

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSGENİK DOMATES BİTKİSİNDE (*Solanum lycopersicum* cv.
UC82MA 35S::ATHB7) KURAKLIĞA DAYANIKLILIK SAĞLAYAN
ATHB7 GENİNİN EKSPRESYON PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI**

NECLA PEHLİVAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE - 2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSGENİK DOMATES BİTKİSİNDE (*Solanum lycopersicum* cv.
UC82MA 35S::*ATHB7*) KURAKLIĞA DAYANIKLILIK SAĞLAYAN
ATHB7 GENİNİN EKSPRESYON PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI**

NECLA PEHLİVAN

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE 2011

T.C.
RİZE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TRANSGENİK DOMATES BİTKİSİNDE (*Solanum lycopersicum* cv. UC82MA 35S::ATHB7)
KURAKLIĞA DAYANIKLILIK SAĞLAYAN ATHB7 GENİNİN EKSPRESYON PROFİLİNİN
ARAŞTIRILMASI

NECLA PEHLİVAN

YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.06.2011

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 23.06.2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Fatih YILMAZ



RİZE 2011

ÖNSÖZ

“Transgenik domates bitkisinde (*Solanum lycopersicum* cv. UC82MA 35S::ATHB7) kuraklığa dayanıklılık sağlayan ATHB7 geninin ekspresyon profilinin araştırılması” adlı bu çalışma Rize Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır. Çalışma süresince Metapontum AGROBIOS Biyoteknoloji Laboratuvarının imkânlarından yararlanılmıştır. Bu bağlamda, en büyük pay sahibi sayın hocam Prof. Dr. Asım KADIOĞLU’na, gerekli olanakları sağlayan Dr. Rina IANNACONE’ye, destekleri ve arkadaşlıkları için, Giancarla TADDONIO ve Rosita QUINTO’ya teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim süresince, emeği geçen ve ilgilerini esirgemeyen danışman hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER’e, tezin yazım aşamasında sunumlarımı izleyen ve verilerin değerlendirilmesinde yorumlarıyla tezin geliştirilmesine katkı sağlayan sayın hocam Yrd.Doç.Dr. Cemal SANDALLI’ya, tavsiye ve fikirlerinden yararlandığım Ghent Üniversitesi doktora öğrencisi Halbay TURUMTAY’a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her safhasında arkamda olan, varlıklarıyla ve sonsuz ilgileri ile beni cesaretlendiren değerli anne ve babama şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma COST FA 0605 nolu aksiyon kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Necla PEHLİVAN
RİZE 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2. Bitki Büyüme ve Gelişimini Etkileyen Stres Faktörleri.....	3
1.2.1. Kuraklık stresi	4
1.2.1.1. Kuraklık stresinin bitki büyüme ve gelişimi üzerine etkisi.....	5
1.3. Stres Sinyalinin Hücresel Olarak Algılanması ve ABA'nın Rolü	7
1.4. Kuraklık Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar	8
1.5. Transkripsiyon Faktörleri	10
1.6. Homeobox Genleri	11
1.6.2. HDZip genlerinin bitkilerdeki biyolojik rolleri.....	15
1.6.3. HDZip (I-IV) genlerinin <i>Arabidopsis</i> 'teki fonksiyonları	15
1.7. Stres Cevap Mekanizmalarında <i>Arabidopsis</i> 'in Önemi	16
1.8. ATHB7 Geni	17
1.8.1. Kuraklığa toleransta ATHB7'nin rolü.....	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	21
2.1. Materyaller	21
2.1.1. Kullanılan bitki tohumları	21
2.1.2. DNA ve RNA izolasyonunda kullanılan bitki büyütme koşulları.....	21
2.1.3. Kimyasallar ve diğer malzemeler.....	21
2.2. Metotlar	23
2.2.1. Olası transgenik domates bitkilerinin PZR ile analizi.....	23
2.2.2. Bitkilerin homojenizasyonu	23
2.2.3. Genomik DNA izolasyonu	23

2.2.4.	DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik tespiti.....	24
2.2.5.	ATHB7 geninin PZR ile amplifikasyonu.....	24
2.2.6.	Agaroz jel elektroforezi.....	24
2.2.7.	Transformantların hedef geni içerdiğinin doğrulanması.....	25
2.3.	ATHB7 geninin ekspresyon analizleri.....	26
2.3.1.	Transgenik bitkilerden total RNA izolasyonu.....	26
2.3.2.	RNA kalitesinin tespiti.....	26
2.3.3.	RNA örneklerinden DNA'nın uzaklaştırılması.....	27
2.3.4.	RNA'nın genomik kontaminasyon açısından taranması.....	27
2.3.5.	Agaroz jel elektroforezi.....	28
2.3.6.	cDNA Sentezi.....	28
2.3.7.	quantitative Real Time PZR.....	29
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	Olası Transgenik Domates Bitkilerinin Tespiti.....	31
3.1.1.	ATHB7 spesifik primerler ile PZR analizi.....	31
3.1.2.	Transgenik bitkilerin ATHB7 ve NPT II gen bölgelerini içerdiğinin doğrulanması.....	33
3.2.	ATHB7 Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	34
3.2.1.	RNA kalitesinin kontrolü.....	34
3.2.2.	RNA'nın genomik kontaminasyon açısından PZR ile taranması.....	34
3.2.3.	quantitative Real Time PZR Analizi.....	36
4.	TARTIŞMA.....	39
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	42
	KAYNAKLAR.....	44
	EKLER.....	55
	ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÖZET

Bir homeodomain l6sın fermuar geni kodlayan ATHB7, *Arabidopsis* homeobox transkripsiyon fakt6r ailesine 6yedir ve ekspresyonu kuraklık koşulları altında up-reg6le olur. Bu 7alışmada; ATHB7 geninin (800 b7 cDNA) şu ana kadar genomunda ATHB7 ortoloğu bir gen tespit edilmemiş olan rekombinant domates bitkisine entegrasyonu ve transgenik domateslerdeki ekspresyon profili karakterize edilmiştir.

Bu ama7la, gen aktarımı yapılmış olası transgenik domates hatları ve izogenik kontrol *Solanum lycopersicum* UC82 k6ltivarı, hedef genin (ATHB7) varlığı ve ifadesi bakımından analiz edildi. Birbirinden bağımsız 4 farklı jenerasyona ait (T0, T1, T2, T6) 4 olası transgenik domates hattından genomik DNA izole edildi ve genin 425 b7'lik kısmı, ATHB7 spesifik primer 7ifti kullanılarak 7oğaltıldı. Elde edilen sonu7lar bitkilerden 48'inin trans geni taşıdığını ortaya koydu. Bunun ışığında, ilgilenilen genin karřılařtırılmalđ ekspresyon profilini elde etmek i7in, transgenik bitkilerin RNA kalıpları kullanılarak cDNA sentezlendi. qRT-PZR analizi ile, spesifik transkriptlerin amplifikasyonu sonucu, farklı hatlara ait yaprak dokularındaki farklı ekspresyon seviyeleri belirlendi. ATHB7 genine ait ekspresyon profilinin transgenik hatlarda belli bir 6l76de değişkenlik arz ettiği saptandı.

Bu sonu7lar, ATHB7 geninin domates genomuna entegrasyonunu ve genomda uygun şekilde ekspres edildiğini kanıtlamaktadır. Buna dayanılarak, trans genin tek kopyasını taşıyan ve g67l6 ekspresyon profili sergilediği d6ř6n6len 6 transgenik hat (hatlar 164, 165A, 167, 204, 19 ve 59) ileriki fizyolojik analizlerde kullanılmak 6zere se7ilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ekspresyon profili, Transkripsiyon fakt6r6, HDZip, L6sın fermuar, ATHB7, Transgenik domates bitkileri

ABSTRACT

Analysing expression pattern of drought tolerant ATHB7 gene in transgenic tomato plant (*Solanum lycopersicum* cv. UC82MA 35S::*ATHB7*)

ATHB7; coding a homeodomain leucine zipper (HD-Zip I) gene which is a member of the homeobox transcription factor family in *Arabidopsis*, shows up-regulation, during water deficit conditions.

In this study; the integration and expression pattern of ATHB7 (800 bp cDNA) was characterized in transgenic tomato plant genome where no ATHB7 orthologous gene has been identified to date. For this purpose, by using isogenic control *Solanum lycopersicum* cv. UC82 and putative transgenic tomato lines, the verification of the integration and expression of the gene of interest “ATHB7”, transformed plants were analyzed. Genomic DNA from 4 different generations (T0, T1, T2, T6) and 4 independent putative transgenic tomato lines were isolated and a part of the gene (425 bp) amplified by using ATHB7 specific primer pair. The observed results showed that 48 of them had that ATHB7 transgene correctly. By the light of this, cDNA was constructed from RNA templates of transgenic tomato plants and to observe relative expression patterns of ATHB7; amplification of the specific transcripts were determined by the qRT-PCR. Different levels of expression of the different lines in the leaf tissues were observed. The expression of the ATHB7 gene in the transgenic lines, varied to some extent.

These results suggest that the ATHB7 gene has been integrated into tomato genome and can be expressed properly in the transgenic plants. Therefore, six transgenic lines (149, 164, 165A, 167, 204, 19 and 59), which contain a single copy of the trans gene and have a moderate to strong level of expression of the trans gene was selected, for further physiological analysis.

Keywords: Expression pattern, Transcription factor, HDZip, Leucine zipper, ATHB7, Transgenic tomato plants

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Bitkileri etkileyen çevresel stres faktörleri.....	4
Şekil 2. Hücresel sinyal iletim yolları ile sinyalin algılanması ve gen ekspresyonu arasındaki ilişki.....	8
Şekil 3. Strese karşı oluşturulan erken ve geç cevap genleri.....	9
Şekil 4. Strese cevapta temel transkripsiyonel mekanizma.....	10
Şekil 5. Homeogenlerin yapısı	12
Şekil 6. DNA'ya bağlanan lösin fermuar motif dimeri	13
Şekil 7. Hayvanlardaki klasik nükleer reseptörlere kıyasla bitkilerde bulunan HD-START proteinlerinin yapısı.....	14
Şekil 8. DNA ve RNA izolasyonunda kullanılan transformantlar	22
Şekil 9. Transgenik bitkilerin sera koşullarındaki gelişimi	31
Şekil 10. ATHB7 gen spesifik primerler kullanılarak olası T0, T1, T2 ve T6 domates pirojenlerinin PZR ile amplifikasyonu.	33
Şekil 11. Transgenik bitkilerin hedef geni içerdiğinin PZR ile doğrulanması	34
Şekil 12. RNA jel elektroforez sonuçları.....	35
Şekil 13. 18S rRNA amplifikasyonu ile DNA kontaminasyonunun belirlenmesi	36
Şekil 14. qRT-PZR amplifikasyon profili	38

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. <i>Arabidopsis</i> 'te tanımlanmış HDZip ailesi üyeleri arasındaki farklılıkların özeti .	13
Tablo 2. <i>Arabidopsis</i> 'te tanımlanmış HDZip genleri	19
Tablo 3. ATHB7'nin kuraklık stresini pozitif yönde kontrol ettiğini gösteren karakterler.	20
Tablo 4. ATHB7 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan spesifik primerler	24
Tablo 5. Taq DNA polimeraz için optimize edilmiş reaksiyon koşulları.....	25
Tablo 6. NPT II gen kasetini kodlayan spesifik primerler	25
Tablo 7. ATHB7 ve NPT-II amplifikasyonu için PZR şartları	25
Tablo 8. DNA'nın uzaklaştırılma işlemi	27
Tablo 9. DNA'nın uzaklaştırılması için gerekli reaksiyon şartları.....	27
Tablo 10. 18S rRNA gen bölgesini kodlayan spesifik primerler	28
Tablo 11. Tek iplikçik cDNA sentezi için reaksiyon koşulları	28
Tablo 12. Tek iplikçik cDNA sentezi için PZR şartları	29
Tablo 13. qRT-PZR için ATHB7 ve 18S spesifik primer ve probalar	29
Tablo 14. ATHB7 probu ile qRT-PZR koşulları.....	30
Tablo 15. Le18S probu ile qRT-PZR koşulları	30
Tablo 16. qRT-PZR şartları.....	30

SEMBOLLER DİZİNİ

ATHB7	<i>Arabidopsis thaliana</i> Homeobox 7
HDZip	Homeodomain lösün fermuar motifi
mRNA	Mesajcı RNA
rRNA	Ribozomal RNA
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
T-DNA	Transfer DNA
cDNA	Komplementer DNA
PZR/PCR	Polimerize Zincir Reaksiyonu
qRT-PZR	quantitatif Real Time PZR
CaMV 35S	Karnabahar Mozaik Virüs 35S Promotoru
NPT II	Neomisin fosfotransferaz
bç/bp	Baz çifti
LEA	Geç embriyogenez proteinleri
SOD	Süperoksit dismutaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
ABA	Absisik asit
CTAB	Setil trimetil amonyum bromid
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ETOH	Etanol
LiCl	Lityum klorür
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA Buffer
EtBr	Etidyum bromür
UV	Ultraviyole
OD	Optik Yoğunluk
g	Yer çekimi ivme kuvveti

1. GENEL BİLGİLER

1.1 Giriş

Stres; genellikle dış çevreden köken alan, fotosentetik aktiviteyi, üretimi ve canlılığı azaltacak şekilde bitki büyüme ve gelişimi üzerine negatif etkiler oluşturan olumsuz koşullar bütünüdür. Bitkiler, doğal çevrede biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin birçok tipi ile karşı karşıya kalırlar (Fujita ve ark., 2006).

Moleküler incelemeler sayesinde birçok türde strese maruz kalındığında, genlere ve benzer proteinlere ait genel bir setin etkinleştiği belirlenmiştir. Stres toleransına ilişkin geçmişte yapılan birçok çalışma, strese maruz kalan bitkilerdeki fizyolojik olayların strese maruz kalmamış bitkilerle karşılaştırılmasını içermektedir. Bu tip incelemelerden hareket edilerek strese tolerans ve duyarlılığın altında yatan biyokimyasal mekanizmalar ortaya konmuş, fakat genellikle bu çalışmaların stres tolerans prensiplerinin moleküler ve genetik analizlerini içermedikleri kaydedilmiştir (Bohnert ve ark., 1995).

Günümüzde moleküler teknoloji, stres sinyal yollarındaki genlerin izole edilmesi, bunların bitkilere aktarılması ve elde edilen transgenik bitkilerdeki ifadelerinin (ekspresyon) incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu genlerin ifade şekillerinin ve düzeylerinin belirlenmesi, abiyotik strese adaptasyondaki rollerinin anlaşılması, daha fazla stres toleransı geliştirmeye öncülük ederek, etkili mühendislik stratejilerinin temellerini oluşturacak değerdedir.

Kuraklığa toleranslı bitkiler, derine inen köklere, su kaybını en aza indirmek için daha kalın kütikula tabakasına veya hücrelerindeki tuz içeriğini ayarlayabilme yeteneğine sahip olacak şekilde geliştirilmeye çalışılmıştır. Elde edilen kuraklığa dayanıklı ilk transgenik bitkiler, ekmek mayasından trehalozu ifade eden bir gen kullanılarak üretilmiştir. Trehaloz; potansiyel bir osmotik koruyucudur (Karim ve ark., 2007) ve mayanın kuru halde de hayatta kalmasını sağlar. Bu gen ile modifiye edilen tütün bitkileri, kurumaya karşı dayanıklılık kazanmıştır (Nottingham, 1998).

Yapılan çalışmalar, antioksidanların farklı tiplerini kodlayan genlerin, farklı bitkilerde kuraklığa direnç sağladığını ortaya koymuştur (Sunkar ve ark., 2006). Örneğin; SOD (süperoksit dismutaz) geninin mühendisliği sonucu, alfalfa (McKersie ve ark., 1996 ve 1997) ve çeltik (Wang ve ark., 2005) bitkilerinde kuraklık toleransı geliştirilmiştir.

Keza, transgenik tütünlerde tokoferol biyosentezinde anahtar enzim olarak fonksiyon gösteren, tokoferol siklazı (VTE1) kodlayan genin aşırı ifadesi (overexpress) sonucu ozon, tuz ve polietilen glikol (PEG) gibi ajanlara karşı yüksek direnç sağladığı bulunmuştur (Liu ve ark., 2008).

