çalkalanarak durulanmıştır. Jel plakası bir sonraki yıkamaya alınmadan önce 10–20 sn süzülmüştür.

Boyama: Jel, boyama çözeltisine aktararak 30 dk iyice çalkalanmıştır.

Durulama: Jel, ultra saf su içeren tepsiye kısa süre daldırılmış, süzölmüş ve soğutulmuş geliştirme çözeltisi içeren tepsiye çabucak yerleştirilmiştir. Jelin ultra saf suya daldırılmasından geliştirme çözeltisine aktarılmasına kadar geçen toplam sürenin 5–10 sn'den fazla olmamasına dikkat edilmiştir.

Geliştirme: a) Önceden soğutulmuş sodyum karbonat çözeltisine, kullanımdan hemen önce formaldehit ve sodyum tiyosülfat ilave edilerek geliştirme çözeltisinin hazırlanması tamamlanmıştır. Önceden soğutulmuş 4 litre geliştirme çözeltisi 2'şer litre iki ayrı tepsiye bölünmüştür. Durulama aşamasından sonra jel hemen birinci geliştirme çözeltisine aktarılmış ve ilk bantlar görünene kadar jel iyice çalkalanmıştır. b) İlk bantlar görünmeye başladıktan sonra jel, ikinci geliştirme çözeltisine aktarılmış ve 2–3 dk daha veya tüm bantlar görünene kadar geliştirme işlemine devam edilmiştir.

Durdurma ve Sabitleme: Geliştirme reaksiyonunu durdurmak ve jeli sabitlemek için geliştirme çözeltisine, sabitleme/durdurma çözeltisinden 1 L eklenerek 2–3 dk çalkalanmıştır.

Durulama: Jel, 2'şer L ultra saf suda 2 kez durulanmıştır (her aşamada 2 dk).

3.4.5. Farklılık gösteren bantların belirlenmesi cDNA izolasyonu ve çoğaltılması

cDNA bantlarının gümüş boyama yöntemi ile görüntülenmesinin ardından gen anlatım farklılığı sonucu olduğu öngörülen bantlar numaralandırılarak işaretlenmiştir. Numaralandırılan bantlar jelden kesilerek çıkarılmış, ardından bantlardan cDNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen cDNA'lar PZR ile çoğaltılmıştır. cDNA izolasyonu ve PZR ile çoğaltılması için RNAspectra™ Kit (GenHunter®) kullanılmış, izolasyon ve çoğaltma reaksiyon kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Anonymous, ---).

3.4.5.1. Farklı bantların kesilmesi ve cDNA izolasyonu

Bantların jelden kesilip alınmasını kolaylaştırmak ve bantlar arasında bulaşmayı engellemek için jel yüzeyi streç filmle kaplanmıştır. Jeldeki farklılık gösteren bantlar temiz bir bisturiyle kesilmiş ve her bir bant 1.5 ml mikrofüj tüpüne konulmuştur. Mikrofüj tüpü içerisindeki jel parçası üzerine 100 µl dH₂O ilave edilmiş ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından cDNA'yı jelden çıkarmak için tüpler 100 °C'de 15 dk kaynatılmıştır. Jel kaynatılıp eritildikten sonra, 13 000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak jel parçaları çöktürülmüştür. Tüplerden sıvı faz alınarak yeni 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Yeni tüplere aktarılan sıvıdan cDNA'yı izole etmek için her bir tüpe 10 µl 3M sodyum asetat, 5 µl glikojen (10 mg/ml) ve 450 µl % 100 EtOH ilave edilmiştir. Karışım, -84 °C'de 30 dk bekletilmiştir. cDNA'yı çöktürmek amacıyla karışım, 13 000 rpm'de ve 4 °C'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjün ardından tüplerden üst faz atılmış ve çöktürmeyi durulamak için 200 µl soğuk EtOH (% 85) eklenerek kısa süreli çöktürme yapılmış ve ardından etanol tüpten atılmıştır. Etanolun buharlaşarak iyice uzaklaşması için tüpler steril kabin içerisinde 20–30 dk bekletilmiştir. Son olarak cDNA çöktürmesi, 10 µl upH₂O ile çözdürülmüştür. İzole edilen cDNA'lar daha sonra PZR ile çoğaltılmak amacıyla -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.5.2. İzole edilen cDNA'ların PZR ile çoğaltılması

cDNA'ların jelden izole edilip edilmediklerinin kontrolü ve klonlama çalışmalarında kullanılabilmesi için cDNA'lara PZR uygulanmıştır. Jelden elde edilen her bir cDNA'nın PZR'ı için ilgili cDNA'nın üretildiği sıcaklık döngüsü koşullarının ve primerlerin aynı kullanılmıştır. İzole edilen cDNA'ların çoğaltılmasında kullanılan PZR içeriği ve PZR'ın gerçekleştirildiği sıcaklık döngüsü koşulları aşağıda verilmiştir.

PZR içeriği (1 tüp için):

upH ₂ O	23.3 µl
10X PZR tamponu	4.0 µl
dNTP karışımı (625 µM)	0.3 µl
H-AP Primer (2 µM)	4.0 µl
H-T ₁₁ M Primer (2 µM)	4.0 µl
cDNA	4.0 µl
<u>Taq DNA polimeraz (5 u/µl) (Biorad)</u>	<u>0.4 µl</u>
Toplam	40.0 µl

H-T₁₁M Primerleri:

H-T ₁₁ G	5' -AAGCTTTTTTTTTTTTG- 3'
H-T ₁₁ A	5' -AAGCTTTTTTTTTTTTA- 3'
H-T ₁₁ C	5' -AAGCTTTTTTTTTTTTC- 3'

Her bir reaksiyon tüpüne H-T₁₁M demirleyici primerlerinden sadece birisi eklenmiştir.

H-AP Primerleri:

H-AP 1	5' -AAGCTTGATTGCC- 3'
H-AP 2	5' -AAGCTTCGACTGT- 3'
H-AP 3	5' -AAGCTTTGGTCAG- 3'
H-AP 4	5' -AAGCTTCTCAACG- 3'

H-AP Primerleri (devam):

H-AP 5	5' –AAGCTTAGTAGGC- 3'
H-AP 6	5' –AAGCTTGCACCAT- 3'
H-AP 7	5' –AAGCTTAACGAGG- 3'
H-AP 8	5' –AAGCTTTTACCGC- 3'
H-AP 49	5' -AAGCTTTAGTCCA- 3'
H-AP 50	5' -AAGCTTTGAGACT- 3'
H-AP 51	5' –AAGCTTCGAAATG- 3'
H-AP 52	5' –AAGCTTGACCTTT- 3'
H-AP 53	5' –AAGCTTCCTCTAT- 3'
H-AP 54	5' –AAGCTTTTGAGGT- 3'
H-AP 55	5' –AAGCTTACGTTAG- 3'
H-AP 56	5' –AAGCTTATGAAGG- 3'

Her bir reaksiyon tüpüne H-AP primerlerinden sadece birisi eklenmiştir.

PZR sıcaklık döngüsü:

94 °C'de	30 sn	}	40 Döngü
40 °C'de	2 dk		
72 °C'de	1 dk		
72 °C'de	5 dk	→	1 Döngü
+4 °C'de	∞		

3.4.5.3. PZR ürünlerinin agaroz jelde kontrolü

Kesilen bantlardan cDNA'ların doğru izole edildiğinin ve çoğaltılan PZR ürününün oluşup oluşmadığını belirlemek için % 1.2 agaroz jelde elektroforez analizi yapılmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında aşağıda belirtilen içerik kullanılmıştır.

% 1.2 Agaroz Jel (50 ml):

dH ₂ O	40.0 ml
Agaroz	0.6 g
5x TBE	10.0 ml
Etidyum Bromür (10 mg/ml)	2.5 µl

5 X TBE Tamponu (1 litre için):

dH ₂ O	900.0 ml
Tris baz	54.0 g
Borik asit	27.5 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	20.0 ml

Gerekli miktardaki agaroz 5x TBE tamponu ve su bir erlen içerisinde karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılarak çözdürülmüştür. Karışım elle tutulur sıcaklığa (50–55 °C) düştüğünde EtBr ilave edilmiştir. Hazırlanan jel sıvısı, jel kasetine dökülmüş ve yükleme kuyusu oluşturmak için tarak yerleştirilerek oda sıcaklığında donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılmış ve jel, koşuturma tamponu (1x TBE) içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 8 µl PZR ürünü ile 2 µl 6 X DNA yükleme tamponu karıştırılmış ve her bir 10 µl'lik karışım kuyulara yüklenmiştir. Ayrıca PZR ürünlerinin moleküler büyüklüklerini belirlemek için jele standart DNA yüklenmiştir. DNA'lar 1 saat süreyle 7V/cm'de elektroforez yapılarak jelde ayrıştırılmışlardır. DNA'lara ait bant görüntüleri, Kodak GL 200 jel görüntüleme sistemi ile 304 nm ışık dalga boyunda ve 590 nm filtre kullanarak elde edilmiştir.

3.5. cDNA'ların Klonlanması

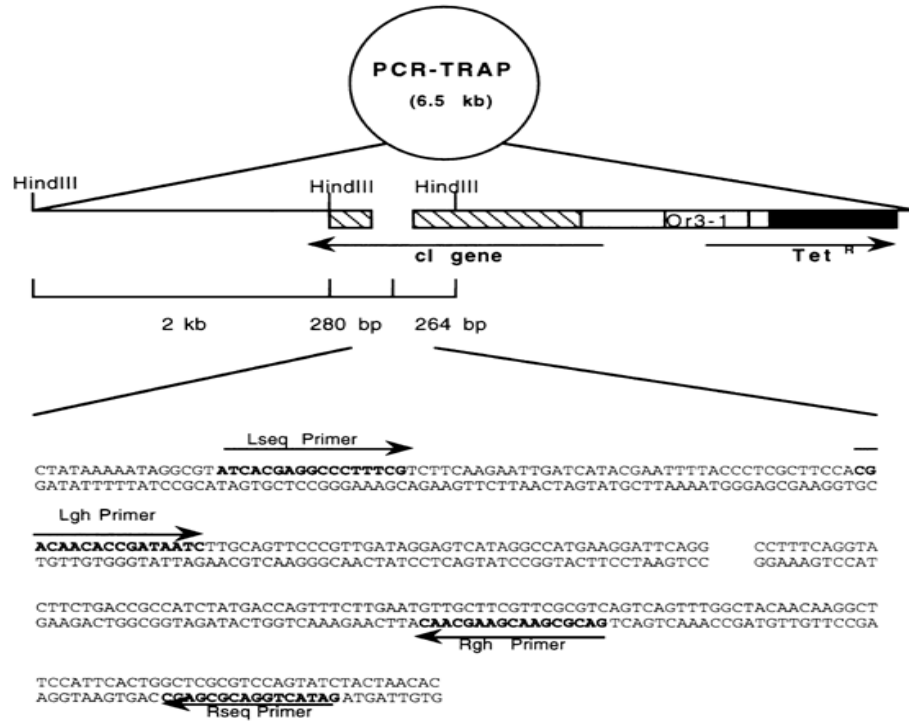
Sıcaklık stresi ile ilişkili olduğu öngörülen cDNA'ların PZR ürünlerinin klonlanması, “PCR-TRAP Cloning System” kiti (GenHunter) kullanılarak yapılmıştır (Anonymous, 1998). Bu klonlama sistemindeki vektör, Lambda fajı baskılayıcı cI genini içermektedir. cI geni içerisindeki boşluk klonlama bölgesini temsil etmektedir (Şekil 3.2). cI geni aktif durumda iken vektörde bulunan tetrasiklin direnç genini baskılamaktadır. PZR ürünü, cI geninin içerisine

klonlanarak bu baskılayıcı gen inaktif hale getirilmekte ve tetrasiklin geni anlatım yapabilmektedir. Böylece hücre tetrasikline direnç kazanmaktadır (Şekil 3.3). PZR ürününün klonlanması durumunda, koloni-PZR reaksiyonu sonrası orijinal PZR parçasından 120 baz çift daha büyük bir parça çoğaltılmaktadır. 120 baz çiftlik bu fark, klonlanan cDNA ile beraber vektör DNA'sına ait parçanın da çoğaltılmasından kaynaklanmaktadır. Klonlama reaksiyonu, sırasına uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

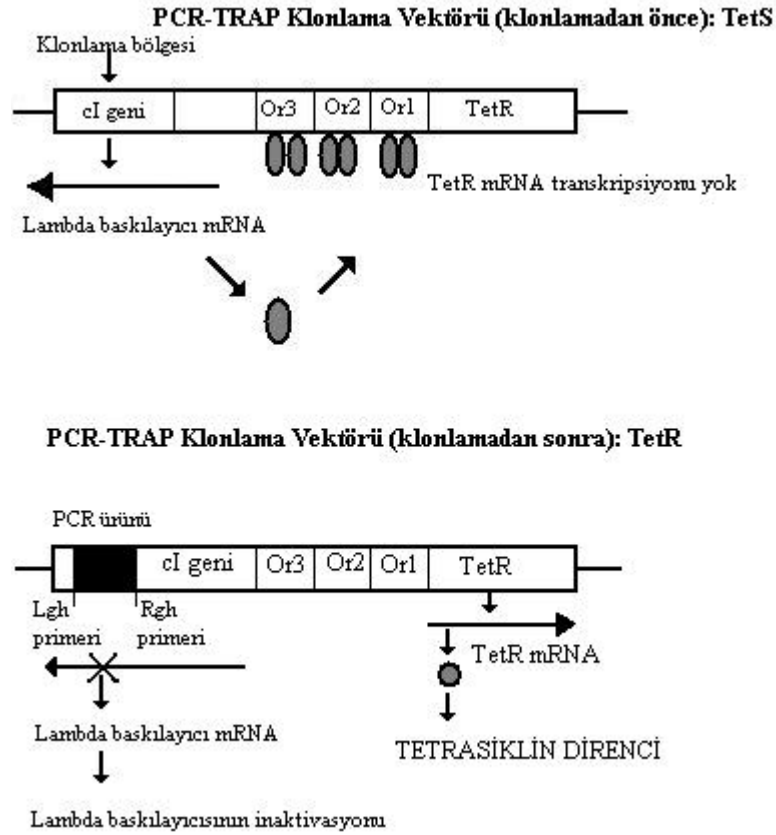
Klonlama Reaksiyonu:

dH ₂ O	10.0 µl
10x Ligazyon tamponu	2.0 µl
Klonlama Vektörü (150 ng/µl)	2.0 µl
cDNA	2.0 µl
T4 DNA ligaz (200 ünite/µl)	1.0 µl

Karışım tüpüne parmak ucuyla vurarak iyice karıştırılmış ve kısa süreli (8–10 sn) santrifüj yapılmıştır. Klonlama amacıyla hazırlanan karışım, gece boyu 16 °C'de inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda klonlama ürünleri –20 °C'de depolanmıştır.



Şekil 3.2. PCR TRAP klonlama vektörünün kısmi haritası (Anonymous, 1998)



Şekil 3.3. PCR TRAP klonlama sisteminin çalışma mekanizması (Anonymous, 1998)

3.6. Plazmidin Bakteri Hücrelerine Transformasyonu

Klonlanmış plazmidler “PCR-TRAP Cloning System” kiti protokolüne uygun şekilde bakteri hücrelerine aktarılmıştır. Aktarım amacıyla kullanılacak hücreler -80 °C derin dondurucudan çıkarılmış ve buz-su karışımı içinde eritilmiştir. Her bir 1.5 ml tüpe 100 µl hücre çözeltisi eklenmiş ve üzerine 10 µl klonlama karışımından ilave edilerek karışım 45 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra karışım 42 °C sıcaklıkta 2 dk bekletilmiş, böylece sıcaklık şokuyla hücre porlarının açılması sağlanmıştır. Sıcaklık şoku uygulanmış hücreler 2 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Hücrelerin ilk çoğaltımı için hücre karışımı üzerine 0.4 ml tetrasiklin antibiyotiği içermeyen, agarsız sıvı steril LB besi ortamı (Luria-Bertani Medium) ilave edilerek hücreler 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saat inkübasyonun ardından 200 µl hücre, 20µg/ml tetrasiklin antibiyotiği içeren agarlı katı LB besi ortamı içeren petrilere ekilmiştir. Petrilere ters yüz edilerek 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Katı LB besi ortamının içeriği aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

LB Besi ortamı:

dH ₂ O	1 litre
Tripton	10g
Maya özütü	5g
NaCl	9g
Agar	15g

LB besi ortamı hazırlandıktan sonra 121 °C sıcaklıkta ve 0.1 MP basınçta 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Karışım elle tutulur sıcaklığa (50 – 55 °C) düştüğünde, son konsantrasyon 20µg/ml olacak şekilde tetrasiklin antibiyotiği ilave edilmiştir. Ertesi gün tetrasiklinli seçici besi ortamında üreyen bakteri kolonilerinden örnekler alınmış ve PZR ile vektörün cDNA’ları alıp almadığı kontrol edilmiştir.

3.6.1. Klonlanlama kontrolü

cDNA'ların klonlanıp klonlanmadığının kontrolü koloni PZR yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemde PCR TRAP vektörünün klonlama bölgesinin her iki yanını saran bölgeye karşılık gelen Lgh ve Rgh primerleri kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu yöntem koloni parçalama ve PZR reaksiyonu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır.

3.6.1.1. Koloni parçalama

Tetrasikline direnç oluşturarak çoğalan koloniler, petrilere işaretlenerek seçilmiştir. Seçilmiş her bir koloninin bir parçası pipet ucuyla alınmış ve 50µl koloni parçalama tamponuna aktarılmıştır. Karışım 100 °C'de 10 dk bekletilerek hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. İnkübasyonun ardından karışım 13 000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek hücre parçacıkları çöktürülmüştür. Üst faz yeni tüpe aktarılmış ve daha sonra PZR için kalıp olarak kullanılmıştır.

3.6.1.2. Koloni PZR

Bir reaksiyon için hazırlanan içerik ve sıcaklık döngüsü aşağıda belirtilmiştir.

Koloni PZR içeriği:	
dH ₂ O	10.2 µl
10X PZR tamponu	2.0 µl
dNTP karışımı (250µM)	1.6 µl
Lgh Primer (2 µM)	2.0 µl
Rgh Primer (2 µM)	2.0 µl
Koloni parçalama ürünü	2.0 µl
<u>Taq DNA polimeraz (5 u/µl) (Biorad)</u>	<u>0.2 µl</u>
Toplam	20.0 µl

Lgh Primeri: CGACAACACCGATAATC
Rgh Primeri: GACGCGAACGAAGCAAC

PZR sıcaklık döngüsü:

94 °C'de	30 sn	}	30 Döngü
52 °C'de	40 sn		
72 °C'de	1 dk		

72 °C'de	5 dk	→	1 Döngü
+4 °C'de	∞		

PZR ürünleri % 1.2 agaroz jelde analiz edilerek, vektörün cDNA'yı alıp almadığı belirlenmiştir.

3.6.2. Transforme hücrelerin depolanması

Klonlanmış plazmitleri aldığı doğrulanmış hücre kolonileri 5 ml steril sıvı LB besi ortamına aktarılmıştır. Hücreler 37 °C'de 100 rpm'de gece boyu çoğaltılmıştır. 250 µl % 60 gliserol içerisine, 750 µl hücre kültürü aktararak 1'er ml'lik gliserol-hücre kültürü karışımı hazırlanmıştır. Karışım vorteks ile iyice karıştırılarak homojen bir karışım oluşturulmuştur. Homojen karışım sıvı azotta dondurulmuş ve sonraki çalışmalar için -84 °C'de saklanmıştır.

3.7. Plazmit DNA İzolasyonu

Klonlanan cDNA'ların baz dizi analizi için bakteri hücrelerinden plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Plazmit DNA izolasyonu, QIAGEN firmasının "QIAprep Spin Miniprep" kiti kullanılarak ve kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır (Anonymous, 2004). Plazmit DNA izolasyonu hücre parçalama, plazmit DNA'nın kolona tutturulması, yıkama ve plazmit DNA'nın kolondan geri kazanılması aşamalarından oluşmuştur. Plazmit DNA izolasyonu aşamalarının tamamı oda sıcaklığı koşullarında gerçekleştirilmiştir. Uygulanan izolasyon protokolü aşağıda açıklanmıştır.

Plazmit DNA izolasyon protokolü:

- 1) 1 ml hücre kültürü 13 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür.
- 2) Sıvı faz atılmış ve çöken hücrelerin üzerine 250 µl P1 tamponu eklenerek pelet çözdürülmüştür.
- 3) Üzerine 250 µl P2 tamponu (parçalama tamponu) eklenmiş ve tüpler 4–6 kez yavaşça ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Parçalama reaksiyonunun 5 dk'dan uzun tutulmasına dikkat edilmiştir.
- 4) Karışım üzerine N3 tamponu (nötralizasyon tamponu) eklenerek hemen 4–6 kez yavaşça ters yüz edilerek karıştırılmıştır.
- 5) Karışım 13 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücre artıkları çöktürülmüştür.
- 6) Üst faz QIAprep kolonuna aktarılmış ve 30–60 sn santrifüj yapılarak plazmit DNA kolona tutturulmuştur.
- 7) Kolona 0.5 ml PB tamponu eklenip 30–60 sn santrifüj edilerek kolon yıkanmıştır. Alt tüpe geçen sıvı atılmıştır.
- 8) İkinci yıkama için kolona 0.75ml PE tamponu eklenmiş ve 30–60 sn santrifüj yapılmıştır ve alta geçen sıvı atılmıştır.
- 9) Yıkama tamponu kalıntısını kolondan uzaklaştırmak amacıyla kolona hiçbir şey eklemeden 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- 10) QIAprep kolonu yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpe yerleştirilmiştir. Plazmit DNA'yı kolondan almak için kolonun ortasına 50 µl EB tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) eklenmiş ve 1 dk oda koşullarında bekletilmiştir. Ardından 1 dk santrifüj yapılarak plazmit DNA yeni tüpe aktarılmıştır.

İzole edilen saf plazmit DNA'sı 1/1000 oranında seyreltilmiş ve miktar tayini için UV-Spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans ölçümü 260 nm ışık dalga boyunda 10 mm yollu 1 ml kuartz küvetlerde yapılmıştır. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri ve Denklem 3.2 kullanılarak, plazmit DNA miktarı belirlenmiştir.

$$\text{Plazmit miktarı } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{seyreltme faktörü (1:1000)} \times 50 \quad (3.2)$$

3.8. Baz Dizi Analizi

İzole edilen saf plazmitlerin baz dizi analizi, GenHunter firmasının dizileme servisine yaptırılmıştır. Dizileme analizi için 10 µl plazmit DNA'sı (200 ng/µl) hazırlanmıştır. Plazmitlerin baz dizi analizi, ABI 3130xl otomatik dizileme cihazında yapılmıştır. Baz dizi analiz sonuçlarını doğrulamak için her bir plazmitin baz dizisi, Lgh ve Rgh primerleri kullanılarak çift yönlü olarak okutulmuştur. Baz dizilerinin kalitesini belirlemek amacıyla, FinchTV Version 1.4.0. yazılımı kullanılmıştır. Plazmit DNA'lardaki olası okuma hataları, çift yönlü baz dizilerinin kromotogram görüntüleri karşılaştırılarak düzeltilmiştir. Plazmit baz dizi sonuçlarından vektör dizilerinin çıkarılmasıyla, klonlanan cDNA'ların baz dizileri elde edilmiştir.

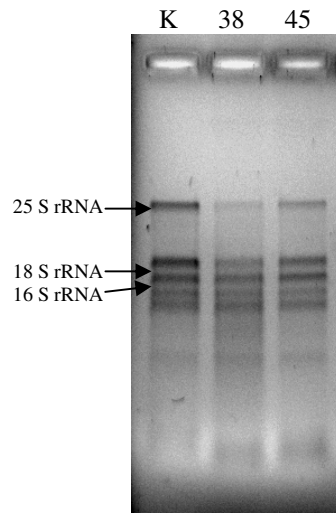
3.9. Homoloji Araştırmaları ve *in silico* Mikrodizilim Analizi

Sıcaklık stresi sonucu farklı anlatım yaptığı belirlenen EST dizilerinin homolojileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ile Plant Genome Data Base (PlantGDB) (<http://www.plantgdb.org/>) ağ sayfalarında yer alan veri tabanlarında araştırılmıştır. Dizi homolojilerinin belirlenmesi için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (Altschul ve ark., 1997) kullanılmıştır. Homoloji araştırmaları sonucunda, cDNA nükleotid dizilerinin benzerlik gösterdiği genlerin, abiyotik stres koşullarında *Arabidopsis thaliana*'da oluşturdukları anlatım modellerini belirlemek amacıyla, Genevestigator programı yardımıyla *Arabidopsis* mikrodizilim (microarray) denemeleri Meta-Profil analizine tabii tutulmuştur (Zimmermann ve ark., 2005).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. RNA İzolasyonu

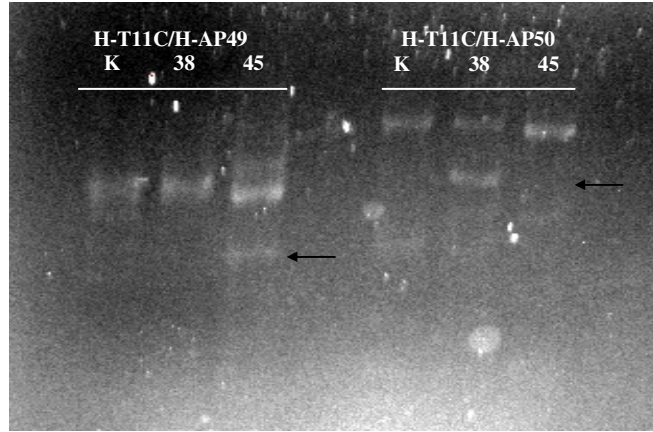
RNA izolasyonu ve RNA'dan DNA'nın uzaklaştırılması işlemlerinin ardından izolasyonun doğrulanması için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.1). Agaroz jel analizi sonucunda kontrol, 38 °C ve 45 °C sıcaklık stresi uygulanmış pamuk bitkilerine ait parçalanmamış, sağlam rRNA bantları gözlenmiştir. Ayrıca jel analizi sonucunda, her üç uygulamanın RNA örneklerinde DNA bulaşığı gözlenmemiştir. Sonuç olarak, *farklılık gösterim* tekniği için kalıp olarak kullanılabilir sağlıklı RNA'lar elde edilmiştir. Şekil 4.1'de K: kontrol, 38: 38 °C sıcaklık stresi, 45: 45 °C sıcaklık stresi uygulanmış pamuk bitkilerini temsil etmektedir. Agaroz jel analizi sonucunda sağlam olarak izole edildiği doğrulanan toplam RNA'ların miktarı spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. Kontrol, orta sıcaklık stresi ve yüksek sıcaklık stresi uygulanmış pamuk bitkilerinden sırasıyla 100 µg/ml, 80 µg/ml ve 65 µg/ml konsantrasyonunda toplam RNA izole edilmiştir.



Şekil 4.1. Toplam RNA agaroz jel analizi

4.2. Farklılık Gösterim

Farklılık gösterim çalışmalarında kalıp olarak kullanmak amacıyla, sıcaklık stresi uygulamalarına (Kontrol, 38 °C ve 45 °C) ait RNA'lardan RT-PZR ile cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için her bir stres uygulamasına ait RNA, üç farklı primer (H-T₁₁A, H-T₁₁G, H-T₁₁C) ile kombine edilmiş ve her bir stres uygulaması için 3 değişik cDNA popülasyonu oluşturulmuştur. Sentezlenen tek iplikçikli cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, DD-PZR yapılmış ve alt cDNA popülasyonları üretilmiştir. DD-PZR, 3 değişik stres uygulaması cDNA'sı, 3 çeşit demirleyici primer ve 16 farklı rastgele (random) primer kombine edilerek gerçekleştirilmiştir. Yapılan DD-PZR'lar ile 144 farklı alt cDNA popülasyonu oluşturulmuştur. DD-PZR'ın ardından, cDNA popülasyonlarının oluşup oluşmadığının kontrolü için cDNA popülasyonlarından rastgele iki tanesi seçilmiş ve bu iki popülasyona agaroz jel analizi yapılmıştır. Seçilen cDNA popülasyonları, %1.2 agaroz jelde 80 V gerilimde 2 saat koşurulmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. cDNA'ların agaroz jel analizi ile kontrolü

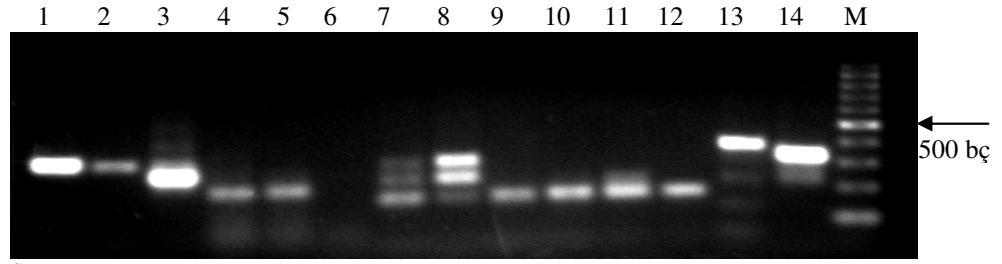
Şekil 4.2'de HT₁₁-C; demirleyici primeri, H-AP49 ve H-AP50; rastlantısal primerleri simgelemektedir. K: kontrol bitkilerine ait cDNA popülasyonunu, 38: 38 °C sıcaklık stresi uygulanmış bitkilere ait cDNA popülasyonunu, 45: 45 °C sıcaklık stresi uygulanmış bitkilere ait cDNA popülasyonunu belirtmektedir. Oklar, olası farklı gen anlatımına ait bantları göstermektedir. Elde edilen görüntü

sonucunda, DD-PZR ile cDNA'ların başarılı bir şekilde çoğaltıldığı doğrulanmıştır.

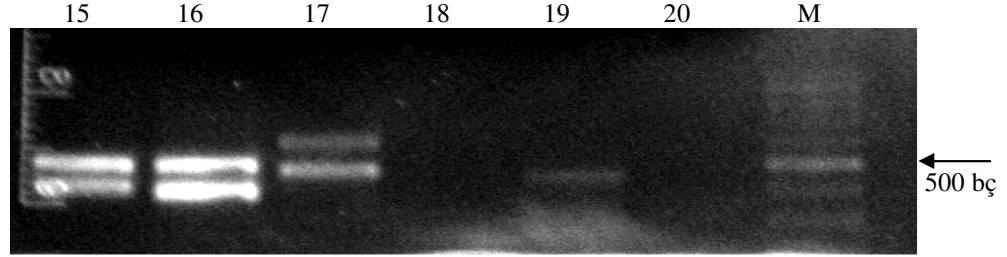
Farklı uygulamalara ait cDNA popülasyonları, % 5 PAGE (poliakrilamid jel elektroforez) kullanılarak ayrıştırılmış ve gümüş boyama yapılarak cDNA'lar görüntülenmiştir. *Farklılık gösterim* jellerinden elde edilen sonuçlara göre, pamukta sıcaklık stresi koşullarında 147 adet EST'nin (Expressed Sequence Tag) transkripsiyon şeklinin değiştiği belirlenmiştir. Sıcaklık stresi koşullarında, bu EST'lerin 12 tanesinin transkripsiyonu azalmış, 29 tanesi tamamen baskılanmış, 57 tanesinin regülasyonu artmış ve 49 tanesi sadece stres koşullarında anlatım göstermiştir.

4.3. cDNA'ların Jelden İzolasyonu ve PZR ile Çoğaltılması

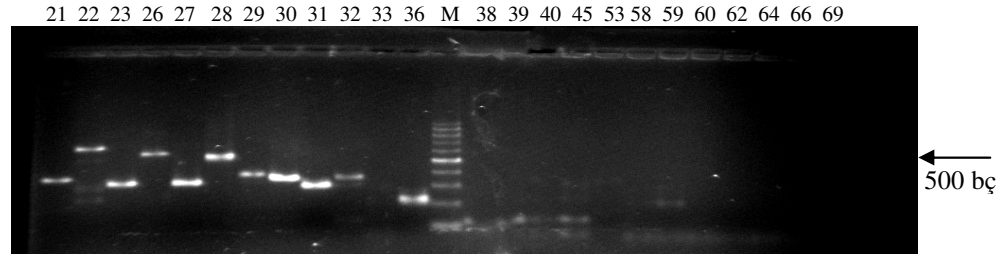
Sıcaklık stresi koşullarında farklılık gösteren bantların tamamı jelden kesilerek alınmıştır. Kesilen jel parçacıklarında bulunan cDNA'lar izole edilmiş, ardından 124 tane cDNA, PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ile çoğaltılan ürünlerden 84 tanesi, % 1.2'lik agaroz jelde analiz edilmiştir. Agaroz jel analizi sonucunda, kesilen jel parçacıklarının 65 tanesinden cDNA'ların izole edilebildiği ve PZR ile çoğaltılabildiği belirlenmiştir. Bazı jel izolasyonlarından, birden fazla cDNA'nın elde edildiği, bazılarında ise çoğaltımın olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3; 4.4; 4.5; 4.6; 4.7). Agaroz jel analizi yapılan cDNA'lardan, tek bant oluşturan 39 cDNA ile klonlama çalışmaları yapılmıştır.



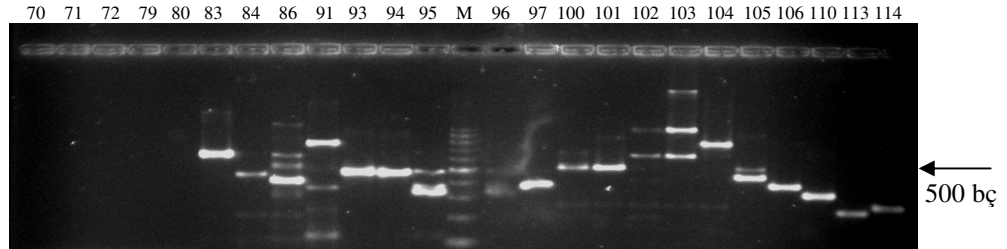
Şekil 4.3. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü



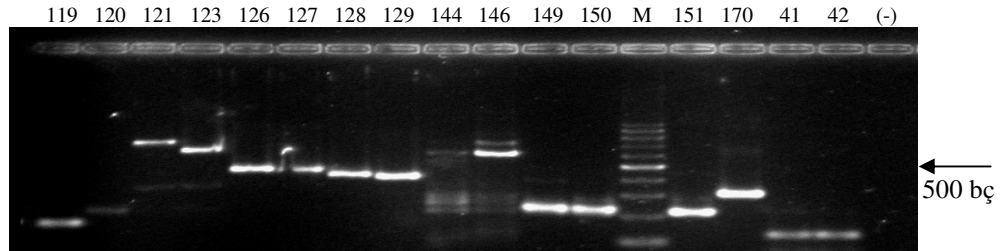
Şekil 4.4. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü



Şekil 4.5. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü



Şekil 4.6. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü

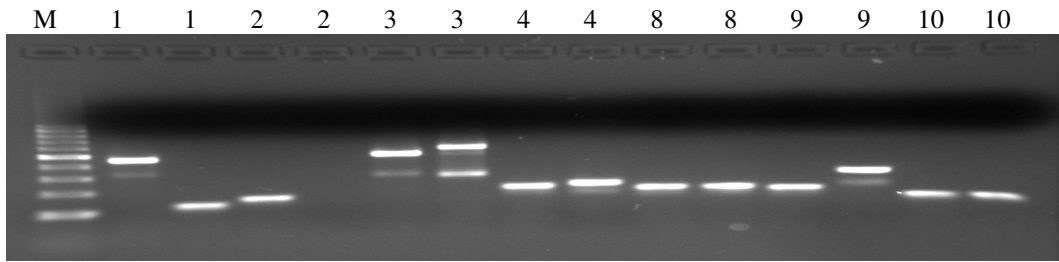


Şekil 4.7. Jelden izole edilen cDNA'ların agaroz jel analiz görüntüsü

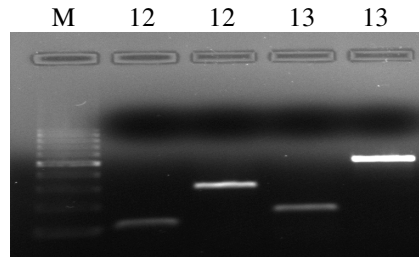
Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'deki rakamlar: *farklılık gösterim* jelinden izole edilen her bir cDNA'yı, M: DNA markörünü, ok işareti: markördeki 500 baz çifti uzunluğundaki en parlak bantı temsil etmektedir.

4.4. cDNA'ların Plazmide Klonlanması ve Hücre Transformasyonu

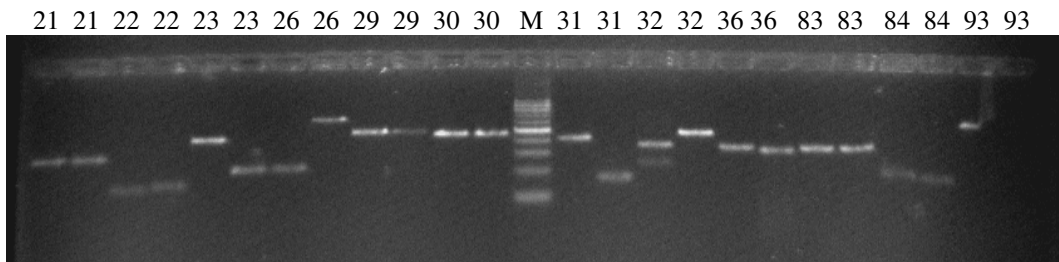
Farklılık gösterim jelinden izole edilip, agaroz jel analizi sonucunda tek bant oluşturduğu belirlenen 39 adet cDNA, PCR-TRAP klonlama vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen klonlar kompetent hücelere transforme edilmiş ve transformant hücreler, seçici katı besi ortamında gece boyu çoğaltılmıştır. Klonlamanın ve transformasyonun doğrulanması amacıyla, koloni-PZR yapılmıştır. Seçici besi ortamında yetiştirilen her bir cDNA'ya ait kolonilerin 2 tanesi, koloni-PZR için kullanılmıştır. Böylece 39 cDNA için 78 adet koloni kullanılarak, koloni-PZR yapılmıştır. Koloni-PZR ürünleri, % 1.2 agaroz jelde analiz edilmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12). Jel analizleri sonucunda, her bir cDNA için seçilen iki koloniden daha uzun PZR ürünü oluşturan koloni, sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla seçilmiş ve hücre kültürü ile çoğaltılmıştır.



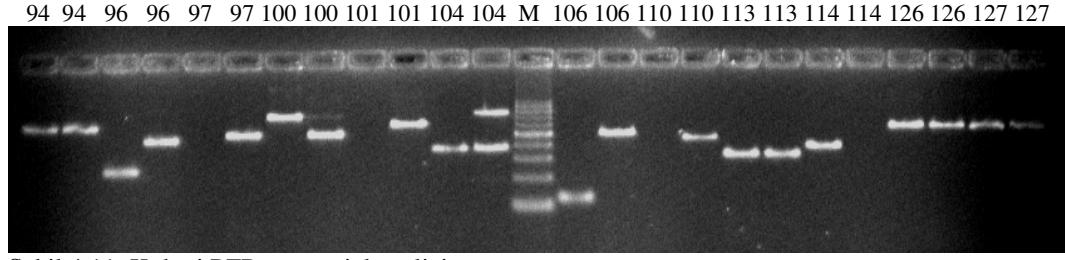
Şekil 4.8. Koloni PZR agaroz jel analizi



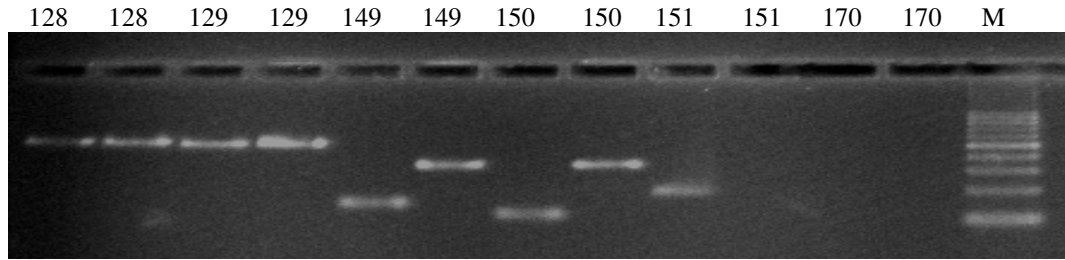
Şekil 4.9. Koloni PZR agaroz jel analizi



Şekil 4.10. Koloni PZR agaroz jel analizi



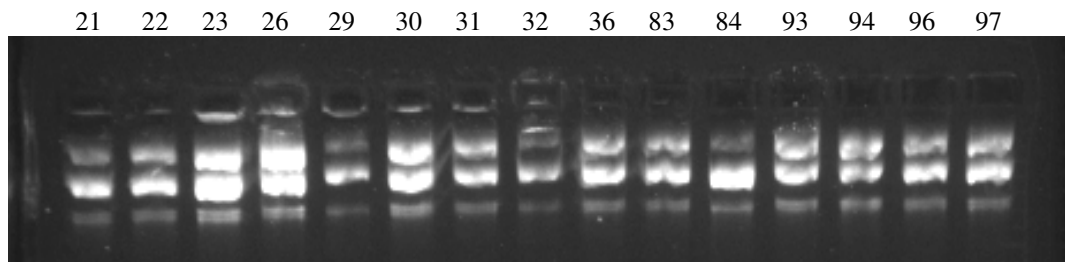
Şekil 4.11. Koloni PZR agaroz jel analizi



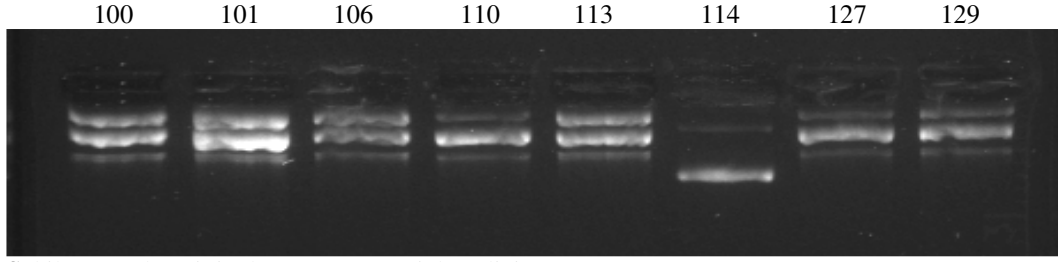
Şekil 4.12. Koloni PZR agaroz jel analizi

4.5. Plazmit İzolasyonu

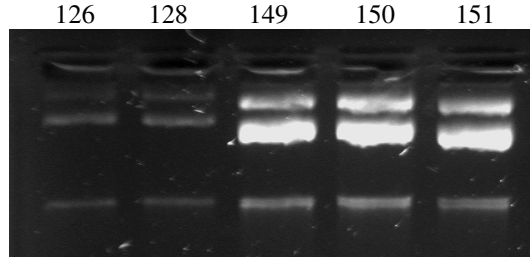
Koloni-PZR jel analizi sonucunda seçilen ve hücre kültürü ile çoğaltılan kolonilerin 28 tanesinden, plazmit izolasyonu yapılmış ve izole edilen plazmitler % 1 agaroz jelde analiz edilmiştir (Şekil 4.13; 4.14; 4.15). Jel analizleri sonucunda, izolasyonda kullanılan tüm hücrelerden plazmitlerin başarılı bir şekilde izole edildiği gözlenmiştir. Jel analizi görüntülerinden, her sütunda üç adet bant olduğu belirlenmiştir. Bu durum, plazmitlerin izolasyondan sonra doğrusal, dairesel ve süper sarmal olmak üzere, üç farklı formda olmasından kaynaklanmaktadır. İzole edilen plazmitlerin miktarları, spektrofotometre ölçümü ile belirlenmiş ve son konsantrasyon 200 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Klonlanmış plazmitleri içerdiği belirlenen 28 adet klona ait hücrelerin, gliserol stokları yapılmış ve -80 °C'de depolanmıştır.



Şekil 4.13. Plazmit izolasyonu agaroz jel analizi



Şekil 4.14. Plazmit izolasyonu agaroz jel analizi



Şekil 4.15. Plazmit izolasyonu agaroz jel analizi

4.6. Baz Dizi Analizi ve Homoloji Araştırmaları

Doktora tezi kapsamında oluşturulan 28 adet klonun nükleotid dizi analizi, Amerika'da bulunan GenHunter firmasına yaptırılmıştır. Klonların nükleotid dizisi, ABI 3130xl otomatik DNA dizileyici cihazında okutulmuştur. Nükleotid dizi analizi sonucunda, 28 adet cDNA klonunun 27'sinin cDNA dizisi tespit edilmiş, bir klonda ise ilgili cDNA dizisi belirlenememiştir. HSGh22 ve HSGh84 klonlarındaki cDNA'larının dizi uzunlukları sırasıyla 37 baz ve 47 baz olarak belirlenmiştir. HSGh22 ve HSGh84 cDNA'larının nükleotid dizi uzunluklarının kısa olması nedeniyle, daha sonraki araştırmalarda değerlendirmeye alınmayarak, 25 adet cDNA ile çalışmalara devam edilmiştir.

Baz dizi analizi sonucunda nükleotid dizisi belirlenen 25 adet cDNA'nın, nükleotid dizisi bakımından kendi içerisinde birbirine benzerlik gösterenleri belirlemek amacıyla, kümeleme (clustering) analizi yapılmıştır. Kümeleme analizi sonucunda, birbirine dizi benzerliği gösteren cDNA'lar 4 küme oluşturmuş ve her bir kümede birbirine benzerlik gösteren 2 cDNA bir arada toplanmıştır (Çizelge 4.1). HSGh29 (369 baz) ile HSGh32 (340 baz) ilk 328 bazda % 100 benzerlik göstererek birinci, HSGh30 (336 baz) ile HSGh31 (288 baz) ilk 279 bazda % 96 benzerlik göstererek ikinci, HSGh93 (459 baz) ile HSGh94 (458 baz) cDNA'larının tamamı % 100 benzerlik göstererek üçüncü ve HSGh126 (472 baz)

ile HSGh128 (427 baz) ilk 415 bazda % 99 benzerlik göstererek dördüncü küme içerisinde yer almışlardır. Analiz sonucunda, üçüncü kümede yer alan cDNA'lar haricindeki HSGh29 ile HSGh32, HSGh30 ile HSGh31 ve HSGh126 ile HSGh128'in cDNA nükleotid dizileri, 3' ucu bölgelerinde farklılık göstermektedirler. 3. kümedeki cDNA'lar haricinde, diğer her bir kümede yer alan ve bir biriyle nükleotid dizisi benzerliği gösteren cDNA'ların, alternatif kırılmaya (alternative splicing) uğramış aynı genin parçaları olma ihtimali bulunmaktadır. Bunlara ilave olarak, aynı kümede yer alan cDNA'lar, gen bankası taraması sonucunda aynı dizilerle homoloji göstermişlerdir. Bu sonuçla, birbirine benzerlik gösteren her iki cDNA'nın tek bir genin parçası olduğu ve küme oluşturan 8 cDNA'nın aslında 8 değil 4 genin parçaları oldukları belirlenmiştir. Kümeleme analizi sonucunda, sıcaklık stresi koşullarında anlatımı değişen 21 gene ait cDNA'nın, pamuktan izole edilip klonlandığı anlaşılmıştır.

Çizelge 4.1. cDNA kümeleme sonuçları

Küme	cDNA'lar	Baz uzunlukları	5' → 3' yönünde cDNA'ların benzerlik gösteren dizi bölgesi	Benzerlik oranı
1. Küme	HSGh29	369	1 → 328	% 100
	HSGh32	340	1 → 328	
2. Küme	HSGh30	336	2 → 280	% 96
	HSGh31	288	1 → 275	
3. Küme	HSGh93	459	1 → 459	% 100
	HSGh94	458	1 → 458	
4. Küme	HSGh126	472	1 → 415	% 99
	HSGh128	427	1 → 415	

Sıcaklık stresi koşullarında pamuktan elde edilen 25 adet cDNA dizisinin homoloji araştırmaları yapılmıştır. Pamuğa sıcaklık stresi uygulanması sonucunda, farklı anlatım gösteren 27 cDNA'nın adı, baz uzunluğu, sıcaklık stresinde anlatım biçimi ve genbankası homoloji sonuçlarının özeti Çizelge 4.2'de verilmiştir. 27 cDNA'nın nükleotid dizileri ise Ekler bölümünde sunulmuştur.

Kümeleme analizi sonuçları da dikkate alınarak, bu çalışmada elde edilen cDNA'lar ile yapılan ilk homoloji araştırmaları sonucunda 2 cDNA, gen bankalarındaki hiçbir gen veya cDNA klonu ile önemli benzerlik göstermemiştir. Buna ilave olarak, 8 gen ve 11 pamuk cDNA klonu ile doğrudan benzerlik

bulunmuştur. Çalışmada elde edilen cDNA'ların benzerlik gösterdiği 11 pamuk cDNA klonunun nükleotid dizileri, NCBI gen bankasından temin edilmiş ve bu 11 cDNA klonunun homoloji araştırmaları yapılmıştır. Homoloji araştırmaları sonucunda, 11 pamuk cDNA klonundan 5 tanesi gen homolojisi oluşturmuş, 6 tanesi ise önemli seviyede gen homolojisi göstermemiştir. Böylece 8 tanesi doğrudan, 5 tanesi dolaylı olmak üzere toplam 13 adet cDNA'nın gen homolojisi oluşturduğu belirlenmiştir. Gen homolojisi gösteren 13 cDNA'dan 1 tanesi, 2 ayrı gen ile aynı düzeyde homoloji göstermiştir.

Sonuç olarak, sıcaklık stresi koşullarında pamuktan izole edilen cDNA'ların 13 tanesi doğrudan veya dolaylı olarak 14 gen ile homoloji oluşturmuş, 8 tanesi ise bilinen hiç bir gen ile önemli benzerlik göstermemiştir. Bu bulgular ışığında, pamuktan izole edilen ve gen homolojisi göstermeyen 8 cDNA'nın yeni gen adayları oldukları söylenebilir.

Bu çalışma kapsamında yeni gen adayı olduğu ileri sürülen 8 cDNA'nın, daha sonraki çalışmalarda tam uzunlukta cDNA'larının oluşturulması, bu genlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve ayrıca northern blot, yarı miktarsal-RT PZR (sq-RT PCR), gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) gibi yöntemler kullanılarak gen anlatım analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu 8 cDNA'nın yeni genler olduklarının ispatlanması durumunda, bu genlerin bitkilerdeki fizyolojik ve moleküler işlevlerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar yapılmalıdır.

Çizelge 4-2. Pamukta sıcaklık stresi uygulamalarından elde edilen cDNA'ların homoloji araştırmaları özeti

cDNA Adı	Baz Sayısı	Sıcaklık Stresinde Gen anlatımı	Benzerlik gösteren diziler	Erişim Numarası	E Değeri	Benzerlik Oranı
HSGh21	194	Artma	<i>G. hirsutum</i> mikrosatalit dizisi Lektin-benzeri proteine benzerlik gösteren <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu Köşeli yaprak leke hastalığı bulaştırılmış <i>G. hirsutum</i> 1-E2 klonu	DQ908162.1 DT051408.1 CF932161.1	1e-77 1e-20 5e-13	% 97 % 80 % 82
HSGh22	37	Artma	Değerlendirmeye alınmamıştır.	-	-	-
HSGh23	320	Artma	Kitinaz'a benzer <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu <i>G. hirsutum</i> kitinaz-benzeri (CTL2) gen <i>G. hirsutum</i> kitinaz-benzeri (CTL1)gen	DT052808.1 AY291286.1 AY291285.1	3e-151 5e-137 2e-21	% 99 % 96 % 83
HSGh26	553	Artma	Tiamin biyosentetik enzime benzer <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu <i>A. thaliana</i> tiamin biyosentetik enzim (TH11)	ES798066.1 NM_124858.2	0.0 2e-81	% 99 % 78
HSGh29	369	Azalma	ATPaz, histidin kinaz, DNA giraz B ve HSP90 benzeri bölge içeren DNA parçası ile zayıf benzerlik gösteren <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	ES806029.1	8e-103	% 98
HSGh30	336	Artma	<i>Gossypium raimondii</i> cDNA klonu.	CO130944.1	1e-150	% 97
HSGh31	288	Artma	<i>Gossypium raimondii</i> cDNA klonu	CO130944.1	5e-129	% 97
HSGh32	340	Artma	ATPaz, histidin kinaz, DNA giraz B ve HSP90 benzeri bölge içeren DNA parçası ile zayıf benzerlik gösteren <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	ES806029.1	7e-103	% 98
HSGh36	215	45 °C'de azalma	RING parmak çinko parmak benzeri <i>Gossypium hirsutum</i> cDNA klonu	DW505766.1	9e-93	% 98

Çizelge 4.2. (devam)

cDNA Adı	Baz Sayısı	Sıcaklık Stresinde Gen Anlatımı	Benzerlik gösteren diziler	Erişim Numarası	E Değeri	Homoloji Oranı
HSGh83	208	Artma	<i>G. hirsutum</i> kloroplast genomunun psaB ve rps14 gen bölgesi psaB ve rps14 benzeri <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	DQ345959.1 DR455725.1.1	1e-92 8e-93	% 98 % 98
HSGh84	47	Yeni anlatım	Değerlendirmeye alınmamıştır	-	-	-
HSGh93	459	Baskılanma	MRP 3'e benzeyen <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu <i>Gossypium barbadense</i> MRP-İke ABC transporter protein	DT462800.1 DQ359122.1	0.0 2e-151	% 99 % 94
HSGh94	458	Baskılanma	MRP3'e benzeyen <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu <i>Gossypium barbadense</i> MRP-İke ABC transporter protein	DT462800.1 DQ359122.1	0.0 2e-151	% 99 % 94
HSGh96	335	45 °C'de artma	CBL-etkileşimli protein kinaz benzeri <i>G. arboreum</i> lif cDNA klonu CBL-etkileşimli protein kinaz benzeri <i>G. hirsutum</i> lif cDNA klonu	BM359757.1 ES820596.1	2e-135 2e-123	% 99 % 100
HSGh97	389	45 °C'de artma	<i>G. barbadense</i> IAA-Ala hidrolaz olduğu varsayılan gen	AF517654.1	5e-119	% 100
HSGh100	644	Azalma	Katalitik proteine benzeyen <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	DW511925.1	0.0	%97
HSGh101	500	Azalma	<i>G. hirsutum</i> ovul cDNA klonu <i>Arabidopsis thaliana</i> protein kinaz	AJ513459.1 NM_120263.3	0.0 2e-05	% 97 % 77
HSGh106	391	45 °C'de artma	SnRNP/ Sm'ye benzer <i>Gossypium hirsutum</i> cDNA klonu <i>Arabidopsis thaliana</i> küçük çekirdekli ribonükleoprotein	DW505510.1 NM_105244.2	7e-167 1e-44	% 99 % 79

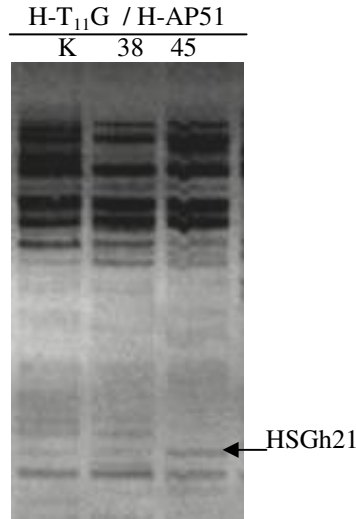
Çizelge 4.2. (devam)

cDNA adı	Baz sayısı	Sıcaklık Stresinde Gen anlatımı	Benzerlik gösteren diziler	Erişim Numarası	E Değeri	Homoloji Oranı
HSGh110	337	38 °C'de artma, 45 °C'de baskılanma	Önemli bir benzerlik yok	-	-	-
HSGh113	198	Artma	Plastid 3-keto-açıl-ACP sentaz II-B ve 3-keto-açıl-ACP sentaz (KAS)'a benzeyen <i>G. raimondii</i> cDNA klonu KAS'a benzeyen <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	CO107708.1 DT572048.1	4e-84 4e-33	% 98 % 98
HSGh126	472	45 °C'de artma	İşlevi tanımlanmamış proteine benzeyen <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	DR456701.1	0.0	% 100
HSGh127	461	38 °C'de artma	Tetrahidrofolilpoliglutam sentaz (ATDFB)'a benzeyen <i>G. raimondii</i> cDNA klonu <i>Arabidopsis thaliana</i> tetrahidrofolilpoliglutam sentaz (ATDFB)	CO121879.1 NM_120680.3	0.0 2e-74	% 99 % 79
HSGh128	427	45 °C'de artma	İşlevi tanımlanmamış proteine benzeyen <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	DR456701.1	0.0	% 98
HSGh129	405	Artma	Ribozomal S14 proteini benzeri <i>G. hirsutum</i> lif kütüphanesi cDNA klonu <i>Arabidopsis thaliana</i> 40S ribosomal protein S14 (RPS14A)	ES819720.1 NM_129174.3	0.0 9e-59	% 100 % 83
HSGh149	232	38 °C'de artma, 45 °C'de baskılanma	ubiquinol-sitokrom C redüktaz ve siklofilin gen benzeri <i>G. hirsutum</i> cDNA klonu	ES827622.1	2e-101	% 99
HSGh150	223	Yeni anlatım	<i>G. hirsutum</i> lif cDNA klonu	ES790686.1	5e-102	% 100
HSGh151	83	Yeni anlatım	Önemli bir benzerlik yok	-	-	-

4.7. Gen Homolojisi Gösteren cDNA'lar

4.7.1. HSGh21 cDNA'sı

Sıcaklık stresi uygulanmamış, orta ve yüksek sıcaklık stresi uygulanmış 3 pamuk grubunda da HSGh21'e ait bant sinyali gözlenmiştir. HSGh21'in anlatımı, 45 °C sıcaklık stresi uygulanan pamuklarda, kontrole ve orta sıcaklık stresindeki bitkilere göre daha yüksek olmuştur (Şekil 4.16). Yapılan homoloji taraması sonucunda HSGh21 cDNA'sı, *G. hirsutum* mikrosatelit dizisi (DQ908162.1), lektin-benzeri protein ile zayıf benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DT051408.1) ve köşeli yaprak leke hastalığı etmeni bulaştırılmış *G. hirsutum*'un 1-E2 klonu (CF932161.1) ile sırasıyla $E = 1e-77$ (% 97), $E = 1e-20$ (% 80) ve $E = 5e-13$ (% 82) seviyesinde homoloji göstermiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.16. HSGh21'in farklılık gösterim jel görüntüsü

Bitkilerdeki lektinin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Lektin tohum olgunlaşması, hücre duvarı oluşumu, savunma mekanizması ve baklagillerin köklerinde rizobial nodül oluşumunda önemli role sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bitkilerde, lektin sentezinin kuraklık stresi koşullarında artış gösterdiği ve lektin sentezindeki artışın absisik asit (ABA) artışına bağımlı olduğu belirtilmektedir (Cammue ve ark., 1989; Raikhel ve Lee, 1993). Yüksek sıcaklık

ve kuraklık stresi koşullarında, bitkilerde ABA sentezi artış göstermekte ve bitkilerin stres direncinin artmasını sağlamaktadır.

Ozmotik stres buğday fidelerinin köklerinde ABA ve lektin miktarında artışa neden olmaktadır (Cammue ve ark., 1989). Benzer şekilde, yetersiz su koşullarında da buğday bitkisinin köklerinde, hem ABA hem de lektin içeriğinde artış meydana geldiği ve dışarıdan ABA uygulaması ile buğday lektin miktarının 2-3 saat içerisinde en üst düzeye ulaştığı ortaya konulmuştur (Raikhel ve Lee, 1993).

Yüksek sıcaklık koşullarında da hücrelerde lektin sentezinin arttığı belirlenmiştir. *Dolichos biflorus* bitkisinin hücre kültürüne uygulanan yüksek sıcaklık sonucu, DB57 lektin proteinin sentezinde artış meydana gelmiştir (Spadoro-Tank ve Etzler, 1988). Benzer şekilde, 40 °C sıcaklık koşullarında buğday hücre kültüründeki hücrelerde ABA miktarının 7 kat, lektin miktarının ise 10 kat arttığı gözlenmiştir (Shakirova ve ark., 1996). Dışarıdan uygulanan buğday lektin proteinin, tuz stresi koşullarında buğday fidelerinde oluşan oksidatif stres düzeyini azalttığı belirlenmesi (Bezrukova ve ark., 2008), stres koşullarında hücrelerde artan lektinin, stresten kaynaklanan zararlanmayı azaltıcı işlevinin olduğunu güçlendirmiştir. Bunlara ilave olarak lektin proteinin 70 °C'de aktivitesini devam ettirebildiği de bilinmektedir.

Son dönemlerde, lektin proteininin lipoksigenaz (LOX) aktivitesine benzer aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Roopashree ve ark., 2006). Elde edilen bu bulgu ile lektinin işlevinin anlaşılmasına yeni bir boyut kazandırılmıştır. LOX yüksek sıcaklığa dayanıklı bir protein olup (Roopashree ve ark., 2006), linolenik ve linoleik asitler LOX'un en yaygın substratlarıdır. LOX, çoklu doymamış yağ asitlerine moleküler oksijen eklenmesini katalize ederek, hidroperoksi doymamış yağ asidi üretimini sağlar. LOX reaksiyonu sonucu oluşan hidroperoksi yağ asidi ürünleri, daha sonra enzim aktiviteleri ile farklı bileşiklere dönüştürülmektedir (Porta ve Rocha-Sosa, 2002).

Bitkilerde LOX reaksiyonu sonucu oluşan ürünler stres, yaralanma ve patojen saldırısı koşullarında sinyal iletiminde görev almakla beraber, antimikrobiyal ve antifungal etki gibi birkaç farklı işleve de sahiptir (Porta ve Rocha-Sosa, 2002). Bunlara ilave olarak, lipoksigenazın patates yumru gelişiminin kontrolü (Kolomiets ve ark., 2001) ve tohumların çimlenme döneminde depo lipidlerinin parçalanması (Feussner ve ark., 2001) işlemlerinde yer aldığı ortaya konulmuştur. Jasmonik asit, absisik asit gibi maddelerle ve yaralanma, kısıtlı su veya patojen saldırısı gibi stres koşullarında, LOX mRNA sentezinde artışlar olmaktadır (Porta ve Rocha-Sosa, 2002). Bu bulgular, LOX'un stres fizyolojisi ile ilişkili bir enzim olduğunu ortaya koymaktadır.

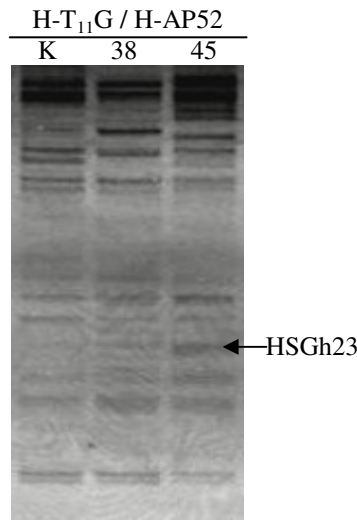
HSGh21'in, lektin benzeri protein ile benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonuna ilave olarak, köşeli yaprak leke hastalığı etmeni *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* bakterisi ile bulaştırılmış pamuktan elde edilen 1-E2 cDNA klonuyla da % 82 homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Köşeli yaprak leke hastalığı bulaştırılmış pamukta, 1-E2 klonunun gen anlatımı nispeten güçlü ve erken devrede artış göstermiştir (Patil ve ark., 2005). Ancak araştırmacılar yaptıkları blastx analizi sonucunda, 1-E2 klonunun amino asit dizisine benzer herhangi bir protein bulamamışlardır. Doktora tezi kapsamında NCBI gen bankasından 1-E2 klonunun baz dizisi elde edilmiş ve blastn analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda 1-E2 klonunun, kalsiyum-bağlama proteini, tranposonlar, alkol dehidrogenaz A, FAD-bağımlı oksidoredüktaz, kafeik asit metiltransferaz, fotosistem II protein genlerini içeren, 130 880 baz uzunluğundaki *G. hirsutum* genomik DNA'sı ile E = 5e-127 düzeyinde, % 83 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Doktora çalışmasında pamukta, pamuk mikrosatalit dizisi, lektin benzeri cDNA klonu ve 1-E2 klonu ile benzerlik gösteren HSGh21'in seviyesinde, sıcaklık stresi ile birlikte artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Abiyotik ve biyotik stres koşullarında bitkilerde, lektin proteini ve 1-E2 klonunun gen anlatımında artış olduğu ortaya konulmuştur. Eldeki mevcut bilgiler ışığında, lektine dolaylı benzerlik gösteren HSGh21 cDNA'sının, lektin geninin bir parçası olduğu kesin olarak belirtilemez. Bunun kesin olarak söylenebilmesi için HSGh21

cDNA'sının tam uzunluktaki cDNA'sının oluşturularak, yapısının belirlenmesi gerekmektedir.

4.7.2. HSGh23 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, 38 °C ve özellikle 45 °C sıcaklık stresi uygulanan pamuklarda HSGh23'ün bant sinyalinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Bu sonuçla, pamukta HSGh23 ile ilişkili genin anlatımının, yüksek sıcaklık koşullarında tetiklendiği söylenebilir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh23, *G hirsutum* sınıf II kitinaz-benzeri (CTL2) gen (AY291286) ile 5e-137 seviyesinde, % 96 ve *G hirsutum* sınıf I kitinaz-benzeri (CTL1) gen ile 2e-21 seviyesinde, % 83 oranında homoloji göstermiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.17. HSGh23'ün *farklılık gösterim* jel görüntüsü

Kitinaz, kitinin parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. Kitin, bitki hücrelerinin içeriğinde bulunmamaktadır ancak, birçok mantarın hücre duvarının temel içeriğini oluşturmaktadır. Bu nedenle, bitkilerin kitin içeren parazitlere karşı kendini korumak amacıyla kitinaz ürettikleri varsayılmıştır (Verburg ve Huynh, 1991). Fizikokimyasal özellikleri ve enzimatik aktivite tipi nedeniyle bitki kitinazları, patojen-ilişkili proteinler içerisinde sınıflandırılmıştır. İlk zamanlarda virüs, bakteri ve mantar gibi patojenlerin, bunla birlikte böcek saldırısının, patojen-ilişkili proteinleri kodlayan genleri uyararak gen anlatımına neden olduğu

bilinmekteydi. Ardından, kitinazların da içinde bulunduğu patojen-ilişkili proteinlerin kuraklık, tuzluluk, yaralanma, ağır metal, UV-ışını ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi çeşitli stres faktörleri tarafından uyarıldıkları tespit edilmiştir (Kasprzewska, 2003).