Luo ve ark., (2009) tarafından yapılan bir çalışma *Medicago sativa* helikaz 1 (MH1) olarak isimlendirilen enzimin, transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde osmotik ayarlama sonucu, prolin içeriğindeki artış ile beraber reaktif oksijen türlerine (ROS) olan savunma kapasitesini de arttırdığı, böylece kuraklığa da direnç sağladığını ortaya koymuştur. Bunun yanında; grup 1 ve grup 2 buğday geç embriyogenez (LEA) proteinlerinden olan PMA1959 ve PMA80 genlerinin çeltiğe aktarılması, bu bitkilerde kuraklığa tolerans gelişimi ile sonuçlanmıştır (Cheng ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar kuraklık stresi altındaki bitkilerde gen regülasyonunda görevli birçok transkripsiyon faktörünün etkinliğini ortaya çıkarmıştır (Bartels ve Sunkar 2005; Vinocur ve Altman 2005; Ding ve ark., 2009). Kaynak organizma ve transgenik konak olarak *Arabidopsis*'i kullanıp, R2R3 MYB transkripsiyon faktörünün (MYB15) transgenik hatlarda ABA tarafından uyarılan stomatal kapanmaya hassasiyet kazandırdığını, böylece stres durumunda bitkide kök uzamasının ve büyümenin baskılanmadığını ortaya koymuştur. Dehidrasyona cevap oluşturan transkripsiyon faktörlerinin (DREB) karnabahar mozaik virüsü promotörünün (CaMV 35S) kontrolü altında aşırı ifade ettirilmesi çeltik bitkilerinde kuraklık ve tuz stresine direnç sağlanması ile sonuçlanmıştır (Dubouzet ve ark., 2003; Oh ve ark., 2005). Benzer şekilde, *Arabidopsis*'in stres ile uyarılabilen promotörü, rd29A'nın kontrolü altında mühendisliği yapılan transkripsiyon faktörü DREB1A, aktarıldığı yerfistığı bitkisinde, ciddi derecede antioksidan enzim birikimi (süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon reduktaz (GR)) oluşturmuş, ayrıca lipid peroksidasyon seviyelerinin de yabancı tip bitkilere kıyasla çok düşük miktarda olduğu gözlenmiştir (Bhatnagar-Mathur ve ark., 2007). DREB (dehidrasyon-cevap bağlayıcı protein) dışında diğer transkripsiyon faktörleri de strese cevapta rol alır. APETELA2 (AP2); don, tuz, kuraklık ve ABA gibi çeşitli streslere direnç kazandıran bu tip bir transkripsiyon faktörüdür. OsCc1 promotörünün kontrolü ile yapılan transformasyon çalışmaları, vejetatif büyüme safhasında AP37 transkripsiyon faktörünü aşırı ifade eden transgenik çeltiklerde, yüksek tuz konsantrasyonları, kuraklığa karşı tolerans ve ürün kalitesinin %16-57 arasında değişen oranlarda arttığını göstermiştir (Oh ve ark., 2009).

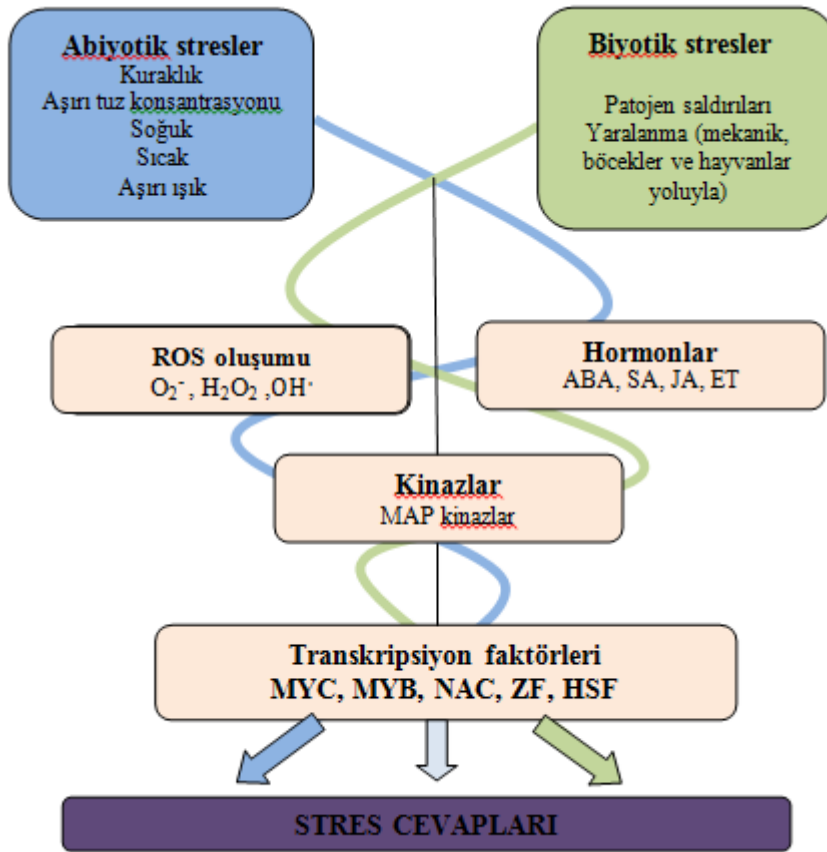
Günümüzde su stoklarının hızla azalması ve bu sebeple meydana gelen ürün kayıpları, kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini oldukça düşündürücü kılmaktadır. Kuraklık stresinin çözüme kavuşturulabilmesi için, çok çeşitli yaklaşımlar olmasına karşın stresle etkilenmiş çevrelerde yaşayabilen, kuraklığa toleranslı bitki yetiştirilmesi amaçlı yapılan genetik mühendislik çalışmaları, bu yaklaşımların en etkili ve ekonomik olanıdır (Ashraf, 2010). Bu sebeple, model organizmalarda kuraklık toleransı ile uyarılan anahtar genlerin tanımlanması, bu genlerin çeşitli bitkilere transformasyonu, stresten sakınma ve tolerans mekanizmalarının aydınlatılması, önemli faydalar sağlayacaktır.

Ökaryotik nükleer genler, hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyede regüle edilir. Bu kontrolün büyük kısmı DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri tarafından gerçekleştirilir. Eğer transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu kontrol edilerek, bunlarla ilgili önceden seçilmiş endojen genlerin aktivasyonu veya kapatılması sağlanabilirse bu durum, tarımsal biyoteknolojinin geliştirilmesine önemli ölçüde katkı sağlayacaktır (Guan ve ark, 2002).

Bu amaç ışığında, mevcut çalışmada gelecekte kuraklığa dirençli domates bitkileri oluşturmanın ilk adımı olarak, heterolog bir sistemde CaMV35S promotorunun kontrolü altında, *Agrobacterium tumefaciens* aracılı gen aktarım yöntemi kullanılarak *Solanum lycopersicum* cv. UC82 bitkilerine aktarılmış olan (CaMV35S::ATHB7) ATHB7 transkripsiyon faktörünün (800 bç cDNA), domates kültürlerindeki entegrasyonu ve ekspresyon profili, moleküler teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir.

1.2. Bitki Büyüme ve Gelişimini Etkileyen Stres Faktörleri

Su stresi (kuraklık), aşırı tuz konsantrasyonu, ekstrem sıcaklık ve don, ani sıcaklık değişiklikleri, sel sebebiyle toprakta meydana gelen oksijen eksikliği, reaktif oksijen radikallerinin oluşumu, uzun süre zarfında kuvvetli ışığa maruz kalma ve radyasyon bitkilerde abiyotik stres faktörlerini oluşturur. Biyotik stresler ise; viral enfeksiyonlar, patojen atakları ve diğer organizmalar ile rekabetten doğar. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir (Lichtenhaler, 1996). Bitkiler evrimsel olarak korunmuş mekanizmaları yoluyla bu tip zararların üstesinden gelirler (Srivastava, 2002).



Şekil 1. Bitkileri etkileyen çevresel stres faktörleri (Fujita ve ark., 2006)

Stres koşulları altındaki hücrel yapıların akıbeti, meydana gelen hasar oranı ile tamir oranı arasındaki dengeye bağlıdır. Eğer bir hücrel komponent için tamir oranı hasar oranından hızlı ise, hasar bitkide görünür hale gelmez. Bu durum muhtemelen stresin hissedilmediği koşullarda geçerlidir. Tamir oranının hasar oranından yavaş ilerlediği koşullarda ise denge hasarın lehine doğru bozulur ve hasar görünür hale gelir (Chen ve Murata, 2002).

1.2.1.Kuraklık stresi

Kuraklık tüm dünyada tarımsal üretimi sınırlayan en önemli çevresel faktörlerdendir. Dünya üzerindeki kullanılabilir alanların maruz kaldığı en önemli stres çeşidinin % 26'lık bir oranla kuraklık olduğu belirtilmiştir. Bu stresi, % 20'lik payla mineral stres, % 15 payla soğuk ve don stresi ile % 29'luk payla diğer stresler takip etmektedir (Blum, 1986).

Kuraklık; toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından gerçekleştirilen transpirasyonel su kayıp hızına bağlı olarak meydana gelir (Jones, 1992; Kozlowski, 1997) ve genel olarak su eksikliği ve kuruma olarak iki tipe ayrılabilir.

Buna göre;

1. Su eksikliği, stomalarda kapanmaya ve gaz değişiminde kısıtlamaya neden olan orta düzeydeki su kaybıdır. Oransal su içeriğinin yaklaşık % 70'te kaldığı hafif su eksikliğine maruz kalan bitkilerde, stomaların kapanmasına bağlı olarak karbondioksit (CO₂) alınımı kısıtlanmaktadır.
2. Kuruma, metabolizma ve hücre yapısının tamamen bozulmasına ve sonunda enzimle katalizlenen reaksiyonların durmasına neden olabilecek bir potansiyele sahip olan, aşırı miktardaki su kaybı olarak tanımlanabilir (Smirnoff, 1993).

1.2.1.1.Kuraklık stresinin bitki büyüme ve gelişimi üzerine etkisi

Bitkilerde kuraklık stresinin fizyolojik etkileri; mekanik, metabolik ve oksidatif etkiler olarak üç bölümde incelenebilir.

Mekanik etki; bitki hücrelerinden belirgin su kaybı gerçekleştiği zaman, bitkide turgor kaybıyla kendini gösteren birincil stres, yani mekanik etki meydana gelir (Levitt, 1980). Hücreden su kaybıyla beraber, hücre özsu konsantrasyonu artar, protoplazmada bir dehidrasyon meydana gelir, membran yapısı değişikliğe uğrar. Plazmolize uğramış hücrede, plazma membranı hücre çeperinden ayrılır, yalnızca plazmodezm bağlantılarıyla varlığını sürdürür. Gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen çökme, yırtılmalara yol açabilir (McKersie ve Leshem, 1994). Zarlar üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimler serbest kalır ve bu durum sitoplazmanın otolizi ile bile sonuçlanabilir (Salisbury ve Ross,1992). Bu zarar normal hücre metabolizmayı kalıcı olarak bozar.

Metabolik etki; su kaybına bağlı olarak gerçekleşen iyon birikimi, membran bütünlüğünün ve proteinlerin yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar verebilir. Su kaybı sonucunda; proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin su ile etkileşimleri bozulur (Campbell, 1991) ve bu durum protein denatürasyonlarına ve enzim inhibisyonlarına neden olur (Bray, 1997). Protein parçalanmalarıyla enzim kayıpları ortaya çıkar, dokularda aminoasitler birikir, ABA artar ve en önemlisi amonyak (NH₃) gibi toksik bir bileşik ortaya çıkar. NH₃ bitkide metabolik dengenin bozulmasına neden olur (Çırak ve Esendal, 2006). Su eksikliğinin metabolizmada en çok engellediği enzimlerden

biri nitrat redüktazdır. Bunun sonucu olarak protein sentezinin azalmasıyla hücre bölünmesi baskılanmakta, hatta orta şiddette kuraklık stresi, mitozu yavaşlatabilmektedir. Bu durumdan en fazla hücre döngüsünün S fazının etkilendiği belirtilmektedir (Özcan ve ark., 2004).

Oksidatif etki; stresin en genel özelliği, elektron transferi ile ilgili metabolizmayı bozmak olduğundan, fotosentetik elektron taşıma sistemi, bitki dokularındaki reaktif oksijen türlerinin üretilebileceği büyük kaynaklardır. Oksijenin, ROS oluşturarak makro moleküllerde geri dönüşümsüz hasar meydana getirmesi; “oksidatif etki” şeklinde tanımlanır.

ROS’lar; eşlenmemiş elektron taşıyıp taşıyamalarına göre 3 grupta incelenir (Çavdar ve ark., 1997).

Radikaller; orbitalinde eşlenmemiş elektron taşıyan süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$) gibi moleküller.

Radikal olmayanlar; eşlenmemiş elektrona sahip olmadıklarından, radikal olarak adlandırılmazlar. Örneğin hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid hidroperoksit (LOOH)

Singlet oksijen; yapısında iki adet eşlenmemiş elektron taşıyan bir moleküldür. Oksijenden kaynaklanan bu oksitleyici radikaller, atomik ya da moleküler yapılarda eşlenmemiş elektron içeren moleküller olup; oldukça reaktifler (McKersie ve ark., 1994) ve protein, lipid, karbohidrat ve nükleik asit gibi makro moleküllerle reaksiyona girerek hücrelerde hasar meydana getirirler. Oksijenin toksikliği, elektron ve enerjinin oksijen molekülüne transferinden kaynaklanır (Jacobson, 1996). Birçok türde kuraklık stresi altında artan O_2^- oluşum hızı; lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doymunluğuna ve sonuçta membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur (Sgherry ve ark., 1996).

Bitkiler; triplet klorofil veya 1O_2 ’nin oksidatif zararının yol açtığı yıkıcı etkilerle mücadele etmek için; lipid peroksidasyonunun serbest radikallerini gideren α -tokoferol, β -karoten gibi, yağda çözünen/membrana bağlı antioksidanlar, O_2^- ve H_2O_2 ’nin detoksifikasyonunda rol oynayan glutatyon ve askorbat gibi suda çözünen antioksidanlar ve SOD, APX, GR, katalaz (CAT) ve peroksidaz (POD) gibi enzimatik antioksidanlardan oluşan karmaşık bir koruyucu sisteme sahiptir (Jung, 2004; Pinheiro ve ark., 2004; Ramachandra ve ark., 2004). Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler, antioksidan savunma sistemlerinin aktivasyonu ile oksidatif etkinin üstesinden gelebilirler. Fakat radikal üretimi,

antioksidan sistemin kapasitesini aşacak kadar olursa, o zaman bitkide meydana gelecek hasar geri dönüşümsüz olmaktadır (Alexieva, 2003).

1.3. Stres Sinyalinin Hücresel Olarak Algılanması ve ABA'nın Rolü

Kuraklık stresine karşı oluşturulacak cevabın kontrolündeki ilk basamak stresin algılanmasıdır. Bitkiler kuraklık, soğuk veya yüksek tuzluluk gibi etmenlerle karşı karşıya kaldıklarında, vejetatif dokularda su potansiyeli azalır. Hücreden suyun kaybı, hücresel bir sinyal iletim yolunu tetiklemektedir. Su kaybının hücresel olarak algılanmasını takiben, bir sinyal mekanizması ile spesifik genler aktive edilmektedir (Bray, 1997).