Bitkiler protein yapıları, substratları ve katalizleme mekanizmaları bakımından farklılık gösteren 7 değişik kitinaz sınıfı sentezlemektedirler. Bu kitinaz sınıfları, sınıf I, II, III, IV, V, VI ve VII olarak sınıflandırılmaktadırlar (Kasprzewska, 2003).

Soğuğa karşı fizyolojik olarak alışma ve su kaybı koşullarında, köpekdişi ayrığı (*Cynodon sp.*) bitkisinde sınıf II kitinaz geni anlatımı başlamaktadır (de los Reyes ve ark, 2001). Soğuk/don direncinde de sınıf I ve sınıf II kitinaz genleri aktif duruma geçmektedir (Yeh ve ark., 2000; de los Reyes ve ark., 2001; Ding ve ark., 2002). Apoplastik kitinazın ayrıca antifriz aktivite göstererek bitki apoplastlarında buz kristali oluşumunu engellediği bulunmuştur (Yeh ve ark., 2000). Daha detaylı araştırmalar, etilen ve kuraklık uygulamasından sonra çavdar yapraklarında da kitinazın antifriz etkisinin oluştuğunu göstermiştir (Yu ve ark., 2001).

Pamuk (*G. hirsutum* ve *G. barbadense*) lif gelişim döneminin 15-18. gününden itibaren lif hücrelerinde, sınıf II'ninde içinde bulunduğu kitinaz genlerinin anlatımında sürekli bir artış olduğu belirtilmiştir (Zhang ve ark. 2004; Tu ve ark., 2007). Bu sonuç, sınıf II kitinazın pamuk lifinin gelişiminde aktif bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık stresi ile bitkilerde kitinaz sentezinde artış meydana geldiği ortaya konulmuştur. Fasulye'de sıcaklık stresi ile sınıf IV kitinaz genin anlatımı artmakta ve 4. saatte ise anlatım düzeyi en üst seviyeye ulaşmaktadır (Margis-Pinheiro ve ark., 1994). Pavoncello ve ark. (2001) ise hasat sonrası greyfurt meyvelerine 62 °C sıcak su püskürtülmesi sonucunda, kitinaz proteini sentezinde artış olduğunu ve ek olarak yeşil küf (*Penicillium digitatum*)'e direncin arttığını ortaya

koymuşlardır. Greyfurt meyvesinde yapılan bu çalışmada, sentezi artan kitinaz proteinin hangi sınıfta yer aldığı bilinmemektedir. ABA, NaCl ve kuraklık uygulamaları ile biberde yaprak ve özellikle sap dokularında sınıf II kitinaz geninin anlatımının fazla miktarda arttığı bulunmuştur (Hong ve Hwang, 2002).

Bitkilerin orta sıcaklık stresine maruz kalmaları veya sıcaklığın, öldürücü yüksek sıcaklığa kademeli olarak artması durumunda, öldürücü yüksek sıcaklıklara sıcaklık toleransı (thermotolerans) kazandıkları bilinmektedir. Etil metansulfonat (EMS) mutasyonu uygulayarak, *Arabidopsis thaliana*'da *hot1*, *hot2*, *hot3* ve *hot4* olarak adlandırılan 4 adet sıcaklık toleransından yoksun mutant belirlenmiştir (Hong ve Vierling, 2000). *Arabidopsis hot2* mutanti sıcaklık toleransı yoksunluğu göstermesine rağmen, sıcaklık stresi koşullarında *hot2* mutantında küçük sıcak şok proteinlerinin (sHSPs) ve sıcak şok proteini 101'in (HSP101) seviyeleri normal düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Hong ve ark., 2003). *Arabidopsis hot2* mutantının sıcaklık toleransı yoksunluğunun yanında tuz ve kuraklık streslerine de direncinin zayıf olduğu belirlenmiş ve *hot2* lokusundaki genin, kitinaz 19 ailesinin üyeleri ile yüksek homoloji gösteren bir proteini kodladığı bulunmuştur (Kwon ve ark., 2007). Aynı çalışmada, belirlenen kitinaz proteinin (ATCTL1) orta sıcaklık stresi (38 °C) koşullarında anlatımının değişmediğini ve kitinaz proteinin, yapısal özelliği sebebiyle sınıf II alt ailesine sınıflandırılabilceğini bildirmişlerdir. Orta sıcaklık stresi koşullarında kitinazın anlatımında değişimin olmadığı sonucu, pamukta elde edilen sonuçla benzerlik göstermektedir. Pamukta kitinaz II ile benzerlik gösteren HSGh23 cDNA'sı, orta sıcaklık stresinde az bir artış göstermiş, yüksek sıcaklık stresinde ise önemli ölçüde artmıştır.

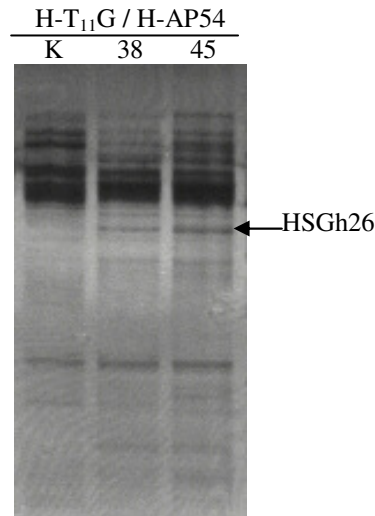
Bu çalışmanın sonucunda elde edilen HSGh23 cDNA'sı, hem sınıf II hem de sınıf I kitinaz-benzeri dizilerle benzerlik göstermiştir. N-terminal kitinaz bağlanma bölgesine sahip olmamaları ve diğer bazı bölgeler haricinde sınıf II kitinazlar yapısal olarak, sınıf I kitinazlara tam benzerlik göstermektedir. HSGh23'nin sınıf I ve sınıf II kitinaz ile homoloji göstermesinin nedeni, bu kitinazların yapısal olarak bir birine benzer olmalarıdır. HSGh23 cDNA'sı sınıf II

kitinaza, sınıf I kitinazdan çok daha yüksek benzerlik göstermiştir. Bu sonuç, HSGh23 cDNA'sının sınıf II kitinaz geninin bir parçası olduğunu güçlendirmektedir.

Bu araştırma sonucunda, pamuk yaprağında özellikle yüksek sıcaklık stresi koşullarında sınıf II kitinaz geninin aktif duruma geçtiği belirlenmiştir. Farklı araştırmacıların çalışmaları sonucunda, sınıf II kitinaz geninin bitkilerde çeşitli abiyotik stres koşullarında tetiklendiği belirtilmiştir. Ancak sınıf II kitinazın sıcaklık stresi ile ilişkisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu çalışma ile pamukta sınıf II kitinaz benzeri HSGh23'ün anlatımının, özellikle yüksek sıcaklık stresi koşullarında arttığı bulunmuş olması, pamuktaki sınıf II kitinazın yüksek sıcaklık stresine cevapta görev almış olabileceğini ortaya koyan yeni bir bulgu özelliğindedir.

4.7.3. HSGh26 cDNA'sı

Çalışma kapsamında, HSGh26 cDNA'sının transkripsiyonu sıcaklık stresi koşullarında tetiklenmiş ve 45 °C sıcaklıkta en üst düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.18). Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh26 cDNA'sı, tiamin biyosentetik enzime benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonuna (ES798066.1) E = 0.0 düzeyinde, % 99 ve *Arabidopsis thaliana* tiyazol biyosentetik enzimine (NM_124258.2) E=2e-81 düzeyinde, % 78 homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.18. HSGh26'nın farklılık gösterim jel görüntüsü

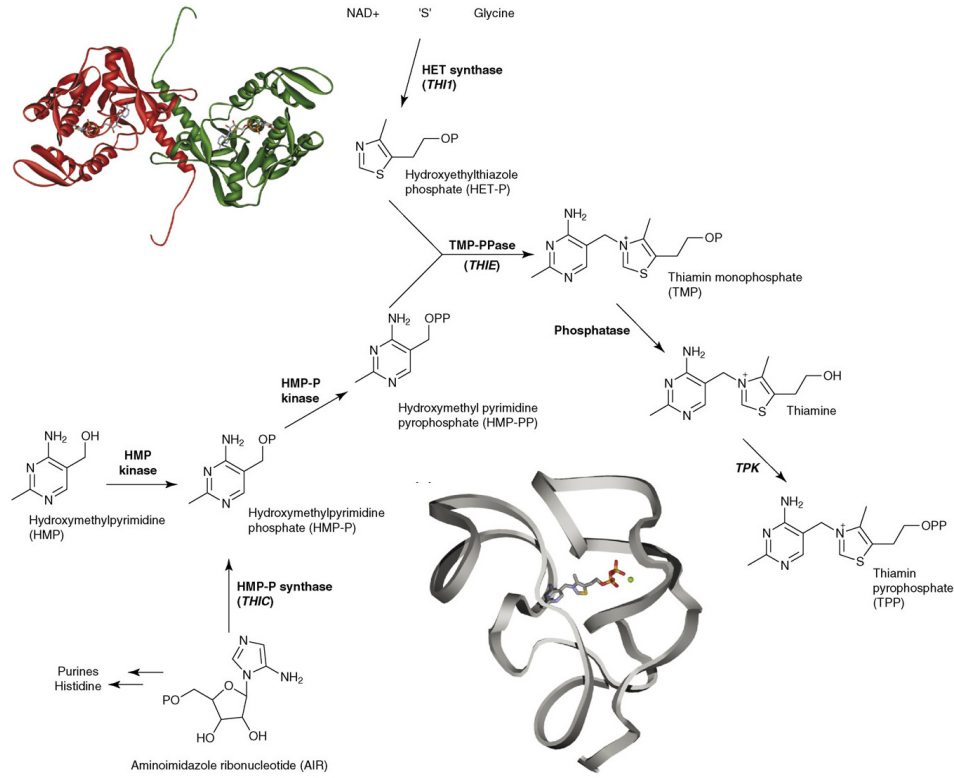
Tiyazol biyosentetik enzimi (THI1 proteini), karbon metabolik enzimlerin işlevi için gerekli olan tiamin kofaktörünün biyosentezinde (Şekil 4.19) yer almaktadır (Smith ve ark., 2007). Tiamin pirofosfat (TPP), B1 vitamininin aktif formudur ve karbon metabolizmasında yer alan temel enzimlerin anahtar kofaktörüdür. Bitkilerde thi1 geni ile ilişkili ilk cDNA, mısırdan izole edilmiş ve mısırın embriyo gelişimi süresince thi1 geninin transkript miktarında artış olduğu belirtilmiştir (Belanger ve ark., 1995). thi1 geninin moleküler karakterizasyon çalışmaları, bu genin tek kopyalı kromozomal bir gen olduğunu ve 1.3 kb uzunluğunda bir transkript kodladığını ortaya koymuştur (Chabregas ve ark., 2001). THI1 proteini, transkripsiyon sonrası mekanizmalar ile hem mitokondriye hem de kloroplasta taşınmaktadır (Chabregas ve ark., 2001; Chabregas ve ark., 2003).

Tiamin sentezi aynı zamanda çevresel koşullara cevap olarak ortaya çıkmaktadır. Işık koşulları, tuz stresi, yetersiz oksijen stresi, aşırı su stresi ve şekerli suni besi ortamında bitkilerde tiamin geninin anlatımı artmaktadır (Ribeiro ve ark., 2005). Ayrıca thi1 geninin promotör bölgesinde absisik asit cevap element (ABRE) motifi bulunmuştur (Ribeiro ve ark. 2005). Bu motif sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk stresine tepki olarak oluşan absisik asit (ABA) ile ilişkili cevap mekanizmasında yer alan genlerde bulunmaktadır.

Bunlara ilave olarak, THI1 proteininin DNA zararlanmasına tolerans sağladığı (Machado ve ark., 1996) ve O_2^- veya OH^- 'in zararlı etkisini ortadan kaldırarak, doğrudan antioksidan etkisinin olduğu (Jung ve Kim 2003) bilinmektedir.

Pamuğa uygulanan sıcaklık stresi ile HSGh26 cDNA'sının anlatımında önemli bir artış olmuştur. HSGh26'nın thi1 ile yüksek benzerlik göstermesi ve abiyotik stres koşullarında tiamin geninin anlatımının artmasına benzer olarak HSGh26'nın anlatımında da artış olması, HSGh26'nın thi1 genin bir parçası olma olasılığını güçlendirmektedir. Elde edilen bu bulgulara göre, pamukta sıcaklık stresıyla transkripsiyonu artan HSGh26'nın, oluşan oksidatif stres zararının

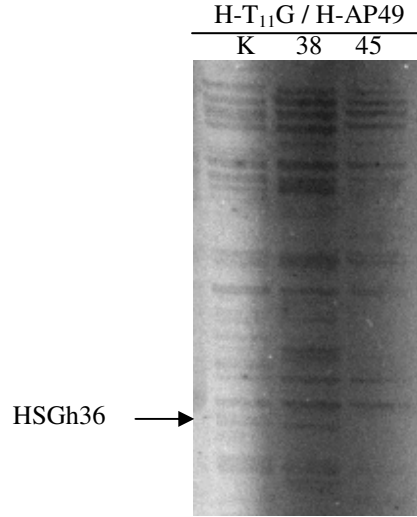
azaltılmasında ve ABA ile ilişkili savunma mekanizmasında rol almış olabileceği varsayılmaktadır.



Şekil 4.19. Tiamin biyosentezi (Smith ve ark., 2007)

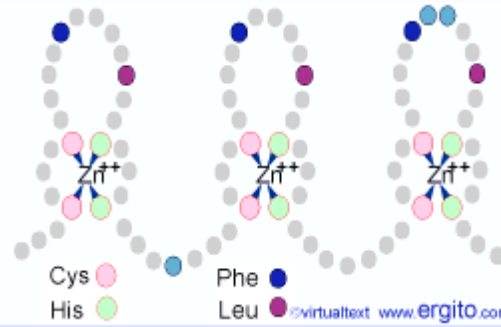
4.7.4. HSGh36 cDNA'sı

Yapılan *farklılık gösterim* çalışmaları sonucunda, HSGh36'nın orta sıcaklık stresinde transkripsiyonunun değişmediği ancak, yüksek sıcaklık stresi ile baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 4.20). Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh36, *G. hirsutum* cDNA klonu (DW505766.1) ile 9e-93 düzeyinde % 98 benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.2). GenBank'tan DW505766.1 klonunun baz dizisi alınmış ve blastx programı kullanılarak yapılan homoloji taraması sonucunda, RING parmak çinko parmak (RING finger Zn finger) proteinine E = 2e-24 seviyesinde ve % 62 oranında benzer ve benzerlik gösteren RING parmağın ise C3HC4 tipi yapısında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20. HSGh36'nın farklılık gösterim jel görüntüsü

Çinko parmak proteinleri, genel olarak proteinlere bağlanma ve çinko bağlama işlevlerine sahiptir. Proteine bağlanma işlevi olarak, bir protein veya protein kompleksiyle, çinko bağlama işlevi olarak ise çinko iyonları ile etkileşime geçmektedirler. Çinko parmak adını, proteinde çinko iyonuna bağlanan korunmuş amino asit grubunun oluşturduğu protein bölgesinin yapısından almaktadır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Çinko parmak motifinin yapısı (Lewin, 2004)

Transkripsiyon, replikasyon ve restriksiyon gibi hücre içerisinde meydana gelen temel işlemlerin çoğunda, protein-DNA interaksyonları yer almaktadır. Bu işlevsel ihtiyaçları karşılamak için spesifik ve spesifik olmayan DNA etkileşimlerini sağlayan birçok protein dizisi ve/veya yapısal motifler bulunmaktadır. DNA'ya bağlanma aktivitesi gösteren ve çinkoya ihtiyaç duyan

katlanma bölgesi yapısına sahip çinko parmaklar (zing fingers), protein-DNA etkileşiminde yer alan motiflerdendir (Lovering ve ark., 1993).

Çinko parmak proteinleri, tipik olarak çinko parmak serisine sahiptirler (Şekil 4.21). Çinko parmak protein motifleri adlarını çinko bağlama yerlerinde çukıntı oluşturan amino asit ilmiğinden almaktadır. Örnek olarak, çinko iyonu ile bağ oluşturan 2 sistein ve 2 histidin amino asitlerinin oluşturduğu parmağa C2H2 tipi (2 sistein, 2 histidin) çinko parmak denilmektedir. Çinko parmak, DNA'ya bağlanan proteinlerde yaygın bulunan bir motiftir (Lewin, 2004). Bir çinko parmak proteinine ilgili bir etkileyici bölgenin eklenmesi ile güçlü transkripsiyon arttırıcılar ve baskılayıcılar meydana gelmektedir.

Sıcaklık stresi uygulanmış pamuktan elde edilen HSGh36 cDNA'sı, C3HC4-tip RING parmak çinko parmak proteinine benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DW505766.1) ile homoloji göstermiştir. Arabidopsis genomunda en çok bulunan bölgelerden birisi RING parmak bölgesidir (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). RING parmak bölgesinin, C3HC4-tip ve C3H2C3-tip olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (Kosarev ve ark., 2002).

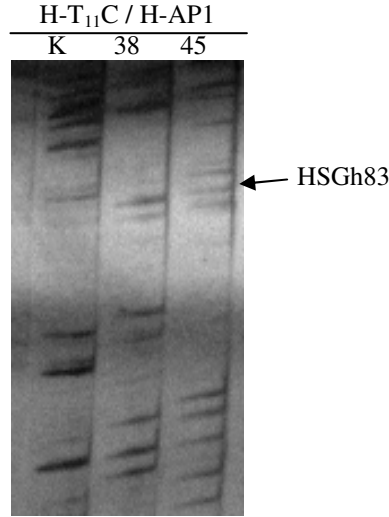
RING parmak motiflerinin, çinko-bağımlı DNA'ya bağlanma bölgeleri özelliğinde olduğu belirlenmiştir (Lovering ve ark., 1993). RING parmak motifinin DNA'ya bağlanma bölgeleri içermesi nedeniyle, bu motife sahip proteinler olasılıkla DNA'ya bağlanmaktadır. Genel olarak, DNA'ya bağlanma bölgeleri içeren proteinler gen anlatımının düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve DNA tamirinde görev almaktadırlar. RING parmak proteinlerinin klasik çinko parmak proteinlerinden ayrı olarak transkripsiyon, translasyon, RNA nakli, sinyal iletimi, protein komplekslerinin oluşturulması ve protein parçalama gibi birçok biyolojik işlem ve biyokimyasal aktiviteyle ilişkisi olduğu belirtilmektedir (Borden, 2000; Kentsis ve ark., 2001; Kosarev ve ark., 2002).

RING parmak proteinlerinin belirtilen geniş işlevleri nedeniyle, belirlenen RING parmak motifi içeren nükleotid dizisini kodlayan genin anlatımının, orta

sıcaklık stresinde değişmeyip, yüksek sıcaklık stresinde baskılanmasının nedenleri bu çalışma kapsamında kesin olarak söylenemez. Bu konunun aydınlatılabilmesi için HSGh36 cDNA'sının tam uzunluktaki dizisinin oluşturularak yapısının belirlenmesi ve daha sonra işlevsel genomik çalışmaları ile moleküler işlevinin belirlenmesi gerekmektedir.

4.7.5. HSGh83 cDNA'sı

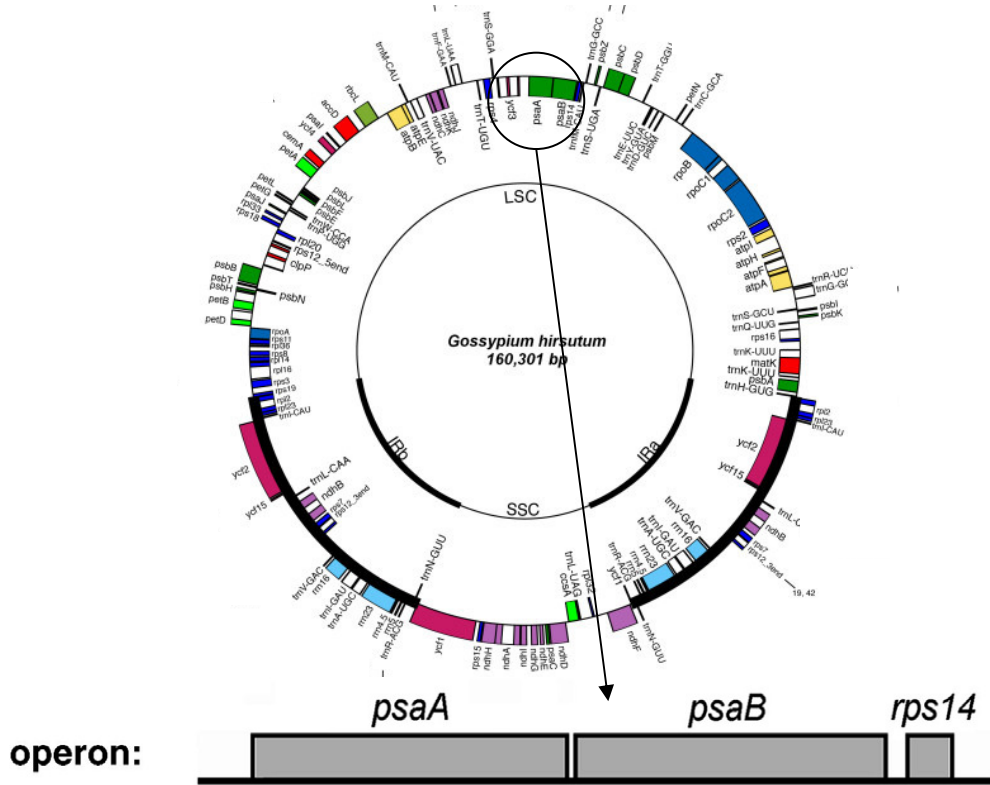
Farklılık gösterim çalışmalarının poliakrilamid jel analizi sonucunda, kontrol pamuklarda HSGh83'e ait çok zayıf sinyal gözlenmiş, buna karşın 38 °C ve 45 °C sıcaklığa maruz bırakılmış pamuk bitkilerinde HSGh83'e ait sinyalin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Elde edilen bu sonuçlar ile sıcaklık stresi koşullarındaki pamukta HSGh83 ile ilişkili genin anlatımının önemli seviyede arttığı söylenebilir. Pamukta HSGh83'ün gen anlatımı, özellikle orta sıcaklık stresinde çok yükselmiş, 45 °C'de kontrole göre yüksek olmuş ancak, 38 °C koşullarına göre biraz azalmıştır. Homoloji taramaları sonucunda HSGh83, *G. hirsutum* kloroplast genomu (DQ345959.1) ile $E = 1e-92$ düzeyinde, % 98 ve *G. hirsutum* CM037C06 cDNA klonu (DR455725.1) ile $E = 8e-93$ düzeyinde % 98 benzerlik göstermiştir. HSGh83'ün uçtan uca hemen hemen tüm dizisi, *G. hirsutum* kloroplast genomunun 39 369. nükleotidden, 39 565. nükleotide kadar olan bölgesi ile benzerlik göstermiştir. Buna ilave olarak, CM037C06 klonunun baz dizisi gen bankasından alınmış ve blastn analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda CM037C06 klonu, *G. hirsutum* kloroplast genomunun 39 040 – 39 628 baz bölgesi ile $E = 0.0$ düzeyinde, % 99 benzerlik göstermiştir. *G. hirsutum* kloroplast genomunun 39 532 – 41 736 baz bölgesinde psA geni, 39 101 – 39 403 baz bölgesinde ise rps14 geni yer almaktadır. Elde edilen bu bilgiler ışığında, pamuk HSGh83 cDNA'sının kloroplast psA/psB/rps14 operonunun bir parçası olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.22. HSGh83'ün farklılık gösterim jel görüntüsü

psaB ve rps14 genleri, bitkilerin kloroplast genomunda yer alan psaA-psaB-rps14 operonunun parçalarıdır (Şekil 4.23). psaA, psaB ve rps14 genleri diğer bitkilerde olduğu gibi pamuk kloroplast genomunda da ardı sıra ve operon dizi olarak yerleşmişlerdir (Chen ve ark., 1990; Lee ve ark., 2006a). Kloroplast genomunda yer alan psaA ve psaB genleri bir arada transkripsiyona uğramaktadırlar (Fish ve ark., 1985; Chen ve ark., 1992). psaA-psaB-rps14 operonunun transkripsiyonu, psaA geninin önünde bulunan ve her üç gen için ortak olan bir promotör tarafından başlatılmaktadır. Bu çalışmada pamuktan elde edilen, sıcaklık stresinde transkripsiyonu artan HSGh83 cDNA'sının psaB ve rps14'ün mRNA dizilerini içeriyor olması, bu operondaki genlerin birlikte transkripsiyona uğradıklarını belirten literatür bilgileriyle uyum içerisindedir.

psaA ve psaB genleri fotosistem I (PSI) reaksiyon merkezinin P700 klorofil a protein kompleksinde yer alan PsaA ve PsaB apoproteinlerini kodlamaktadırlar. rps14 geni ise ribozomal protein S14'ü kodlamaktadır. PSI tilakoid zara yerleşmiş bir protein kompleksi olup, fotosentezdeki plastosiyaninden ferrodoksin'e elektron transferi aşamasına aracılık etmek için ışık enerjisini kullanmaktadır.



Şekil 4.23. *Gossypium hirsutum* kloroplast genomu (Lee ve ark., 2006a) ve *psaA/psaB/rps14* operonu

Bitkinin farklı gelişim evrelerinde ve çevresel sinyallere cevap olarak plastid mRNA seviyesi artış göstermektedir. Bitki gelişiminin ışık ve karanlık evrelerinde birçok plastid geninin transkripsiyonu değişmektedir (Mayfield ve ark., 1995). Domateste, aralarında *psaA*'nın da bulunduğu fotosentetik genlerin transkripsiyonu sabah erken saatlerinde artış göstermekte, öğleden sonra ise azalmaktadır (Piechulla ve Grussem 1987). Karanlık koşullarda arpada *psaA* ve *psaB* genlerinin transkripsiyon seviyesi artmaktadır (Kreus ve ark., 1986).

PSI tarafından emilen 650 nm dalga boyu ışıkta yetişen bezelye bitkisinde, *psaB* geninin transkripsiyonu kontrole göre % 45 azalmış, PII tarafından emilen 560 nm dalga boyunda yetişen bezelyede ise *psaB* genin transkripsiyonu kontrole göre % 119 artmıştır. *psaB* gen transkripsiyonu değişen çevre koşullarına hızlı biçimde tepki vermektedir (Tullberg ve ark., 2000). Bu çalışmanın sonucunda PSI için uygun olmayan koşullarda, *psaB* gen anlatımının arttığı ortaya çıkmaktadır.

PsaA ve PsaB proteinleri PSI'in en büyük alt ünitelerini oluşturmalarına rağmen hassas bir yapıya sahiptirler. PsaA veya PsaB alt ünitelerinin herhangi birinde oluşan bir aksaklık, PSI aktivitesinin ortadan kalkmasına ve kompleks içerisinde yer alan diğer alt ünitelerin hızlı bir şekilde parçalanmasına sebep olmaktadır (Smart ve ark., 1991; Smart ve ark., 1993; Redding ve ark., 1999).

Çevresel değişimlere karşı psaB geninin, buna paralel olarak psaA ve rps14'ün transkripsiyonunun hızlı biçimde değiştiği bilinmektedir. Bu değişim genel olarak transkripsiyon artışı olarak gerçekleşmektedir. Çevresel değişiklikler sonucu psaA-psaB-rbs14 operonunda meydana gelen transkripsiyon artışının nedeni olarak, zarar gören PsaA ve PsaB proteinlerinin yerine yenilerinin sentezlenmesi varsayılabilir.

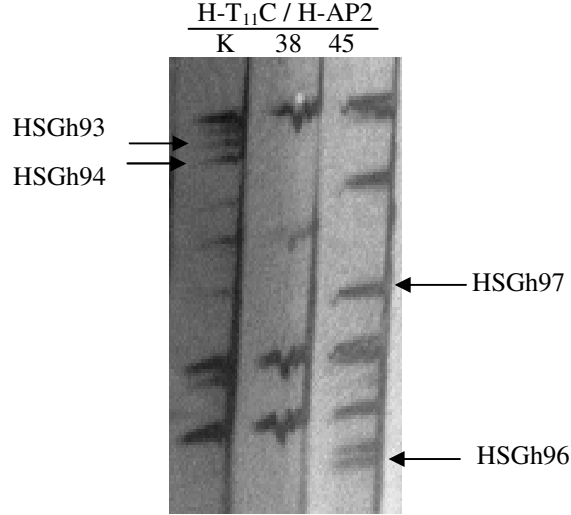
Pamuğun sıcaklık stresi koşullarında psaB ve rps14 benzeri HSGh83'ün transkripsiyonunun artması sonucunda, HSGh83 cDNA'sının sıcaklık stresi ile zarar gören PSI'in yenilenmesi mekanizmasında yer almış olabileceği düşünülmektedir. Bunun daha kesin söylenebilmesi için bu konuda ayrıntılı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

4.7.6. HSGh93 ve HSGh94 cDNA'ları

HSGh93 ve HSGh94, sırasıyla 459 ve 458 baz uzunluğundadırlar. cDNA kümeleme analizi sonucunda, HSGh93 ve HSGh94 aynı kümede yer almışlardır. Kümeleme analizi, bu iki cDNA'nın baştan sona tüm baz bölgesinin % 100 benzerlik gösterdiği sonucunu vermiştir. Her iki cDNA bir birine % 100 benzerlik göstermesine rağmen, HSGh93'ün 139. sırasında yer alan "G" bazı yerine HSGh94'te, "A" bazı yer almış ve HSGh93'ün 260. sırasında yer alan "G" bazı, HSGh94'te delesyona uğramıştır.

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, HSGh93 ve HSGh94'ün her ikisi aynı transkripsiyon modelini göstermiş ve sıcaklık stresi koşullarında anlatımları baskılanmıştır (Şekil 4.24). Homoloji taramaları sonucunda HSGh93 ve HSGh94'ün her ikisi, MPR3'e benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu

(DT462800.1) ile E = 0.0 seviyesinde, % 99 ve *Gossypium barbadense* MRP-benzeri ABC taşıyıcı protein (DQ359122.1) ile E = 2e-151 düzeyinde, % 94 homoloji göstermiştir.



Şekil 4.24. HSGh93, 94, 96 ve 97'nin farklılık gösterim jel görüntüsü

HSGh93 ve HSGh94'ün tam benzerlik gösterdiği DT462800.1 *G. hirsutum* klonunun UniGene bağlantısında, adı geçen klonun ABC protein 5'e orta düzeyde benzer olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma kapsamında DT462800.1 klonunun baz dizisinin blastn ve blastx programları ile homoloji araştırması yapılmış ve sonuç olarak, DT462800.1 cDNA klonun ATMRP3 proteinine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Buna ilave olarak, blastn ve blastx programları kullanılarak *Gossypium barbadense* MRP-benzeri ABC transporter proteine ait nükleotid dizisinin de homoloji araştırması yapılmış ve yüksek oranda ATMRP3 proteini ile homolojisinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu araştırmalar sonucunda, HSGh93 ve HSGh94 cDNA klonlarının yüksek ihtimalle MRP3 proteinine benzer olduğu söylenebilir.

ABC protein ailesine ait aynı genlerin adlandırılmasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu çalışmada, Verrier ve ark., (2008)'in ABC gen isimlerindeki farklılıkları ortadan kaldırmak için henüz geliştirdikleri yeni adlandırma sistemi

tercih edilmiştir. Bu bağlamda doktora tezinde, ABC protein ailesinin, MRP alt ailesi için ABCC, MRP3 için ABCC3 adları kullanılmıştır.

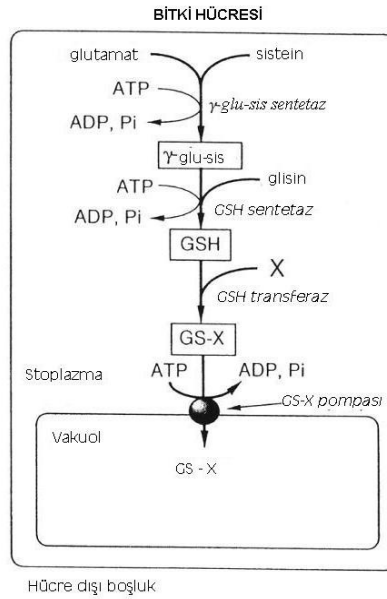
ATP-bağlanma kaset (ABC) protein üst ailesi, bilinen en büyük protein ailesidir. ABC proteinlerinin çoğu, membrandan geçen maddelerin taşınmasında görev alan membran proteinleridir ve bu özellikteki proteinlere ABC taşıyıcıları (ABC transporters) denilmektedir (Sánchez-Fernández ve ark., 2001). ABC taşıyıcıları bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunmaktadır. ABC genlerinin çoğu membrana-bağlanan proteinleri kodlarlar ve sentezlenen bu proteinler çok geniş aralıktaki molekülün membrandan geçirilerek naklini sağlarlar. ABC proteinleri, stoplazma temel alınarak molekülleri nakletme yönüne bağlı olarak içeri alıcılar ve dışarı aktarıcılar olarak sınıflandırılmaktadırlar. ABC proteinleri, hormonları, lipitleri, metalleri, ikincil (sekonder) metabolitleri ve ksenobiyotikleri nakletmelerinin yanında, bitki-patojen ilişkisine ve iyon kanallarının değişikliklere uyum sağlamasına katkıda bulunmaktadır (Verrier ve ark., 2008).