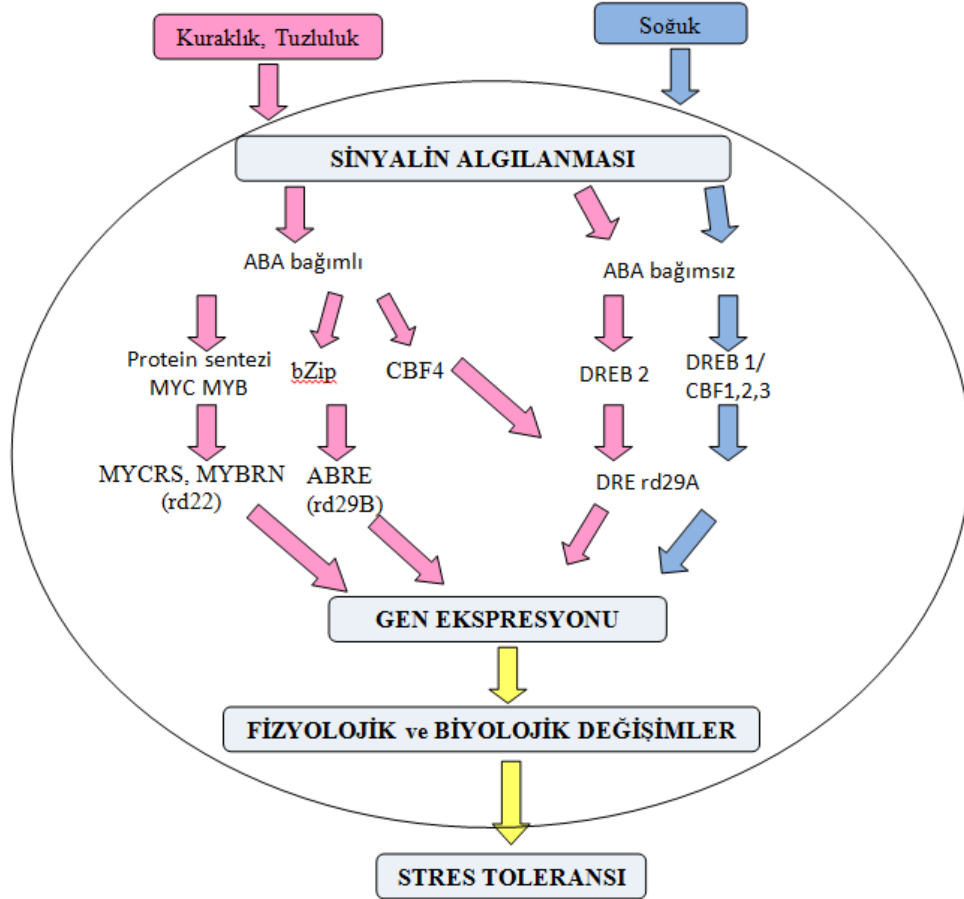
Bu koşullar altında, endojen ABA seviyesinde de artış meydana gelir. ABA; endojen miktarı arttığında, çevresel streslere cevaben vejetatif büyümeyi kontrol eden, azaldığında ise bir büyüme promotörü gibi davranan bitki büyüme ve gelişimini inhibe edici fitohormonlardan biridir (Cheng ve ark., 2002). Ayrıca ABA, tohum çimlenmesi ve olgunlaşması, çevresel stres koşullarında vejetatif dokuların verdiği cevaplar gibi çeşitli süreçlerde bir sinyal molekül olarak görev yapar (McCarty, 1995; Leung ve ark., 1998) ve çeşitli stresler altında birçok genin ekspresyon seviyesindeki değişimlerini kontrol eder (Christmann ve ark., 2006). Bu sinyal iletim (transdüksiyon) yolları, transkripsiyon faktörleri tarafından strese direncin derecesine göre gen setlerini aktif eden ya da baskılayan kontrol noktaları içerir (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 2005).

ABA bağımlı gen aktivasyon yolu, ABA'ya cevap elementlerini (ABREs) tanıyan spesifik bir lösine zengin transkripsiyon faktör ailesi (bZIP) tarafından düzenlenir. Bunlar ABA'ya cevap elementlerini bağlayan proteinler (AREBs) (Uno ve ark., 2000) veya faktörler (ABFs) (Choi ve ark., 2000) olarak bilinirler. Kuraklığa/soğuğa cevap elementlerini bağlayan proteinler (DREB/CBF) ile homeodomain lösine fermuar proteinlerini kodlayan bir grup (HDZip) da, (Seki ve ark., 2002a,b) kontrolde görevli diğer aileyi oluşturur (Liu ve ark., 1998). Bu transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonel karakterizasyonu; *Arabidopsis*'te aşırı ifade edildiklerinde kuraklığa ve soğuk stresine direnç sağladıklarını ortaya koymuştur (Kim ve ark., 2004; Fujita ve ark., 2005)

1.4. Kuraklık Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar

Su eksikliğine karşı oluşturulan cevaplar; türe, genotipe, su kaybı şiddetine ve süresine, bitkinin gelişme durumuna, yaşına, organ ile hücre tipine ve hücre çeperi, hücre zarı gibi hücresel kompartımanlaşmaya bağlı olarak değişir (Bray, 1997).

Kuraklık stresi bitkilerde fizyolojik veya biyokimyasal cevapların oluşturulması ile beraber, bir dizi strese cevap geninin de transkripsiyonel aktivasyonunu tetikler. Bazı genler kuraklık stresine oldukça hızlı cevap verirken, diğerleri ABA birikiminden sonra yavaş olarak indüklenmektedir. Su kaybı, ABA üretimini tetikler ve sentezlenen ABA, çeşitli genleri uyarır. Kuraklık stresi altında uyarılan genler birtakım metabolik proteinler üreterek, hücreleri su eksikliğinden korumada görev almaktadır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

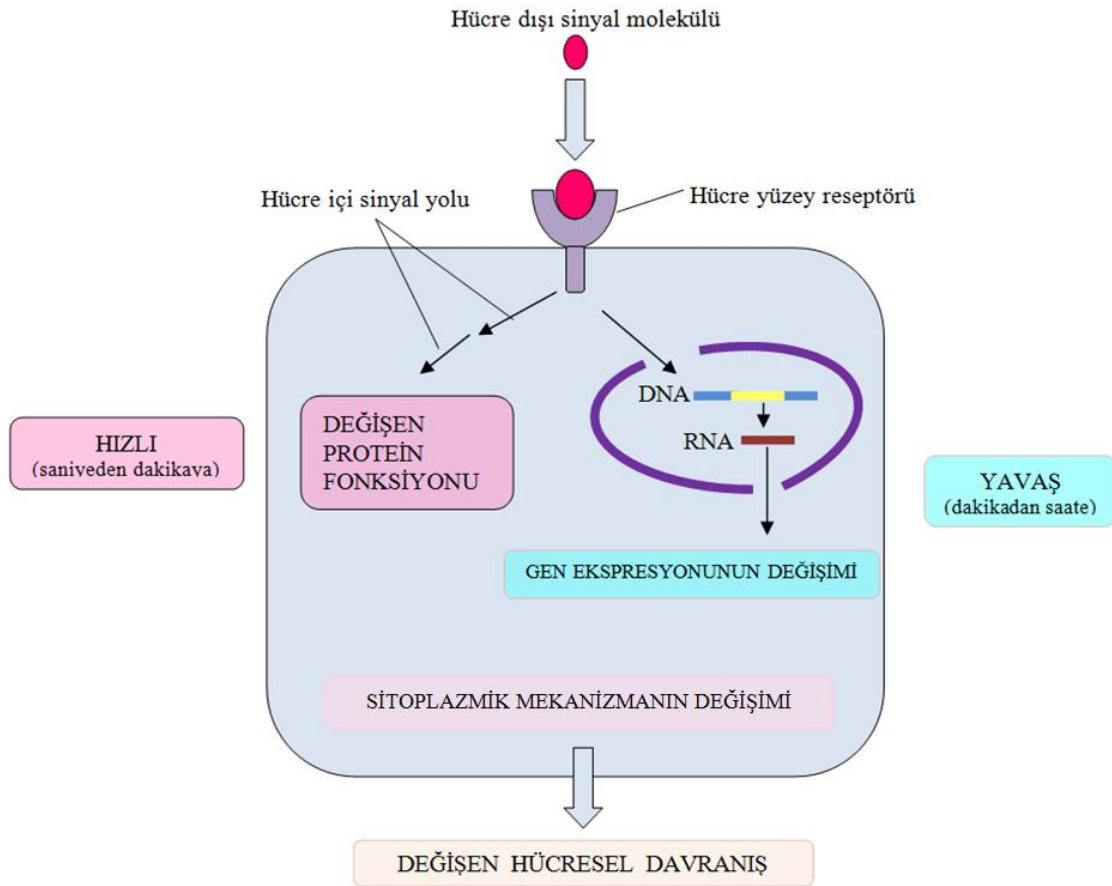


Şekil 2. Hücresel sinyal iletim yolları ile sinyalin algılanması ve gen ekspresyonu arasındaki ilişki (URL-2, 2011) DRE: kuraklığa cevap elementi, ABRE: absisik asit cevabını bağlayıcı element, MYBRS: MYB tanıma bölgesi, MYCRS: MYC tanıma bölgesi, bZIP: temel lösin fermuar domaini

Strese karşı oluşturulan cevapta yer alan genler iki tiptir: Bunlar; dakikalar içinde ve geçici olarak indüklenen erken cevap genleri ve strese karşı daha yavaş indüklenen ve ifadeleri çoğunlukla devamlı olan geç cevap genleridir.

Bu genlerin ürünleri iki gruba ayrılır: Kuraklık stresi ile uyarılan genlerin ilk grubu; stres toleransında fonksiyon gösteren su kanal proteinleri, şekerler, prolin, glisin-betain gibi osmotik koruyucuların biyosentezinde görev alan enzimler, makromolekülleri ve membranları koruyan mRNA'ya bağlanan proteinler, LEA proteinleri, şaperonlar, proteazlar ve detoksifikasyon enzimlerini içermektedir.

İkinci grubu ise protein kinazlar, fosfolipaz C ve transkripsiyon faktörleri gibi regülatör proteinler oluşturur (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

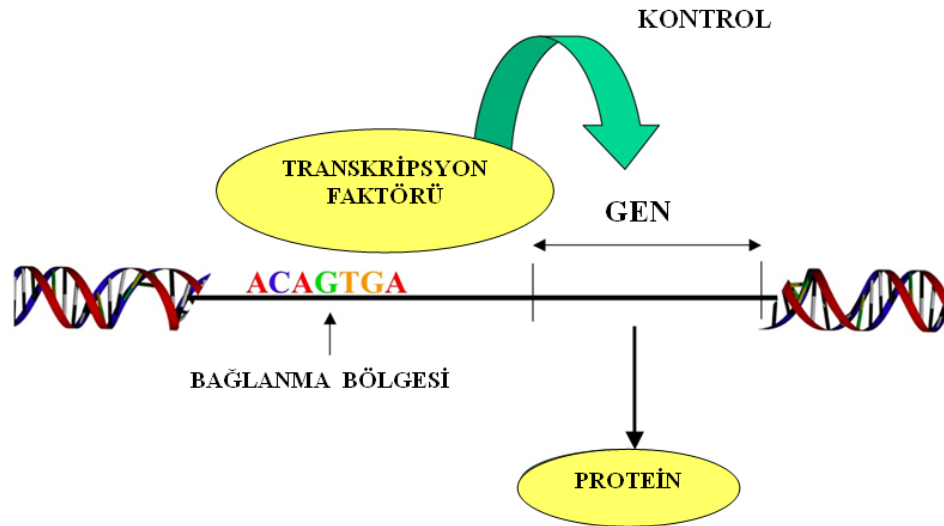


Şekil 3. Strese karşı oluşturulan erken ve geç cevap genleri (URL-3, 2011)

Strese cevapta yer alan genlerin büyük bir kısmını geç cevap genleri oluşturmaktadır. Erken cevap genleri ise; geç cevap genlerini aktive ederek; strese karşı cevapta rol oynayan genlerin ifadesinin ve sinyal iletiminin ileriki regülasyonunda yer alan proteinleri, yani transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (Zhu, 2002).

1.5. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri hedef genin promotor bölgesine spesifik olarak bağlanan ve bu genlerin transkripsiyonunu kontrol eden proteinlerdir. Bu proteinler; hedef DNA'ya bağlanmak için birkaç fonksiyonel domainden oluşmuş modüler yapılara sahiptirler. Bu yapılar, temel transkripsiyonel yollarda, ya da diğer işlevlerde farklı proteinler veya transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi sağlarlar.



Şekil 4. Strese cevapta temel transkripsiyonel mekanizma (URL-4, 2011)

Bir ökaryotik genomda kodlanan transkripsiyon faktörlerinin, genomdaki toplam gen sayısının % 3,5-7'si arasında olduğu hesaplanmıştır (Riechmann ve ark., 2000; Riechmann ve Ratcliffe 2000). Geçtiğimiz on yıl süresince, birçok biyolojik sürecin kontrolünde görev yapan yüzlerce transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (Takatsuji, 1998). *Arabidopsis*, çeltik ve mısır genomlarının sırasıyla 1510-1581, 1611 ve 3337 adet transkripsiyon faktörü kodladığı ortaya konmuştur (Riechmann ve ark., 2000; Gong ve ark., 2004; Guo ve ark., 2005; Iida ve ark., 2005; Xiong ve ark., 2005; Yılmaz ve ark., 2009). Bu transkripsiyon

faktörlerinin DNA-bağlanma domainlerindeki primer ve/veya üç boyutlu yapılarındaki benzerliklere göre 40-60 aile altında sınıflandırıldığı tespit edilmiştir (Wingender ve ark., 2001; Warren, 2002; Yılmaz ve ark., 2009).

Yıllarca, transkripsiyonel düzenlemenin, kuraklık stresine cevabın kontrolünde önemli bir rol üstlendiği tahmin edilmiş, kuraklık stresi ile uyarılan genlerin promotorları ile transkripsiyon faktörleri arasında bir etkileşim olduğu saptanmaya çalışılmıştır. Bu faktörlerin stres ile uyarılan genlerin aktivasyonuna katıldığı ve muhtemelen bitkide osmotik adaptasyonu başlattıkları rapor edilmiştir (Liu ve ark., 1998). Günümüze kadar, genetik yaklaşımlar kullanılarak çeşitli fenomenlerde (genlerin etiketlenmesi ve harita tabanlı klonlama) işlevselliği olan birçok transkripsiyon faktörü tanımlanmış, fakat hedef genlerin ilgili transkripsiyon faktörlerini içeren moleküler düzeydeki hareketleri hala çok iyi anlayamamıştır.

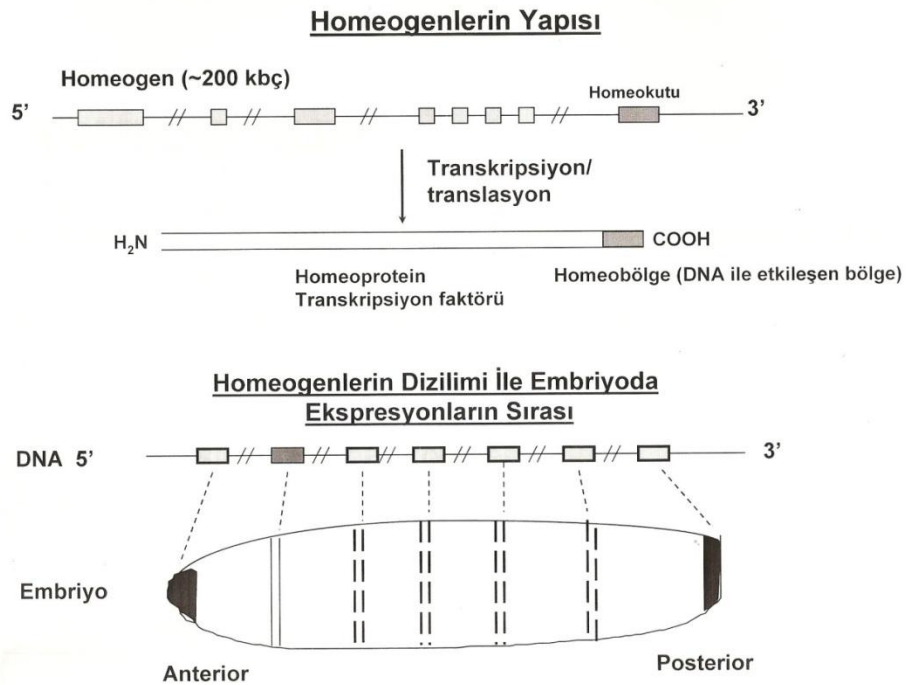
Bitkilerde abiyotik streslere cevap veren genlerin aktivasyonunda, hangi transkripsiyonel faktörün hangi strese cevap genini indüklediğine dair genel bir kural yoktur. Bunun yerine, sadece bir grup strese cevap geninin ekspresyonunu düzenleyen ya da bunlar ile işbirliği içerisinde, aynı geni aktive eden birçok farklı transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmektedir (Xiong ve Zhu, 2001).

1.6. Homeobox Genleri

Homeozis (homeostaz) olgusu vücuttaki bir segmentin diğerine kısmen ya da tümüyle dönüşmesi veya farklı bir organa özgü özellikler kazanmasıdır. Homeotik genler ise vücut kısımlarının nasıl şekilleneceğini belirleyen genlerdir ve her bir homeotik gen embriyogenezis sırasında farklı zamanda ve farklı dokularda ifade edilir (Henriksson, 2004). Homeotik mutasyonlar olarak isimlendirilen mutasyonlar birtakım anomalilere sebep olur ve bu mutasyonlar bitkileri de içine alan birçok organizma grubunda keşfedilmiştir. Bu olguya verilebilecek en iyi örnek başında anten olarak görev yapan bacaklara sahip “antennapedia” olarak adlandırılan *Drosophila* mutantıdır. İlgili gen *Antp*; klonlama ile tanımlanan ilk homeotik gendir (McGinnis ve ark., 1984; Scott ve Weiner, 1984). Bu tanımlamadan sonra, 180 nükleotit (60 a.a)’ lik korunmuş ortak bir DNA bağlayıcı motifi ifade eden, benzer sekans ve fonksiyonlara sahip diğer genler, homeobox genleri olarak anılmaya başlanmıştır (Gehring ve ark., 1990).

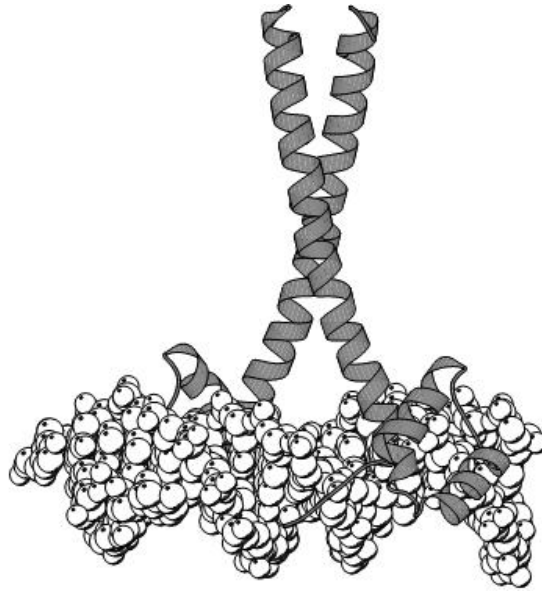
Arabidopsis'te bulunan gen ailesi, halen birçoğunun fonksiyonu tespit edilememiş 89 farklı genden oluşur (Schrick ve ark., 2004). Homeobox proteinleri, DNA promotor ve enhancer (kontrol) dizilerine bağlanan düzenleyici protein bölgelerine benzerlik gösterir. Bu dizilere bağlandıklarında, bir seri gende koordine bir ekspresyon sağlayarak diğer genlerin ekspresyonunu denetler (Kissinger ve ark., 1990).

Homeobox genleri geniş bir filogenetik dağılıma sahip olup, tüm ökaryotik organizmalarda bulunmuştur. Örneğin hayvanlarda bulunan bu genler organizmanın oluşumunu kontrol eden, farklı vücut kısımlarını ve spesifik organları tanımlayan evolüsyonel olarak korunmuş birer zorunlu moleküler anahtar olarak rol oynar. Bu proteinlerin hücre bölünme hızının ve hücrenin yerleşeceği bölgenin düzenlenmesinde, hücre şeklinin, büyüklüğünün ve hücre yüzey özelliklerinin (yapışkanlığının) belirlenmesinde, rolleri vardır (Hjellström, 2002). Fakat bitkilerdeki homeobox genleri, çevresel streslere karşı adaptasyon süreçlerinde görevlidirler (Iannacone ve ark., 2004; Deng, 2006). Ayrıca tüm homeotik genlerin, duplikasyon yoluyla oluştuğu ve bu homeodomain proteinlerinin birer transkripsiyon faktörü gibi davrandığı ortaya konmuştur (Olsson, 2005).



Şekil 5. Homeogenlerin yapısı (URL-1, 2011)

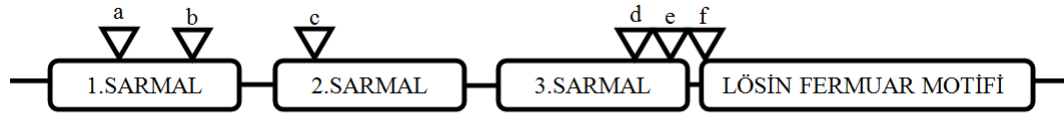
Bu 47 gen, HDZip ailesini oluşturur ve bitkide spesifik proteinleri kodlar (Schrack ve ark., 2004). Benzer domain organizasyonları maya ya da hayvanlarda bulunamamasına rağmen HDZip transkripsiyon faktör homodomainleri, fonksiyonel anlamda diğer ökaryotik canlılar ile benzerdir ve bu proteinlerin çoğu, büyüme ve gelişimin kontrolü ilgili birer anahtar olarak işlev görür (Gehring, 1993).



Şekil 6.DNA'ya bağlanan lösin fermuar motif dimeri (Hanson, 2000)

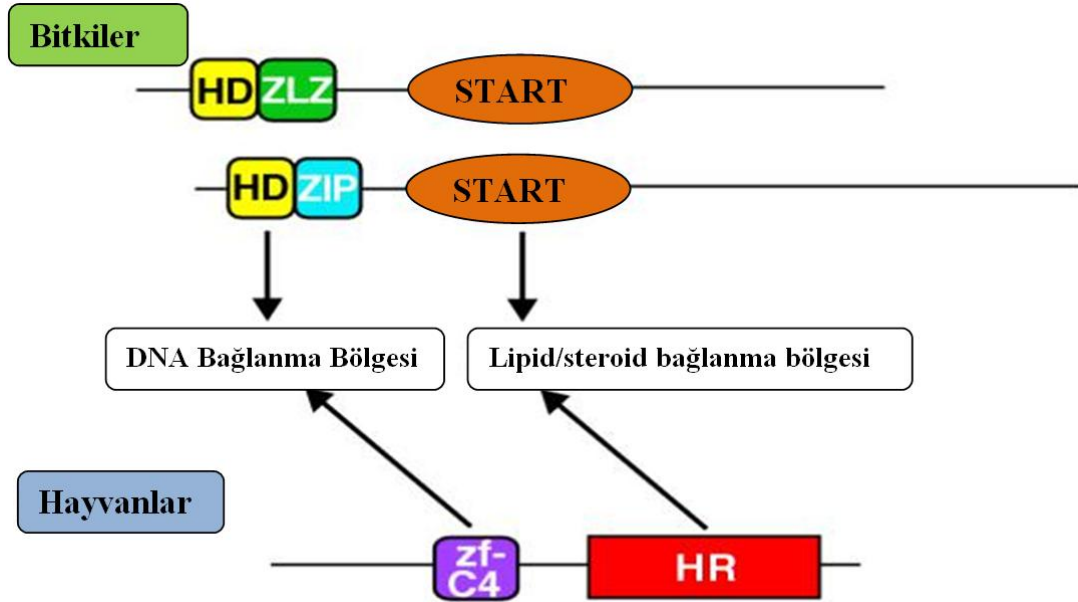
HDZip genleri, sekans benzerliği ve ortak ekzon-intron paternlerine göre 4 sınıf (I-IV) altında toplanmıştır.

Tablo 1. *Arabidopsis*'te tanımlanmış HDZip ailesi üyeleri arasındaki farklılıkların özeti (Hanson, 2000)



Sınıf	mRNA uzunluğu	Homodomainde bulunan intronlar	HDZip domainindeki ekstra aminoasitler
HDZip I	Yaklaşık 1500 baz	a veya hiç	Hiç
HDZip II	Yaklaşık 1500 baz	c ve e	Hiç
HDZip III	Yaklaşık 3300 baz	d	Helix 2 ve 3 arasında 4
HDZip IV	Yaklaşık 3000 baz	b ve f	Helix 3 ve lösin fermuar arasında 4 Helix 3 ve lösin fermuar arasında 7

HDZip I ve II bulundurdıkları l6sin fermuar domaini bakımından III ve IV'den ayrılır. III ve IV genleri, l6sin fermuar domaini ve bir standart homodomainin yanı sıra, steroid benzeri bir liganda baēlandıēı d6ş6n6len bir START domaini de kodlar (Schrick ve ark., 2004).



Şekil 7. Hayvanlardaki klasik n6klear resept6rlere kıyasla bitkilerde bulunan HD-START proteinlerinin yapısı (Schrick ve ark., 2004)

Yapılan protein-protein etkileşim analizleri, HDZip transkripsiyon fakt6rlerinin homodimer ya da heterodimer olarak işlev g6sterebileceēini ve ps6dopalindromik DNA baēlanma b6lgeleri ile etkileşim halinde olduklarını ortaya koymuştur. HDZip I ve II ailesi 6yesi genler, birer heterodimer olarak davranıp, (6rneēin ATHB5; ATHB6 ve 16 ile heterodimerize olabilir) transkripsiyonu A/T ya da G/C merkez pozisyonuna g6re CAAT(A/T)ATTG veya CAAT(G/C)ATTG b6lgelerine, III ve IV ailesine ait genler ise; GTAAT(G/C)ATTAC ve TAAATG(C/T)A ps6dopalindromik DNA b6lgelerine baēlanarak aktive eder veya baskılar (Ohgishi ve ark., 2001). Çeltik ve *Craterostigma plantagineum* gibi bitkilerde bulunan HDZip 6yelerinin de gen ekspresyonunu *Arabidopsis*'teki HDZip I ve II ailesi 6yeleri ile benzer DNA baēlanma b6lgelerini tercih ederek ind6kledikleri saptanmıştır (Meijer ve ark., 2000).

1.6.2. HDZip genlerinin bitkilerdeki biyolojik rolleri

Drosophila'da bulunan homeobox gen ailesi üyelerinin aksine HDZip genleri mutasyonlarla fonksiyonlarını kaybederek olumsuz fenotipik özellikler ortaya koymazlar. Tüm test edilmiş HDZip I proteinleri, bitkide korunmuş CAAT(N)ATTG bölgesine bağlanarak, birer transkripsiyon faktörü olarak davranır ve bitki büyüme ve gelişimini kontrol eder.

HDZip I genleri içinde duplikasyonlar şeklinde meydana gelen fonksiyonel fazlalık ve çevresel sinyallere karşı oluşturdukları geniş ve farklı transkript dağılımı ile meydana gelen fonksiyonel ağ; bitkiye, çevresel değişikliklere karşı adaptasyon yeteneği kazandırır. Bu gen ürünlerinin fonksiyonları hakkındaki verilere, HDZip genlerine ait cDNA'ların genellikle CaMV 35S promotörü ile füzyona uğratılmasıyla elde edilen transgenik bitkiler ve bu bitkilerin çevresel sinyallere verdikleri cevaplar incelenerek ulaşılmıştır. Diğer faktörlere bağlı olarak, gerekli durumlarda transkripsiyonu baskılayan veya aktive edebilen bu proteinlerin, çok geniş bir yelpazede işlevsel oldukları, birçok HDZip geninin kuraklığa, tuz stresine ve aşırı ışığa tepki gösterdikleri belirlenmiştir (Hjellström, 2002).

1.6.3. HDZip (I-IV) genlerinin *Arabidopsis*'teki fonksiyonları

17 üyeye sahip HDZip I sınıfına ait genlerin, mutant *Arabidopsis* bitkilerinde yüksek seviyede ifade edilmesi ile, hipokotil büyümesinde etkili olan mavi ışık inhibisyonunun pozitif yönde kontrolünden, vejetatif formdan generatif forma geçerken fotoperiyoda gösterilen cevabın azalmasından, tohum çimlenmesi ve stomatal kapanma esnasındaki ABA sinyal yolunun negatif kontrolüne kadar geniş bir yelpazede etkili olduğu ortaya konmuştur (Himmelbach ve ark., 2002; Wang ve ark., 2003; Henriksson, 2004). Ayrıca; kuraklık oluşturulmuş ve ABA'nın dışarıdan uygulandığı durumlarda up veya down regüle olarak, yaprak ve gövde büyümesini kontrol ettikleri de ortaya konmuştur (Hjellström ve ark., 2003). Bunların yanı sıra, bu ailedeki genlerin aktarıldığı transgenik bitkilerde, primer ve adventif kök gelişiminin baskılandığı, kotiledon hücrelerinin lateral büyümesinin engellendiği gibi fenotipik sapmaların olduğu; dolayısıyla bu genlerin, yaprak ve kotiledon gelişimini kontrol ettiği ve yine bitkideki şeker sentezinde düzenleyici bir potansiyel oldukları saptanmıştır (Hanson ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalar; 9 gen içeren HDZip II sınıfı üyelerinin, uzak kırmızı ışık etkisiyle indüklendikleri, sis veya gölge gibi düşük R:FR (kırmızı uzak kırmızı) ışık

oranlarındaki çevresel koşullarda yapraklardaki hücre gelişimi üzerinde oluşan olumsuz etkiyi azaltmak adına transkripsiyonlarının arttığı, hipokotil ve kotiledonlardaki hücre çoğalmasını koordine ettikleri ve oksin bağlantılı morfogenezi uyardıkları yönünde sonuçlar vermiştir (Sawa ve ark., 2002).

Arabidopsis'te bulunan 5 HDZip sınıf III geninin ise; apikal meristem fonksiyonları ve vasküler gelişimdeki rolleri ortaya konmuş, yaralanma karşısında iyileştirici fonksiyonlarının olduğu ve oksin hormonu tarafından pozitif şekilde kontrol edildikleri saptanmıştır (Emery ve ark., 2003)

Sınıf IV 'e ait 16 HDZip geninin ise *Arabidopsis* kök epidermisinde trikoma (tüy) oluşumunda fonksiyonu olduğu ve hücre tabakalarının oluşumunu düzenleyen genlerin ifadesi ile ilintili olduğu açığa çıkan sonuçlar arasındadır (Abe ve ark., 2003).

1.7. Stres Cevap Mekanizmalarında *Arabidopsis*'in Önemi

Brokoli, karnabahar, lahanalar, turp ve kolza ile yakın akraba olan *Arabidopsis*, *Cruciferae* (*Brassicaceae*) familyasına ait dikotiledon bir bitkidir. Fakat bu bitkilerin aksine, tarımsal önemi olan bir ürün değildir. Bitkinin küçük genom ebatı (n=5, 119Mb (1Mb=1000000 nükleotid), tahmini gen sayısı (26207-<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/ath1.shtml>) ve mütevazî büyüme gereksinimleri birçok çalışmada model organizma olarak kullanılmasını sağlamış ve *Arabidopsis* 'e olan bilimsel ilgiyi artırmıştır.

Genom haritası tamamlanmış ilk bitki olan *Arabidopsis*, (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) en az 1533 transkripsiyon faktörü içerir. Bu, tüm gen sayısının %5,9' unu ifade eder ve ayrıca bu sayı, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* ve mayadan 2 veya 3 kat daha fazladır (Riechmann ve ark., 2000). Bu faktörlerin bazıları sadece bitki spesifik DNA bağlanma bölgeleri ihtiva ederken, diğer organizmalarda bulunan bazıları da, bitki spesifik bağlanma bölge kombinasyonları içerir (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Gelişen tekniklerle beraber *Arabidopsis*, spesifik genlerin fonksiyonlarını araştırmada kullanılan mutant ya da transgenik bitki oluşturulmasında ve bu bitkilerin fenotipik olarak incelenip, manüplasyonu yapılan genin fonksiyonunu tanımlamada, sağlam bir genetik temel oluşturur (Somerville ve Koornneef, 2002). Bunun yanı sıra, bu çalışmada da olduğu gibi, *Arabidopsis* incelenerek elde edilmiş bilgiler, direkt olarak diğer bitkilere uyarlanabilir.

1.8. ATHB7 Geni

Arabidopsis thaliana HB7, HDZip I transkripsiyon faktör ailesine aittir ve aynı aileye üye ATHB12 geni ile protein seviyesinde etkin heterodimerler oluşturarak bitki büyüme ve gelişimini kontrol eden potansiyel bir regülatördür. Benzer proteinleri kodlamalarının yanı sıra, promotorları hemen hemen aynı hücrelerde aktiftir (Hjellström, 2003). Fonksiyonel olarak korunmuş bu gen çifti 20-60 milyon yıl önce duplike olmuştur. Detaylı transkripsiyon analizleri HDZip sınıf I genlerinden % 80 paralog olan bu genler, benzer promotor aktivitesi, benzer sekans, benzer ekspresyon profili ve benzer fonksiyon gösterirler. Biri fonksiyonunu kaybederse bu diğeri tarafından telafi edilebilir. Bunlar üst üste çakışık (overlap) genler gibi değil, bir heterodimer olarak davranıp aynı protein kompleksinin elemanı olarak, aynı ya da benzer hedefleri etkileyebilirler. Yapılan çalışmalar, ATHB7 ve ATHB12'nin yaprak, kök ve gövdedeki kuraklığa verdikleri cevap profillerinin aynı olduğunu ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2003). Tuz stresi ile uyarılmış bitkilerde ATHB7 mRNA ekspresyonunun sistemik bir sinyal olarak etki gösterdiği, kuraklık stresine karşı su dengesini kontrol etmek için, PSII (fotosistem II)'nin yüksek fotokimyasal etkinliğini baskıladığı, saptanmıştır. Ayrıca gölgeye maruz kalan bitkilerde R/FR oranının azalmasından dolayı meydana gelen sakınım mekanizmalarında gövde uzamasının down regülasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Hjellström, 2002; Iannacone, ve ark., 2007).