İşlevsel ABC taşıyıcıları, tipik olarak iki transmembran bölgesi (TMDs) ve iki nükleotid-bağlanma katlanmaları (NBFs)'ndan oluşmaktadır. Ökaryotik organizmalarda, bu dört bölge (domain) genellikle tek bir polipeptitte yerleşmiş olup, tam boyutlu bir taşıyıcıyı oluştururlar. Bununla birlikte ökaryotik genlerin bazıları her bir peptitte bir NBF ve bir TMD içeren yarım boyutlu taşıyıcıları kodlamaktadırlar (Higgins, 1992).

Arabidopsis tam boyutlu ABC taşıyıcılarının en büyük ikinci alt ailesi ABCC'lerdir [MRP (Multidrug Related Protein)] ve ABCC ailesinin 15 üyesi bulunmaktadır. ABCC proteinleri en az 1 500 amino asitten oluşmakta ve genellikle diğer ABC proteinlerine ilave olarak bu alt aileye özgü 3 yapı içermektedirler. *Arabidopsis*'ten klonlanan ve ABCC homologları olan AtABCC1, AtABCC2 ve AtABCC3 genleri, glutatyon sülfid – X (GS-X) pompalarını kodlamaktadırlar. Ancak, bu genlerin kodladıkları pompaların, GS ile birleşen maddeler dışındaki diğer maddeleri de nakledebilmeleri sebebiyle, GS-X

pompaları dışında farklı bir pompalama proteini olabilecekleri de düşünülmektedir. ABCC3, ABCC4 ve ABCC5'in, dairesel (cyclic) nükleotidleri ve folat türevlerini de taşıdıkları belirtilmektedir (Sánchez-Fernández ve ark., 2001).

AtABCC3, vakuol membranına yerleşmiş (Dunkley ve ark., 2006) bir protein olup, genel işlevinin makromoleküller, küçük moleküller ve iyonlar gibi maddelerin hücre içine veya dışına taşınmasını sağlamak olduğu bilinmektedir (Şekil 4.25). AtABCC3, ayrıca moleküler olarak, glutatyon ile birleşmiş maddelerin ve klorofil yıkım ürününün membrandan geçmesine aracılık etmektedir. Özet olarak, AtABCC3 farklı sınıf maddelerin membrandan naklini sağlamaktadır (Tommasini ve ark., 1998).



Şekil 4.25. GS-X pompasının işlevi (Toshihisa ve ark., 1997)

Bitki ABC taşıyıcılarının, çeşitli bileşiklerin vakuole aktarılarak hapsedilmesi ve zehirli bileşikleri hücre dışına naklederek zehir etkisini giderici özelliği olduğu belirlenmiştir (Rea ve ark., 1998; Theodoulou, 2000; Jasinski ve ark., 2001; Martinoia ve ark., 2002). Bununla birlikte, bitki ABC proteinin işlevi sadece zehir giderici özelliği ile sınırlı değildir. Bitki büyümesi ve gelişiminde, metabolitlerin nakledilmesinde, kızıl-ötesi ışığa tepki, stomaların hareketi, oksin

taşınması, stoplazmik Fe/S proteinlerinin olgunlaşması ve tohum çimlenmesi işlemlerinde görev almaktadır (Sidler ve ark., 1998; Debeaujon ve ark., 2001; Gaedeke ve ark., 2001; Kushnir ve ark., 2001; Møller ve ark., 2001; Noh ve ark., 2001; Footitt ve ark., 2002). ABC proteinleri üzerine yapılan çalışmaların artmasına rağmen, çoğu bitki ABC proteinin işlevi bilinmemektedir (Zhu ve ark., 2003).

Arabidopsis ABCC3 taşıyıcı geninin, abiyotik stres koşullarındaki regülasyonu ile ilgili bilgilere, AtGenExpress birliğinin (konsorsiyum) sağladığı mikrodizilim (microarray) verilerinden (Anonymous, 2008b) ulaşılmıştır. AtGenExpress mikrodizilim verilerine göre, ABCC3'ün regülasyonu tuz stresinde ve kızılötesi ışık uygulamalarında azalmış, demir eksikliği ve CO₂ uygulamalarında ise artmıştır. Bunlara ilave olarak, bu çalışma kapsamında yapılan *in silico* mikrodizilim analizi sonucunda, sıcaklık stresi uygulanan *Arabidopsis*'te ABCC3 gen sinyalinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada pamuğa uygulanan sıcaklık stresi sonucunda, ABCC3-benzeri cDNA'ların transkripsiyonunun baskılandığı belirlenmiştir. Dolaylı olarak, sıcaklık stresinin GS-X pompalarının sentezini olumsuz etkilemiş olabileceği söylenebilir. ABCC3'ün sıcaklık stresi koşullarındaki davranışı ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak bu konunun aydınlatılması gerekmektedir.

4.7.7. HSGh96 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmalarının poliakrilamid jel analizi sonucunda, HSGh96 cDNA'sının sadece 45 °C sıcaklığa maruz bırakılmış pamuk bitkilerinde sinyal verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Elde edilen bu sonuçla, pamukta HSGh96'nın transkripsiyonunun yüksek sıcaklık stresi koşullarında başladığı söylenebilir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh96, *G. arboreum* cDNA'sıyla (BM359757.1) $E = 2e-135$ düzeyinde % 99, *G. hirsutum* cDNA'sıyla (ES820596.1) $E = 2e-123$ düzeyinde % 100 ve *G. raimondii* cDNA'sıyla (CO088038.1) $E = 5e-111$ düzeyinde % 97 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. UniGene veritabanında, *G. hirsutum* cDNA'sının (ES820596.1) CBL-etkileşimli

protein kinaz 6'ya (CBL-interacting protein kinase 6) orta düzeyde benzer olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışma kapsamında, *G. hirsutum* cDNA'sının (ES820596.1) nükleotid dizisi gen bankasından alınmış ve blastx programı kullanılarak homoloji analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda *G. hirsutum* cDNA'sının (ES820596.1), *Populus trichocarpa* CBL-etkileşimli protein kinaz 9 ile $E = 6e-60$, *Populus trichocarpa* CBL-etkileşimli protein kinaz 8 ve CBL-etkileşimli protein kinaz 7 ile $E = 9e-58$, *Glycine max* SOS2-benzeri protein kinaz ile $E = 9e-49$ ve *Arabidopsis thaliana* CIPK6 (CBL-interacting protein kinase 6) ile $E = 8e-44$ düzeyinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Pamuk HSGh96'nın daha çok CBL-etkileşimli protein kinaz 9 ile benzerlik göstermesine rağmen elde edilen bu bilgiler ışığında, HSGh96'nın CIPK9 olduğu kesin olarak söylenemez. Ancak, CIPK ailesinin bir üyesi olma ihtimali yüksektir.

CIPK9 geni, SOS2 ile benzerlik gösteren CBL-etkileşimli protein kinazı kodlamaktadır. CIPK9 geni, SNRK3.12 ve SNF-ilişkili protein kinaz 3.12 gibi farklı isimlerle de adlandırılmaktadır.

CIPK9 temel olarak, protein fosforilasyonu ve sinyal iletiminde görev almaktadır. CIPK (SNRK veya SNF-ilişkili protein kinaz), bitkilerden önce hayvanlarda ve mayada (*S. cerevisiae*) bulunmuştur. CIPK'nin, maya'daki homoloğu SNF1 (Sucrose nonfermenting-1) protein kinaz, hayvanlardaki homoloğu ise AMPK (AMP'nin aktive ettiği protein kinaz)'dir. Mayadaki SNF1, başka genlerin anlatımını engelleyen glikozun baskılayıcı işlevini engellemede rol olarak, suskun genlerin transkripsiyona başlamasına yardımcı olmaktadır (Hardie, 1999). Sıcak şokunun da içinde bulunduğu stres koşullarında, hücrelerde ATP tükenirken AMP miktarında artış meydana gelmektedir. AMP ile aktive olan AMPK, belirli biyosentetik enzimleri fosforilize ederek işlevlerini engelleme suretiyle ATP'leri korumakta ve aynı zamanda, alternatif katabolik yolları çalıştırarak daha fazla ATP üretimine katkı sağlamaktadır. SNF1 ve AMPK sistemlerinde paralellik olmasına rağmen SNF1, AMP tarafından aktive

edilmemektedir. Bitkilerde bulunan CIPK (SNRK veya SNF-ilişkili protein kinaz)'lar da SNF ile aynı şekilde, AMP tarafından aktive olmamaktadırlar (Hardie, 1999).

Canlıların gelişiminin ve hayatta kalmasının önemli etkenlerinden birisi, enerji dengesinin kontrol altında tutulmasıdır. SNF1/AMPK/CIPK (SnRK) protein kinazlar, enerji dengesinin kontrolünde önemli bir rol oynayabilmektedirler. Mayanın fermentatif metabolizmadan aerobik metabolizmaya geçişinde, SNF1'in anahtar role sahip olduğu, benzer şekilde AMPK'nın, stres koşullarında alternatif fizyolojik yolları (pathways) başlatarak daha fazla ATP üretilmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Buna karşın, bu kinazların bitkilerdeki homologlarının işlevi hakkında az şey bilinmektedir. Bazı verilerin, bitki CIPK (SnRK)'larının büyümeyi optimize etmek için karbonhidrat ve nitrat metabolizmasına katıldıklarını desteklediği belirtilmektedir (Polge ve Thomas, 2007).

Birçok biyotik ve abiyotik stres etkeni, bitki hücrelerinde Ca^{+2} konsantrasyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Kalsinörin B-benzeri (calcineurin B-like: CBL) protein ailesi, Ca^{+2} 'yi algılayıcı proteinler içerisinde yer almaktadır. CBL proteininin, bitkilerde Ca^{+2} 'ye bağımlı farklı işlemlerde kritik işleve sahip olduğu belirtilmektedir (Cheong ve ark., 2007). CBL proteini, hücrede Ca^{+2} değişikliğini algılamakta ve bu sinyalleri, fosforilasyon şelaleleri ve gen anlatımının düzenlenmesi gibi alt basamaktaki cevaplara iletmektedir. Bu özellikleri sebebiyle CBL proteini, Ca^{+2} algılayıcı iletişim aracı olarak sınıflandırılmaktadır (Batistic ve Kulda, 2004).

Serin/treonin protein kinaz grubuna dahil olan ve bitkilerde en az 25 üyesi bulunan CIPK (Kolukisaoglu ve ark., 2004), bitkilerin birçok strese cevabına aracılık eden CBL proteini ile etkileşime girmektedir (Cheong ve ark., 2007). Bu güne kadar yapılan çalışmalar ışığında CIPK'nin moleküler işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Genel olarak, stres koşullarında bitkilerin, CIPK ailesinin üyelerine ihtiyaç duyduğu söylenebilir. Bitkilerde CIPK gen ailesinin üyeleri, farklı şekilde anlatım göstermektedirler. *Arabidopsis thaliana*'da CIPK9

geni, kök haricinde hemen hemen tüm dokularda anlatım yapmakta ve ABA uygulamasıyla anlatımında büyük ölçüde artış olmaktadır. Buna karşın, NaCl ile kuraklık stresinde ise CIPK9 geninin anlatımında az artış olmaktadır (Gong ve ark., 2002a). Düşük potasyum (K) düzeyinde, *Arabidopsis thaliana*'da CIPK9'un kritik bir düzenleyici olarak rol aldığı ve potasyum eksikliği toleransı için bu protein kinaza ihtiyaç olduğu belirlenmiştir (Pandey ve ark., 2007). CIPK8 geninin ise CIPK9'dan farklı olarak kökte anlatım yaptığı ve transkripsiyon düzeyinin, uygulanan stres etmenlerinden etkilenmediği belirlenmiştir (Gong ve ark., 2002b). Oksidatif stres koşullarında, *Nicotina tabacum* yapraklarında CIPK23 geninin anlatımı artmaktadır (Vranova ve ark., 2002b). SnRK2.8 *Arabidopsis thaliana*'da ozmotik stresle aktive olmakta ve kuraklık toleransını artırmaktadır (Umezawa ve ark., 2004). Soğuk, NaCl stresi, ABA uygulaması, kuraklık ve yaralanma ile *Arabidopsis*'te CIPK3'ün transkripsiyonunun arttığı ve hem ABA hem de stresle tetiklenen kalsiyum sinyali ile hücredeki gen anlatımı arasında moleküler bir köprü olarak görev aldığı ortaya konulmuştur (Kim ve ark., 2003).

Bu çalışma kapsamında pamukta yüksek sıcaklık stresi koşullarında tespit edilen HSGh96 cDNA'sı, yüksek ihtimalle CIPK ailesine ait bir genin parçası olabilir. Bu bulgunun, işlevsel olarak hakkında az bilgi bulunan kalsinörin B-etkileşimli protein kinazların, sıcaklık stresindeki işlevlerinin belirlenmesine yönelik bir kapı açacağı öngörülmektedir.

4.7.8. HSGh97 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmalarının poliakrilamid jel analizi sonucunda, HSGh97 cDNA'sının kontrolde çok zayıf bir bant oluşturduğu, 38 °C'de sinyal oluşturmadığı, 45 °C sıcaklığa maruz bırakılmış pamuk bitkilerinde ise bant sinyalinin fazla miktarda arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Elde edilen bu sonuçla pamukta, HSGh97'nin transkripsiyonun 45 °C sıcaklık stresi koşullarında yüksek düzeye ulaştığı söylenebilir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh97, *G. barbadense* IAA-Ala hidrolaz olduğu varsayılan gen (AF517654.1) ile E = 5e-119 düzeyinde % 100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

İndol-3-asetik asit (IAA), bitkilerde doğal olarak en fazla miktarda bulunan oksindir. IAA, embriyogenezisten yaşlanmaya kadar bitki gelişiminin hemen hemen her aşamasında rol almaktadır. IAA, damar dokularının gelişimini, hücre uzaması ve uç (apikal) baskınlığını kontrol etmektedir. IAA hücrelerde ya serbest olarak ya da bağlanmış formda bulunmaktadır. IAA'nın aktif formu serbest IAA'dır. IAA'nın karboksil grubunun ester bağları aracılığıyla şekerlerle veya amid bağları vasıtasıyla amino asit ya da peptidlerle birleşmesi sonucu IAA'nın bağlanmış formu oluşmakta (LeClere ve ark., 2002) ve bu form IAA kojugantı olarak adlandırılmaktadır. Bu konjugatların oksinlerin depolanmasında, taşınmasında, bölümlere ayrılmasında, fazla IAA'nın zehir etkisinin giderilmesinde ve peroksidatif parçalanmalara karşı serbest IAA'ların korunmasında görev aldıkları belirtilmektedir (LeClere ve ark., 2002). Bitkiler aktif IAA'yı ya baştan sentezleyerek veya IAA konjugatlarını hidrolize ederek üretmektedirler. Bitkiler IAA konjugantları oluşturarak aktif IAA'ları baskılamakta, depolamakta ve gerektiğinde bu konjugatları hidrolize ederek ihtiyaç duydukları serbest IAA'yı üretmektedirler.

Bitkilerde IAA-Asp, IAA-Glu, IAA-Ala ve IAA-Leu olmak üzere birçok IAA-aminoasit konjugantı bulunmuştur (Anderson ve Sandberg, 1982, Cohen, 1982, Sonner ve Purves, 1985, Östin ve ark., 1992, Tam ve ark., 2000, Kowalczyk ve Sandberg, 2001). Bitkilerde, belirli IAA-aminoasit konjugatlarına özgü, belirli IAA-aminoasit hidrolazları bulunmaktadır. HSGh97 cDNA'sının benzerlik gösterdiği IAA-Ala hidrolaz (IAR3), IAA-Ala konjugantını hidrolize eden bir enzimdir. Buğdayda bulunan IAA-Ala hidrolazın, sadece IAA-Ala kojugantını hidrolize ettiği ve incelemeye alınan diğer IAA-aminoasit konjugatları ise hidrolize etmediği bildirilmiştir (Campanella ve ark., 2004). IAA-Ala hidrolaz, ILL5 ile homoloji gösteren IAR3 (IAA-Ala—resistant) geni tarafından kodlanmaktadır (Davies ve ark., 1999).

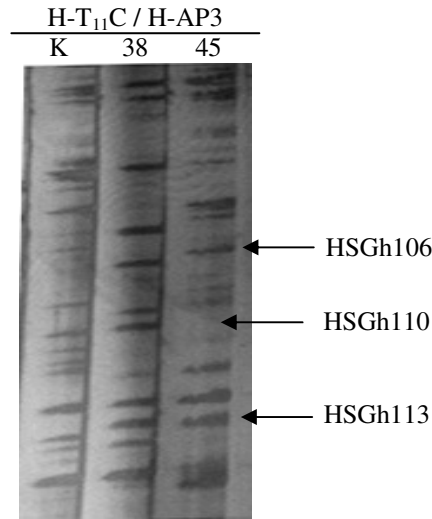
Bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda, IAR3 geninin bitkilerin tüm dokularında az veya çok anlatım yaptığı belirlenmiştir. Değişik şartlarda IAR'3 geninin transkripsiyonu farklılık gösterebilmektedir. Kök hastalık etmeni olan

Plasmodiophora brassicae ile bulaştırılan *Brassica rapa* bitkilerinde, IAR3 geninin ortoloğu Br – IAR'ın transkripsiyonunun düştüğü tespit edilmiştir (Schuller ve Ludwig-Müller, 2006). *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, yaralanma stresi sonucu belirlenen ve JR3 olarak adlandırılan bir cDNA klonu izole edilmiştir (Titarenko ve ark., 1997). Davies ve ark. (1999), IAR3 geni ile JR3 cDNA'sının nükleotid dizilerinin % 96 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Yaralanma stresi, jasmonik asit (JA) ve ABA uygulamaları sonucunda, Arabidopsis yaprak dokularında JR3 cDNA klonunun anlatımının arttığı belirlenmiştir (Titarenko ve ark., 1997). Aynı çalışmada, hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol bitkilerinin yapraklarında, JR3'ün transkripsiyonu ya hiç meydana gelmemiş ya da çok zayıf düzeyde gerçekleşmiştir.

Arabidopsis thaliana'da, IAR3 geninin abiyotik stres koşullarında transkripsiyon düzenlenmesinin nasıl gerçekleştiğini tespit etmek amacıyla, Genevstigator programı (Zimmermann ve ark., 2005) kullanılarak, Arabidopsis mikrodizilim (microarray) denemeleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, rozet dönemindeki *Arabidopsis*'te sıcaklık stresi koşullarında IAR3 genin sinyal oranının bitkinin yeşil aksamında – 0.56 oranında, çiçek ve harnup dönemindeki *Arabidopsis*'te ise – 3.26 oranında azaldığı, belirlenmiştir. Bununla birlikte, kuraklık stresi, ozmotik stres, oksidatif stres, tuz stresi ve yaralanma stresinde IAR3 genin anlatımının arttığı tespit edilmiştir. IAR3 gen anlatımının, özellikle abiyotik stres koşullarının uzaması durumunda arttığı sonucuna ulaşılmıştır. IAR3 benzeri HSGh97 cDNA'sı, kontrol pamuk bitkilerinde düşük düzeyde bant sinyali oluşturmuş, orta sıcaklık stresi koşullarında ise bant sinyali gözlenmemiştir. Bununla birlikte, yüksek sıcaklık stresinde IAR3 benzeri HSGh97'nin anlatımının yüksek düzeye çıktığı tespit edilmiştir. Pamukta sıcaklık stresi derecesinin artması ve süresinin uzaması koşullarında, IAR3 genine benzerlik gösteren HSGh97 cDNA'sının anlatımının arttığının belirlenmesi, *Arabidopsis*'te uzun süren abiyotik stres koşullarında, IAR3 geninin anlatımının artmasıyla paralellik göstermektedir.

4.7.9. HSGh106 cDNA'sı

Yapılan *farklılık gösterim* çalışmaları sonucunda, HSGh106 cDNA'sının transkripsiyonun 45 °C sıcaklık stresi koşullarında tetiklendiği belirlenmiştir (Şekil 4.26). Homoloji araştırmaları sonucunda, HSGh106 cDNA'sının, snRNP/Sm proteinine benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DW505510.1) ile $E = 7e-167$ düzeyinde, % 99 ve *Arabidopsis thaliana* snRNP/Sm proteinine ise $E = 1e-44$ düzeyinde % 79 homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.26. HSGh106, 110, 113'ün *farklılık gösterim* jel görüntüsü

snRNP geni, pre-mRNA'dan intron uzaklaştırma işleminde görev alan proteinleri kodlayan gen ailesinden birisidir. Çoğu ökaryotik genler intron içermektedirler ve mRNA'nın proteine çevrilmesinden önce, intronlar pre-mRNA'lardan uzaklaştırılmaktadır. İntronlar çekirdekte, RNA ve proteinlerden oluşan bir kırpma kompleksi (spliceosome) tarafından kesilip çıkarılmaktadır. Pre-mRNA'daki 5' ve 3' kırpılma bölgeleri ve dallanmış dizi, kırpma aygıtının bileşenleri tarafından tanınmaktadır. Kırpma kompleksi, her hangi bir reaksiyon gerçekleşmeden önce 5' ve 3' kırpılma bölgelerinin her ikisine beraber bağlanmaktadır. Kırpma işlemi, ancak tüm bileşenlerin bir araya gelmesinden sonra meydana gelmektedir. Kırpma kompleksi, farklı küçük çekirdeksel

ribonükleoprotein zerrelerinin (snRNP) bir araya gelmesinden meydana gelmektedir. snRNP'ler, kırpma kompleksinin (spliceosome) yapısında yer alan zerrecikler olarak tanımlanabilir. RNA-protein kompleksi olan U1, U2, U4, U5 ve U6 snRNP'leri (küçük çekirdeksel ribonükleoprotein zerreleri), kırpılma işleminde yer almaktadır. snRNP'ler, sahip oldukları RNA bileşenlerine göre adlandırılmaktadır. Örneğin; U1 snRNP, U1 küçük çekirdeksel RNA (snRNA) içermektedir. Her bir snRNP, sadece tek bir snRNA ve birçok protein içermektedir. snRNP'lerde yer alan proteinlerin bir kısmı doğrudan kırpılma işleminde yer alırken, diğer proteinlerin yapısal rolleri olabilir. Kırpılma işleminde yer alan proteinlerin yaklaşık 1/3'ünü, snRNP bileşenleri oluşturmaktadır. Böylece, çekirdeksel pre-mRNA kırpılma işlemi, çok dinamik bir işlem olup protein bileşenleri, snRNP'lerin birleşmesinde önemli düzenleyici bir role sahiptir (Kambach ve ark., 1999; Lewin, 2004).

snRNP protein anlatımının ve snRNP düzeyinin yükselmesinin, çekirdeksel bir organel olan Kajal cisimciğinin (Cajal body veya coiled body) oluşumunu attırdığı bildirilmektedir (Sleeman ve ark., 2001). Küçük bir çekirdek organeli olan Kajal cisimciğinin, hayvanlardan bitkilere kadar birçok organizmanın hücre çekirdeğinde bulunuyor olması, bu organelin temel hücresel işlemlerde görev aldığı desteklemektedir. Kajal cisimciğinin kırpılma veya daha genel ifadeyle pre-RNA'nın işlenmesinde görev aldığı ve snRNP'lerin bu organelde yer aldığı bildirilmektedir (Gall, 2000). RNA polimeraz I, II ve III adlı transkripsiyon kompleksleri ilk olarak Kajal cisimciğinde oluşturulmakta ve daha sonra çekirdekteki transkripsiyon yerlerine aktarılmaktadırlar (Gall, 2001).

U5 snRNP ile ilişkili olduğu belirlenen *sta1* geninin, soğuk stresinde transkripsiyonun arttığı ve *Arabidopsis thaliana*'nın soğuk stresine toleransta bu gene ihtiyaç duyduğu bulunmuştur. Ayrıca, *sta1* mutantının öldürücü olması nedeniyle, STA1'in işlevinin *Arabidopsis* için zaruri olduğu belirtilmektedir (Lee ve ark., 2006b).

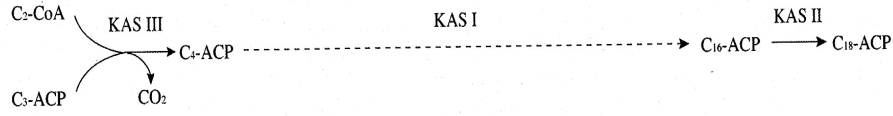
Bu çalışma sonucunda, HSGh106 cDNA'sının yüksek sıcaklıkta transkripsiyonun arttığı ve snRNP ile ilişkili olduğunun belirlenmesi nedeniyle, HSGh106'nın yüksek sıcaklık stresine tepki olarak alternatif kırılma işlemlerinde rol aldığı düşünülmektedir. Bu konunun netleşmesi için ayrıntılı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

4.7.10. HSGh113 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmalarının, poliakrilamid jel analizi sonucunda pamukta, HSGh113 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında yüksek bant sinyali verdiği, kontrol bitkisinde ise çok zayıf bant sinyali oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.26). Bu sonuçla, HSGh113 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında anlatımının arttığı söylenebilir. Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh113'ün, *G. raimondii* cDNA klonuna (CO107708.1) $E = 4e-84$ düzeyinde, % 98 ve *G. hirsutum* cDNA klonuna (DT572048.1) $E = 4e-33$ düzeyinde, %98 benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.2).

CO107708.1 cDNA klonunun nükleotid dizisi GenBank'tan temin edilmiş ve bu diziye BLAST analizi uygulanmıştır. BLAST analizi sonucunda, CO107708.1 cDNA klonunun, beta-keto-açıl taşıyıcı protein (ACP) sentaza (KAS), $E = 9e-126$ düzeyinde, % 81 benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

KAS, yağ asidi sentezinde görev alan bir enzimdir. Bitkilerde yağ asidi sentezi, KAS'ın da görev aldığı birçok enzim tarafından plastidlerde gerçekleştirilmektedir. KAS, malonil-CoA ünitelerini yoğunlaştırma işlemini katalize etmektedir. KAS'ın katalizleme işlemi sonucunda, palmitol-açıl taşıyıcı protein (16:0ACP) ve stearoil-ACP (18:0-ACP) oluşmaktadır (Şekil 4.27). Üç sınıf KAS enzimi tanımlanmıştır. KAS III; asetil-CoA ve malonil-ACP'nin yoğunlaştırıldığı birinci yoğunlaştırma aşamasında görev almakta, KAS I; karbon zincirinin 16 karbona kadar uzatıldığı uzama aşamasında görev almakta ve KAS II ise 16 karbondan 18 karbona arttırma işlemi olan son yoğunlaştırma aşamasında (Şekil 4.27) görev almaktadır (Harwood, 1996).



Şekil 4.27. KAS işlevinin şematik gösterimi

Hücre zarlarının temelini iki katlı lipid yapı oluşturmaktadır ve lipidlerin yapısında yağ asitleri bulunmaktadır. Hücre zarları plastid, mitokondri, endoplazmik redikulum, çekirdek gibi birçok organeli ve tabii ki stoplazmayı çevrelemektedir. Hücre zarlarının bütünlüğü ve işlevi yüksek sıcaklığa karşı hassasiyet göstermektedir. Stres koşullarında, bitki hücre zarlarının işlevlerini devam ettirebilmesi, fotosentez ve solunum işlemleri için çok önemlidir. Sıcaklık stresi moleküllerinin zardan geçişini hızlandırmakta, böylece zardaki moleküllerin kimyasal bağlarını gevşetmektedir. Bu durum, zardaki proteinlerin denatürasyonu ve doymamış yağ asitlerinin artması sebebiyle, zarların çift katmanlı lipid yapısının daha akışkan olmasına neden olmaktadır (Savchenko ve ark., 2002). Sonuç olarak, yüksek sıcaklık stresi hücre zarlarının zararlanmasına sebebiyet vermektedir.

Yüksek sıcaklık stresi koşullarında yetiştirilen *Arabidopsis* bitkilerinde, zarlardaki toplam lipid içeriğinin yarıya düştüğü, doymuş yağ asidi oranının arttığı, doymamış yağ asidi oranının ise düştüğü bildirilmiştir (Somerville ve Browse, 1991). Benzer şekilde, bataklık tavus otu (*Agrostis stolonifera*) bitkisinde de sıcaklık stresi ile doymuş yağ asidi oranında artış meydana geldiği bulunmuştur (Larkindale ve Huang, 2004).

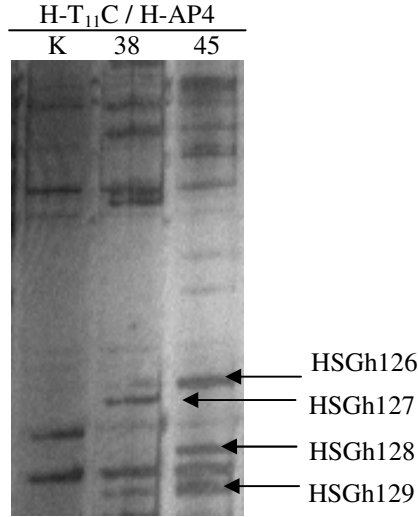
Bu bilgiler ışığında, pamuğa uygulanan sıcaklık stresi ile hücre zarlarında zararlanma ve yağ asidi içeriğinde değişme olmuş olma olasılığı çok yüksektir. HSGh113 cDNA'sı, yağ asidi sentezinde görev alan KAS ile ilişkili genin nükleotid dizisine dolaylı benzerlik göstermiştir. Sıcaklık stresi koşullarında, pamukta HSGh113 cDNA'sının transkripsiyonunun artmasının sebebi, olası azalma gösteren yağ asidi içeriğini normale yaklaştırmak, böylece sıcaklıktan kaynaklanan hücre zarı zararlanmalarını azaltmak amaçlı olabilir.

4.7.11. HSGh127 cDNA'sı

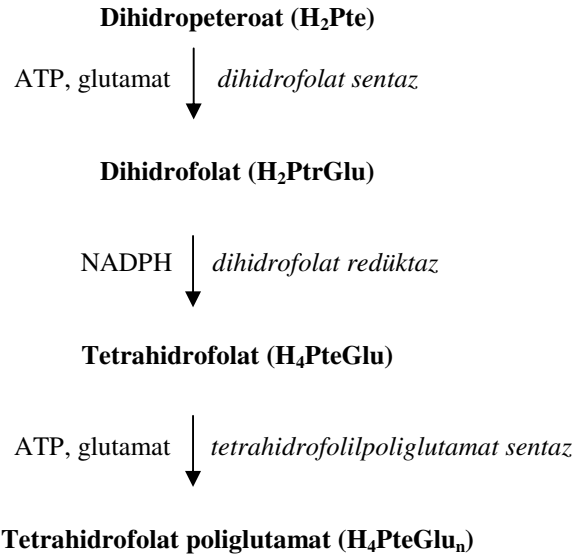
Farklılık gösterim çalışmalarının poliakrilamid jel analizi sonucunda, HSGh127 cDNA'sının sadece 38 °C sıcaklığa maruz bırakılmış pamuk bitkilerinde yüksek sinyal verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.28). Elde edilen bu sonuçla, 38 °C sıcaklık stresi koşullarında pamukta HSGh127'nin transkripsiyonunun artarken, 45 °C sıcaklık stresi koşullarında ise baskılandığı söylenebilir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh127'nin, *Gossypium raimondii* cDNA klonu (CO121879.1) ile $E = 0.0$ düzeyinde, % 99 ve tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz (DHFS-FPGS HOMOLOG B) geni (NM_120680.3) ve bu genin kloroplastik izoformu (AJ250873.2) ile $E = 2e-74$ düzeyinde, % 79 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Gossypium raimondii cDNA klonunun (CO121879.1) nükleotid dizisi GenBank'tan temin edilmiş ve BLAST analizi yapılmıştır. BLAST analizi sonucunda, *Gossypium raimondii* cDNA klonunun (CO121879.1) tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz (DHFS-FPGS HOMOLOG B) genine $E = 3e-171$ düzeyinde, % 77 benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz, tetrahidrofolat poliglutamat sentezini katalize eden bir enzim olup (Şekil 4.29), karbon-bir (one-carbon, C_1) metabolizmasında yer almaktadır. Tüm hücrelerde, pürin, timidilat, formilmetionil-tRNA, pantotenat (B5 vitamini), metionin, glisin ve serin sentezinde muhakkak tetrahidrofolata (B9 vitamini) gereksinim duyulmaktadır (Cossinss ve Chen, 1997; Ravanel ve ark. 2001).



Şekil 4.28. HSGh126, 127, 128 ve 129'un farklılık gösterim jel görüntüsü



Şekil 4.29. Tetrahidrofolat poliglutamat (H₄PteGlu_n) sentezi

Köklerine yetersiz oksijen stresi uygulanan çeltik bitkisinde, tetrahidrofolat sentaz ile homoloji gösteren SA-DSL-85 klonunun ekspresyonu çok önemli düzeyde azalmıştır (Agarwal ve Grover, 2005).

Doktora çalışması kapsamında tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz genine benzerlik gösteren HSGh127 cDNA'sının ekspresyonu orta sıcaklık stresinde artmış, yüksek sıcaklık stresinde ise baskılanmıştır. Stres koşullarında doğrudan tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz geninin anlatımı ile ilgili fazla literatüre

rastlanamamıştır. Bu nedenle, bu genin stres koşullarında nasıl davranış gösterdiğine ilişkin yeterli bilgi mevcut değildir. Karbon-bir (C₁) metabolizmasında yer alan enzimlerin, düzenlenme mekanizmasının tam anlaşılacağı belirtilmektedir. Bu durumun, C₁ metabolizmasının, klasik biyokimya ve genetik ile çalışılmasının zor olmasından kaynaklandığına dikkat çekilmektedir. Tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz enziminin de içinde bulunduğu C₁ metabolizmasına ait enzimlerin, belki çok düşük miktarlarda oldukları, birçok izoformlarının bulunduğu ve mutantlarının olmadığı belirtilmiştir. Buna ilave olarak, bu metabolizmada folatlar (Tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz bu gruba dahildir), S-adenosilmetionin, S-adenosil-homosistein gibi anahtar araçların değişmeye meyilli kararsız özelliğe sahip oldukları ve miktarlarının belirlenmesinin çok zor olduğu ileri sürülmüştür (Hanson ve Roje, 2001). Bu konunun aydınlatılabilmesi için yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.7.12. HSGh129 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmalarının poliakrilamid jel analizi sonucunda, HSGh129 cDNA'sının sıcaklık stresi ile anlatımının arttığı ve anlatımın yüksek sıcaklık stresi koşullarında en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.28). Homoloji taramaları sonucunda HSGh129'un, ribozomal protein s14'e benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonuna (ES819720.1) E = 0.0 düzeyinde, % 100, *Arabidopsis thaliana* 40S ribozomal protein S14'e (NM_129174.3) E = 9e-59 düzeyinde, % 83 homoloji gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Ökaryotik ribozomlar karmaşık bir yapıya sahip olup, ribozomal RNA'lar (rRNA) ve ribozomal proteinler (r-protein) olmak üzere iki temel molekülden oluşmaktadırlar. Ribozomlarda, 4 tip rRNA ve yaklaşık 80 çeşit r-protein yer almaktadır. Hücre işleyişinin vazgeçilmez parçaları olan ribozomlar, protein sentezinden sorumludurlar ve bu şekilde hücre büyümesi, bölünmesi ve gelişimi gibi olayların kontrolünde temel bir role sahiptir. Ribozomal bileşenlerdeki genetik hasar örneğin, bir r-proteinin miktarındaki azalma, organizmanın gelişimi ve fizyolojisi üzerine zararlı etkiye neden olmaktadır (Barakat ve ark., 2001).

Bitkilerde, r-protein genlerinde meydana gelen mutasyon sonucunda embriyonun yaşamını devam ettirebilmesi ve bitkilerin gelişimi olumsuz yönde etkilenmektedir (Van Lijsebettens ve ark., 1994; Tsugeki ve ark., 1996; Revenkova ve ark., 1999; Ito ve ark., 2000). Bunlara ilave olarak, r-protein gen transkripsiyonunun seviyesi ile hücre bölünmesi (mitoz) arasında pozitif ilişki olduğu belirlenmiştir (Joanin ve ark., 1993; Garo ve ark., 1994, Gantt ve Key, 1985; Williams ve Sussex, 1995).

Bitkilerdeki r-protein genlerinin sayısı, genomdaki dağılımı ve anlatımı ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. *Arabidopsis thaliana*'da 249 r-protein geni bulunmuş ve r-protein genlerinin anlatımının farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Barakat ve ark., 2001).

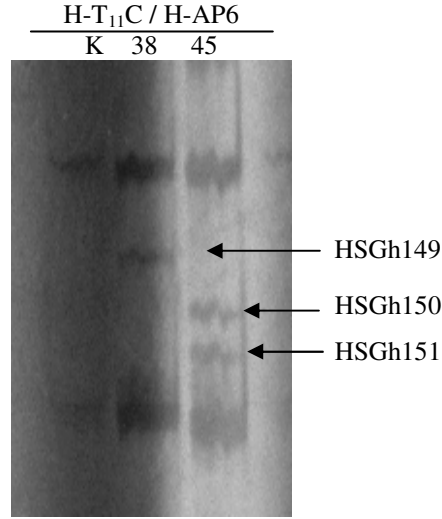
Bu araştırma sonucunda, pamukta sıcaklık stresi süresinin ve derecesinin artmasıyla, ribozomal protein S14'e (RPS14) yüksek benzerlik gösteren HSGh129 cDNA'sının transkripsiyonunda sürekli artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçla, pamukta sıcaklık stresine cevap olarak RPS14'ün transkripsiyonunu artırdığı söylenebilir. Sıcaklık stresine cevapta, RPS14'ün işlevinin ne olduğu hakkında kesin bir yargıya varılamasada bir öngörü olarak, sıcaklık stresinde hücre işlevlerini korumak amacıyla diğer proteinlerin sentezinin artırılmasına ihtiyaç duyulmasına paralel, daha fazla miktarda ribozom oluşumuna gereksinim duyulmuş olabilir. Bu sebeple, sıcaklık stresi ile pamukta, RPS14'le ilişkili HSGh129 cDNA'sının transkripsiyonu artmış olabilir.

4.7.13. HSGh149 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmalarının poliakrilamid jel analizi sonucunda, HSGh149 cDNA'sının sadece 38 °C sıcaklığa maruz bırakılmış pamuk bitkilerinde bant sinyali verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.30). Bununla birlikte, 45 °C sıcaklık stresi koşullarında HSGh149'un bant sinyali oluşturmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçla, pamukta HSGh149'un transkripsiyonun 38 °C'de arttığı, 45 °C sıcaklık stresi koşullarında ise baskılandığı söylenebilir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh149'un, *G. hirsutum* lif cDNA klonuna

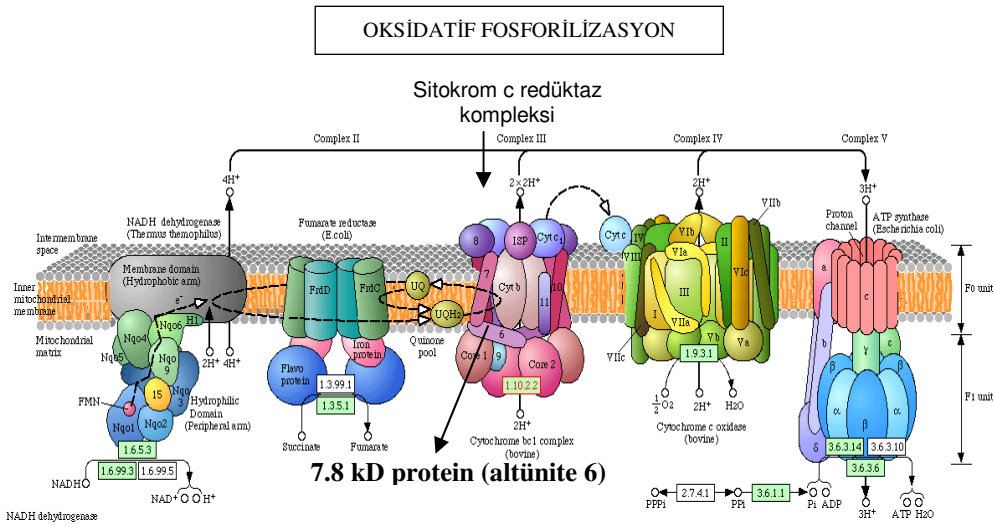
(ES827622.1) $E = 2e-101$ düzeyinde, % 99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

ES827622.1 cDNA klonun nükleotid dizisi, GenBank'tan temin edilmiş ve bu diziye BLAST analizi yapılmıştır. BLAST analizi sonucunda ES827622.1 cDNA klonun, sitokrom C redüktaz kompleksinin 7.8 kDa proteinine (BT028948.1) $E = 1e-39$ düzeyinde, % 78 ve siklofilin (Cyclophilin, ROC5 veya ATCYP1) genine (AK228231.1), aynı şekilde $E = 1e-39$ düzeyinde ve % 78 oranında homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak HSGh149, iki ayrı gene aynı düzeyde benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.30. HSGh149, 150 ve 151'in farklılık gösterim jel görüntüsü

Sitokrom c redüktaz kompleksi oksidatif fosforilizasyonda görev alan ve mitokondri zarına yerleşen bir protein kompleksidir (Şekil 4.31). HSGh149'un benzerlik gösterdiği 7.8 kDa proteini (sitokrom c redüktaz altünite 6), sitokrom c redüktaz kompleksi yapısında yer alan bir proteindir (Şekil 4.31) ve kompleksin mitokondriye bağlanmasını sağlayan menteşe proteini olduğu varsayılmaktadır.



Şekil 4.31. Sitokrom c redüktaz kompleksi ve 7.8 kDa proteini (altünite 6)

HSGh149 cDNA'sının dolaylı benzerlik gösterdiği ROC5 (ROTAMASE CYP 5), siklofilin kodlayan bir gen dir ve *Arabidopsis thaliana*'da en az 29 farklı siklofilin geni (ROC veya ATCYP) bulunmaktadır (Romano ve ark., 2004). ROC5'in, siklofilinin stoplazmik formu olduğu belirlenmiştir (Chou ve Gasser, 1997). ROC5, ATCYP1 şeklinde de adlandırılmaktadır.

Siklofilinlerin (CyPs), birçok organizmada sinyal iletiminde ve protein katlanmasında rol alıyor olabileceği belirtilmektedir (Chou ve Gasser, 1997). Siklofilin genlerinin stres koşullarında tetiklendiğinin belirlenmiş olmasına rağmen fizyolojik işlevleri bilinmemektedir (Saito ve ark., 1999). *Arabidopsis*'te ATCYP1 (siklofilin) genin transkripsiyonun yapraklarda çok zayıf sinyal oluşturduğu, çiçek ve kökte ise güçlü sinyal oluşturduğu, ATCYP2 (siklofilin) geninin ise sadece çiçekte nispeten güçlü sinyal oluşturduğu tespit edilmiştir (Saito ve ark., 1999). Domates ve kolzadaki CYP geni ise tüm organlarda yüksek seviyede transkripsiyon göstermektedir (Gasser ve ark., 1990). *Arabidopsis*'e uygulanan bazı stres etmenleri sonucunda, ATCYP1 ve ATCYP2'nin mRNA seviyelerinde değişiklikler belirlenmiş ancak, uygulanan stres etmenleriyle bu genlerde önemli bir tetiklenme belirlenmemiştir (Saito ve ark., 1999). Mayada ise siklofilini kodlayan iki genin (CYP1 ve CYP2), sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun arttığı bulunmuştur (Sykes ve ark., 1993). Sıcaklık stresi

uygulanan bakla bitkilerinde, siklofilinin kloroplast formu olan pCyP B geninin transkripsiyonunda yüksek artış gözlenmiştir (Luan ve ark., 1994). Sıcaklık stresi, tuz stresi gibi abiyotik stres koşullarında ve bitkilerin gelişen organlarında, siklofilin genlerinin transkripsiyonu artmakta fakat bu durum bitkiler arasında farklılık gösterebilmektedir (Marivet ve ark., 1992; Marivet ve ark., 1994).

HSGh149 cDNA'sı, sitokrom C redüktaz kompleksinin 7.8 kDa proteinine ve siklofilin (ROC5) geninin her ikisine orta düzeyde benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonuna yüksek düzeyde benzerlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, HSGh149'un bu iki genden hangisinin parçası olduğu net olarak söylenemez. Bu konunun kesinlik kazanabilmesi için HSGh149'un tam uzunluktaki cDNA'sının oluşturularak, yapısal analizinin ve gen anlatım analizinin yapılması gerekmektedir.

4.8. Gen Homolojisi Göstermeyen cDNA'lar

4.8.1. HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları

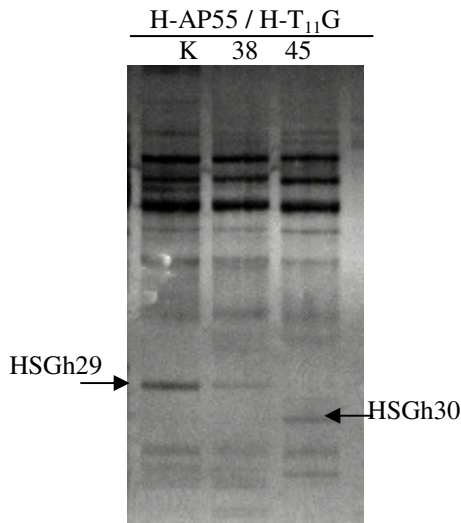
Yapılan cDNA kümeleme analizi sonucunda, HSGh29 ve HSGh32 aynı kümede yer almışlardır. Bu iki cDNA'nın 1 - 328 baz bölgesi % 100 aynı baz dizisine sahiptir. HSGh29 ve HSGh32'nin 3' uçları uzunluk ve baz dizisi bakımından birbirinden farklılık göstermiştir. Her iki cDNA'nın tam uzunluktaki cDNA baz dizisi bilgisine sahip olmamamıza rağmen, HSGh29 ve HSGh32'nin aynı gen ailesinden olabileceği söylenebilir. Bu konunun kesinlik kazanabilmesi için her iki cDNA'nın tam uzunluktaki dizilerinin elde edilmesi ve karşılaştırılması gerekmektedir.

HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları, 3' bölgeleri haricinde tam bir benzerlik göstermelerine rağmen transkripsiyonları farklılık göstermiştir. HSGh29'un transkripsiyonu 38 °C sıcaklık stresinde azalmış, 45 °C sıcaklık stresinde ise baskılanmıştır. HSGh32'nin anlatımı kontrole göre 38 °C'de fazla miktarda artmış, 45 °C'de ise 38 °C'deki transkripsiyonun biraz azalmıştır.

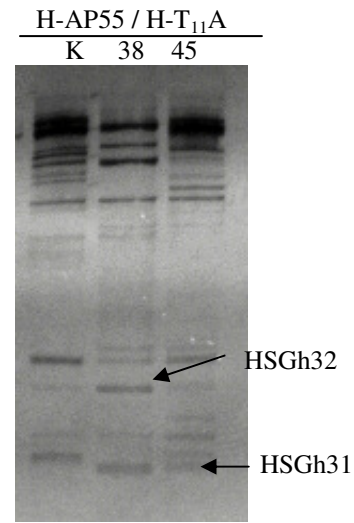
Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh29 ve HSGh32, *G. hirsutum* lifinden izole edilen UFL_641_39 cDNA klonu (ES806029.1) ile 7e-103 düzeyinde önemli ve % 98 oranında benzerlik göstermiştir.

UFL_641_39 cDNA klonuna ait baz dizisi GenBank'tan alınmış ve Blastn programı ile homoloji araştırması yapılmıştır. Araştırma sonuçlarından UFL_641_39 cDNA klonunun ATPaz, histidin kinaz, DNA giraz B ve HSP90 benzeri bölge (domain) içeren protein ile zayıf benzerlik ($E = 3 \cdot 10^{-5}$) gösterdiği belirlenmiştir.

HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemiştir. HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları daha önce tanımlanmamış yeni bir genle ilişkili olabilirler. Bu cDNA'ların tam uzunluktaki dizileri belirlendikten ve yapısal, işlevsel analizleri yapıldıktan sonra gen bilgileri aydınlatılabilir.



Şekil 4.32. HSGh29 ve 30'un farklılık gösterim jel görüntüsü



Şekil 4.33. HSGh31 ve 32'nin farklılık gösterim jel görüntüsü

4.8.2. HSGh30 ve HSGh31 cDNA'ları

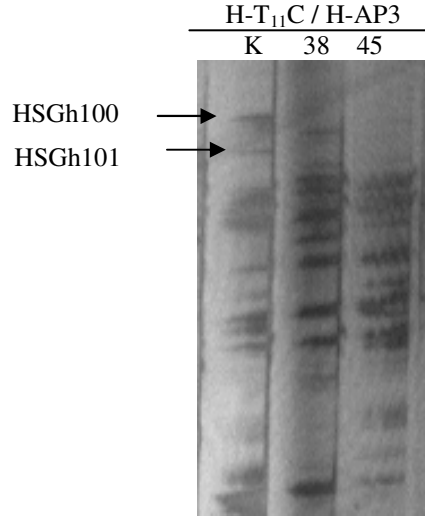
HSGh30 ve HSGh31 aynı kümede yer almışlardır. HSGh30'un 2 - 280 baz bölgesi ile HSGh3'in 1 - 275 baz bölgesi birbiriyle % 96 benzerlik göstermiştir. HSGh30 ve HSGh31 cDNA'larının her ikisinin transkripsiyonu sıcaklık stresi ile

tetiklenmiştir. *Farklılık gösterim* jelinde, kontrol ve 38 °C’de HSGh30’a ait çok zayıf bant sinyali gözlenmiş, 45 °C’de ise bant sinyali yüksek miktarda artmıştır (Şekil 4.32). HSGh31 için kontrolde bant oluşmamış, 38 °C ve 45 °C’de ise belirgin bantlar oluşmuştur (Şekil 4.33). Bu sonuçlar, HSGh30’un 45 °C sıcaklık stresinde transkripsiyonunun arttığını, HSGh31’in ise hem 38 °C hem de 45 °C sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonunun arttığını ortaya koymaktadır.

Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh30 ve HSGh31 bilinen herhangi bir genle benzerlik göstermemiş, *G. raimondii* GR__Eb33P12.f cDNA klonu ile 1e-150 düzeyinde % 97 benzerlik göstermiştir. GR__Eb33P12.f cDNA klonu, *G. raimondii* lifinden oluşturulan cDNA kütüphanesinden elde edilmiştir (Udall ve ark., 2006). GR__Eb33P12.f cDNA klonunun baz dizisi blastn programı ile homoloji araştırmasına tabii tutulmuş, sonuç olarak bilinen herhangi bir genle önemli benzerlik göstermemiştir. HSGh30 ve HSGh31 cDNA’ları daha önce belirlenmemiş yeni bir gen adayları olabilirler. Bu cDNA’ların tam uzunluktaki dizileri belirlendikten ve yapısal, işlevsel analizleri yapıldıktan sonra gen bilgileri aydınlatılabilir.

4.8.3. HSGh100 cDNA’sı

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, HSGh100 cDNA’sının sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.34). Nükleotid düzeyinde yapılan homoloji araştırmaları sonucunda HSGh100, katalitik proteine benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DW511925.1) ile $E = 0.0$ seviyesinde, % 97 ve *Arabidopsis thaliana* katalitik mRNA dizisi (NM117759.3) ile $E = 2e-51$ düzeyinde, % 76 homoloji göstermiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.34. HSGh100 ve 101'in farklılık gösterim jel görüntüsü

Katalitik proteinler, enzimatik reaksiyon gösteren proteinlerdir. Biyolojik katalizleme reaksiyonlarında, reaktantlar substrat olarak katalitikleyiciler ise enzim olarak bilinen doğal meydana gelen makromoleküler bileşiklerdir. Enzimler substratlara özgü bağlanma bölgelerine sahiptirler ve genellikle bir enzimin tamamı veya büyük bir kısmı proteinden oluşmaktadır. Arabidopsis katalitik protein, serin/treonin fosfataz, 2C ailesi (PP2C)'yle ilişkili bölge (domain) içermektedir.

HSGh100 cDNA'sı, enzimatik işleve sahip olduğu varsayılan bir proteinle benzerlik göstermiştir ancak, bu proteinin işlevi bilinmemektedir.

4.8.4. HSGh101 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, HSGh101 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.34). Nükleotid düzeyinde yapılan homoloji araştırmaları sonucunda HSGh101, protein kinaz ile zayıf benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (AJ513459.1) ile $E = 0.0$ seviyesinde % 99 ve *Arabidopsis thaliana* protein kinaz mRNA dizisi (NM_120263.3) ile $E = 2e-05$ düzeyinde ve % 77 oranında zayıf homoloji göstermiştir (Çizelge 4.2).

HSGh101 cDNA'sının yapısının ve işlevinin aydınlatılabilmesi için ilk olarak, tam uzunlukta cDNA'sının oluşturulması, ardından işlevsel genomik çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

4.8.5. HSGh110 cDNA'sı

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, HSGh110 cDNA'sının 45 °C sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 4.26). Blastn ve blastx homoloji taramaları sonucunda HSGh110, herhangi bir gen, cDNA klonu veya protein dizisi ile önemli bir benzerlik göstermemiştir.

HSGh110'nun bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemesi, bu cDNA'nın daha önce tanımlanmamış yeni bir genle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu cDNA'nın ancak, tam uzunluktaki dizileri belirlendikten ve yapısal, işlevsel analizleri yapıldıktan sonra gen bilgileri aydınlatılabilir.

4.8.6. HSGh126 ve HSGh128 cDNA'ları

HSGh126 472 baz, HSGh128 ise 427 baz uzunluğundadır. cDNA kümeleme analizi sonucunda, HSGh126 ve HSGh128 aynı kümede yer almışlardır. Kümeleme analizi, bu iki cDNA'nın 1. bazdan 415. baza kadar olan bölgenin % 99 benzerlik gösterdiği sonucunu vermiştir. HSGh126 ve HSGh128 426. bazdan itibaren 3' poliA kuyruğuna kadar olan bölge uzunluk ve nükleotid dizisi bakımından birbirinden farklılık göstermiştir.

Farklılık gösterim jelinde, HSGh126 ve HSGh128 cDNA'larının özellikle 45 °C sıcaklık stresinde yüksek miktarda sinyal verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.28). Elde edilen bu sonuçla, HSGh126 ve HSGh128'in, 45 °C sıcaklık stresinde transkripsiyonlarının önemli ölçüde arttığı söylenebilir.

HSGh126 ve HSGh128 cDNA'ları, tanımlanmamış ve adlandırılmamış *Arabidopsis thaliana* proteini ile orta düzeyde benzerlik gösteren, *G. hirsutum*

cDNA klonu (DR456701.1) ile $E = 0.0$ düzeyinde ve % 100 oranında homoloji göstermiştir.

HSGh126 ve HSGh128'in tanımlanmış veya işlevi bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemiş olması nedeniyle, HSGh126 ve HSGh128'in sıcaklık stresi cevabında rol alan, tanımlanmamış yeni bir genle ilişkili oldukları düşünülmektedir. Bu cDNA'ların ilişkili olduğu geni belirleyecek ayrıntılı yapısal ve işlevsel genomik araştırmalarının yapılması gerekmektedir.

4.8.7. HSGh150 ve HSGh151 cDNA'ları

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, HSGh150 ve HSGh151 cDNA'larının sadece 45 °C sıcaklık stresi koşullarında yüksek düzeyde sinyal verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.30). Elde edilen bu sonuçla, 45 °C sıcaklık stresinde HSGh150 ve HSGh151'in transkripsiyonlarının önemli ölçüde arttığı söylenebilir. Yapılan homoloji taramaları sonucunda HSGh150, *G. hirsutum* lif cDNA'sına (ES790686.1) $E = 5e-102$ seviyesinde, % 100 homoloji göstermiştir. ES790686.1 cDNA'sının nükleotid dizisi GenBank'tan temin edilmiş ve yapılan BLAST analizi sonucunda, ES790686.1 cDNA'sı herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemiştir. HSGh151 ise herhangi bir gen veya cDNA klonu ile benzerlik göstermemiştir. HSGh151 cDNA'sı 83 baz uzunluğunda kısa bir diziye sahiptir ve bu cDNA'nın herhangi bir homoloji oluşturmamasının nedeni, yüksek ihtimalle baz uzunluğunun kısa olmasından kaynaklanmaktadır.

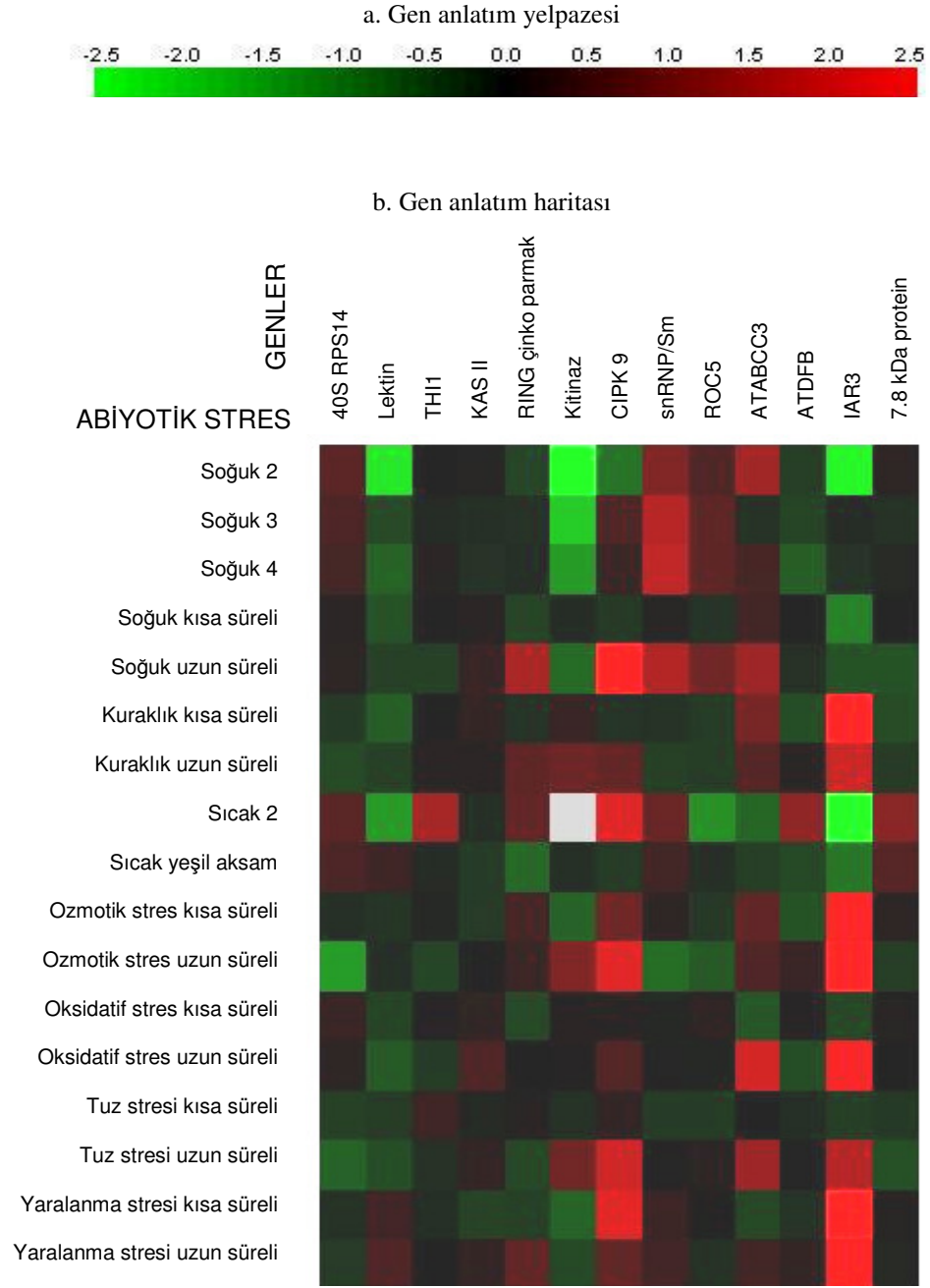
HSGh150 ve HSGh151'in bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemesi, bu cDNA'ların daha önce tanımlanmamış yeni genlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. HSGh150 ve HSGh151 cDNA'larının ancak, tam uzunluktaki dizileri belirlendikten sonra yapısal ve işlevsel analizleri yapılarak gen bilgileri aydınlatılabilir.

4.9. *Arabidopsis*'te *in silico* Mikrodizilim (Microarray) Analizi

Bu çalışma kapsamında, sıcaklık stresi koşullarında pamukta anlatımının değiştiği belirlenen cDNA'ların homoloji gösterdiği 14 genin, abiyotik stres koşullarında *Arabidopsis*'te oluşturdukları gen anlatım modelleri Genevestigator programı kullanılarak *in silico* mikrodizilim (microarray) analizi sonucunda belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında pamuktan izole edilen cDNA'ların, bilinen 14 gen ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Genevestigator programı kullanılarak, homoloji gösteren 14 genin 13 tanesinin, *Arabidopsis* mikrodizilim (microarray) araştırmalarında incelendiği belirlenmiştir. *Arabidopsis* mikrodizilim analizlerinde *psaA/psaB/rps14* operonuna ait prob olmadığı gözlenmiştir. Böylece *in silico* (sanal) mikrodizilim (microarray) analizi ile 13 genin, abiyotik stres koşullarında *Arabidopsis thaliana*'da oluşturduğu anlatım modeli (Şekil 4.35) ve kontrol bitkilerine göre değişen sinyal oranları (Çizelge 4.3) belirlenmiştir.

Gen anlatım haritasında (Şekil 4.35b), gen anlatımı arttıkça renk kırmızılaşmakta, azaldıkça yeşil renk oluşmaktadır. Çizelge 4.3'de ise değişik abiyotik stres koşullarında, kontrole kıyasla meydana gelen anlatım oranları logaritmik değer olarak sunulmuştur. Çizelge 4.3'de eksi olarak belirtilen oransal değerler gen sinyalinde azalış olduğunu, artı oransal değerler ise artış olduğunu ifade etmektedir.

İncelemeye alınan 13 genin (40S RPS14, Lektin, THI1, KAS II, RING çinko parmak, Kitinaz, CIPK 9, snRNP/Sm, ROC5, ATMRP3, ATDFB, IAR3 ve 7.8 kDa protein) her birinin, değişik abiyotik stres koşullarında farklı gen anlatım modeli oluşturduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.35. *in silico* mikrodizilim analiz sonucu

Çizelge 4.3. Abiyotik stres koşullarında log₂ tabanında genlerin değişen sinyal oranları

Genler	818188 40S RPS14	814756 Lektin	835567 TH1	843835 KAS II	816382 RING çinko parmak	820947 Kitinaz	839349 CIPK9	842881 snRNP/ Sm	829639 ROC5	820496 ATABCC3	830484 ATDFB	841602 IAR3	838075 7.8 kDa protein
Abiyotik stres koşulları													
Soğuk stresi 2	0.38	-1.37	0.00	0.03	-0.23	-2.67	-0.55	0.64	0.32	0.88	-0.18	-1.47	0.06
Soğuk stresi 3	0.28	-0.26	-0.04	-0.07	-0.08	-1.17	0.31	1.02	0.41	-0.10	-0.21	-0.06	-0.09
Soğuk stresi 4	0.23	-0.44	0.05	-0.11	-0.06	-0.81	0.17	2.14	0.42	0.25	-0.39	-0.11	-0.04
Soğuk stresi kısa süreli	0.05	-0.32	0.02	0.05	-0.23	-0.06	-0.15	0.03	-0.11	0.21	0.01	-0.64	0.02
Soğuk stresi uzun süreli	0.08	-0.18	-0.18	0.14	0.92	0.48	2.22	0.98	0.52	0.84	-0.08	-0.30	-0.31
Kuraklık stresi kısa süreli	-0.15	-0.40	0.01	0.11	-0.11	0.16	-0.10	-0.09	-0.17	0.59	-0.28	2.14	-0.27
Kuraklık stresi uzun süreli	-0.26	-0.19	0.06	0.05	0.41	1.42	0.46	-0.19	-0.16	0.36	0.05	1.17	-0.15
Sıcak 2	0.37	-0.82	0.92	-0.07	0.44	0.38	1.31	0.48	-0.75	-0.46	0.75	-3.26	0.69
Sıcak yeşil aksam	0.28	0.18	0.97	-0.16	-0.47	-0.08	-0.17	0.22	-0.06	-0.18	-0.25	-0.56	0.35

Çizelge 4.3. (devam)

Genler	818188 40S RPS14	814756 Lektin	835567 TH1	843835 KAS II	816382 RING çinko parmak	820947 Kitinaz	839349 CIPK9	842881 snRNP/Sm	829639 ROC5	820496 ATABCC3	830484 ATDFB	841602 IAR3	838075 7.8 kDa protein
Abiyotik stres koşulları													
Ozmotik stres kısa süreli	-0.07	-0.12	-0.02	-0.16	0.25	-0.43	0.53	0.06	-0.14	0.42	-0.31	1.56	0.06
Ozmotik stres uzun süreli	-0.84	-0.07	-0.23	0.01	0.17	0.64	1.33	-0.50	-0.37	0.32	0.15	2.00	-0.17
Oksidatif stres kısa süreli	0.15	-0.22	0.03	0.10	-0.25	0.04	0.05	-0.02	0.08	-0.35	0.03	-0.25	0.04
Oksidatif stres kısa süreli	0.07	-0.37	-0.17	0.30	0.02	0.03	0.34	-0.01	-0.03	1.22	-0.29	1.51	0.00
Tuz stresi kısa süreli	-0.19	-0.15	0.18	-0.04	0.04	-0.09	0.10	-0.16	-0.17	0.00	-0.06	-0.17	-0.14
Tuz stresi uzun süreli	-0.43	-0.28	-0.09	0.11	-0.24	0.53	1.19	-0.01	0.07	0.85	-0.02	1.03	-0.30
Yaralanma stresi kısa süreli	-0.10	0.21	-0.06	-0.02	-0.18	-0.43	1.34	0.17	0.02	-0.24	-0.11	3.01	0.04
Yaralanma stresi uzun süreli	-0.15	0.31	0.02	0.12	0.43	-0.24	0.43	0.20	-0.10	0.21	0.11	1.61	-0.04

Genevestigator’da, *Arabidopsis*’de yapılan üç ayrı sıcaklık stresi denemesine ilişkin mikrodizilim analiz sonucu bulunmaktadır. Bunlar, “sıcak 2”, “sıcak yeşil” ve “sıcak kök” olarak adlandırılmıştır. Sıcak 2 denemesi *Arabidopsis*’in çiçek ve harnup gelişim döneminde, sıcak yeşil ve sıcak kök denemeleri ise *Arabidopsis*’in rozet yaprak döneminde yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında, sıcaklık stresi analizi için “sıcak 2” ve “sıcak yeşil” denemeleri değerlendirmeye alınmıştır. “Sıcak yeşil” denemesinde, rozet yapraklardaki gen anlatımlarına ilişkin veriler bulunmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan iki ayrı sıcaklık stresi denemesinin mikrodizilim analiz sonuçları incelendiğinde, 40S RPS14 geni sinyalinin sıcak 2 ve sıcak yeşil denemelerinde arttığı; lektin geni sinyalinin sıcak 2’de azaldığı, sıcaklık yeşil’de ise arttığı; THI1’in her ikisinde arttığı; KAS II’nin her ikisinde azaldığı; çinko parmak protein geninin sıcak 2 denemesinde arttığı, sıcak yeşilde ise azaldığı, kitinazın sıcak 2’de arttığı, sıcak yeşilde azaldığı; CIPK 9 geninin sıcak 2’de arttığı, sıcak yeşilde azaldığı; snRNP/Sm’nin her ikisinde arttığı; ROC 5’in her ikisinde azaldığı; ATMRP3’ün her ikisinde azaldığı; sitokrom c redüktaz kompleksi 7.8 kDa protein geni sinyalinin her iki sıcaklık denemesinde arttığı; ATDFB geni sinyalinin sıcak 2 denemesinde arttığı, sıcak yeşil denemesinde ise azaldığı; IAR3 geninin her ikisinde azaldığı belirlenmiştir.