1.8.1. Kuraklığa toleransta ATHB7'nin rolü

ATHB7 transkripsiyonları arttırılmış transgenik bitkiler ve ATHB7 fonksiyonlarını kaybetmiş mutant (*athb7*) bitkiler, köklerdeki ABA-aracılı büyüme cevabının incelenmesinde etkilidir. ABA veya kuraklık stresine karşı, transkript seviyelerinin yanı sıra, ATHB7 promotor aktivitelerinin de yaprak, kök ve gövdede açıkça up-regüle olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerde, fenotipik olarak dallanmanın arttığı, kök gövde yaprak büyümelerinin ise ABA'ya cevaben azaldığı ortaya konmuştur (Hjellström, 2002).

Yapılan çalışmalarda, (Merlot ve ark., 2001) bitkilerin vejetatif fazı süresince ifade edilen ATHB7 proteininin kuraklık stresine verdiği cevabın, ABA bağımlı protein fosfatazlar vasıtasıyla (ABI1 ve ABI2 serin-treonin protein fosfatazlar proton konsantrasyonu ile kontrol edilir ve H₂O₂ ile geri dönüşümlü olarak inaktive edilirler (Meinhard ve Grill., 2001)) gerçekleştiği ve ABA muamelesinin ATHB7 mRNA

akümülyasyonunu arttırdığı saptanmıştır (Wang ve ark., 2003). ATHB7'nin de dâhil olduğu *Arabidopsis*'te tanımlanmış HDZip gen ailesi üyeleri Tablo 2'de verilmiştir.

Fakat ATHB7'nin gövde büyümesini inhibe edici fonksiyonu ABA'dan veya suyun kullanılabilirliğinden bağımsızken, kök büyümesi üzerine etkisi ABA'ya bağımlıdır (Hjellström ve ark., 2003; Olsson ve ark., 2004). Ayrıca, ATHB7'nin karanlıktan mavi ışığa ani geçişte şiddetli şekilde up-regüle edildiği saptanmış ve bu mekanizmanın etiyol tohumların gelişimi için, solunum ve fotosentezi arttırarak daha fazla su kullanımını sağlayıp su stresi oluşumuna sebebiyet vermesiyle meydana geldiği rapor edilmiştir (Jiao ve ark., 2003).

Tablo 2. *Arabidopsis*'te tanımlanmış HDZip genleri

HDZipSınıfı	Gen adı	Gen kodu	Referans
I	ATHB1/HAT5	At3g01470	(Aoyama ve ark., 1995; Ruberti ve ark., 1991; Sessa ve ark., 1993; Sessa ve ark., 1997)
I	ATHB3/HAT7	At5g15150	(Mattsson ve ark., 1992)
I	ATHB5	At5g64310	(Johannesson ve ark., 2001; Johannesson ve ark., 2003; Soderman ve ark., 1994)
I	ATHB6	At2g22430	(Himmelbach ve ark., 2002; Soderman ve ark., 1999; Soderman ve ark., 1994)
I	ATHB7	At2g46680	(Hjellstrom ve ark., 2003; Soderman ve ark., 1996; Soderman ve ark., 1994)
I	ATHB12	At3g61890	(Lee and Chun, 1998; Lee ve ark., 2001)
I	ATHB13	At1g69780	(Hanson ve ark., 2001; Hanson ve ark., 2002)
I	ATHB16	At4g40060	(Hjellstrom ve ark., 2003)
I	ATHB20	At3g01220	(Hanson, 2000)
I	ATHB21	At2g18550	(Soderman ve ark., 1999)
I	ATHB22	At2g36610	(Soderman ve ark., 1999)
I	ATHB23	At1g26960	(Hanson, 2000)
I	ATHB40	At4g36740	(Hjellstrom ve ark., 2003)
I	ATHB51	At5g03790	(Soderman ve ark., 1999)
I	ATHB52	At5g53980	(Soderman ve ark., 1999)
I	ATHB53	At5g66700	(Soderman ve ark., 1999)
I	ATHB54	At1g27050	(Soderman ve ark., 1999)
II	ATHB2/HAT4	At4g16780	(Carabelli ve ark., 1993; Ohgishi ve ark., 2001; Ruberti ve ark., 1991; Schena ve ark., 1993; Sessa ve ark., 1993; Sessa ve ark., 1997; Steindler ve ark., 1999)
II	ATHB4	At2g44910	(Carabelli ve ark., 1993)
II	ATHB17	At2g01430	(Ruberti ve ark., 1991)
II	HAT1	At4g17460	(Schena and Davis, 1994)
II	HAT2	At5g47370	(Schena and Davis, 1994)
II	HAT3	At3g60390	(Schena and Davis, 1994)
II	HAT9	At2g22800	(Schena and Davis, 1994)
II	HAT14	At5g06710	(Schena and Davis, 1994)
II	HAT22	At4g37790	(Schena and Davis, 1994)
III	ATHB8	At4g32880	(Baima ve ark., 2001; Baima ve ark., 1995; Sessa ve ark., 1998)
III	ATHB9/PHB	At1g30490	(Emery ve ark., 2003; Sessa ve ark., 1998)
III	ATHB14/PHV	At2g34710	(Emery ve ark., 2003; Sessa ve ark., 1998)
III	ATHB15	At1g52150	(Ohashi-Ito and Fukuda, 2003)
III	REV/ILF1	At5g60690	(Emery ve ark., 2003; Otsuga ve ark., 2001; Ratcliffe ve ark., 2000; Talbert ve ark., 1995; Zhong and Ye, 1999)
IV	ATHB10/GL2	At1g79840	(DiCristina ve ark., 1996; Ohashi-Ito ve ark., 2003; van Hengel ve ark., 2004)
IV	ANL2/AHDP	At4g00730	(Kubo ve ark., 1999)
IV	PDF2	At4g04890	(Abe ve ark., 2003)
IV	ATML1	At4g21750	(Abe ve ark., 2003)
IV	FWA	At4g25530	(Soppe ve ark., 2000)
IV		At1g05230	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At1g17920	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At1g34650	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At1g73360	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At2g32370	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At3g03260	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At3g61150	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At4g17710	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At5g17320	(Schrick ve ark., 2004)
IV		At5g46880	(Schrick ve ark., 2004)

Bunun yanı sıra ATHB7 aktarılmış transgenik bitkilerin kuraklık stresini pozitif yönde kontrol ettiklerini gösteren bazı karakterler Tablo 3'te verilmiştir (Hjelström, 2002).

Tablo 3. ATHB7'nin kuraklık stresini pozitif yönde kontrol ettiğini gösteren karakterler

Özellik	Yabani tipe göre 35S::ATHB7 bitkilerinde
Stomatal iletkenlik	Azalış (ciddi derecede)
Köklerin ABA hassasiyeti	Azalış
Çiçeklenme	Gecikme
Dallanma	Artış
Renk	Sabit
Yapraklardaki klorofil floresans emilimi	Artış (fotosistem II' nin daha az zarar gördüğünü gösterir)

Tüm bu veriler dikkate alındığında ATHB7'nin diğer HDZip proteinleri ile birlikte hareket ederek, kuraklık durumunda bitkideki büyümeyi regüle (kontrol) eden bir transkripsiyon faktörü olduğu söylenebilir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan bitki tohumları

DNA ve RNA izolasyon çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens* aracılı gen aktarım yöntemi kullanılarak *Solanum lycopersicum cv. UC82* bitkisine aktarılmış olan, ATHB7 gen bölgesini içerdiği düşünülen 4 adet jenerasyona (T0, T1, T2 ve T6) ve 4 farklı transformasyon grubuna (1-3., 5-8., 7-6., 20.) ait domates tohumları, kontrol bitkileri için ise aynı genotipte fakat bu geni içermeyen *UC82 MA* (Metapontum AGROBIOS) kodlu tohumlar kullanılmıştır.

2.1.2. DNA ve RNA izolasyonunda kullanılan bitki büyüme koşulları

DNA izolasyonu için; 22 °C sıcaklık, %7 nem ve 25 adet 400w hafif sarı ışık altında 3 hafta süresince inkübe edilmiş yabancı tip kontrol bitkileri (*UC82*) ve transgenik aday bitkiler olmak üzere toplam 220 adet domates bitkisinin yapraklarından alınan örnekler kullanıldı (Şekil 8A).

Ardından trans geni taşıdığı tespit edilen 3 haftalık 48 adet bitki buldukları küçük saksılardan alınıp, Fertilizer-NPK 20.20.20, Valagra, ITALY (% 5,5 nitrik azot , % 3,9 amonyak azotu, %10,6 üre azotu, suda çözünebilirliği %20 olan potasyum oksit (K₂O) ve fosforik anhidrit (P₂O₅), % 0,01 boron (B), % 0,05 bakır (Cu), % 0,01 çinko (Zn) ve düşük klor (Cl) ihtiva eden daha büyük saksılara aktarıldı ve RNA izolasyonu aynı koşullarda inkübe edilmiş, fakat bu makro ve mikro elementlerin eklendiği taze toprakta 2 hafta daha büyütülen, toplam 5 haftalık bitkilerin yaprakları kullanılarak yapıldı (Şekil 8B).

2.1.3. Kimyasallar ve diğer malzemeler

Moleküler biyoloji çalışmaları için kullanılan tüm kimyasal ve malzemeler Invitrogen, Ambion, Sigma, Bio-Rad, Amersham, E-Gel, Eppendorf, CellStar ve Euro Clone ticari firmalarından temin edilmiştir.



Şekil 8. A ve B; DNA ve RNA izolasyonunda kullanılan transformantlar

2.2. Metotlar

2.2.1. Olası transgenik domates bitkilerinin PZR ile analizi

T0, T1, T2, T6 jenerasyonlarına ve 4 farklı transformasyon grubuna (1-3., 5-8., 7-6. ve 20.) ait (Ek Tablo 6) transgenik aday üyeler ve kontrol bitkileri transfer edilen genin entegrasyonu ve ekspresyon profilini ortaya koymak adına, sırası ile gerçekleştirilen DNA ve RNA izolasyonu, PZR, cDNA sentezi, quantitative Real Time PZR (qRT-PZR) metodları kullanılarak analiz edildi.

2.2.2. Bitkilerin homojenizasyonu

Bitkilerin tamamı etiketlendikten sonra her birinden alınan küçük birer yaprak örneği, steril ependorf tüplere aktarıldı ve tüpler sıvı azota bırakıldı. Ardından örnekler elektrikli homojenizatör yardımıyla homojenize edildi ve DNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

2.2.3. Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda, modifiye edilen Plant DNA Miniprep (Lassner ve ark., 1989) metodu kullanıldı. Bu yöntemle, transgenik aday bitkilerin farklı jenerasyonlarından ve kontrol bitkilerinin yapraklarından, yabancı DNA kontaminasyonu ve DNaz etkileri önlenerek toplam 220 adet bitkinin genomik DNA'sı izole edildi.

300 mg taze doku, steril santrifüj tüplere alındı ve üzerine 1000 µl ekstraksiyon tamponuna (Ek Tablo 1) eklendi. Örnekler 1-2 dk vortekslendikten sonra, 13000 rpm 4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 600 µl ekstraksiyon tamponu ve nüklei lysis tamponu (Ek Tablo 2) ile resüspanse edildi. Sonrasında 120 µl % 5'lik sarkozil eklendi ve alt üst edildi. Tüpler 65°C 'de 30 dk inkübe edildikten sonra, örneklere 600 µl kloroform eklendi, tüpler 2-3 kez alt üst edildi ve 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak yeni steril ependorflara aktarıldı. Süpernatanta 600 µl izopropanol eklendi ve tüpler yavaşça alt üst edildikten sonra 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet, 100 µl % 75'lik etil alkol (ETOH) ile 3 dk yıkandı. Vakumlu vortekste (SpeedVac SC100) 3 dk süresince alkolden uzaklaştırılan DNA, 2 µl RNase (100 µg/ml) eklenmiş 100 µl TE tamponu (Ek Tablo 4) ile çözüldü ve kullanıma hazır halde 4°C'de saklandı.

2.2.4. DNA konsantrasyonunun spektrofotometrik tespiti

İzole edilen 220 adet DNA'nın saflık ve konsantrasyonu NanoDrop ND1000 Spektrofotometre cihazı ile 260 ve 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) dalga boylarındaki optik yoğunluk ölçülerek belirlendi.

2.2.5. ATHB7 geninin PZR ile amplifikasyonu

İzole edilen genomik DNA'lar, konsantrasyon ölçüm sonuçları da dikkate alınarak, her bir örnekten 100 ng/ 5µl kullanılmak üzere ATHB7 geninin 425 bç'lik kısmının varlığı bakımından analiz edildi.

Amplifikasyon için, NCBI (National Center for Biotechnology Information-Bethesda, USA) veri havuzundan elde edilen ATHB7 gen bölgesine özgü dizayn edilmiş primer çifti kullanıldı (Tablo 4). PZR toplam 50 µl hacimde 96 universal peQStar PZR cihazı ile gerçekleştirildi.

Tablo 4. ATHB7 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan spesifik primerler

ATHB7 Forward	5'-GACCGGAGATGGAGATGAAA -3'	T _m = 60,4°C
ATHB7 Reverse	5'-TCTCGCTGAGAAACGAGTCA -3'	T _m = 60,4°C

Tüm PZR ve qRT-PZR çalışmaları, olası bir kontaminasyonu önlemek ya da tespit etmek adına herhangi bir T-DNA ya da cDNA kalıbı (trans gen) içermeyen negatif kontroller kullanılarak yapıldı. Amplifikasyon için optimize edilmiş reaksiyon koşulları ve PZR şartları Tablo 5 ve 7'de verildi.

2.2.6. Agaroz jel elektroforezi

E-Gel[®] 96 %1'lik Agarose (GP) (Invitrogen) jele 20 µl PZR ürünlerinden ve 10 µl Low Range Quantitative DNA Markör (E-Gel[®], Invitrogen) yüklenerek ve E-Gel[®] 96 Mother Base[™] 50/60Hz 500mA cihazında 75 volt altında 8 dk süresince yürütüldü. DNA moleküllerinin varlığı, BIO-RAD UV Transilluminator 2000 cihazı ile ultraviyole altında gözlemlendi ve fotoğraflandı.

Tablo 5. Taq DNA polimeraz için optimize edilmiş reaksiyon koşulları

(10X) Buffer	5µl
(10 mM) dNTP	1µl
(20 µM) Primer Forward	1µl
(20 µM) Primer Reverse	1µl
Steril H ₂ O	20,3µl
(5U/µl) Taq DNA Polimeraz (Invitrogen)	0,2µl
(50 mM) MgCl ₂	1,5µl
(100 µg) Kalıp DNA	20µl
TOPLAM HACİM	50µl

2.2.7. Transformantların hedef geni içerdiğinin doğrulanması

Hedef geni içerdiği tespit edilen 90 örnekten, gen aktarımının yapıldığı 6. jenerasyon üyesi 45 bitki, transgenik bitkide kesinlikle bulunması beklenen ve bitkiye kanamisin direnci veren NPT II (neomisin fosfotransferaz) plazmidinin varlığı bakımından, diğer jenerasyonlara ait kalan 45 bitki ise ATHB7 geninin varlığı bakımından kontrol amaçlı tekrar incelendi. Doğrulama için, PZR komponentlerinin miktarı ve koşulları değiştirilmeden (Tablo 5 ve 7), 6. jenerasyon üyesi bitkiler için Tablo 6’da verilen NPT II gen bölgesine özgü (yaklaşık 795 bç) primer çifti kullanılırken, diğer 45 bitki için ise, yine ATHB7 gen bölgesini kodlayan spesifik primerler kullanıldı.

Tablo 6. NPT II gen kasetini kodlayan spesifik primerler

NPT II_Forward	5'-ATGACTGGGCACAACAGACA -3'	T _m =57,3°C
NPT II_Reverse	5'-AATATCACGGGTAGCCAACG -3'	T _m =57,3°C

Tablo 7. ATHB7 ve NPT-II amplifikasyonu için PZR şartları

İlk denatürasyon	5 dk 95 °C
Denatürasyon	30sn. 95 °C
Primerlerin bağlanması	45sn. 58°C (35X)
Uzama	1dk 72°C
Son uzama	5 dk 72°C

2.3. ATHB7 geninin ekspresyon analizleri

PZR amplifikasyonu ile trans geni taşıdığı tespit edilen farklı jenerasyonlara ait domates bitkileri ATHB7 geninin ekspresyonu bakımından qRT-PZR analizi ile doğrulandı.

2.3.1. Transgenik bitkilerden total RNA izolasyonu

48 transgenik bitkinin RNA'sı, bu bitkilerin yaprakları kullanılarak, Prescott ve Martin (1987) metoduna göre izole edildi. RNA ekstraksiyon prosedüründe kullanılan tüm materyaller (tip, endorf, solüsyonlar ve distile su), DEPC (dietyl pirokarbonat) ile muamele edilip otoklavlandıktan sonra kullanıldı.

100 mg yaprak örnekleri 2ml'lik steril endorflara alınıp 5-10 dk sıvı azotta donduruldu. Örnekler bir homojenizatör yardımıyla 15-30 sn homojenize edilip toz haline getirildi. Her bir örneğe 500 µl RNA ekstraksiyon tamponu (Ek Tablo 3) eklenerek birkaç saniye vortekslendi. Örnekler eşit hacimde fenol/kloroform (1:1) eklendi ve ara sıra alt üst edilerek 5 dk buzda bekletildi. Daha sonra 5 dk 4°C'de ve 13000 rpm'de santrifüj edildi ve berrak faz (üst faz) yeni bir steril endorfa aktarıldı. Ardından fenol/kloroform (1:1) ekstraksiyonu tekrarlanarak 10 dk 4°C'de ve 13000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz yeni bir steril endorfa alınıp, üzerine eşit hacimde kloroform/ izoamilalkol (24:1) eklendi ve ara sıra alt üst edilerek 5 dk buzda bekletildi. 10 dk 4°C'de ve 13000 rpm'de santrifüj yapıldı, berrak faz yeni bir endorfa transfer edildi ve üzerine son konsantrasyon 2 M olacak şekilde steril LiCl solüsyonu (8 M) eklenerek gece boyunca -20°C'de bekletildi. -20°C'den alınan örnekler, 10 dk 4°C'de 10000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatantları uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl % 70'lik ETOH ile 2 dk 4°C'de yıkandı. Vakumlu vortekste 3 dk kurutulan pellet 100 µl TE (10:1) ile çözüldü ve sonraki kullanımlar için -80°C'de saklandı.

2.3.2. RNA kalitesinin tespiti

RNA moleküllerinin varlığı, E-Gel ® 48 %1'lik Agarose (GP) (Invitrogen) jelle, 1:10 oranında seyreltilmiş RNA örneklerinden ve 10 µl Low Range Quantitative DNA Markör (E-Gel®, Invitrogen) yüklenerek ve E-Gel ® 96 Mother Base™ cihazı ile tespit edildi. Ardından jel, UV altında gözlendi ve fotoğraflandı.

2.3.3. RNA örneklerinden DNA'nın uzaklaştırılması

cDNA sentezi öncesi elde edilen 48 adet RNA'dan DNA'yı elimine etmek için, Ambion™ TURBO DNA-free™ Kit (DNase I Buffer, rDNase I, Turbo DNase, DNA Inactivation Reagent) kullanıldı. Reaksiyon 50 µl son hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları ve programı Tablo 8 ve 9'da belirtildiği gibidir.

Tablo 8. DNA'nın uzaklaştırılma işlemi

DNase I tamoponu (10X)	5µl
rDNase I	1µl
RNase Out (Invitrogen)	1µl
RNA	30µl
Steril H ₂ O	13µl
TOPLAM HACİM	50µl

37°C'de 30 dk inkübasyon sonucu örneklere 1'er µl daha rDNase I enzimi eklendi ve 30 dk daha inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, tüplere 0,2 birim (volume) (toplam hacim/20 µl=2,55 µl) DNA Inactivation Reagent eklenip ara sıra alt üst edilerek 2 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 2000 g'de 5 dk santrifüj yapıldı ve her bir örnekten 50'şer µl süpernatant alınarak CELLSTAR ® steril DNaz ve RNAz uzaklaştırılmış 96'lık platelerde -80°C'de saklandı.

Tablo 9. DNA'nın uzaklaştırılması için gerekli reaksiyon şartları

İlk sıcaklık	110°C
İnkübasyon	37°C de 30 dk
Saklama	8°C

2.3.4. RNA'nın genomik kontaminasyon açısından taranması

-80 °C'deki DNA'sı uzaklaştırılmış RNA örneklerinden 1'er µl ve 18S rRNA gen bölgesine özgü primerler kullanılarak (Tablo 10) örneklerdeki genomik DNA'nın elimine edilip edilmediği PZR ile tespit edildi.

Taq DNA polimeraz için optimize edilmiş reaksiyon koşulları ve PZR şartları, Tablo 5 ve 7'de belirtildiği gibidir.

Tablo 10. 18S rRNA gen bölgesini kodlayan spesifik primerler

18S rRNA Reverse	5'-TAGCAGGCTGAGGTCTCGTT -3'	Tm=62,4°C
18S rRNA Forward	5'-GCATTTGCCAAGGATGTTTT -3'	Tm=56,3°C

2.3.5. Agaroz jel elektroforezi

Reaksiyon sonuçları % 1'lik agaroz jel konsantrasyonunda yapılan elektroforezin ardından, UV altında incelendi ve fotoğraflandı. Bu işlem için, 2 gr Eppendorf Agaroz D-1 LOW EEC, 200 ml TAE (1X) tamponu (Ek Tablo 5) içerisinde, mikrodalgada ısıtılmak suretiyle çözüldü. Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra 6 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Elektroforez tankı, (1X) TAE Buffer ile dolduruldu ve kuyucuklara (yükleme tamponu) son konsantrasyon 1X olacak şekilde hesaplanarak yüklenen 10X'lik boya ile 20'şer µl PZR ürünü 75 volt voltaj altında Bio-Rad POWER PAC 300 elektroforez cihazında, 45 dk süresince yürütüldü.

2.3.6. cDNA Sentezi

48 DNA uzaklaştırılmış RNA kalıbından tek iplikçik cDNA sentezi için, BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kit (iScript reaction mix, iScript reverse transkriptaz, Nuclease-free water) kullanıldı. Kullanılacak olan RNA miktarı jel elektroforez sonuçları dikkate alınarak belirlendi. Sentez, 20 µl toplam hacimde BIO-RAD iCycler™ Optical Module Real Time Detection System kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları Tablo 11 ve 12'de belirtildiği gibidir.

Tablo 11. Tek iplikçik cDNA sentezi için reaksiyon koşulları

(5x) iScript reaction mix	4µl
iScript Reverse Transkriptaz	1µl
Steril H ₂ O	6µl
Kalıp RNA >1µg	9µl
TOPLAM HACİM	20µl

Tablo 12. Tek iplikçik cDNA sentezi için PZR şartları

İlk inkübasyon	5 dk 25°C
İkinci inkübasyon	30 dk 42°C
Son inkübasyon	5 dk 85°C
Saklama	4°C

2.3.7. quantitative Real Time PZR

Toplam 48 cDNA kalıbının gösterdiği ATHB7 gen ekspresyon profilini belirlemek için, CFX96™ Real Time System C1000 termal cycluser cihazı ile, BIO-RAD iQ™ SYBR Green Kit (iQSupermix) ve Le18S rRNA ve qRT ATHB7 primerlerine spesifik probalar kullanılarak (Tablo 13), 96'lı plakelerde qRT-PZR yapıldı. 153 numaralı örnek, gösterdiği eğri (melt curve) verileri dikkate alınarak ST 1 (1:0) - ST 0,1 (1:10) - ST 0,01 (1:100) ve ST 0,001 (1:1000) şeklinde seyreltilip, standart olarak seçildi. Hedef gene referans olması ve transkripsiyon seviyelerinin kıyaslanabilmesi açısından ise 18S rRNA housekeeping gen transkripti, internal/endojen kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca olası bir kontaminasyonu tespit etmek ya da engellemek için, hiçbir cDNA kalıbı içermeyen negatif kontroller kullanıldı ve çalışmadaki her bir örneğin üçer adet teknik tekrarı uygulandı. Her bir örnek için eşik (threshold cycle) değerleri, standart sapma parametreleri dikkate alınarak sistem tarafından otomatik olarak hesaplandı. Reaksiyonun spesifikliği, sistem tarafından indirilen standart method ile amplifikasyon ürünlerinin eğim analizleri yapılarak değerlendirildi. qRT-PZR reaksiyon koşul ve şartları Tablo 14, 15 ve 16'da verilmiştir.

Tablo 13. qRT-PZR için ATHB7 ve 18S spesifik primer ve probalar

İsim	Sekans	
ATHB7 Forward	5'AACTACGACAACCTGGCTTCTCA 3'	Tm=58,9
ATHB7 Reverse	5'TGATTCATGATGTGTGCTGCTTAG 3'	Tm=59,3
ATHB7 probu	5'FamACCGCTTGATCTCCACTACTGCCTTTam3'	
18S Forward	5'GAAACGGCTACCACATCCAAG 3'	Tm=65,4°C
18S Reverse	5'CCCCGTGTTAGGATTGGGT 3'	Tm=65,7°C
18S probu	5'Fam AAGGCAGCAGGCGCGCAAATam 3'	

Tablo 14. ATHB7 probu ile qRT-PZR koşulları

cDNA Kalıbı	2µl
(1X) iQSupermix	10µl
(20 µM)qRT ATHB7 Forward	0,3µl
(20 µM)qRT ATHB7 Reverse	0,3µl
(10 µM)(TaqMan ATHB7 Prob (Sigma)	0,3µl
Steril H ₂ O	7,1µl
TOPLAM HACİM	20µl

Tablo 15. Le18S probu ile qRT-PZR koşulları

cDNA Kalıbı	2µl
(1X)iQ Supermix	10µl
(10 µM)Le18S rRNA Forward	0,6µl
(10 µM) Le18S rRNARreverse	0,6µl
(10 µM)TaqMan Le18S prob (Sigma)	0,3µl
Steril H ₂ O	6,5µl
TOPLAM HACİM	20µl

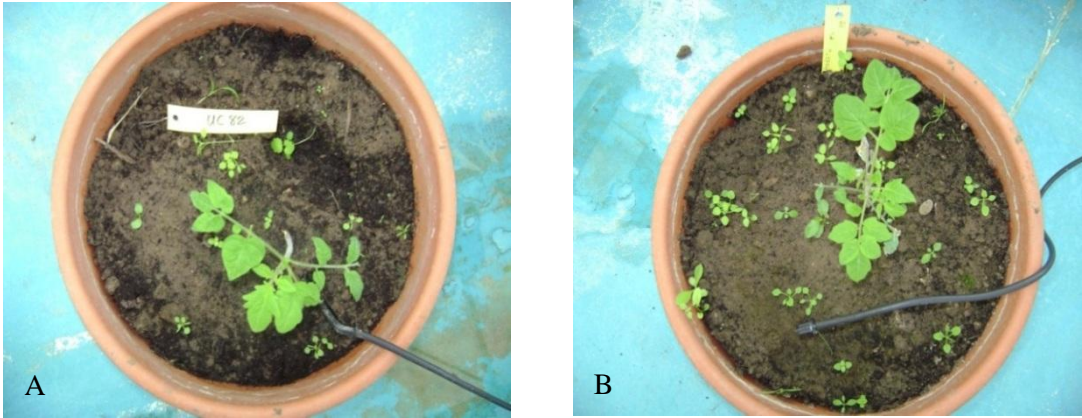
Tablo 16. qRT-PZR şartları

1.Döngü (1x)	50°C 2 dk
2.Döngü (1x)	95°C 2 dk
3.Döngü (45x)	95°C 15 sn.
1. Adım	60°C 30 sn.
2. Adım	
4.Döngü (1x)	15°C saklama

3. BULGULAR

3.1.Olası Transgenik Domates Bitkilerinin Tespiti

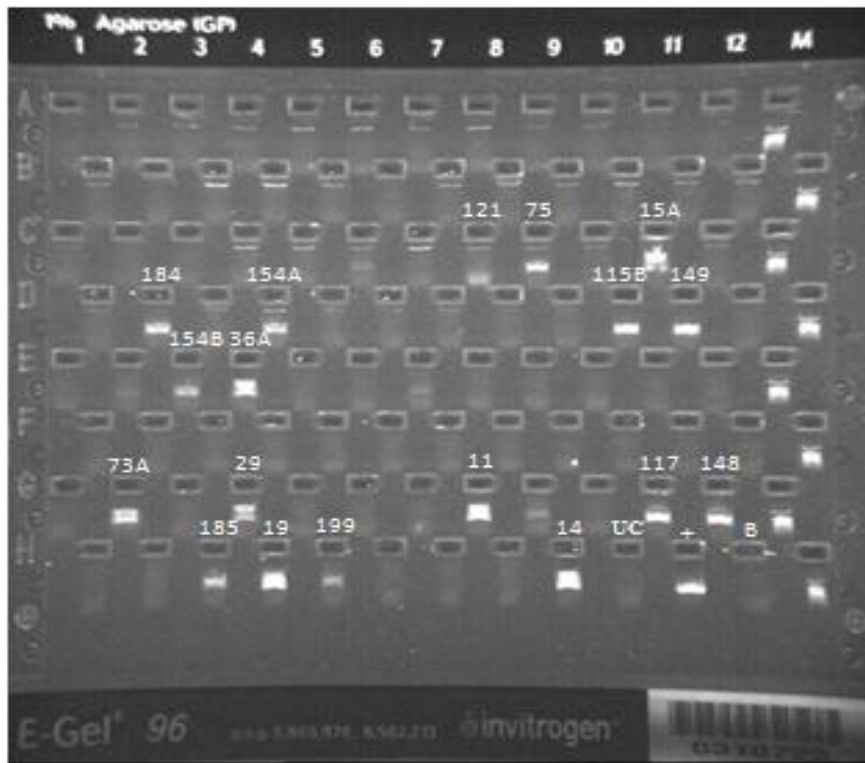
4 farklı transformasyon grubuna ve 4 farklı jenerasyona (pirojeniye) ait 220 transformant, aktarılan genin entegrasyonunu ve transkript seviyelerindeki farklılıkları ortaya koymak adına bir dizi analize tabi tutuldu. Bu analizlerde kullanılan kontrol bitkilerinin (*UC82*) ve olası transgenik bitkilerin sera koşullarındaki gelişimi Şekil 9'da verilmiştir.



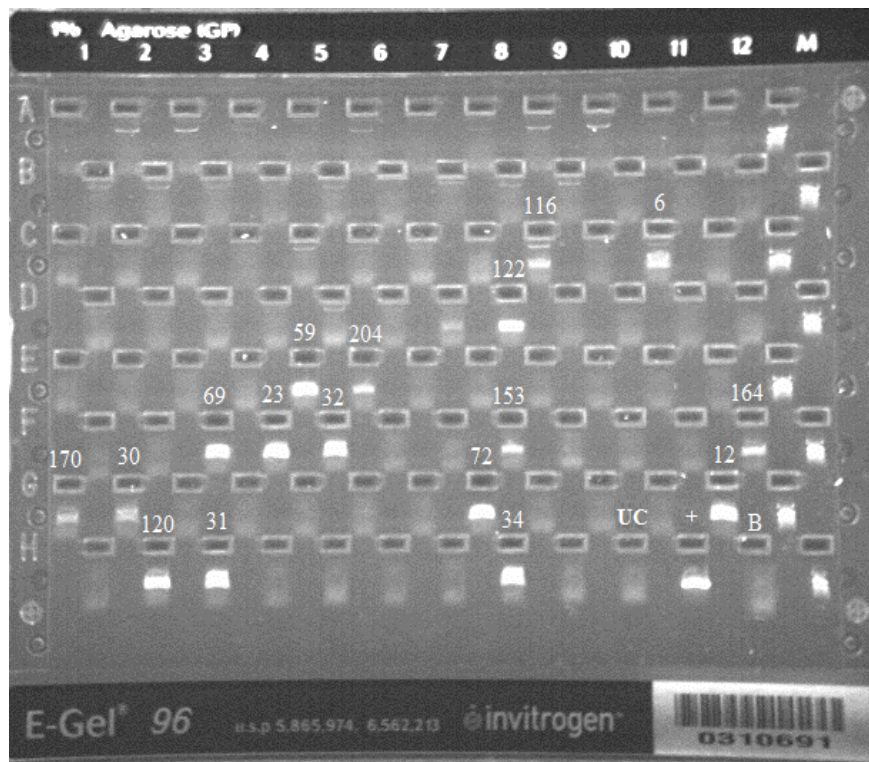
Şekil 9. Transgenik bitkilerin sera koşullarındaki gelişimi A; Trans geni taşımayan kontrol bitkisi B; Hedef geni taşıyan transgenik bitki

3.1.1.ATHB7 spesifik primerler ile PZR analizi

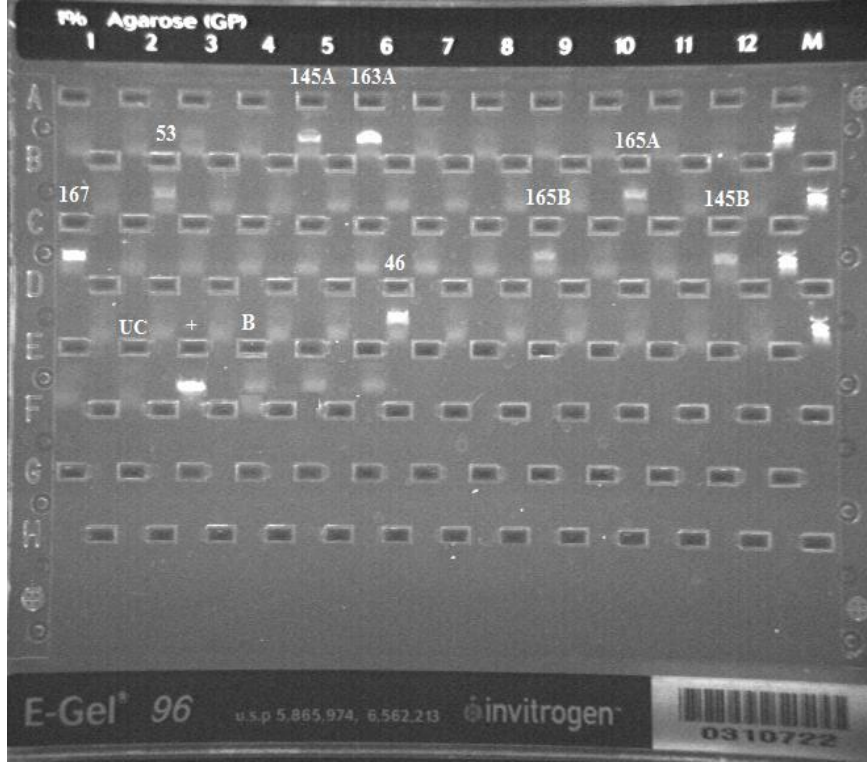
İzole edilen genomik DNA kullanılarak, transgenik adayları T0, T1, T2 ve T6 pirojenilerine ait bitkilerdeki ATHB7 geninin varlığı, spesifik primerler ile test edildi. Bu analiz ve diğer tüm amplifikasyon analizlerinde, pozitif kontrol olarak; genin klonlandığı plazmid DNA (628), negatif kontrol olarak, *UC82* genotipli yabani tip bitki DNA'sı, markör olarak ise 10 µl Low Range Quantitative DNA Markör (E-Gel® Invitrogen) kullanıldı (Şekil 10). Tüm bitkilerin PZR amplifikasyon sonuçlarının ayrıntısı Ek Tablo 7'de verilmiştir.