İncelenen 13 genden 8 tanesi (40S RPS14, THI1, KAS II, snRNP/Sm, ROC 5, 7.8 kDa protein, ATMRP3 ve IAR3), sıcak 2 ve sıcak yeşil denemelerinde benzer gen anlatım modeli oluştururken, 5 gen (Lektin, çinko parmak protein, kitinaz, CIPK 9, ATDFB) denemeler arasında anlatım modeli bakımından farklılık göstermiştir. Bu beş geninin denemeler arasında sıcaklık stresine farklı tepki vermesinin nedeni, bitkileri sıcaklık stresine maruz bırakma yöntemlerinin ayrı olmasından ve stres uygulamalarının bitkilerin değişik gelişme dönemlerinde yapılmış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Farklı sıcaklık stresi uygulamalarında, *Arabidopsis*’te benzer anlatım modeli gösteren 8 genin anlatım modeli ile bu genlerin orta ve yüksek sıcaklık stresi

uygulanmış pamukta homoloji oluşturduğu cDNA'ların anlatım modeli karşılaştırılmıştır. *Arabidopsis*'te sıcaklık stresi ile 40S RPS14, THI1, snRNP/Sm ve sitokrom c redüktaz kompleksi 7.8 kDa protein genlerinin sinyali artmış, bu genler ile sırasıyla homoloji gösteren HSGh129, HSGh26, HSGh113 ve HSGh149 cDNA'larının sinyali, pamukta da sıcaklık stresi koşullarında kontrole göre artış göstermiştir. 7.8 kDa protein haricinde, belirtilen diğer genler pamukta hem orta hem de yüksek sıcaklık stresinde artış göstermiş, sitokrom c redüktaz kompleksi 7.8 kDa protein geni sinyali ise orta sıcaklık stresinde artmış ancak, yüksek sıcaklık stresinde bant sinyali oluşmamıştır. Sıcaklık stresi koşullarında *Arabidopsis*'de KAS II, ROC 5, ATMRP3, IAR3 genlerinin sinyali azalmıştır. Bu genlerin pamukta homoloji gösterdiği cDNA'lar incelendiğinde, KAS II benzeri HSGh113'ün sinyali hem orta hem de yüksek sıcaklık stresinde fazla miktarda artmıştır. ATMRP3 benzeri HSGh93 ile HSGh94 cDNA'larının sinyali orta ve yüksek sıcaklık stresinde baskılanmıştır. IAR3 benzeri HSGh97'nin sinyali orta sıcaklık stresinde baskılanmış, yüksek sıcaklık stresinde ise fazla miktarda artış göstermiştir. ROC 5 benzeri HSGh149'un sinyali orta sıcaklık stresinde artmış, yüksek sıcaklık stresinde ise baskılanmıştır. Bu çalışma kapsamında HSGh149 cDNA'sının, ROC 5 ve 7.8 kDa protein genlerinin her ikisi ile aynı düzeyde homoloji gösterdiği daha önce de belirtilmiştir. Bu çalışmada Genevestigator programı kullanılarak yapılan Meta-Profil analizi (Meta-Profile Analysis) sonucunda, *Arabidopsis*'te sıcaklık stresi ile ROC5 geni sinyalinin azaldığı, 7.8 kDa protein geninin ise arttığı belirlenmiştir. *Farklılık gösterim* sonucunda ise pamukta HSGh149'un sinyali orta sıcaklık stresinde artmış, yüksek sıcaklık stresinde ise baskılanmıştır. HSGh149 cDNA'sının hangi genin parçası olduğunun belirsizliği, yapılan *in silico* anlatım analizi sonucunda devam etmektedir. Bu nedenle HSGh149'un tam uzunluktaki cDNA'sının oluşturulmasından sonra hangi gen olduğu netleşebilir.

Yapılan tüm bu araştırmalar sonucunda, 40S RPS14, THI1, snRNP/Sm ATMRP3 genlerinin hem *Arabidopsis*'te hem de pamukta ve her türlü sıcaklık stresi koşullarında aynı gen anlatım modelini oluşturdukları belirlenmiştir. 40S RPS14, THI1, snRNP/Sm genlerinin anlatımı sıcaklık stresi ile artmakta,

ATMRP3 geninin anlatımı ise azalmaktadır. Bu sonuçla, işlevi ve özellikle sıcaklık stresindeki gen anlatımı hakkında az bilgi bulunan ATMRP3 geninin sıcaklık stresi koşullarındaki gen anlatım modeli nispeten belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu sonucun daha da kesinleşebilmesi için ATMRP3 geninin northern blot, RT-PZR gibi yöntemlerle anlatım analizlerinin yapılması gerekmektedir. KAS II ve IAR 3 genlerinin, sıcaklık stresi koşullarında *Arabidopsis* ile pamukta farklı anlatım modelleri oluşturduğu belirlenmiştir. KAS II geninin sinyali *Arabidopsis*'te azalırken, pamukta orta ve yüksek sıcaklık stresinde fazla miktarda artmıştır. IAR3 geninin sinyali *Arabidopsis*'te azalmakta, pamukta ise yüksek sıcaklık stresinde artmaktadır. Bu sonuçla, *Arabidopsis* ile mukayese edildiğinde KAS II ve IAR3 genlerinin sıcaklık stresi koşullarında pamuğa özgü olarak anlatımının arttığı söylenebilir. Bu durumun gen anlatım analizleri ile kesinleştirilmesi gerekmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bitkilerin sıcaklığa uyumunun artırılması ile ilgili yaklaşımlar ve çalışmalar yeni olup, küresel ısınma tehdidinin fark edilmesiyle başlamıştır. Bitkilerin abiyotik strese karşı gösterdikleri tepkinin genetik, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını giderek daha iyi anlamamız, abiyotik stres koşullarına daha iyi uyum sağlayacak bitkiler geliştirmemizi kolaylaştıracaktır. Bitkilerin stres koşullarında oluşturdukları biyokimyasal yolların bilinmesi kadar, bu yollarda görev alan enzimlerin ve diğer metabolitlerin ilişkili olduğu genlerin anlatım düzeyleri hakkında bilgi sahibi olmak da önem arz etmektedir. Bugüne kadar stresle ilişkili olduğu tespit edilen genlerin çoğu, moleküler genetikte model bitki olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana*'da bulunmuştur. Fakat önemli bir tarım bitkisi olan pamuğun, sıcaklık stresi koşullarında moleküler düzeyde gen anlatımının nasıl düzenlendiği hakkında az bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışma, sıcaklık stresi koşullarında pamukta farklı anlatım yapan genlerin belirlenmesi ve belirlenen genlerin sıcaklık stresi koşullarında nasıl anlatım yaptıklarının anlaşılması ayrıca, pamuğun orta ve yüksek sıcaklık stresine moleküler düzeyde nasıl cevap verdiğinin kısmen anlaşılması amacıyla yürütülmüştür.

Doktora tezi çalışmaları sonucunda, *farklılık gösterim* tekniği kullanılarak sıcaklık stresi ile pamukta anlatımı değişen 25 adet cDNA'nın homoloji araştırması yapılarak, benzerlik gösterdikleri genler tespit edilmiştir.

Elde edilen cDNA'lara kümeleme analizi uygulanmıştır. Sonuç olarak her bir kümede 2 cDNA'nın bulunduğu 4 küme oluşmuştur. Bu sonuçla, birbirine benzerlik gösteren her iki cDNA'nın tek bir genin parçası olduğu ve 8 cDNA'nın aslında 8 değil 4 genin parçaları oldukları belirlenmiştir. Kümeleme analizi

sonucunda, sıcaklık stresi koşullarında anlatımı değişen 21 gene ait cDNA'nın, pamuktan izole edilip klonlandığı anlaşılmıştır.

Homoloji araştırmaları sonucunda, sıcaklık stresi koşullarında pamuktan izole edilen cDNA'ların 13 tanesi doğrudan veya dolaylı olarak 14 gen ile homoloji oluşturmuş, 8 tanesi ise bilinen herhangi bir gen ile önemli benzerlik göstermemiştir. Bu bulgular ışığında, pamuktan izole edilen ve gen homolojisi göstermeyen 8 cDNA'nın yeni gen adayları oldukları söylenebilir.

Bu çalışmanın devamına ya da başka araştırmacıların çalışmalarına ışık tutmak amacıyla;

Yeni gen adayı olduğu ileri sürülen 8 cDNA'nın, tam uzunlukta cDNA'larının oluşturulması,

Bu genlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi,

Northern blot, yarı miktarsal-RT PZR (sq-RT PCR), gerçek zamanlı PZR (real-time PCR) gibi yöntemler kullanılarak gen anlatım analizlerinin yapılması,

Bu 8 cDNA'nın yeni genler olduklarının ispatlanması durumunda, bitkilerdeki fizyolojik ve moleküler işlevlerinin belirlenmesi üzerine araştırmaların yapılması, gibi öneriler getirmek mümkündür.

KAYNAKLAR

- AGARWAL, S., and GROVER, A., 2005. Isolation and Transcription Profiling of Low-O₂ Stress-Associated cDNA Clones from the Flooding-stress-tolerant FR13A Rice Genotype. *Annals of Botany*, 96:831–844.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., and LIPMAN, D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17):3389-3402.
- ANDERSSON, B., and SANDBERG, G., 1982. Identification of Endogenous N-(3-indoleacetyl) Aspartic Acid in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) by Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Using High-Performance Liquid Chromatography for Quantification. *J. Chromatogr.*, 238:151–156.
- ANONYMOUS, ---. RNAspectra™ Fluorescent mRNA Differential Display System. GenHunter Corp., Nashville, USA, 13p.
- ANONYMOUS, 1998. PCR-TRAP Cloning System. Version 3.0, GenHunter Corp., Nashville, USA, 21p.
- ANONYMOUS, 2000. MessageClean® for Complete Removal of DNA Contamination from RNA. GenHunter Corp., Nashville, USA, 9p.
- ANONYMOUS, 2001. RNeasy® Mini Handbook, Third Edition. Qiagen, 114p.
- ANONYMOUS, 2004. QIAprep® Miniprep Handbook. Qiagen, 51p.
- ANONYMOUS, 2008a. FAO. www.fao.org/
- ANONYMOUS, 2008b. <http://www.arabidopsis.org/>
- ASHRAF, M., SAEED, M.M., and QURESHII, M.J., 1994. Tolerance to High Temperature in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) at Initial Growth Stages. *Environ. and Exp. Botany*, 34(3):275-283.
- BARAKAT, A., SZICK-MIRANDA, K., CHANG, I. F., GUYOT, R., BLANC, G., COOKE, R., DELSENY, M., and BAILEY-SERRES, J., 2001. The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the Arabidopsis Genome. *Plant Physiol.*, 127(2):398-415.
- BATISTIC, O., and KULDA, J., 2004. Integration and Channeling of Calcium Signaling Through the CBL Calcium Sensor/CIPK Protein Kinase Network. *Planta*, 219:915–924.
- BELANGER, F. C., LEUSTEK, T., CHU, B. Y., and KRIZ, A. L., 1995. Evidence for The Thiamine Biosynthetic Pathway in Higher-Plant Plastids and Its Developmental Regulation. *Plant Mol. Biol.*, 29:809-821.
- BERRY, J., and BJÖRKMAN, O., 1980. Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31:491–543.
- BEZRUKOVA, M., KILDIBEKOVA, A., and SHAKIROVA, F., 2008. WGA Reduces The Level of Oxidative Stress in Wheat Seedlings Under Salinity. *Plant Growth Regul.*, 54:195–201.
- BOHNERT, H. J., NELSON, D. E., and JENSEN, R. G., 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7:1099-1111.
- BORDEN, K. L., 2000. RING Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds? *Journal of Mol. Biol.*, 295:1103-1112.

- BREUSEGEM, F. V., VRANOVÁ, E., DAT, J. F., and INZÉ, D., 2001. The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction. *Plant Science*, 161:405–414.
- BUKHOV, N. G., WIESE, C., NEIMANIS, S., and HEBER, U., 1999. Heat Sensitivity of Chloroplasts and Leaves: Leakage of Protons from Thylakoids and Reversible Activation of Cyclic Electron Transport. *Photosynthesis Research*, 59:81–93.
- CAMMUE, B. P. A., BROEKAERT, W. F., KELLENS, J. T. C., RAIKHEL, N. V., and PEUMANS, W. J., 1989. Stress-Induced Accumulation of Wheat Germ Agglutinin and Abscisic Acid in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiol.*, 91(4):1432–1435.
- CAMPANELLA, J. J., OLAJIDE, A. F., MAGNUS, V., and LUDWIG-MÜLLER, J., 2004. Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat With Substrate Specificity for Longer Side-Chain Auxin Amide Conjugates. *Plant Physiol.*, 135(4):2230-2240.
- CHABREGAS, S. M., LUCHE, D. D., FARIAS, L. P., RIBEIRO, A. F., VAN SLUYS, M. A., MENCK, C. F. M., and SILVA-FILHO, M. C., 2001. Dual Targeting Properties of the N-terminal Signal Sequence of *Arabidopsis thaliana* THI1 Protein to Mitochondria and Chloroplasts. *Plant and Mol. Biology*, 46:639–650.
- CHABREGAS, S. M., LUCHE, D. D., VAN SLUYS, M. A., MENCK, C. F. M., and SILVA-FILHO, M. C., 2003. Differential Usage of Two In-Frame Translational Characterization of The Thi1 Region 1803 Start Codons Regulates Subcellular Localization of *Arabidopsis thaliana* THI1. *Jour. of Cel. Science*, 116:285–291.
- CHEN, S. C. G., CHENG, M. C., CHEN, J., and HWANG, L. Y., 1990. Organization of The Rice Chloroplast *psaA-psaB-rps14* Gene and The Presence of Sequence Heterogeneity in This Gene Cluster. *Plant Science*, 68:213-221.
- CHEN, S. C. G., CHENG, M.C., CHUNG, K. R., YU N. J., and CHEN, M. C., 1992. Expression of the Rice Chloroplast *psaA-psaB-rps14* Gene Cluster. *Plant Science*, 81:93-102.
- CHEONG, Y. H., PANDEY, G. K., GRANT, J. J., BATISTIC, O., LI, L., KIM, B. G., LEE, S. C., KUDLA, J., and LUAN, S., 2007. Two Calcineurin B-Like Calcium Sensors, Interacting with Protein Kinase CIPK23, Regulate Leaf Transpiration and Root Potassium Uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52:223–239.
- CHOU, I. T., and GASSER, C. S., 1997. Characterization of the Cyclophilin Gene Family of *Arabidopsis thaliana* and Phylogenetic Analysis of Known Cyclophilin Proteins. *Plant Mol. Biology*, 35:873–892.
- COHEN, J. D., 1982. Identification and Quantitative Analysis of Indole-3-acetyl-L-aspartate from Seeds of *Glycine max* L.. *Plant Physiol.*, 70:749–753.
- COSSINS, E. A., and CHEN, L., 1997. Folates and One-Carbon Metabolism in Plants and Fungi. *Phytochemistry*, 45(3):437-452.
- CRAFTS-BRANDER, S. J., and SALVUCCI, M. E., 2004. Analyzing the Impact of High Temperature and CO₂ on Net Photosynthesis: Biochemical Mechanisms, Models and Genomics. *Field Crops Research*, 90:75-85.

- DAVIES, R. T., GOETZ, D. H., LASSWELL, J., ANDERSON, M. N., and BARTEL, B., 1999. IAR3 Encodes An Auxin Conjugate Hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell*, 11(3):365-376.
- de los REYES, B. G., TALIAFERRO, C. M., ANDERSON, M. P., MELCHER, U. and MCMAUGH, S. 2001. Induce Expression of the Class II Chitinase Gene During Cold Acclimation and Dehydration of Bermudagrass (*Cynodon* sp.). *Theor. Appl. Genet.*, 103:297-306.
- DEBEAUJON, I., PEETERS, A. J., LEON-KLOOSTERZIEL, K. M., and KOORNNEEF, M., 2001. The TRANSPARENT TESTA12 Gene of Arabidopsis Encodes a Multidrug Secondary Transporter-Like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium. *Plant Cell*, 13:853-871.
- DING, C. K., WANG, C. Y., GROSS, K. C., and SMITH, D. L., 2002. Jasmonate and Salicylate Induce the Expression of Pathogenesis-Related-Protein Genes and Increase Resistance to Chilling Injury in Tomato Fruit. *Planta*, 214:895-901.
- DUNKLEY, T. P. J., HESTER, S., SHADFORTH, I. P., RUNIONS, J., WEIMAR, T., HANTON, S. L., GRIFFIN, J. L., BESSANT, C., BRANDIZZI, F., HAWES, C., WATSON, R. B., DUPREE, P., and LILLEY, K. S., 2006. Mapping the Arabidopsis Organelle Proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(17):6518-6523.
- FEUSSNER, I., KÜHN, H., and WASTERNAK, C., 2001. Lipoxxygenase-Dependent Degradation of Storage Lipids. *Trends Plant Sci.*, 6:268-273.
- FISH, L. E., KIICK, U., and BOGORAD, L., 1985. Two Partially Homologous Adjacent Light-Inducible Maize Chloroplast Genes Encoding Polypeptides of the P700 Chlorophyll a Protein Complex of Photosystem I. *J. Biol.Chem.*, 260:1413-1421.
- FOOTITT, S., SLOCOMBE, S. P., LARNER, V., KURUP, S., WU, Y., LARSON, T., GRAHAM, I., BAKER, A., and HOLDSWORTH, M., 2002. Control of Germination and Lipid Mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis Homologue of Human ALDP. *EMBO J.*, 21:2912-2922.
- GAEDEKE, N., KLEIN, M., KOLUKISAAGLU, U., FORESTIER, C., MULLER, A., ANSORGE, M., BECKER, D., MAMNUN, Y., KUCHLER, K., and SCHULZ, B., 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC Transporter AtMRP5 Controls Root Development and Stomata Movement. *EMBO J.*, 17:1875-1887.
- GALL, J. G., 2000. Cajal Bodies: The First 100 Years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16:273-300.
- GALL, J. G., 2001. A Role for Cajal Bodies in Assembly of The Nuclear Transcription Machinery. *FEBSS Letters*, 498(2-3):164-167.
- GANTT, J. S., and KEY, J. L., 1985. Coordinate Expression of Ribosomal Protein mRNAs Following Auxin Treatment of Soybean Hypocotyls. *J. Biol. Chem.*, 260:6175-6181.
- GARO, J., KIM, S. R., CHUNG, Y. Y., LEE, J. M., and AN, G., 1994. Developmental and Environmental Regulation of Two Ribosomal Protein Genes in Tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 25:761-770.

- GASSER, C. S., GUNNING, D. A., KIM, A., BUDELIER, and BROWN, S. M., 1990. Structure and Expression of Cytosolic Cyclophilin/Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase of Higher Plants and Production of Active Tomato Cyclophilin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9519-9523.
- GEORGIEVA, K., 1999. Some Mechanisms of Damage and Acclimation of the Photosynthetic Apparatus due to High Temperature. Bulg. J. Plant Physiol., 25(3-4):89-99.
- GONG, D., GONG, Z., GUO, Y., and ZHU, J. K., 2002a. Expression, Activation, and Biochemical Properties of A Novel Arabidopsis Protein Kinase. Plant Physiol., 129:225-234.
- GONG, D., GONG, Z., GUO, Y., CHEN, X., and ZHU, J. K., 2002b. Biochemical and Functional Characterization of PKS11, A Novel Arabidopsis Protein Kinase. J Biol. Chem., 277:28340-28350.
- GONG, M., LI, Y. J., DAI, X., TIAN, M., and LI, Z. G., 1997. Involvement of Calcium and Calmodulin in the Acquisition of Heat-Shock Induced Thermotolerance in Maize. J. Plant Physiol., 150:615-621.
- GONG, M., VER DAN LUIT, A. H., KNIGHT, M. R., and TREWAVAS, A. J., 1998. Heat-Shock Induced Changes in Intracellular Ca²⁺ Level in Tobacco Seedlings in Relation to Thermotolerance. Plant Physiol., 116: 429-437.
- GOSSETT, D. R., MILLHOLLN, E. P., LUCAS, M. C., 1994. Anti-Oxidant Response to NaCl Stress in Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Cultivars of Cotton. Crop Science, 34:706-714.
- GURLEY, W. B., 2000. HSP101: A Key Component for the Acquisition of Thermotolerance in Plants. The Plant Cell, 12:457-460.
- GÜR, A., ÇOPUR, O., ve ÖZEL, A., 2000. Harran Ovası Koşullarında Farklı Ekim Zamanlarının Pamuk Bitkisinde (*Gossypium hirsutum*) Verim ve Kalite Unsurlarına Etkisi Üzerinde Araştırmalar. HR.Ü. Ziraat Fak. GAP Tarımsal Araştırma-İnceleme ve Geliştirme Proje Paketi, Proje Kod No:2.1, Kesin Sonuç Raporu, Şanlıurfa, 50s.
- HANSON A. D., and ROJE, S., 2001. One-Carbon Metabolism in Higher Plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 52:119-137.
- HARDIE, D. G., 1999. Plant Protein Serine/Threonine Kinases: Classification and Functions. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50:97-131.
- HAREM, E., 2007. Türkiye’de Tescil Edilen Pamuk Çeşitleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No:65.
- HARWOOD, J. L., 1996. Recent Advances in the Biosynthesis of Plant Fatty Acids. Biochim. et Biophys. Acta, 1301:7-56.
- HIGGINS, C. F., 1992. ABC Transporters: From Microorganisms to Man. Annu. Rev. Cell Biol., 8:67-113.
- HOAGLAND, D. R., and ARNON, D. S., 1950. The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil. Cal. Agric. Exp. Stat. Circ., 374:305-311.
- HONG, J. K., and HWANG, B. K., 2002. Induction by Pathogen, Salt And Drought of A Basic Class II Chitinase mRNA and Its in situ Localization in Pepper (*Capsicum annuum*). Physiologia Plantarum, 114(4):549-558.
- HONG, S. W., and VIERLING, E., 2000. Mutants of *Arabidopsis thaliana* Defective in the Acquisition of Tolerance to High Temperature Stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4392-4397.

- HONG, S. W., LEE, U., and VIÉRLING, E., 2003. Arabidopsis *hot* Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. *Plant Physiology*, 132:757–767.
- IBA, K., 2002. Acclimative Response to Temperature Stress in Higher Plants: Approaches of Gene Engineering for Temperature Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53:25–245.
- ITO, T., KIM, G. T., and SHINOZAKI, K., 2000. Disruption of an Arabidopsis Cytoplasmic Ribosomal Protein S13-Homologous Gene by Transposon-Mediated Mutagenesis Causes Aberrant Growth and Development. *Plant J.*, 22:257–264.
- JAGTAP, V., BHARGAVA, S., STREB, P., and FEIERABEND, J., 1998. Comparative Effect of Water, Heat and Light Stresses on Photosynthetic Reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Experimental Botany*, 49(327):1715-1721.
- JAIN, A. K., BASHA, S. M., and HOLBROOK, C. C., 2001. Identification of Drought-Responsive Transcripts in Peanut (*Arachis hypogea* L.). *Electronic Journal of Biotech.*, 4(2):ISSN:0717-3458. <http://www.ejb.org/content/vol4/issue2/full/2>
- JASINSKI, M., STUKKENS, Y., DEGAND, H., PURNELLE, B., MARCHAND-BRYNAERT, J., and BOUTRY, M., 2001. A Plant Plasma Membrane ATP Binding Cassette-Type Transporter is Involved in Antifungal Terpenoid Secretion. *Plant Cell*, 13:1095–1107.
- JIANG, Y., and HUANG, B., 2001. Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Sci.*, 41:436–442.
- JOANIN, P., GIGOT, C., and PHILLIPS, G., 1993. cDNA Nucleotide Sequence And Expression of A Maize Cytoplasmic Ribosomal Protein S13 Gene. *Plant Mol. Biol.*, 21:701–704.
- JOSHI, C. P., and NGUYEN, H. T., 1996. Differential Display-Mediated Rapid Identification of Different Members of a Multigene Family, HSP16.9 in Wheat. *Plant Mol. Biol.*, 31(3):575–584.
- JOSHI, C. P., KLUEVA, N. Y., MORROW, K. J., and NGUYEN, H. T., 1997. Expression of a Unique Plastid-Localized Heat-Shock Protein is Genetically Linked to Acquired Thermotolerance in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5-6):834-841.
- JUNG, I. L., and KIM I. G., 2003. Thiamine Protects Against Paraquat-Induced Damage: Scavenging Activity of Reactive Oxygen Species. *Environ. Toxi. and Pharmacology*, 15(1):19-26.
- KAMBACH, C., WALKET, S., and NAGAIT, K., 1999. Structure and Assembly of the Spliceosomal Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles. *Curr. Op. in Structural Biology*, 9:222-230.
- KASPRZEWSKA, A., 2003. Plant Chitinases—Regulation and Function. *Cell. and Mol. Biol. Letters*, 8:809–824.
- KENTSIS, A, DWYER, E. C., PEREZ, J. M., SHARMA, M., CHEN, A., PAN, Z. Q., and BORDEN, K. L. B., 2001. The RING Domains of the Promyelocytic Leukemia Protein PML and the Arenaviral Protein Z Repress Translation by Directly Inhibiting Translation Initiation Factor eIF4E. *Journal of Mol. Biol.*, 312:609-623.

- KIM, K. N., CHEONG, Y. H., GRANT, J. J., PANDEY, G. K., and LUAN, S., 2003. CIPK3, A Calcium Sensor-Associated Protein Kinase That Regulates Abscisic Acid and Cold Signal Transduction in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15(2):411-23.
- KOLOMIETS M. V., HANNAPEL D. J., CHEN H., TYMESON M., and GLADON R. J., 2001. Lipoxygenase is Involved in The Control of Potato Tuber Development. *Plant Cell*, 13:613–626.
- KOLUKISA OGLU, Ü., WEINL, S., BLAZEVIC, D., BATISTIC, O., and KULDA, J., 2004. Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases: Genomics of the Arabidopsis and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. *Plant Physiology*, 134:43–58.
- KOSAREV, P., MAYER, K. F. X., and HARDTKE, C. S., 2002. Evaluation and Classification of RING-finger Domains Encoded by the Arabidopsis Genome. *Genome Biology*, 3(4):1-12.
- KOWALCZYK, M., and SANDBERG, G., 2001. Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid Metabolites of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 127:1845–1853.
- KREUS, K., DEHESH, K., and APEL, K., 1986. The Light-Dependent Accumulation of the P700 Chlorophyll A Protein of the Photosystem I Reaction Center in Barley. Evidence for Translational Control. *Eur. J. Biochem.*, 159:459-467.
- KRIEG, D. R., 1983. Photosynthetic Activity during Stress. *Agricultural Water Management*, 7:249-263.
- KUSHNIR, S., BABIYCHUK, E., STOROZHENKO, S., DAVEY, M. W., PAPENBROCK, J., RYCKE, R. D., ENGLER, G., STEPHAN, U. W., LANGE, H., and KISPAL, G., 2001. A Mutation of the Mitochondrial ABC Transporter *Stal* Leads to Dwarfism and Chlorosis in the Arabidopsis Mutant *Starik*. *Plant Cell*, 13:89–100.
- KWON, Y., KIM, S. H., JUNG, M. S., KIM, M. S., OH, J. E., JU, H. W., KIM, K. I., VIERLING, E., LEE, H., and HONG, S. W., 2007. Arabidopsis *hot2* Encodes an Endochitinase-Like Protein That is Essential for Tolerance to Heat, Salt and Drought Stresses. *Plant J.*, 49(2):184-193.
- LARKINDALE, J., and HUANG, B. R., 2004. Changes of Lipid Composition And Saturation Level in Leaves and Roots For Heat-Stressed and Heat-Acclimated Creeping Bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Environmental and Experimental Botany*, 51(1):57-67.
- LAW, R.D., and CRAFTS-BRANDERS, J., 1999. Inhibition and Acclimation of Photosynthesis to Heat Stress Is Closely Correlated with Activation of Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiology*, 120:173-181.
- LAW, R. D., CRAFTS-BRANDNER, S. J., and SALVUCCI, M. E., 2001. Heat Stress Induces the Synthesis of a New Form of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase in Cotton Leaves. *Planta*, 214(1):117-125.
- LECLERE, S., TELLEZ, R., RAMPEY, R.A., MATSUDA, S.P., and BARTEL, B., 2002. Characterization of a Family of IAA-Amino Acid Conjugate Hydrolases from Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, 277(23):20446-20452.

- LEE, B., KAPOOR, A., ZHU, J., and ZHU, J. K., 2006b. STABILIZED1, a Stress-Upregulated Nuclear Protein Is Required for Pre-mRNA Splicing, mRNA Turnover, and Stress Tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell.*, 18(7):1736–1749.
- LEE, S. B., KAITTANIS, C., JANSEN, R. K., HOSTETLER, J. B., TALLON L. J., TOWN, C. D., and DANIELL, H., 2006a. The Complete Chloroplast Genome Sequence of *Gossypium hirsutum*: Organization and Phylogenetic Relationships to other Angiosperms. *BMC Genomics*, 7:61-72.
- LEWIN, B., 2004. *Genes VIII*. International Edition, Pearson Prentice Hall, USA, 1051p.
- LIANG, P., and PARDEE, A. B., 1992. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 257:967–971.
- LIU, H. T., LI, B., SHANG, Z. L., LI, X. Z., MU, R. L., SUN, D. Y., and ZHOU, R. G., 2003. Calmodulin is Involved in Heat Shock Signal Transduction in Wheat. *Plant Physiology*, 132:1186–1195.
- LIU, P. F., WANG, Y. K., CHANG, W. C., CHANG, H. Y., and PAN, R. L., 2008. Regulation of *Arabidopsis thaliana* Ku Genes at Different Developmental Stages under Heat Stress. *Biochim. Biophys. Acta*, 1779(6-7):402-407.
- LOVERING, R., HANSON, I. M., BORDEN, K. L., MARTIN, S., O'REILLY, N. J., EVAN, G. I., RAHMAN, D., PAPPIN, D. J., TROWSDALE, J., and FREEMONT, P.S., 1993. Identification and Preliminary Characterization of A Protein Motif Related to the Zinc Finger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2112-2116.
- LUAN, S., LANE, W. S., and SCHREIBER, S. L., 1994. pCyP B: A Cyclophilin Chloroplast-Localized, Heat Shock- Responsive from Fava Bean. *The Plant Cell*, 6:885-892.
- MACHADO, C. R., COSTA de OLIVEIRA, R. L., BOITEUX, S., PRAEKELT, U. M., MEACOCK, P. A., and MENCK, C. F. M., 1996. THI1, A Thiamine Biosynthetic Gene in *Arabidopsis thaliana*, Complements Bacterial Defects in DNA Repair. *Plant Mol. Biol.*, 31:585-593.
- MARGIS-PINHEIRO, M., MARIVET, J., and BURKARD, G., 1994. Bean Class IV Chitinase Gene: Structure, Developmental Expression and Induction by Heat Stress. *Plant Science*, 98 :163-173
- MARIVET, J., FRENDON, P., and BURKARD, G., 1992., Effects of Abiotic Stresses on Cyclophilin Gene-Expression in Maize and Bean and Sequence Analysis of Cyclophilin cDNA. *Plant Science*, 84: 171–178
- MARIVET, J., MARGIS-PINHEIRO, M., FRENDON, P., and BURKARD, G., 1994. Bean Cyclophilin Gene Expression During Plant Development and Stress Conditions. *Plant Mol Biol.*, 26(4):1181-1189.
- MARTINOIA, E., KLEIN, M., GEISLER, M., BOVET, L., FORESTIER, C., KOLUKISA OGLU, U., MULLER-ROBER, B., and SCHULZ, B., 2002. Multifunctionality of Plant ABC Transporters: More than Just Detoxifiers. *Planta*, 214:345–355.
- MAYFIELD, S. P., YOHN, C. B., COHEN, A., and DANON, A., 1995. Regulation of Chloroplast Gene Expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46:147-166.