A



B

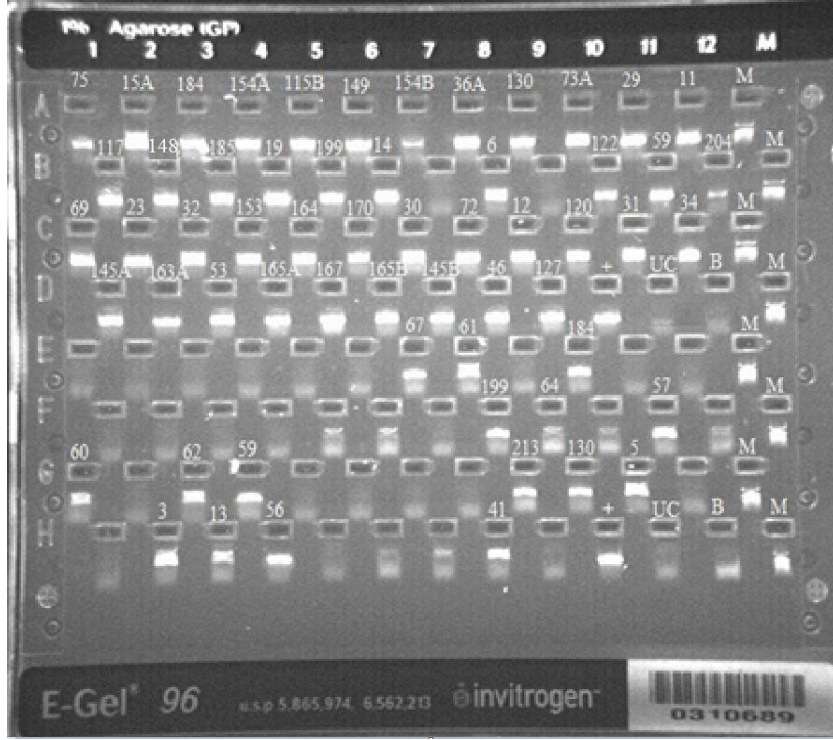


C

Şekil 10. A, B ve C ATHB7 gen spesifik primerler kullanılarak olası T0, T1, T2 ve T6 domates pirojenlerinin PZR ile amplifikasyonu. Sinyal içeren amplifikasyon ürünleri, ATHB7 trans geninin (425 bç'lik kısmının) varlığını simgelemektedir. Aynı sinyal kontrol bitkilerinde gözlenmemiştir. B: Kör, M: Markör, (UC): negatif kontrol UC82, (+): pozitif kontrol (628).

3.1.2. Transgenik bitkilerin ATHB7 ve NPT II gen bölgelerini içerdiğinin doğrulanması

İlk değerlendirme sonucu pozitif tespit edilen transformantlar, kontrol amaçlı tekrar ATHB7 spesifik primerler ile çoğaltılırken, önceki çalışmalarda allel stabilizasyonunun yakalandığı, kesinlikle kanamisin direncine sahip olması beklenen T6 pirojenleri ise, transgenik bitkiye kanamisin direnci veren NPT II gen kasetine spesifik primerler ile çoğaltıldı. T6 pirojenlerine ait sadece 4 örneğin hedef gen bakımından pozitif olduğu tespit edildi. Amplifikasyon sonrası gözlenmesi beklenen ATHB7 (425 bç) ve NPT II (795 bç) fragmentleri Şekil 12'de verilmiştir. PZR amplifikasyon sonuçlarının ayrıntısı Ek Tablo 8'de verilmiştir.



Şekil 11. Transgenik bitkilerin hedef geni içerdiğinin PZR ile doğrulanması (B: Kör, M: Markör, (UC): negatif kontrol UC82, (+): pozitif kontrol (628) A, B, C ve D satırları ATHB7 primerleri ile, E, F, G ve H satırları ise NPT II primerleri ile çoğaltılmış fragmentleri simgelemektedir. Görüntüde, 20 µl PZR ürünü, markör olarak ise 10 µl Low Range Quantitative DNA Markör (E-Gel® Invitrogen) kullanılmıştır.

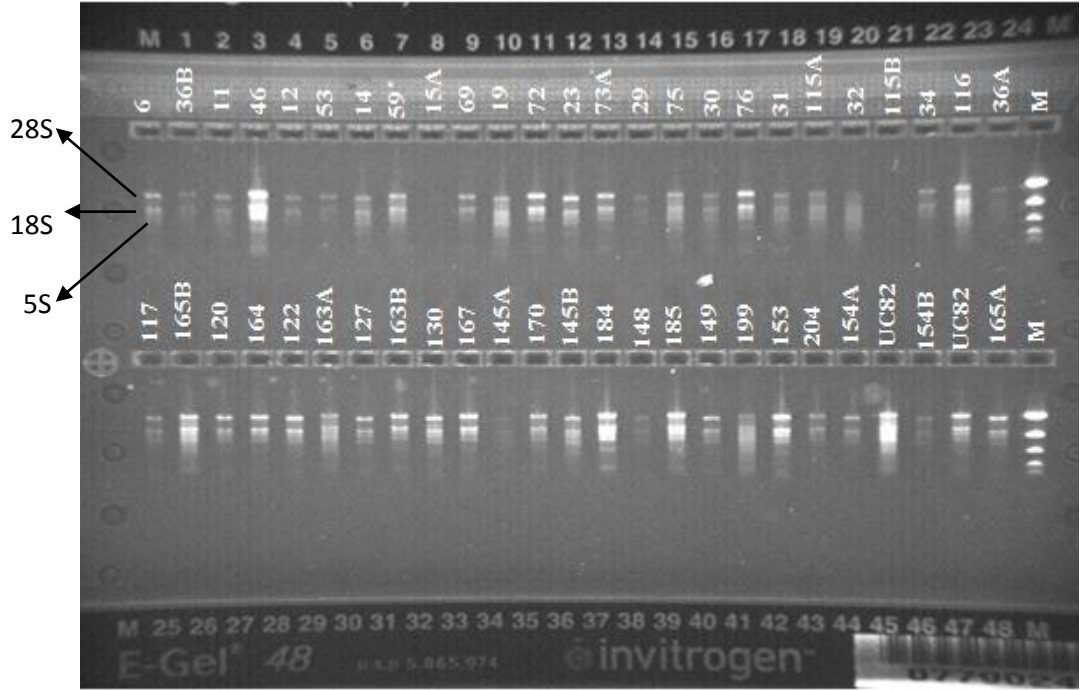
3.2. ATHB7 Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları

3.2.1. RNA kalitesinin kontrolü

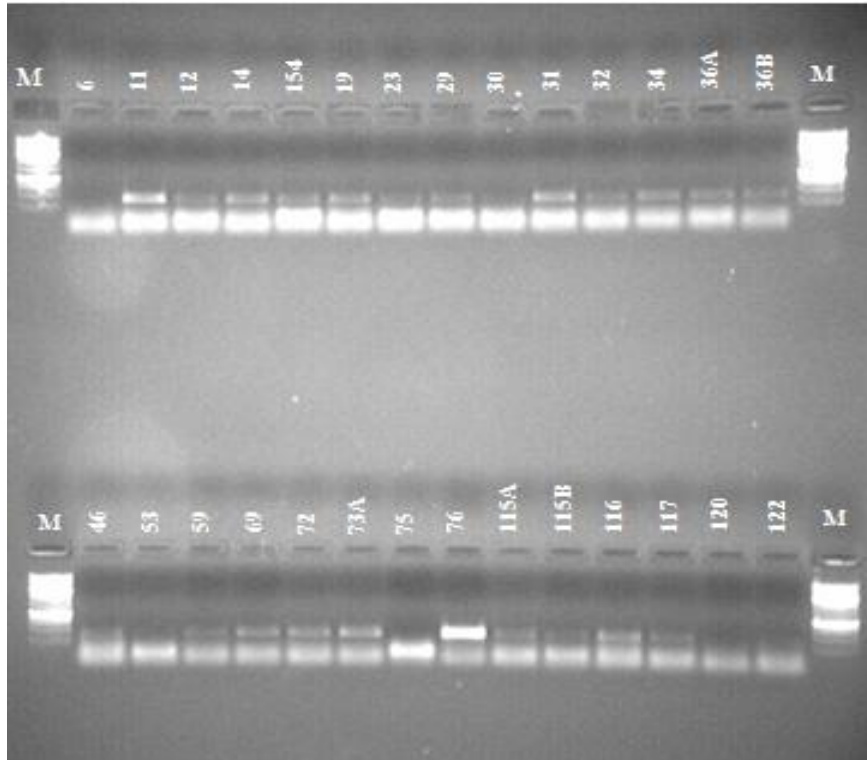
cDNA sentezi öncesi, izole edilen RNA'nın kalitesi, agaroz jel elektroforezinde gözlemlendi (Şekil 12).

3.2.2. RNA'nın genomik kontaminasyon açısından PZR ile taranması

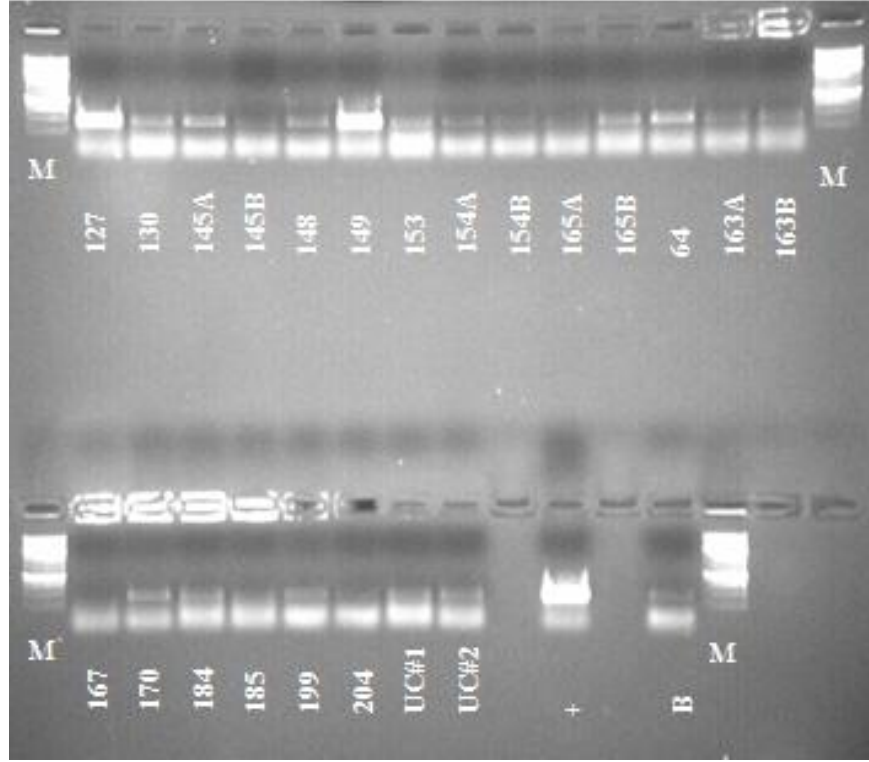
cDNA sentezinde kullanılacak olan DNA uzaklaştırılmış RNA örnekleri 18S rRNA spesifik primerler ile genomik kontaminasyon olup olmadığı açısından değerlendirildi (Şekil 13).



Şekil 12. RNA jel elektroforez sonuçları Jel görüntüsünde, 1:10 oranında seyreltilmiş RNA örnekleri ve 10 µl Low Range Quantitative DNA Markör kullanılmıştır. (Ayırt edilen 3 bant 28S, 18S ve 5S ribozomal RNA bantlarını işaret etmektedir).



A



B

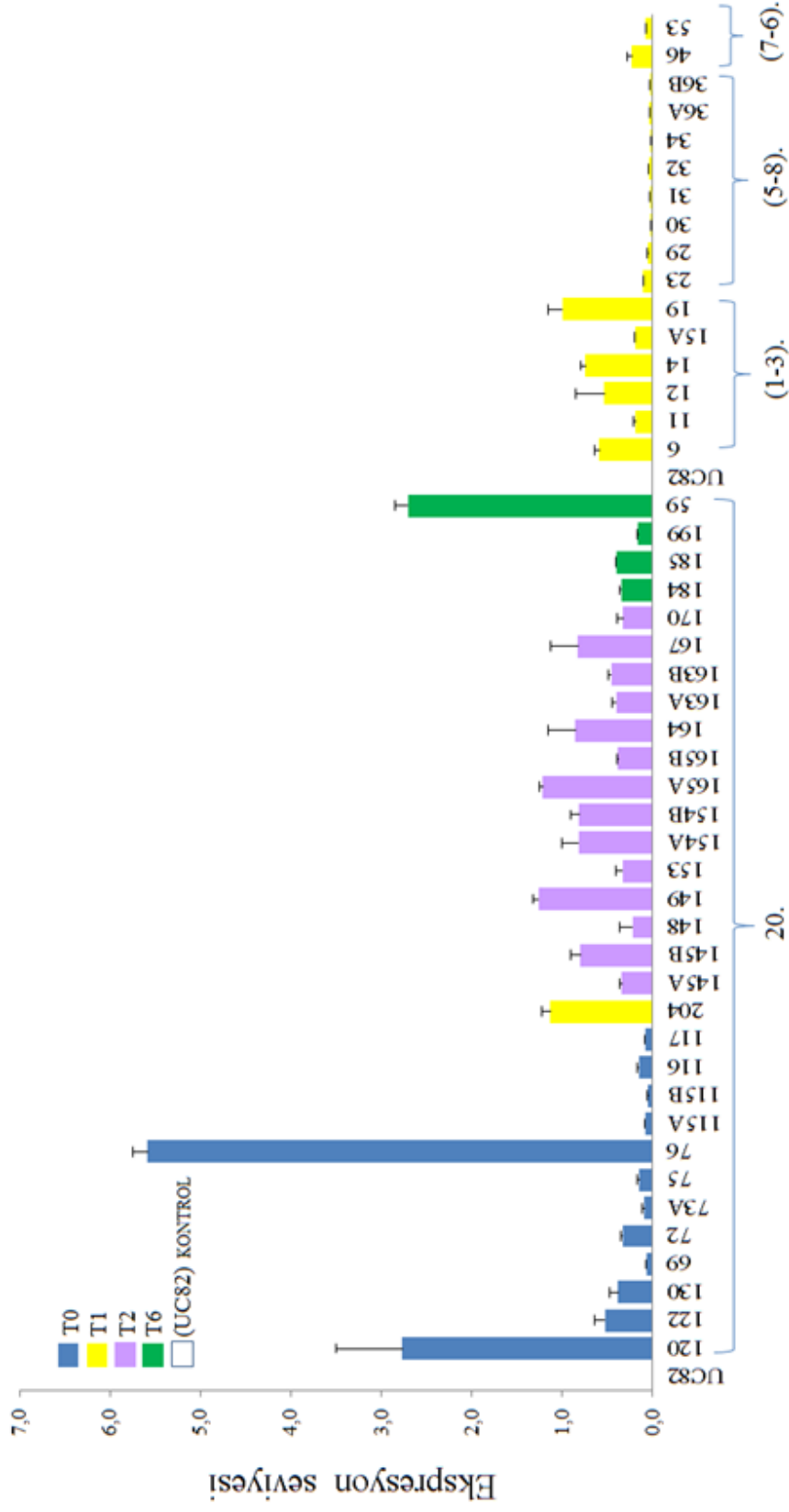
Şekil 13. A ve B 18S rRNA amplifikasyonu ile DNA kontaminasyonunun belirlenmesi Sonuç olarak; 11, 31, 76, 127 ve 149 numaralı örneklerde bir miktar DNA'nın varlığı tespit edildi. M; 1,5 µl SharpMass™ 1-DNA Markör.