- MØLLER, S. G., KUNKE, T., and CHUA, N. H., 2001. A Plastidic ABC Protein Involved in Intercompartmental Communication of Light Signaling. *Genes Dev.*, 15:90–103.
- NOH, B., MURPHY, A. S., and SPALDING, E. P., 2001. Multidrug Resistance-Like Genes of Arabidopsis Required for Auxin Transport and Auxin-Mediated Development. *Plant Cell*, 13:2441–2454.
- ÖSTIN, A., MORITZ, T., and SANDBERG, G., 1992. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Conjugates and Oxidative Metabolites of Indole-3-acetic acid. *Biol. Mass Spectrom.*, 21:292–298.
- ÖZÜDOĞRU, T., 2006. Pamuk Durum ve Tahmin: 2006/2007. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 148.
- PANCHUK, I. I., VOLKOV, R. A., and SCHÖFFL, F., 2002. Heat Stress and Heat Shock Transcription Factor-Dependent Expression and Activity of Ascorbate Peroxidase in Arabidopsis1. *Plant Physiology*, 129:838–853.
- PANDEY, G. K., CHEONG, Y. H., KIM, B. G., GRANT, J. J., LI, L., and LUAN, S., 2007. CIPK9: A Calcium Sensor-Interacting Protein Kinase Required for Low-Potassium Tolerance in Arabidopsis. *Cell Res.*, 17(5):411-21.
- PARK, J. A., CHO, S. K., KIM, J. E., CHUNG, H. S., HONG, J. P., HWANG, B., HONG, C. B., and KIM, W. T., 2003. Isolation of cDNAs Differentially Expressed in Response to Drought Stress and Characterization of the Ca-LEAL1 Gene Encoding a New Family of Atypical LEA-like Protein Homologue in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Plant Science*, 165:471-481.
- PATIL, M. A., PIERCE, M. L., PHILLIPS, A. L., VENTERS, B. J. and ESSENBERG, M. K., 2005. Identification of Genes Up-Regulated in Bacterial-Blight-Resistant Upland Cotton in Response to Inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 67(6):319-335.
- PAVONCELLO, D., LURIE, S., DROBY S., and PORAT R., 2001. A Hot Water Treatment Induces Resistance to *Penicillium digitatum* and promotes The Accumulation of Heat Shock and Pathogenesis-Related Proteins In Grapefruit Flavedo. *Physiologia Plantarum*, 111:17–22.
- PAYTON, P., HOLADAY, A. S., ALLEN, R. D., 2001. Antioxidant Systems and Environmental Stress Tolerance in Cotton. In *Genetic Improvement of Cotton Engineering Technologies*. Edt. Jenkins, J.N., Saha, S., Science Publishers, Inc. ISBN 1-57808-145-9.
- PIECHULLA, B., and GRUISSEM, W., 1987. Diurnal mRNA Fluctuations of Nuclear And Plastid Genes In Developing Tomato Fruits. *EMBO J.*, 6:3593-3599.
- POLGE, C., and THOMAS, M., 2007. SNF1/AMPK/SnRK1 Kinases, Global Regulators at the Heart of Energy Control? *Trends in Plant Science*, 12(1):20–28.
- PORTA, H., and ROCHA-SOSA, M., 2002. Plant Lipoxygenases: Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology*, 130:15–21.
- RAHMAN, H., MALIK, S. A., and SALEEM, M., 2004. Heat Tolerance of Upland Cotton During the Fruiting Stage Evaluated Using Cellular Membrane Thermostability. *Field Crops Research*, 85:149–158.

- RAIKHEL, N. V., and LEE, H. I., 1993. Structure and Function of Chitin-Binding Proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44:591-615.
- RAVANEL, S., CHEREST, H., JABRIN, S., GRUNWALD, D., SURDINKERJAN, Y., DOUCE, R., and RÉBEILLÉ, F., 2001. Tetrahydrofolate Biosynthesis in Plants: Molecular and Functional Characterization of Dihydrofolate Synthetase and Three Isoforms of Folylpolylglutamate Synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(26):15360–15365.
- REA, P. A., LI, Z. S., LU, Y. P., DROZDOWICZ, Y. M., and MARTINOIZ, E., 1998. From Vacuolar GS-X Pumps to Multispecific ABC Transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:727–760.
- REDDING, K., COURNAC, L., VASSILIEV, I. R., GOLBECK, J. H., PELTIER, G., and ROCHAIX, J. D., 1999. Photosystem I is Indispensable for Photoautotrophic Growth, CO₂ Fixation, and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, 274:10466-10473.
- REDDY, K. R., HODGES, H. F., MCKINION, J. M., 1995. Carbon Dioxide and Temperature Effects on Pima Cotton Growth. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 54:17-29.
- REDDY, K. R., KAKANI, V. G., ZHAO, D., KOTI, S., and GAO, W., 2004. Interactive Effects of Ultraviolet-B Radiation and Temperature on Cotton Physiology, Growth, Development and Hyperspectral Reflectance. *Photochemistry and Photobiology*, 79(5):416–427.
- REVENKOVA, E., MASSON, J., KONCZ, C., AFSAR, K., JAKOVLEVA, L., and PASZKOWSKI, J., 1999. Involvement of *Arabidopsis thaliana* Ribosomal Protein S27 in mRNA Degradation Triggered by Genotoxic Stress. *EMBO J.*, 18:490–499.
- RIBEIRO, D. T., FARIAS, L. P., de ALMEIDA, J. D., KASHIWABARA, P. M., RIBEIRO, A. F. C., SILVA-FILHO, M. C., MENCK, C. F. M., and VAN SLUYS, M. A., 2005. Functional Characterization of the THI1 Promoter Region from *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 56:1797-1804.
- RIZHSKY, L., LIANG, H., and MITTLER, R., 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology*, 130:1143-1151.
- ROMANO, P. G. N., HORTON, P., and GRAY J. E., 2004. The Arabidopsis Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiology*, 134:1268–1282.
- ROOPASHREE, S., SINGH, S. A., GOWDA L. R. and RAO, A. G. A., 2006. Dual-Function Protein in Plant Defense: Seed Lectin from *Dolichos biflorus* (horse gram) Exhibits Lipoxxygenase Activity. *Biochemical Journal*, 395:629–639.
- SAITO, T., TADAKUMA, K., TAKAHASHI, N., ASHIDA, H., TANAKA, K., KAWAMUKAI, M., MATSUDA, H., and NAKAGAWA, T., 1999. Two Cytosolic Cyclophilin Genes of *Arabidopsis thaliana* Differently Regulated in Temporal and Organ-Specific Expression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(4):632-637.

- SAKUMA, Y., MARUYAMA, K., QIN, F., OSAKABE, Y., SHINOZAKI, K., and YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2006. Dual Function of an Arabidopsis Transcription Factor DREB2A in Water-stress-responsive and Heat-stress-responsive Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(49):18822-18827.
- SALVUCCI, M. E., and CRAFTS-BRANDNER, S. J., 2004. Inhibition of Photosynthesis by Heat Stress: The Activation State of Rubisco as a Limiting Factor in Photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120:179–186.
- SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R., DAVIES, T. G. E., COLEMAN, J. O. D., and REA, P. A., 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(32):30231–30244.
- SAVCHENKO, G. E., KLYUCHAREVA, E. A., ABRABCHIK, L. M., and SERDYUCHENKO, E. V., 2002. Effect of Periodic Heat Shock on The Membrane System of Etioplasts. *Russ. J. Plant Physiol.* 49:349–359.
- SCHÖFFL, F., PRÄNDL, R., and REINDL, A., 1998. Regulation of the Heat-Shock Response. *Plant Physiol.*, 117:1135–1141.
- SCHULLER, A., and LUDWIG-MÜLLER, J., 2006. A Family of Auxin Conjugate Hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and Expression During Clubroot Disease. *New Phytol.*, 171(1):145-57.
- SEKI, M., NARUSAKA, M., ABE, H., KASUGA, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., CARNICI, P., HAYASHIZAKI, Y., SHINOZAKI, K., 2001. Monitoring The Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes Under Drought and Cold Stresses by Using A Full Length cDNA Microarray. *Plant Cell*, 13:61-72.
- SHAKIROVA, F. M., BEZRUKOVA M. V., and SHAYAKHMETOV, I. F., 1996. Effect of Heat Shock on Dynamics of ABA and WGA Accumulation in Wheat Cell Culture. *Plant Growth Regulation*, 19(1):85–87.
- SHINDO, C., and SASAKUMA, T., 2002. Genes Responding to Vernalization in Hexaploid Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(6-7):1003-1010.
- SIDLER, M., HASSA, P., HASAN, S., RINGLI, C., and DUDLER, R., 1998. Involvement of an ABC Transporter in a Developmental Pathway Regulating Hypocotyl Cell Elongation in the Light. *Plant Cell*, 10:1623–1636.
- SIMOES-ARAÚJO, J. L., ALVES-FERREIRA, M., RUMJANEK, N. G., and MARGIS-PINHEIRO, M., 2008. VuNIP1 (NOD26-like) and VuHSP17.7 Gene Expression are Regulated in Response to Heat Stress in Cowpea Nodule. *Env. and Exp. Botany* 63(1-3):256-265.
- SINGH, K.B., FOLEY, R.C., and ONATE-SANCHEZ, L., 2002. Transcription Factors in Plant Defense and Stress Responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:430-436.
- SINGH, R. P., PRASAD, P. V. V., SUNITA, K., GIRI, S. N., and REDDY, K. R., 2007. Influence of High Temperature and Breeding for Heat Tolerance in Cotton: A Review. *Advances in Agronomy*, 93:315-385.
- SLEEMAN, J. E., AJUH, P., and LAMOND, A. I., 2001. snRNP Protein Expression Enhances the Formation of Cajal Bodies Containing p80-coilin and SMN. *Journal of Cell Science*, 114(24):4407-4419.

- SMART, L. B., ANDERSON, S. L., and McINTOSH, L., 1991. Targeted Genetic Inactivation of The Photosystem I Reaction Center in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *EMBO J.*, 10:3289-3296.
- SMART, L. B., WARREN, P. V., GOLBECK, J. H., and McINTOSH, L., 1993. Mutational Analysis of the Structure and Biogenesis of the Photosystem I Reaction Center in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1132-1136.
- SMITH, A. G., CROFT, M. T., MOULIN, M., and WEBB M. E., 2007. Plants Need Their Vitamins Too. *Current Opinion in Plant Biology*, 10:266–275.
- SMITH, C. W., and COTHREN, J. T., 1999. Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, Inc. 850p.
- SOMERVILLE, C., and BROWSE, J., 1991. Plant Lipids, Metabolism and Membranes. *Science*, 252:80–87.
- SONG, P., and ALLEN, R. D., 1997. Identification of a Cotton Fiber-Specific acyl Carrier Protein cDNA by Differential Display. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1351:305-312.
- SONNER, J. M., and PURVES, W. K., 1985. Natural Occurrence of Indole-3-acetyl aspartate and Indole-3-acetyl glutamate in Cucumber Shoot Tissue. *Plant Physiol.*, 77:784–785.
- SOTIRIOS, K. A., ARGYROKASTRITIS, A., LOUKAS, M., ELIOPOULOS, E., TSAKAS S., and KALTSIKES, P. J., 2006. Isolation and Characterization of Stress Related Heat Shock Protein Calmodulin Binding Gene from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica*, 147(3):343-351.
- SPADORO-TANK J. P., and ETZLER, M. E., 1988. Heat Shock Enhances the Synthesis of a Lectin-Related Protein in *Dolichos biflorus* Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.*, 88:1131-1135.
- SUN, W., MONTAGU, M. V., and VERBRUGGEN, N., 2002. Small Heat Shock Proteins and Stress Tolerance in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577:1–9.
- SUNG, D. Y., KAPLAN, F., LEE, K. J., and GUY, C. L., 2003. Acquired Tolerance to Temperature Extremes. *Trends in Plant Science*, 8(4):179-187.
- SYKES, K., GETHING, M. J., and SAMBROOK, J., 1993. Proline Isomerases Function During Heat Shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5853-5857.
- TAM, Y. Y., EPSTEIN, E., and NORMANLY, J., 2000. Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis. Low Steady-State Levels of Indole-3-acetyl aspartate, Indole-3-acetyl glutamate, and Indole-3-acetyl glucose. *Plant Physiol.*, 123:589–595.
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000. Analysis of The Genome Sequence of The Flowering Plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408:796-815.
- THEODOULOU, F. L., 2000. Plant ABC Transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465:79–103.
- TITARENKO, E., ROJO, E., LEON, J., and SANCHEZ-SERRANO, J. J., 1997. Jasmonic Acid-Dependent and -Independent Signaling Pathways Control Wound-Induced Gene Activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 817–826.

- TOMMASINI, R., VOGT, E., FROMENTEAU, M., HÖRTENSTEINER, S., MATILE, P., AMRHEIN, N., and MARTINOIA E., 1998. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both Glutathione-Conjugate and Chlorophyll Catabolite Transport Activity. *The Plant Journal*, 13(6):773–780.
- TOSHIHISA, I., ZE-SHENG, L., YU-PING, L., and PHILIP, A. R., 1997. The GS-X Pump in Plant, Yeast, and Animal Cells: Structure, Function, and Gene Expression. *Bioscience Reports*, 17(2):189-202.
- TSUGEKI, R., KOCHIEVA, E. Z., and FEDOROFF, N. V., 1996. A Transposon Insertion in The Arabidopsis SSR16 Gene Causes An Embryo-Defective Lethal Mutation. *Plant J.*, 10:479–489.
- TU, L. L., ZHANG, X. L., LIANG, S. G., LIU, D. Q., ZHU, L. F., ZENG, F. C., NIE, Y. C., GUO, X. P., DENG, F. L., TAN, J. F., and XU, L., 2007. Genes Expression Analyses of Sea-Island Cotton (*Gossypium barbadense* L.) During Fiber Development. *Plant Cell Rep.*, 26:1309–1320.
- TULLBERG, A., ALEXCIEV, K., PFANNSCHMIDT, T., and ALLEN J. F., 2000. Photosynthetic Electron Flow Regulates Transcription of the *psaB* Gene in Pea (*Pisum sativum* L.) Chloroplasts through the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Plant Cell Physiol.*, 41(9):1045–1054.
- UDALL, J. A., SWANSON, J. M., HALLER, K., RAPP, R. A., SPARKS, M. E., HATFIELD, J., YU, Y., WU, Y., DOWD, C., ARPAT, A. B., SICKLER, B. A., WILKINS, T. A., GUO, J. Y., CHEN, X. Y., SCHEFFLER, J., TALIERCIO, E., TURLEY, R., MCFADDEN, H., PAYTON, P., KLUEVA, N., ALLEN, R., ZHANG, D., HAIGLER, C., WILKERSON, C., SUO, J., SCHULZE, S. R., PIERCE, M. L., ESSENBERG, M., KIM, H., LLEWELLYN, D. J., DENNIS, E. S., KUDRNA, D., WING, R., PATERSON, A. H., SODERLUND, C., and WENDEL, J. F., 2006. A Global Assembly of Cotton ESTs. *Genome Res.*, 16(3):441-450.
- UEDA, A., SHI, W., NAKAMURA, T., and TAKABE, T., 2002. Analysis of Salt-Inducible Genes in Barley Roots by Differential Display. *J. Plant Res.*, 115:119-130.
- UMEZAWA, T., YOSHIDA, R., MARUYAMA, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., and SHINOZAKI, K., 2004. SRK2C, a SNF1-Related Protein Kinase 2, Improves Drought Tolerance by Controlling Stress-Responsive Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(49):17306–17311.
- VAN LIJSEBETTENS, M., VANDERHAEGHEN, R., DE BLOCK, M., BAUW, G., VILLARROEL, R., and VAN MONTAGU, M., 1994. An S18 Ribosomal Protein Gene Copy at the Arabidopsis PFL Locus Affects Plant Development by Its Specific Expression in Meristems. *EMBO J.*, 13:3378–3388.
- VERBURG J. G., and HUYNH, Q. K., 1991 Purification and Characterization of an Antifungal Chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 95:450-455.

- VERRIER, P. J., BIRD, D., BURLA, B., DASSA, E., FORESTIER, C., GEISLER, M., KLEIN, M., KOLUKISA OGLU, Ü., LEE, Y., MARTINOIA, E., MURPHY, A., REA, P. A., SAMUELS, L., SCHULZ, B., SPALDING, E. J., YAZAKI K., and THEODOULOU, F. L., 2008. Plant ABC Proteins – a Unified Nomenclature and Updated Inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4):151-159.
- VISIOLI, G., MAESTRI, E., and MARMIROLI, N., 1997. Differential Display-Mediated Isolation of a Genomic Sequence for a Putative Mitochondrial LMWHSP Specifically Expressed in Condition of Induced Thermotolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology*, 34:517–527.
- VOLKOV, R. A., PANCHUK, I. I., MULLINEAUX P. M., and SCHÖFFL, F. 2006. Heat Stress-induced H₂O₂ is Required for Effective Expression of Heat Shock Genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 61(4-5):733-746.
- VRANOVA, E., ATICHARTPONGKUL, S., VILLARROEL, R., VAN MONTAGU, M., INZE, D., and VAN CAMP, W., 2002b. Comprehensive Analysis of Gene Expression in *Nicotiana tabacum* Leaves Acclimated to Oxidative Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:10870–10875.
- VRANOVA, E., INZE, D., and BREUSEGEM, F. V., 2002a. Signal Transduction during Oxidative Stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(372):1227-1236.
- WATERS, E.R., 2003. Molecular Adaptation and The Origin of Land Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29:456–463.
- WILLIAMS, M. E., and SUSSEX, L. M., 1995. Developmental Regulation of Ribosomal Protein L16 Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 8:65–76.
- XU, J., BELANGER, F., and HUANG, B., 2008. Differential Gene Expression in Shoots and Roots under Heat Stress for a Geothermal and Non-thermal *Agrostis* Grass Species Contrasting in Heat Tolerance. *Environ. and Exp. Botany* 63(1-3):240-247.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., KASUGA, M., LIU, Q., NAKASHIMA, K., SAKUMA, Y., ABE, H., SHINWARI, Z. K., SEKI, M., and SHINOZAKI, K., 2002. Biological Mechanisms of Drought Stress Response. JIRCAS Working Report, 1-8.
- YEH, S., MOFFAT, B. A., GRIFFITH, M., XIONG, F., YANG, D. S. C., WISEMAN, S. B., SARHAN, F., DANYLUK, J., XUE, Y. Q., HEW, C. L., DOHERTY-KIRBY, A. and LAJOIE, G., 2000. Chitinase Genes Responsive to Cold Encode Antifreeze Proteins in Winter Cereals. *Plant Physiol.*, 124:1251-1263.
- YU, X. M., GRIFFITH, M. and WIESEMAN, S.B., 2001. Ethylene Induces Antifreeze Activity in Winter Rye Leaves. *Plant Physiol.*, 126:1232-1240.
- ZHANG, D., HRMOVA, M., WAN, C. H., WU, C., BALZEN, J., CAI, W., WANG, J., DENSMORE, L. D., FINCHER, G. B., ZHANG, H., and HAIGLER, C. H., 2004. Members of A New Group of Chitinase-Like Genes are Expressed Preferentially in Cotton Cells with Secondary Walls. *Plant Mol. Biol.*, 54:353–372.
- ZHANG, Y., MIAN, M. A., CHEKHOVSKIY, K., SO, S., KUPFER, D., LAI, H., and ROE, B. A., 2005. Differential Gene Expression in *Festuca* under Heat Stress Conditions. *J. Exp. Bot.*, 56(413):897-907.

- ZHOLKEVICH, V. N., ZUBKOVA, N. K., MAEVSKAYA, S. N., VOLKOV, V. S., RAKITIN, V. Y., and KUZNETSOV V. V. 1997. Interaction between Heat Shock and Water Stress in Plants: 2. Osmoregulation in the Leaves of Cotton Plants Successively Treated with Short-Term Hyperthermia and Soil Drought. *Russian Jour. of Plant Physio.*, 44(4)533-542.
- ZHU, Y. Q., XU, K.X., LUO, B., WANG, J. W., and CHEN, X. Y., 2003. An ATP-Binding Cassette Transporter GhWBC1 from Elongating Cotton Fibers. *Plant Physiol.*, 133:580-588.
- ZIMMERMANN, P., HENNIG, L., and GRUISSEM, W., 2005. Gene Expression Analysis and Network Discovery Using Genevestigator. *Trends in Plant Science*, 9(10):407-409.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Hatay ilinde doğdu. İlk, orta ve lise öğretimini Adana'da tamamladı. 1999 yılında, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden Ziraat Mühendisi ünvanı ile mezun oldu. 2000 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2003 yılında, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalına yüksek lisans tezini sunarak, Yüksek Ziraat Mühendisi ünvanını aldı. Halen adı geçen bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarına devam eden Ufuk DEMİREL, evli ve bir kız çocuğu babasıdır.

EKLER: Pamukta sıcaklık stresi ile ilişkili 27 cDNA'nın nükleotid dizileri

HSGh21, 194 nükleotid:

AAGCTTCGAAATGGCATGTATAGGACTACCCTTTTTGTTGGGGGTCATGGACCCTTTG
GACTTGTATAATTTTGGATAGCCATGCGAAAATGGCTTATATATGTTTGAGTATAATG
TTATAATCATTTGGTATGGATATGGTTATTGAGAGGTGTGGATATGCTTAACAAGGAT
TGGCCAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh22, 37 nükleotid:

AAGCTTGACCTTTACTATAATCAAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh23, 320 nükleotid:

AAGCTTGACCTTTTGGGAGTTGGCCGAGAAGAAGCTGGTCCTCATGATATGCTCACCT
GTGAAGAACAAGAACCCTTCACTGTTTCTCCTTCATCCGCAACATCATCATGAATAAA
GGAAACAAACTCTGGTATATGCGGATTTATTTCAATTTGCGTGAATCCCACAATGGAT
TGCTCTTAACAATTGTGGAGTTTTACAGCAGTTTGTGTTGGTTGTATAAATTTGAGAT
TTTTTTTTTCTTCTTTTTACTATCAAATTGTAGCTAATAGTACGTGATTGAGTGGTCTAT
ATGTCTATTCCCAAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh26, 553 nükleotid:

AAGCTTTTTGAGGTCATGATGGGCCATTTGGAGCCACCGGGGTGAAGAGGTTGAAAAG
CATTTGGGATGATTGATAGTGTGCCAGGGATGAAGGCACTGGATATGAATACAGCTGA
GGATGCTATAGTGAGGCTGACTAGGGAAATTGTGCCTGGGATGATTGTCACCGGGAT
GGAAGTTGCTGAGATTGATGGATCCCCAAGAATGGGGCCAACATTTGGAGCAATGAT
GATATCAGGGCAAAAAGGCAGCCCATCTTGCCCTGAAATCATTAGGATTGCCTAATGCA
ATTGATGGAACATATGTGGGAAGCATTACCCCGGAGCTGATCTTGGCCGCTGCAGATT
CCGCCGAGACCGCTGACGCTTAGTTGCAAGGGTCATAGTTGCTAAACTGCTATGGAGA
TAGGAGGAATTGGAATAATGTGCAGTCATTGGTAGGATTTGGAATAATCTCCTGTAAC
TTAGTAGCAAAACCTTAGCATTTTGTAGCTTGTGTTCTTCTCCTTGCATGCCTTTAAT
TGAGTTCTGTTCTTTCAAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh29, 369 nükleotid:

AAGCTTACGTTAGCATGAACATGAGGGAGGTTCTAACCTACGCCGGGGGAGTGGAGT
TGCAGCAGTTTGAGAGAGACCCTCGCTGTTGAAACCCCAAGGTTCTGGATTTCGATGA
GCCTGCCTCGGAAACATGGGGTGATTGATTGTGCGAAGGCAAATAAAAAATAAAAA
TGATAATGCCAAAAATGCCCTTCTCTATGTTTAGCAAAAAAAAAAGGAAAATTTGAGTTG
GAGTTTCCAAAAAGGGAAAAACAAAAGTAGTTTTCTTGCATTTTGTAAATTAATGTC
TTTTCTTAATCCAAAATTGATATCCGTATTTAAATAAATTTAAATTAATGCTTTGAA
TGGTATCAAAAAAAAAAAAAAGCTT

EKLER: (devam)

HSGh30, 336 nükleotid:

AAGCTTACGTTAGGACTATAATAGGGGGTACGATTGAGAAAAGCTCCGGCTATCATA
ATTTGAGAAAAACAAGAGTTGTTGTATTTATCCTATATAATGAACTTTAGAATGGCAT
GCATTGGTAGGGAGTAAGAACAATAAAAAGAAAAACAGTAACATTATATATACT
ATGATGTCATGGTTTCTATTCTAGGCCGAGATTTTACTCTCATATAAGACTCGGCA
GTCAGGGATGTGATTTTGTGAAGAAATAGAGTCGATTTCTTATGTCTAGTTGTTTCTG
CATTAATACAATGGATTATCTCTTTATTTTCCAAAAAAAAAAAAAGCT

HSGh31, 288 nükleotid:

AGCTTACGTTAGGACTATAATAGCGGGTATGATCGAGAAAAGCTCCAGCTTTCATACAT
TTGAGAAAAACAAGAGTTGTTGTATTTATCCTATATAATGAACTTTAGAATGGCATGCATT
GGTAGGGAGTAAGAACAATAAAAAGAAAAACAGTAACATTATATATACTACTATGT
CATGTTTCTATTCTAGGCCGAGATTTTACTCTCATATAAGACTCGGCAGTCAGG
GATGTGATTTTGTGAAGAAATAGAGTCGATTTCTTATGTCTAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh32, 340 nükleotid:

AAGCTTACGTTAGCATGAACATGAGGGAGGTTCTAACCTACGCCGGGGAGTGGAGT
TGCAGCAGTTTGAGAGAGACCACTCGCTGTTGAAACCCCAAGGTTCTGGATTTCGATGA
GCCTGCCTCGGAAACATGGGGTGATTGATTGTCGAAAGCAAATAAAAATAAAAAATAAA
TGATAATGCCAAAAATGCCCTTCTCTATGTTTAGCAAAAAAAAAAGGAAAATTTGAGTTG
GAGTTTCCAAAAAGGGAAAAACAAAAGTAGTTTTCTTGCATTTTGTTTAAATTAATGTC
TTTTTTTTTAATCCAAAATTGATATCCGTATTTAAATAAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh36, 215 nükleotid:

AAGCTTGATTGCCCAATTTGTAGAACGAGGGTTCGATTTGAAAATGAAGATAATTGCA
ATTCGGTCCCTGTTGTTTCGAGGAGAGCAGAGTTTCAGGGCTTGTGTTGATTGTAAGTT
TATTGCAAATTCAGTCCCTCTTTTTTGTATTATAAAATTTACAGCTCCCTTTTTCTTAA
TAATCGTTATGAAGAATTCCTGCAAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh83, 208 nükleotid:

AAGCTTGATTGCCTCTACATCGGGCAAATTTGGTTAATTCCTTATGTTATGCGCTGTAT
CTGCGATAATATCATCTCTTTCGATGGAGAAGGGGGTATGCCCCCTCTATTTCTAC
ATCTAGGATCCGACTTGTATCATTGATAATAATAGGAACTGAACCATTATGGCAAAGA
AAAGTTTGATTCATAGGGAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh84, 47 nükleotid:

CATAACACAAATCTATTAAGAGTGAGTTTGAATAGGCAATCAAGCTT

EKLER: (devam)

HSgh93, 459 nükleotid:

AAGCTTCGACTGTACGGTCATAACAATCGCTCACCGAATAACTTCGGTTCTTGATAGC
GACATGGTTCTTCTTCTAAGTCATGGAGTAATAGAAGAATATGATAGTCCATCAAGTT
TGCTGGAAAACAAGTCTTCATCGTTTGCACAGCTTGTAGCAGAGTACACTGTGAGATC
AAATTCTGGTTTTTGTATAGAACTGGATTGAATTAGACGATGATGAAAATTTACTAGT
GTTAATAATTAGTAATGTTTTAACTTGTAAATTGTGGATGTTTTTCATTGTTTTGTGCCA
TTTTCTTTGGCTCCCAACGATTTTTCCCTTTTTTTGTGGTCCAATTGTTATGTTTTATGTT
GCTAAAACTTTTCGTATGTGTTCCATACTTGTATTATATACATGTATATAAACATAAGG
GGAGATAATAGAAAATTTTGTTAGGATGGTTCGAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSgh94, 458 nükleotid:

AAGCTTCGACTGTACGGTCATAACAATCGCTCACCGAATAACTTCGGTTCTTGATAGC
GACATGGTTCTTCTTCTAAGTCATGGAGTAATAGAAGAATATGATAGTCCATCAAGTT
TGCTGGAAAACAAGTCTTCATCATTTGCACAGCTTGTAGCAGAGTACACTGTGAGATC
AAATTCTGGTTTTTGTATAGAACTGGATTGAATTAGACGATGATGAAAATTTACTAGT
GTTAATAATTAGTAATGTTTTAACTTTAATTGTGGATGTTTTTCATTGTTTTGTGCCAT
TTTTCTTTGGCTCCCAACGATTTTTCCCTTTTTTTGTGGTCCAATTGTTATGTTTTATGTT
GCTAAAACTTTTCGTATGTGTTCCATACTTGTATTATATACATGTATATAAACATAAGG
GGAGATAATAGAAAATTTTGTTAGGATGGTTCGAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSgh96, 335 nükleotid:

AAGCTTCGACTGTGGCTTGATTTATGTGAGGTGGGAAGTCATTGTTTTGATGATGAAGG
TTATTGTTGTTATTGTAACAGTGTGTTTATGTGATTGTTTTAGATGGGAAATTGAAAA
CCCAGATTTGTTGTTGTTTATCCATTGTATGTTGCTGATGTTTTAGATGTTGTGCTGT
TAATGTTGTGGTAGTGGGCTGCTTTAAGTTACCATCTTTGTCTGCAACTTTCCTTCATT
ATCTCTTTTCAATATTATTATCTCACATTTACTGTTTGATTAATTCGACCCATACTTAA
TAGTATTTACACTAATTAATGAGGAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSgh97, 389 nükleotid:

AAGCTTCGACTGTAAACGATAAAGGACTTGCACGAGCATTTCTGAAAGTTGCTGGGG
ATATGCTTGAAATGACAAAGTTAAAGACATGAAACCAGTGATGGGGTCTGAGGATT
TTGCATTTTACCAAGAGGCGTTTCTGGGTATTTCTTCTTCATTGGGATGCAAGATGAA
AACCGCCCGAAGCTCAGCTCAGTCCACACCCCAAACCTCACTATCAATGAAGATATTC
TTCTTACGGTGCTGCACTTCATGCATCATTGGCTACTACTTATCTCCTTGAAGCAGAG
TCGAAACTTCGTCCTACAGGGGGCAATTTACATGATGAACTGTGAAGATTCTTTGAAT
AAGAACACGATCAGATTTATTGGTAGAAAAAAAAAAAAAGCTT

EKLER: (devam)

HSGh100, 644 nükleotid:

AAGCTTTGGTCAGGTCTTTGCAGTTCCTGTTGCTCCAGGAGATGTTATCATTGCTGGCA
CAGATGGACTGTTTCGATAACTTGTACAATAACGAAATTAAGTGCAGTGGTGGTTTATGC
AGTGAGAGCTGGTTTGGGGCCTCAAGTGACTGCTCAGAAGATAGCAGCATTGGCAAG
GCAACGAGCACAGGATAGAGACCGACAACACCTTTCTCCACTGCTGCTCAAGATGC
TGGATTCCGTTATTATGGTGGAAAGCTTGATGACATTACTGCTGTTGTGTCATACATTA
CCAGCTCCGAAGAATTAATGCAGGAGAACAAGTCTAGATGAAGTTAGTGAAGCTGGT
ATGGCCTGTGATCCAAATTTTCGTTTATCAGTTGATCAGTTGGCATTGGGCGATGGAAT
GGATGATGGGATCTTTGTTTGTACTATAGTTGGCAATCAACCAACTTTCCCTCTTC
TTTTTGATGAATTATTCTTTTACCATATTCTGTCAAGTTCCTTTCCCTCTGGATCCATATT
CAAACCACAACATTTTGTAAATATATATTGCTGGTAGACTATTTCTTTATGAAATTA
ATGTTGCTGGAAAAAAATCAAATATAAGGCCTTGCCTGTTAGTAGAAAAAA
AGCTT

HSGh101, 500 nükleotid:

AAGCTTTGGTCAGATAGTACGTATGCTGAATGCTTTTCTCTTCACACTCACACCTCCTC
CATCGTCAATACCTGAATCCGACGCTAGCGAGAAAGCAGGAACGAGTAATGGAACCA
TAACTGAGTTATCTGTTCCGGGCAAAGGGGAAATTTGCTTCCCTACGCCAATTGTTTCG
TGCAAAGAGGACAAGGAACTGATAATGAGGGTAAAACCGGTAAAATTTTAAAAAA
AGGGTTTCTTTTTGTTCCAACCAAGAAAGTTGGCATGTGATAGTAGATATATATGTT
TAACTGAACCTCTTCATAGTTAGCTTTTCTAGTGATGATTTTTTCATCAAGTAAATGTA
GAAAGATGTTTGTGGGGGTAACCTGGCAAATAAAAACAAAAATAGAACCCTTTA
CGTCGTCTAGTCCACATTGTTGTAAAGAAGGTATACGATTTTCAATTTTCCCTGTTT
ATTAATGTTACCCTTCATCTGAAAAAAAGCTT

HSGh106, 391 nükleotid:

AAGCTTTGGTCAGGCTACAAATATCATTCTCGATGAATCTCATGAACGCGTATACTCC
ACCAAGGAAGGTGTTTCAGCAACTTGTGTTGGGCTTGTACATAATAAGAGGTGACAAC
ATAAGTGTGTTGGTGAACCTGGATGAAGAGCTGGATTCTGCACTCGACTTGTCCAACC
TGAGAGCACATCCTTTGAAGCCAGTTATCCATTGATTGAACTGATAAAAGTTGTAGAG
TTATTTTAAAGGACAGCTTGTGGATTGAATACCTTAAAAGAACCAAAGTGTAAATGAA
TGATAATATCAATGTGTATTAAGTTTTGGATGCATTTCTATGTTATTTTTGTATGCCA
ATTGTTTCCCTTCATTCCTTTATGCTCGAAAAAAAGCTA

HSGh110, 337 nükleotid:

AAGCTTTGGTCAGCATAATAAGTCAAGTGATTTTCGAAAATATACAGGTCTGTCTTATT
TGACTTTTTCTTATAACTGGAAAGAACTCAATTGGATGTGACGAAACAGACTTAACC
TAACTTGTCAATCGTGCGGGACGGCTTAATTTTCAGATTTGGTTCGATTTAGTTCCGGT
GATTGTAGTTTCTAAAATTTTTGAATCAATTTGGATTTTCAGATCATTAGGATTGAGGT
TAGTTTGTCACTTGACATATTCGTAATTTTTAATTAGATTATTTCTGTTTGTATCATTCAA
GTAGTCCAATAATTGCTATGTTCCCTGTGGAAAAAAAGCTT

EKLER: (devam)

HSGh113, 198 nükleotid:

AAGCTTTGGTCAGGAAAAGTGTCAATATAGGTCAGCTACATCGTGCAGAAGACTCGA
GAAACCTCGTCTATCGACAAACACCGGTCCGGAAAAAGGGTTATCATAGGGAGAAAG
ATGATGTTTAAAGAGTTCATTGTTGTGTTTTAAAGATGTCATATTTTCTATTAATTTTA
AAGCTACGATGGAAAAAAAAAAGC

HSGh126, 472 nükleotid:

AAGCTTCTCAACGTATACTACTACATGTATTTTCGCCAAAGCAACCACCACAATGCCGG
CTCACAAGGCAAATCGAACGAATTCAACTGTTGGGATGACTGGTTATGCTTAAGGTTA
AATTACTCAATTAATGAAGCCAGGCAGATAAGTTTCACATCTTGTCTAGTGTGACTT
CGATTGACATTGTAATAAACAACACTGTACTTGTATGTTTTCGCTTTTCCATGATGCTAC
AGCTCAGGTAATGAATGTATGGTGTCAATGGAAGGAGCGATAGATTTGTTGGGAACA
ATGTACGTAAAGATCAAAGAAATGTCTTGGGGCTTGACCTCAGATGTCAGCCATCGCT
TGGCCTAGTGATATTCTACAGAACTCTGGGAACTATACTATATTAGCAACTTGTTTT
ATAAGGAAATTTGAGCTTGGTATATTAATTCTAGTATGTTGCTTGTCTTGAAAAAAA
AAAAGCTT

HSGh127, 461 nükleotid:

AAGCTTCTCAACGCTTCCTCTCATTTCCTCAAATCCTTTCATCCATCCAAATAAAAAATA
TCCCAATGGCTGAAGGAGGATCGATGGAGTCTGCGGCGGGTCGATACCAATCGACGT
TGGATGCCTTGTCTGCTGTTGATAACGAAAAAGAGCCGTGCTGACAAGAGTAATAAAG
GGGACCGCTACGACTTGCTCTTTGATTATTTGAAAATTTTGGAACTGGATGAGGCAAT
TTCACAGTTGAAAATCATCCATGTTGCTGGCACTAAAGGAAAGGGATCAACATGCAC
GTTTGTGTAATCTATATTACGTAATTGTGGGTTTCGAACTGGACTTTTTCACATCTCCTC
ATCTTATTGATGTTTCGTGAAAGGTTTCGACTGGATGGTTTGGAAATAAGTGAGGAGAA
ATTCTTGAATATTTCTGGTGGTGTATGATAGGCTGAAGGAAAAAAAAAAGCTT

HSGh128, 427 nükleotid:

AAGCTTCTCAACGTATACTACTACATGTATTTTCGCCAAAGCAACCACCACAATGCCGG
CTCACAAGGCAAATCGAACGAATTCAACTGTTGGGATGACTGGTTATGCTTAAGGTTA
AATTACTCAATTAATGAAGCCAGGCAGATAAGTTTCACATCTAGTCTAGTGTGACAT
CGATTGACATTGTAATAAACAACACTGTACTTGTATGTTTTCGCTTTTCTATGACGCTAC
AGCTCAGGTAATGAATGTATGGTGTCAATGGAAGGAGCGATAGATTTGTTGGGAACA
ATGTACGTAAAGATCAAAGAAATGTCTTGGCGCTTGACCTCAGATGCCTGCCATCGCT
TGGCTTAGTGATATTCTACAGAACTCTGGGAACTATACTATATTAGCAACTTGTTTTA
TAAGGAAAAAAAAAAGCTT

EKLER: (devam)

HSGh129, 405 nükleotid:

AAGCTTCTCAACGCTGCAAGGAGTTGGGTATTACTGCCCTTCATATAAAGCTCCGAGC
TACTGGAGGAAACAAGACGAAGACCCCTGGTCCTGGTGCTCAGTCAGCACTTAGAGC
CCTTGCTCGTTTCAGGCATGAAAATTGGTTCGAATAGAGGATGTTACTCCCATTCCCCT
GATAGTACCCGTAGAAAGGGTGGCAGACGTGGAAGAAGGCTCTGATTCTTTGCTTTAT
ATCAATTACTCACTCAGCTACTACTGCTGTGGTGCTTGGAGTTTTCTTTGTTAAACAGT
TTTTTTATATTCAAGTGTGTTTTGCTCGGTTCTCTTGCTGCACATTTAGTTTTTTGGAA
TGGATTTTAGATCTTTTATCTAGACAGGAAAAAGTTGTGGAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh149, 232 nükleotid:

AAGCTTGCACCATCGCTATTCACAAAACCGAAATAACCAGGGCCAGAGTTGTACAAC
GGTAGCATCATGTCATGCTGTTGAATGATTGTTTCAGACAATTTGGCTCCATAAACTT
GACAAGTGTTAAAATTTTTTTGTGTTACTTTGGAAGCATTTAAATAAATTTGGATCCTG
GGATACATCCCTCTTGGAATAGGATCACAGTGTATGACGAAAAAAAAAAAAAGCTT

HSGh150, 223 nükleotid:

AAGCTTGCACCATGTTTTAGTAAGTTGCTGTATGAGTATTTGAACGGAGGAAAAGGGC
ATAAAGTCATATGTGGTCTCAAATTGGATGCGAAGTGGGAGTGTTATGACGATTTGAG
TGGATCCAAATCATATTTTATAGTATGTAATTTATGTTCTGAACTAAAATTTGTAATT
TGCCAGCGGATTTTCTTGTTCAAGTTCATGAGAAAAAAAAAAAAAGCAT

HSGh151, 83 nükleotid:

CCGGTGTGGGATCATGTATTATATTGTATGTATCTATTTGTTTCAATTTATAATTTTCC
ATCTCTTAGAAAAAAAAAAAAAGCTA

ÖZET

Bitkilerin sıcaklığa uyumunun artırılması ile ilgili yaklaşımlar ve çalışmalar yeni olup, küresel ısınma tehdidinin fark edilmesiyle başlamıştır. Bitkilerin abiyotik strese karşı gösterdikleri tepkinin genetik, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını daha iyi anlamamız, abiyotik stres koşullarına daha iyi uyum sağlayacak bitkiler geliştirmemizi kolaylaştıracaktır. Bitkilerin stres koşullarında oluşturdukları biyokimyasal yolların bilinmesi kadar, bu yollarda görev alan enzimlerin ve diğer metabolitlerin ilişkili olduğu genlerin anlatım düzeyleri hakkında bilgi sahibi olmak da önem arz etmektedir. Bugüne kadar stresle ilişkili olduğu tespit edilen genlerin çoğu, moleküler genetikte model bitki olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana*'da bulunmuştur. Fakat önemli bir tarım bitkisi olan pamuğun, sıcaklık stresi koşullarında moleküler düzeyde gen anlatımının nasıl düzenlendiği hakkında az bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışma, sıcaklık stresi koşullarında pamukta farklı anlatım yapan bazı genlerin belirlenmesi ve belirlenen genlerin sıcaklık stresi koşullarında nasıl anlatım yaptıklarının kısmen anlaşılması amacıyla yürütülmüştür.

Bu amaç doğrultusunda sıcaklık, ışık ve nem kontrollü bitki yetiştirme dolabında yetiştirilen pamuk bitkilerine, çıkıştan 2.5 ay sonra orta (38 °C) ve yüksek (45 °C) sıcaklık stresi uygulanmıştır. Sıcaklık stresi uygulanan bitkilerdeki gen anlatım değişiklikleri, kontrol bitkilerinin gen anlatımıyla karşılaştırılarak belirlenmiştir. Sıcaklık stresindeki gen anlatım değişikliklerinin belirlenmesi için *farklılık gösterim* tekniği kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında, kontrol ve sıcaklık stresi uygulanmış pamuk yapraklarından toplam RNA izolasyonu yapılmış ve ters transkripsiyon ile mRNA'lardan tek iplikçikli cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. 16 rastlantısal ve 3 demirleyici primer kombine edilerek, tek iplikçikli cDNA'lardan PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile çift iplikçikli cDNA popülasyonları oluşturulmuştur. Aynı

primer kombinasyonları ile oluşturulmuş ve farklı stres uygulamalarına ait cDNA popülasyonları, denatürleyici poliakrilamid jelde ayrıştırılmışlardır. Jelde ayrıştırılan cDNA'ların görüntülenmesi, gümüş boyama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Poliakrilamid jel analizi sonucunda, stres koşullarında farklı bant modelleri oluşturan cDNA'lar jelden izole edilmiş ve PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ile çoğaltılan cDNA'ların 39 tanesi, PCR-TRAP klonlama vektörüne klonlanmış ve klonlar kompetent hücrelere transforme edilmiştir. Rekombinant hücreler seçici besi ortamında (Tet⁺) yetiştirilerek, sadece klonu alan hücrelerin çoğaltılması sağlanmıştır. Seçici besi ortamında büyüyen kolonilere koloni-PZR uygulanmış ve klonlanan cDNA'yı alan hücreler kesin olarak belirlenmiştir. Klonlanan cDNA'yı aldığı kesin olarak belirlenen 28 adet koloni, LB besi ortamında çoğaltılmış ve ardından gliserol stokları yapılarak -80 °C'de depolanmışlardır. Klonlanan cDNA'ları içeren 28 adet hücre kültüründen plazmitler izole edilmiş ve DNA dizi analizi sonucunda, klonlanan cDNA'ların bulunduğu vektör bölgelerinin nükleotid dizileri belirlenmiştir. Elde edilen nükleotid dizilerden vektöre ait diziler çıkarılarak, klonlanan cDNA'ların nükleotid dizileri tespit edilmiştir. Birbirinden ayrı olarak izole edilen ve dizileri belirlenen cDNA'lar fastpcr programı kullanılarak kümeleme analizine tabii tutulmuş ve birbirine benzerlik gösteren cDNA'lar belirlenmiştir. Blastn ve blastx programları kullanılarak, sıcaklık stresi koşullarında farklı anlatım yaptıkları belirlenen cDNA'lara ait nükleotid dizilerinin homoloji araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sıcaklık stresi koşullarında pamuktan izole edilen cDNA'ların *Arabidopsis*'deki ortologlarının, abiyotik stres koşullarındaki transkripsiyon düzeyleri Genevstigator programı kullanılarak belirlenmiştir.

Doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda, 28 adet cDNA klonunun 27'sinin cDNA dizisi tespit edilmiş, bir klonda ise ilgili cDNA dizisi belirlenememiştir. HSGh22 ve HSGh84 klonlarındaki cDNA'larının dizi uzunlukları sırasıyla 37 baz ve 47 baz olarak belirlenmiştir. HSGh22 ve HSGh84 cDNA'larının nükleotid dizi uzunluklarının kısa olması nedeniyle, homoloji araştırmalarında değerlendirmeye alınmamışlardır. Sonuç olarak 25 adet cDNA, gen bankası homoloji araştırmaları için kullanılmıştır.

Birbirine dizi benzerliği gösteren cDNA'ları belirlemek amacıyla, elde edilen 25 cDNA dizisine kümeleme (clustering) analizi yapılmıştır. Kümeleme analizi sonucunda, 4 küme ortaya çıkmış ve her bir kümede birbirine benzerlik gösteren 2 cDNA bir arada toplanmıştır. HSGh29 ile HSGh32, HSGh30 ile HSGh31, HSGh93 ile HSGh94, HSGh126 ile HSGh128 aynı kümede yer almışlardır. Bu sonuçla, birbirine benzerlik gösteren her iki cDNA'nın tek bir genin parçası olabileceği ve 8 cDNA'nın aslında 8 değil 4 genin parçaları olabilecekleri belirlenmiştir. Kümeleme analizi sonucunda, sıcaklık stresi koşullarında anlatımı değişen 21 genin cDNA'sının, pamuktan izole edilip klonlandığı anlaşılmıştır.

Homoloji araştırmaları sonucunda, sıcaklık stresi koşullarında pamuktan izole edilen cDNA'ların 13 tanesi doğrudan veya dolaylı olarak 14 gen ile homoloji oluşturmuş, 8 tanesi ise bilinen hiç bir gen ile önemli bir benzerlik göstermemiştir. Bu bulgular ışığında, pamuktan izole edilen ve gen homolojisi göstermeyen 8 cDNA'nın yeni gen adayları oldukları söylenebilir.

HSGh21 cDNA'sının anlatımı, 45 °C sıcaklık stresi uygulanan pamuklarda, kontrole ve orta sıcaklık stresindeki bitkilere göre daha yüksek olmuştur. HSGh21 cDNA'sı *G. hirsutum* mikrosatalit dizisi (DQ908162.1), lektin-benzeri protein ile zayıf benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DT051408.1) ve köşeli yaprak leke hastalığı etmeni bulaştırılmış *G. hirsutum*'un 1-E2 klonu (CF932161.1) ile sırasıyla $E = 1e-77$ (% 97), $E = 1e-20$ (% 80) ve $E = 5e-13$ (% 82) seviyesinde homoloji göstermiştir.

Farklılık gösterim çalışmaları sonucunda, 38 °C ve özellikle 45 °C sıcaklık stresi uygulanan pamuklarda HSGh23'ün bant sinyalinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla, pamukta HSGh23 ile ilişkili genin anlatımının, yüksek sıcaklık koşullarında tetiklendiği söylenebilir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh23'ün, *G. hirsutum* sınıf II kitinaz-bezeri (CTL2) gen (AY291286) ile 5e-137 seviyesinde, % 96 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Sınıf II kitinazın sıcaklık stresi ile ilişkisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu

çalışma ile pamukta sınıf II kitinaz benzeri HSGh23'ün anlatımının, özellikle yüksek sıcaklık stresi koşullarında arttığı bulunmuş olması, pamuktaki sınıf II kitinazın yüksek sıcaklık stresine cevapta görev almış olabileceğini ortaya koyan yeni bir bulgu özelliğindedir.

HSGh26 cDNA'sının transkripsiyonu sıcaklık stresi koşullarında tetiklenmiş ve 45 °C sıcaklıkta en üst düzeye ulaşmıştır. Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh26 cDNA'sı, tiamin biyosentetik enzime benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonuna (ES798066.1) $E = 0.0$ düzeyinde, % 99 ve *Arabidopsis thaliana* tiyazol biyosentetik enzimine (NM_124258.2) $E = 2e-81$ düzeyinde, % 78 homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Pamukta sıcaklık stresıyla transkripsiyonu artan HSGh26'nın, oluşan oksidatif stres zararının azaltılmasında ve ABA ile ilişkili savunma mekanizmasında rol almış olabileceği varsayılmaktadır.

HSGh36'nın orta sıcaklık stresinde transkripsiyonunun değişmediği ancak, yüksek sıcaklık stresi ile baskılandığı belirlenmiştir. Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh36, *G. hirsutum* cDNA klonu (DW505766.1) ile $9e-93$ düzeyinde % 98 benzerlik göstermiştir. GenBank'tan DW505766.1 klonunun baz dizisi alınmış ve blastx programı kullanılarak yapılan homoloji taraması sonucunda, RING parmak çinko parmak proteinine $E = 2e-24$ seviyesinde ve % 62 oranında benzer ve benzerlik gösteren RING parmağın, C3HC4 tipi yapısında olduğu belirlenmiştir.

Sıcaklık stresi koşullarında pamukta, HSGh83 ile ilişkili genin anlatımı önemli seviyede artmıştır. Pamukta HSGh83'ün gen anlatımı, özellikle orta sıcaklık stresinde çok yükselmiş, 45 °C'de kontrole göre yüksek olmuş ancak, 38 °C koşullarına göre biraz azalmıştır. Homoloji taramaları sonucunda HSGh83, *G. hirsutum* kloroplast genomu (DQ345959.1) ile $E = 1e-92$ düzeyine, % 98 benzerlik göstermiştir. HSGh83 cDNA dizisinin *G. hirsutum* kloroplast genomuna benzerlik gösterdiği bölgenin incelenmesi sonucunda, HSGh83 cDNA'sının kloroplast psaA/psaB/rps14 operonunun bir parçası olduğu bulunmuştur. HSGh83

cDNA'sının sıcaklık stresi ile zararlanan PSI'in yenilenmesi mekanizmasında yer almış olabileceği düşünülmektedir.

Birbirleriyle nükleotid dizi benzerliği gösteren HSGh93 ve HSGh94 cDNA'larının her ikisi aynı transkripsiyon modelini göstermiş ve sıcaklık stresi koşullarında anlatımları baskılanmıştır. Homoloji taramaları sonucunda HSGh93 ve HSGh94'ün her ikisi, ABCC3 genine benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DT462800.1) ile $E = 0.0$ seviyesinde, % 99 ve *Gossypium barbadense* MRP-benzeri ABC taşıyıcı protein (DQ359122.1) ile $E = 2e-151$ düzeyinde, % 94 homoloji göstermiştir. Pamuğa uygulanan sıcaklık stresi sonucunda, ABCC3-benzeri cDNA'ların transkripsiyonun baskılanması sonucunda, sıcaklık stresinin GS-X pompalarının sentezini olumsuz etkilemiş olabileceği düşünülmektedir.

HSGh96 cDNA'sının transkripsiyonun yüksek sıcaklık stresi koşullarında başladığı belirlenmiştir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh96 cDNA'sının daha çok CBL-etkileşimli protein kinaz 9 genine benzerlik göstermiştir. Buna rağmen, HSGh96'nın CIPK9 olduğu kesin olarak söylenemez. Ancak, CIPK ailesinin bir üyesi olma ihtimali yüksektir. Bu bulgunun, işlevsel olarak hakkında az bilgi bulunan kalsinörin B-etkileşimli protein kinazların, sıcaklık stersindeki işlevlerinin belirlenmesine yönelik bir kapı açacağı öngörülmektedir.

Pamukta HSGh97 cDNA'sının transkripsiyonun, 45 °C sıcaklık stresi koşullarında yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh97, *G. barbadense* IAA-Ala hidrolaz olduğu varsayılan gen (AF517654.1) ile $E = 5e-119$ düzeyinde, % 100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

HSGh106 cDNA'sının transkripsiyonun 45 °C sıcaklık stresi koşullarında tetiklendiği belirlenmiştir. Homoloji araştırmaları sonucunda, HSGh106 cDNA'sının, snRNP/Sm proteinine benzerlik gösteren *G. hirsutum* cDNA klonu (DW505510.1) ile $E = 7e-167$ düzeyinde, % 99 ve *Arabidopsis thaliana* snRNP/Sm proteinine ise $E = 1e-44$ düzeyinde % 79 homoloji gösterdiği

belirlenmiştir. HSGh106 cDNA'sının yüksek sıcaklıkta transkripsiyonun arttığını ve snRNP ile ilişkili olduğunun belirlenmesi nedeniyle, HSGh106'nın yüksek sıcaklık stresine tepki olarak alternatif kırılma işlemlerinde rol aldığı düşünülmektedir.

HSGh113 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında yüksek bant sinyali verdiği, kontrol bitkisinde ise çok zayıf bant sinyali oluşturduğu belirlenmiştir. Bu sonuçla, HSGh113 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında anlatımının arttığı söylenebilir. Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh113'ün, beta-keto-açıl taşıyıcı protein (ACP) sentaza (KAS) benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Sıcaklık stresi koşullarında, pamukta HSGh113 cDNA'sının transkripsiyonun artmasının sebebi, olası azalma gösteren yağ asidi içeriğini normale yaklaştırmak, böylece sıcaklıktan kaynaklanan hücre zarları zararlanmalarını azaltmak amaçlı olabilir.

Pamukta HSGh127'nin transkripsiyonu, 38 °C sıcaklık stresi koşullarında artarken, 45 °C sıcaklık stresi koşullarında ise baskılanmıştır. Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh127'nin, tetrahidrofolilpoliglutamat sentaz (DHFS-FPGS HOMOLOG B) genine (NM_120680.3) benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

HSGh129 cDNA'sının sıcaklık stresi ile anlatımının arttığı ve anlatımın yüksek sıcaklık stresi koşullarında en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Homoloji taramaları sonucunda HSGh129'un, ribozomal protein s14'e benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Sıcaklık stresinde diğer proteinlerin sentezinin arttırılmasına ihtiyaç duyulmasına paralel olarak, daha fazla miktarda ribozom oluşumuna gereksinim duyulmuş olabilir. Bu sebeple, sıcaklık stresi ile pamukta, RPS14'le ilişkili HSGh129 cDNA'sının transkripsiyonu artmış olabilir.

Pamukta HSGh149'un transkripsiyonu 38 °C'de artmış, 45 °C sıcaklık stresi koşullarında ise baskılanmıştır. Homoloji taramaları sonucunda HSGh149'un, sitokrom C redüktaz kompleksinin 7.8 kDa proteinine (BT028948.1) ve siklofilin (Cyclophilin, ROC5 veya ATCYP1) genine (AK228231.1) aynı düzeyde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda,

HSGh149'un bu iki genden hangisinin parçası olduğu net olarak söylenemez. Bu konunun kesinlik kazanabilmesi için HSGh149'un tam uzunluktaki cDNA'sının oluşturularak, yapısal analizinin ve gen anlatım analizinin yapılması gerekmektedir.

Yapılan cDNA kümeleme analizi sonucunda, HSGh29 ve HSGh32 aynı kümede yer almışlardır. HSGh29 ve HSGh32 cDNA'larının transkripsiyonları farklılık göstermiştir. HSGh29'un transkripsiyonu 38 °C sıcaklık stresinde azalmış, 45 °C sıcaklık stresinde ise baskılanmıştır. HSGh32'nin anlatımı kontrole göre 38 °C'de fazla miktarda artmış, 45 °C'de ise 38 °C'deki transkripsiyonu biraz azalmıştır. HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemiştir. HSGh29 ve HSGh32 cDNA'ları daha önce tanımlanmamış yeni bir genle ilişkili olabilirler. Bu cDNA'ların tam uzunluktaki dizileri belirlendikten ve yapısal, işlevsel analizleri yapıldıktan sonra gen bilgileri aydınlatılabilir.

HSGh30 ve HSGh31 aynı kümede yer almışlardır. HSGh30 ve HSGh31 cDNA'larının her ikisinin transkripsiyonu sıcaklık stresi ile tetiklenmiştir. Homoloji araştırmaları sonucunda HSGh30 ve HSGh31 bilinen herhangi bir genle önemli benzerlik göstermemiştir. HSGh30 ve HSGh31 cDNA'ları daha önce belirlenmemiş yeni bir gen adayı olabilirler. Bu cDNA'ların tam uzunluktaki dizileri belirlendikten ve yapısal, işlevsel analizleri yapıldıktan sonra gen bilgileri aydınlatılabilir.

HSGh100 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Nükleotid düzeyinde yapılan homoloji araştırmaları sonucunda HSGh100, işlevi belirlenmemiş ve adı konmamış bir katalitik proteine benzerlik göstermiştir.

HSGh101 cDNA'sının sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Nükleotid düzeyinde yapılan homoloji araştırmaları sonucunda HSGh101, protein kinaz ile zayıf benzerlik göstermiştir.

HSGh110 cDNA'sının 45 °C sıcaklık stresi koşullarında transkripsiyonun baskılandığı belirlenmiştir. Blastn ve blastx homoloji taramaları sonucunda HSGh110, herhangi bir gen, cDNA klonu veya protein dizisi ile önemli bir benzerlik göstermemiştir. HSGh110'nun bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemesi, bu cDNA'nın daha önce tanımlanmamış yeni bir genle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

HSGh126 ve HSGh128 nükleotid dizileri bakımından birbirlerine benzerlik göstermişleridir. HSGh126 ve HSGh128 cDNA'larının aynı transkripsiyon modeli oluşturdukları ve özellikle 45 °C sıcaklık stresinde transkripsiyonlarının önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. HSGh126 ve HSGh128 cDNA'ları, tanımlanmamış ve adlandırılmamış bir *Arabidopsis thaliana* proteini ile homoloji göstermiştir. HSGh126 ve HSGh128'in sıcaklık stresi cevabında rol alan, tanımlanmamış yeni bir genle ilişkili oldukları düşünülmektedir.

HSGh150 ve HSGh151 cDNA'larının, 45 °C sıcaklık stresinde transkripsiyonlarının önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Yapılan homoloji taramaları sonucunda HSGh150, bilinen herhangi bir genle benzerliği olmayan *G. hirsutum* lif cDNA'sına (ES790686.1) yüksek homoloji göstermiştir. HSGh151 ise herhangi bir gen veya cDNA klonu ile benzerlik göstermemiştir. HSGh151 cDNA'sı 83 baz uzunluğunda kısa bir diziye sahiptir ve bu cDNA'nın herhangi bir homoloji oluşturmamasının nedeni, yüksek ihtimalle baz uzunluğunun kısa olmasından kaynaklanmaktadır. HSGh150 ve HSGh151'in bilinen herhangi bir genle önemli bir benzerlik göstermemesi, bu cDNA'ların daha önce tanımlanmamış yeni genlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

The studies and approaches to improve the adaptability of plants to high temperature stress conditions have recently begun. To understand plant response to different abiotic stresses such as heat, drought, cold and salt at genetic, physiological and biochemical levels will make easier to form tolerant plants. Moreover, gene expression regarding to abiotic stress response pathways is vitally important issue. At molecular level, most of the information for heat stress response was obtained from model plants such as *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* and, *Oryza sativa* but, little molecular research has focused on heat stress responses of cotton. For this reason, our knowledge is insufficient related to heat stress response of cotton at the molecular level.

This research was conducted to improve our understanding of how cotton responses to heat stress at molecular and cellular levels by determining some heat stress related genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). To achieve the aims of this study, cottons were grown in plant growth chamber until 77 days after emergence, and a 77 days old plants were exposed to moderate (38 °C) and high (45 °C) heat stress conditions. Stressed cottons were compared with control cottons at mRNA expression level through differential display technique.

By using this technique, a 28 cDNAs were cloned and then sequenced. After sequencing analysis, it was observed that a 27 of the 28 clones had cDNA sequences but, a 1 clone had not cDNA sequence. In addition, HSGh22 and HSGh84 cDNAs had small sequence, 37 bases and 47 bases respectively. Finally, a 25 of the 28 cDNAs were used for gene homology search. For determining contigs (similar cDNAs), clustering analysis was applied to the 25 cDNAs. As a result, there were 4 clusters, which had two similar cDNAs in each cluster. Contigs cDNAs were such that HSGh29 similar to HSGh32; HSGh30 similar to HSGh31; HSGh93 similar to HSGh94; and HSGh126 similar to HSGh128. According to these results, it could be concluded that two similar cDNAs might be

parts of one single gene. After clustering analysis, it was deduced that cDNAs of 21 genes were isolated and cloned from cotton.

Homology search was done with 25 cDNAs for determination of similarities between cDNAs isolated from heat stressed cotton and known genes in GeneBank. As a result of homology search, a 13 of the 21 cDNAs isolated from cotton showed direct or indirect similarity to 14 known genes, but an 8 cDNAs did not show significant homology to any known gene. According to these results, an 8 cDNAs shown no homology may be possible new genes.

Transcription level of HSGh21 was increased in cotton stressed at 45 °C, compared to control and moderately heat stressed cottons. HSGh21 showed homology with *G. hirsutum* microsatellite sequence (DQ908162.1), and *G. hirsutum* cDNA clone (DT051408.1) that weakly similar to lectin-like protein, and *X. campestris pv. malvacearum* inoculated *G. hirsutum* 1-E2 cDNA clone (CF932161.1) at $E = 1e-77$ (% 97), $E = 1e-20$ (% 80) and $E = 5e-13$ (% 82) levels, respectively.

HSGh23 cDNA related gene expression was specially induced by high heat stress. HSGh23 showed homology with *G. hirsutum* class II chitinase-like (CTL2) gene at $E = 5e-137$ level and % 97 identity. There is a little knowledge about relationship between class II chitinase and heat stress. It was thought that class II chitinase may has a role in response to heat stress, because it was determined that class II chitinase-like HSGh23 expression increased in cotton.

HSGh26 cDNA transcription was induced through moderately heat stress, and it reached the highest level at 45 °C heat stress. HSGh26 showed homology with *G. hirsutum* cDNA clone (ES798066.1), similar to thiamine biosynthetic enzyme gene, at $E = 0.0$ and 99 % identity, and *Arabidopsis thaliana* thiazole biosynthetic enzyme (NM_124258.2) at $E = 2e-81$ and 78 % identity. It was hypothesized that HSGh26 may have a role in decreasing of oxidative stress injury and ABA-depending defense mechanism.

HSGh36 cDNA transcription was suppressed at 45 °C while, it was not changed at 38 °C according to control. HSGh36 showed homology with *G. hirsutum* cDNA clone (DW505766.1), at $E = 9e-93$ level, and 98 % identity. Sequence of DW505766.1 was taken from GenBank and searched for homology by using blastx program. As a result, it showed similarity with RING finger zinc finger protein at $E = 2e-24$ level, and 62 % identity.

HSGh83 expression was up-regulated at 38 °C and 45 °C heat stresses. However, HSGh83 expression decreased at 45 °C heat stress according to 38 °C. HSGh83 showed homology to *G. hirsutum* chloroplast *psaA/psaB/rps14* operon.

Both of HSGh93 and HSGh94 cDNAs suppressed in heat stressed cottons. Both of them were similar to *Gossypium barbadense* MRP-like ABC transporter protein (DQ359122.1).

HSGh97 cDNA transcription showed high accumulation at 45 °C heat stress. According to homology search results, HSGh97 was similar to putative IAA-Ala hydrolase gene (AF517654.1) at $E = 5e-119$ level, and 100 % identity.

HSGh106 cDNA transcription induced at the 45 °C heat stress. According to homology search results, HSGh106 showed homology with *G. hirsutum* cDNA clone (DW505510.1) similar to snRNP/Sm protein at $E = 7e-167$, and 99 % identity and to *Arabidopsis thaliana* snRNP/Sm protein at $E = 1e-44$, and 79 % identity. HSGh106 may involve in alternative splicing as a response to high heat stress.

HSGh113 cDNA occurred band signal on differential display gel in heat stressed cottons, while it did not observed in control cottons. HSGh113 was similar to beta-keto-acyl carrier protein (ACP) synthase. HSGh113 may fix fatty acid content of membranes to decrease membrane injury resulted from heat stress.

HSGh127 cDNA transcription was up-regulated by 38 °C temperature while, suppressed by 45 °C. HSGh127 showed homology with tetrahydrofolilpolyglutamat synthase (DHFS-FBGS HOMOLOG B) gene (NM_120680.3).

HSGh129 cDNA expression was up-regulated by 38 °C temperature and reached the highest level by 45 °C. According to homology search results, it was determined that HSGh129 was similar to ribosomal protein s14 (RPS14).

HSGh149 cDNA transcription was up-regulated by 38 °C, while it was suppressed by 45 °C. HSGh149 showed homology with both of cytochrome c reductase complex, 7.8 kDa protein and cyclophilin gene at the same level.

According to clustering analysis, HSGh29 and HSGh32 cDNAs were similar. But their transcriptions were different under heat stress conditions. HSGh29 was down-regulated by 38 °C, while it was suppressed by 45 °C. Transcription of HSGh32 up-regulated at 38 °C but, it was decreased slightly at 45 °C compared to 38 °C. Both of HSGh29 and HSGh32 cDNAs were not similar to any known genes.

According to clustering analysis, HSGh30 and HSGh31 cDNAs were similar. Transcriptions of them were induced by heat stress. HSGh30 and HSGh31 were not similar to any known genes.

It was observed that transcription of HSGh100 cDNA was significantly decreased by 38 °C and 45 °C heat stresses. HSGh100 was similar to an unnamed protein with unknown function.

Transcription of HSGh101 cDNA was significantly decreased by 38 °C and 45 °C heat stresses. HSGh101 was weakly similar to a protein kinaz.

According to image of differential display gel, a suppression of HSGh110 was determined at 45 °C temperature. There was no significant homology with any known gene in genbank for HSGh110.

Both of HSGh126 and HSGh128 cDNAs were up-regulated especially in high heat stressed cotton. Both of them were shown similarity to *Arabidopsis thaliana* unknown protein. It was hypothesized that HSGh126 and HSGh128 may be new genes at heat stress response of cotton.

Both of HSGh150 and HSGh151 cDNAs were up-regulated especially in high heat stressed cottons. HSGh150 showed homology with a *G. hirsutum* cDNA that has no any similarity to known genes. However, HSGh151 showed no significant similarity to any known gene or cDNA clone. The reason of no homology for HSGh151 cDNA might resulted by a short sequence (83 bases). According to these results, it could be hypothesized that HSGh150 and HSGh151 may be new genes of cotton for heat stress response.