3.2.3. quantitative Real Time PZR Analizi

qRT-PZR analizi, yapraklardaki transkript akümülyasyonunu belirlemek adına, TaqMan teknolojisi kullanılarak her bir örnek için 20 µl toplam hacimde gerçekleştirildi. ATHB7'ye referans gen olarak 18S rRNA housekeeping gen kullanıldı. Hedef gen için relative ekspresyon (karşılaştırmalı ifade) seviyeleri eşik (C_t) ve standart sapma değerleri baz alınarak sistem tarafından (CFX96™ Real Time System C1000 termal cycler) otomatik olarak hesaplandı. Reaksiyonun tamamlanmasının ardından, amplifikasyon spesifikliği ve PZR etkinlik değerleri 18S için $E=100$, ATHB7 için $E=91$ olarak yine sistem tarafından belirlendi. Amplifikasyon sonrası, üçer tekrardan oluşan her farklı RNA örneğine ait spesifik transkriptler, grafikte her biri ayrı bir pik ile ifade edilen değerler ile doğrulandı. 10 transgenik hatta yüksek seviyede ekspresyon belirlendi: 76, 59, 19, 204, 167, 164, 165A, 149, 145B ve 120 Orta seviyeli ekspresyon; hat 14, 12, 6, 185, 184, 170, 163A, 163B, 165B, 154A, 154B ve 122'de gözlemlendi. 130, 145A, 148, 153, 199, 11, 15A, 23, (29-34), 36A, 36B, 46, 53, 69, 72, 73A, 75, 115A, 115B, 116 ve 117 hatlarında ise;

düşük seviyeli ya da hiç tanımlanamayan ekspresyon olduğu gözlemlendi. Trans genin 1 kopyasını taşıyan (Ek Tablo 6) 59, 204, 120, 149, 165A, 164, 167 , 76 ve 19 numaralı örneklerin ekspresyonunun, yine bir kopya taşıyan 73A, 69, 115A, 115B ve 117 numaralı örneklerle kıyasla, önemli ölçüde yüksek olduğu, ayrıca hedef genin 2 kopyasını taşıyan (Ek Tablo 6) bazı transformantların ise (30, 31, 32, 34, 36A, 36B) çok zayıf ekspresyon seviyelerine sahip oldukları tespit edildi. T6 jenerasyonuna ait transgenik oldukları tespit edilen 4 bitkiden yalnızca bir tanesinin (59 numaralı örnek) ATHB7 ekspresyonunun beklenen düzeyde olduğu, kalan 3 örnekten ikisinin (184 ve 185) orta seviyeli, sonuncusunun ise (199) düşük seviyeli ekspresyon gösterdiği saptandı (Şekil 14).

Domates ATHB7/18S



Şekil 14. qRT-PZR amplifikasyon profili. Barlar, 4 farklı transformasyon gurubuna (20, 1-3, 5-8 ve 7-6) ve bu grupların farklı jenerasyonlarına (T0, T1, T2, T6) ait domates bitkilerine aktarılmış olan ATHB7 geninin ekspresyon düzeyini ifade etmektedir.

4. TARTIŞMA

Şu ana kadar literatürde bitkilerde kuraklık stresine cevap veren birçok gen tanımlanmıştır (Abe ve ark., 1997 ve 2003; Diab ve ark., 2004; Suprunova ve ark., 2007). Bu genlerin önemli metabolik proteinleri sentezleyerek hücreleri su eksikliğinden korumalarının yanı sıra, sinyal iletim mekanizmalarını da düzenledikleri bilinmektedir. Hücrelerde bu şekilde gerçekleşen cevaplar, sinyal iletim yollarında yer alan genleri, özellikle transkripsiyon faktörlerini, strese dayanıklı ürünler geliştirmede önemli adaylar yapmaktadır.

Transkripsiyon faktörleri, bitkilerde stres durumundan öncelikli olarak etkilenen ve cevapları hızlı bir şekilde etkisini gösteren, önemli hücre içi regülatör proteinlerdir. Bir HDZip transkripsiyon faktörü olarak bilinen ATHB7, ekspresyonu endojen ve ekzojen ABA konsantrasyonu ve su eksikliği ile artış gösteren (10^{-8} M 'dan daha az ABA konsantrasyonlarındaki belirlenebilir cevabı 30 dakika içindedir) ve kuraklık ile indüklenen genlerin transkripsiyonel kontrolünde direkt olarak aktif olan bir regülatördür (Söderman ve ark., 1996).

Mutant ve yaban tip *Arabidopsis thaliana* bitkileri üzerinde yapılan fizyolojik ve moleküler analizler, HB7' nin büyümenin negatif regülatörü olduğunu ve genin aktarıldığı transgenik bitkilerin ağır stres altında dahi, rejenerasyon yeteneklerinin kaybolmadığını (turgorun devam ettiğini), böylelikle de kuraklığa daha toleranslı hale geldiklerini göstermiştir (Chen ve ark., 1983; Lalk ve Dörffling, 1985; Gilmour ve Tomashow, 1991; Nordin ve ark., 1991; Lang ve ark., 1994; Hjellstrom ve ark., 2003).

Sinyal iletiminin transkripsiyonel kontrolünü anlamak için çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen, şu ana kadar elde edilen bilgiler sınırlı düzeydedir (Selçuk, 2004). Bu amaçla çalışmamızda, kuraklığa toleranslı domates bitkileri yetiştirmenin ilk adımı olarak, *Arabidopsis thaliana*'dan izole edilen HB7' nin, gen aktarımı yapılmış farklı jenerasyonlara ait domates transformantlarındaki entegrasyonu ve ekspresyon profili ortaya konmuştur. Literatürde, domates bitkisinde HB7 geninin ortoloğu tespit edilememiş olup, bu genin jenerasyonlara göre farklılık gösteren ekspresyonu, domates kültürlerinde ilk kez karakterize edilmiştir. Ayrıca; literatürde transkripsiyon faktörlerinin bitkilere aktarımı ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen *Arabidopsis* dışında HB7 'nin

aktarıldığı bir organizma bulunmamaktadır. Bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde, çalışmada elde edilen deneysel verilerin *Arabidopsis thaliana* orijinli bir genin, genetik mühendisliği yapılmış domates bitkilerinin ekspresyon profilini ortaya koyan ilk örnek olduğunu söylemek mümkündür (Ek Şekil 1 ve 2).

Çalışmada, transformasyonun başarısını ve aktarılan genin muhtemel transgenik bitkilerdeki varlığını test etmek için tüm farklı jenerasyonlar (T0,T1,T2,T6) belirli moleküler analizlere tabi tutuldu. PZR analiz sonuçları ile 48 bağımsız transgenik hatta HB7 genine ait çoğaltılmış fragmentin varlığı ortaya konuldu. Bu tip bir fragment hedef geni almayan yabancı tip bitkilerde gözlenemedi ve bu bitkiler transgenik olmayan bitkiler (non-transformant) olarak kategorize edilerek, çalışmanın ikinci aşamasına dahil edilmedi. Çalışmanın ikinci basamağında, qRT-PZR analizi kullanılarak HB7 transkriptlerinin bağımsız transgenik hatlardaki çok yüksek ve çok düşük seviyeler arasında değişkenlik gösteren ekspresyon düzeyleri belirlendi. Ekspresyon düzeylerinde elde edilen bu varyasyonun 3 önemli teori ile ilgili olduğu düşünülmektedir:

1-Pozisyon etkisi

2-Aktarılan genin kopya sayısı

3-Transgenin aktarılan bitkinin kromozomlarındaki allelik durumu

Aktarılan genin bitki genomundaki yerleşim noktasına bağlı olarak anlatım düzeyindeki değişiklikler “pozisyon etkisi” olarak adlandırılır. Bitki genomuna aktarılan yeni DNA parçasının ekspresyonunun, dolaylı olarak konak DNA’da entegrasyonun yakınındaki bölgenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden etkileneceğini öngörür. Transkripsel olarak aktif olan bir bölgeye yerleşen yeni DNA parçasının gen anlatım düzeyinin, aynı DNA’nın gende farklı bir bölgeye yerleşmesi sonucunda değiştiği görülmüştür (Peach, 1991). Dolayısıyla ökaryotik organizmalarda genin aktarıldığı bölgenin kromatin yapısı (ökromatin veya heterokromatin olma durumu) gen anlatım düzeyini etkiler. denilebilir.

Genin kopya sayısı, ekspresyonu ile doğru orantılı olarak etkilenir (Hobbs ve ark., 1993). Daha önceki aşamalarda yapılan Southern Blot analizleri, çalışmadaki transformasyon gruplarından (5-8) ve (7-6) kodlu grup ekzogen DNA’nın 2’şer kopyasını taşıırken, (1-3) ve 20. gruba ait bitkilerin 1’er kopya taşıdığını ortaya koymuştur. Bu bilgiye rağmen bazı (7-6) ve (5-8) grubuna ait bitkilerde tespit edilen düşük HB7 ekspresyon seviyeleri, hücrelerdeki RNA miktarına bağlı olan ‘silencing’ mekanizması ile

açıklanabilir. Bitkilerde “genin susturulması” olarak adlandırılan “silencing” mekanizmasının histon deasetilasyonu, DNA metilasyonu veya hücredeki siRNA ya da miRNA miktarı ile kontrol edildiği ve bu mekanizmalar aktif iken gen ekspresyonunun baskılandığı rapor edilmiştir. Mekanizma üzerinde etkili olan bir diğer nokta; dizayn edilen vektörün hedef gene olan benzerliğinin yüksek olmasıdır. Bu yüksek benzerlik, hedef gen ile dimer oluşturarak genin transkripsiyon seviyesinin düşmesine sebep olur (Eamens ve ark, 2008). Transgenik bitkilerin oluşturulduğu transformasyon esnasında meydana gelen çoklu kopyalarda karşılaşılabilen yüksek benzerlik, “silencing” mekanizmasını tetikleyebilir. Genden gene farklılık arz eden bu mekanizma, hedef genin konak genomda kopya sayısı fazla olduğu halde ekzogen DNA'nın ekspresyonunun baskılanmasına sebep olmuş olabilir. Bundan dolayı gen aktarım çalışmalarında genellikle aktarılan genin tek kopyasını taşıyan örnekler üzerinde yoğunlaşmıştır

Trans genin aktarılan bitki kromozomlarında homozigot veya heterozigot olarak bulunma durumunun da gen ekspresyonunu etkileyeceği bilinmektedir (Masclaux ve ark., 2005). Aktarılan gen, T0 jenerasyonunda homolog kromozomlardan yalnızca birine entegre olabilir. Bu bitkiler ‘hemizigot’ olarak isimlendirilir. T0 bitkilerinden gelen T1 jenerasyonuna ait bitkiler ise “heterozigot” olarak adlandırılır. Bu heterozigot bitkiden türevlenen diğer jenerasyonlarda homozigot, heterozigot veya geni hiç almamış bitkiler (1:2:1) oluşabilir. Hemizigot bitkideki gen ekspresyon düzeyinin, aktarılan geni homozigot durumda bulunduran bir bitkiye nazaran daha az ekspresleneceği beklenir. Fakat bahsedilen ‘silencing’ mekanizmasından dolayı hedef geni homozigot durumda taşıyan bitkilerin dahi, HB7 ekspresyon seviyeleri, heterozigot bitkilere göre yüksek olmayabilir. Transformasyon çalışmalarında, allel stabilizasyonunun yakalandığı T6 jenerasyonuna ait bitkilerde gözlemlenmiş olan düşük ifade seviyeleri, bu teori ile açıklanabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Solanaceae ailesine üye olan domates, ekonomik açıdan dünyadaki en önemli üçüncü ticari üründür ve meyve olgunlaşmasında, hastalıklara cevapta, genetikte ve tüm genomun belirlenmesine yönelik dizi analizi çalışmalarında uzun yıllar model bitki olarak kullanılmıştır (Mueller ve ark., 2005). Geçtiğimiz yıllarda domates bitkilerinde abiyotik strese karşı cevap mekanizmaları hakkında önemli bilgiler ortaya konmuş olmasına rağmen, bu bilgiler bitki moleküler biyolojisinde model organizma kabul edilen *Arabidopsis* ile karşılaştırıldığında hala oldukça yetersizdir (Tsai-Hung Hsieh ve ark., 2010).

Suyun alınımının sınırlandığı alanlarda, kuraklığa dirençli bitkiler geliştirmek alternatif bir yoldur (Cushman ve Bohnert 2000; Hu ve ark., 2010). Stres koşulları altında, gen ekspresyon profillerinin karakterizasyonunu ortaya koymak ise, dayanıklı bitki yetiştirme çalışmalarında önemli bir araçtır (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2007). Domateste, ilgili genlerin ekspresyon profilinin ifadesi çalışmaları ise, strese cevap veren genlerin transkripsiyonel kontrolünü anlamada ve stres toleransını geliştirmede kullanılabilecek genleri belirlemede, yol gösterici olacaktır. Bunun yanı sıra; transkripsiyon düzeyinde stresle ilgili gen regülasyonu hakkında gittikçe artan oranda elde edilen bilgiler, strese toleranslı bitki mühendisliği için hedef gen seçiminde, oldukça kolaylık sağlayacaktır (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2000; Chinnusamyet ve ark., 2004).

Bilinen bu veriler göz önünde bulundurularak bu çalışmada amaç; ATHB7 geni kullanılarak çeşitli ticari bitki türlerine stres toleransı kazandırılabilmesi ve bu yolla ürün kalitesinin artırılabilmesi düşüncesinin önünü açmaktır. Bu amaç için, kuraklık stresine karşı dayanıklılığı *Arabidopsis*'te yapılan araştırmalarca kanıtlanan (Söderman, 1996) ve *Agrobacterium* aracılı gen aktarım yöntemleri kullanılarak domates bitkilerine aktarılmış olan ATHB7 geni aşırı ifade edilerek transgenik bitkilerdeki anlatım (ekspresyon) profili ortaya konmuştur.

Bu araştırma sonuçlarına göre elde edilmiş olan veriler, ATHB7 geninin domates genomuna entegrasyonunu ve genomda uygun şekilde ekspres edildiğini kanıtlamaktadır. Bu çalışmada; yüksek ekspresyon gösteren fakat genomik kontaminasyon tespit edildiği

(76 ve 149 numaralı örnekler) ve yüksek standart hataya sahip (120 numaralı örnek) bitkiler elenmiş; ve trans genin tek kopyasını taşıyan ve güçlü ekspresyon profili sergilediği düşünülen 6transgenik hat (hatlar 164, 165A, 167, 204 19 ve 59) daha sonraki fizyolojik analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Ekspresyon seviyesi yüksek bulunan jenerasyonlara ait seçilen bu bitkilerin Northern Blot analizi uygulandıktan sonra, kuraklık stresi altındaki rejenerasyon kabiliyet testlerinin yapılmamış olması çalışmanın eksik ayağını oluşturmaktadır. Bu amaçla ileride yapılması planlanan çalışmalar, kurak ortam koşullarında ATHB7 geninin yardımı ile yaşayabilme yetisi kazanan transgenik domates kültürlerinin fizyolojik ve biyokimyasal performanslarının yabani tip bitkilerle kıyaslanması yönündeki araştırmaları kapsayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. Plant Cell, 15, 1, 63-78.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K., 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. Plant Cell, 9, 10, 1859-1868.
- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y., and Takahashi, T., 2003. Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. Development, 130, 635-643.
- Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I., and Karanov, E., 2003. Interaction between stresses. Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue, 1-17.
- Aoyama, T., Dong, C.H., Wu, Y., Carabelli, M., Sessa, G., Ruberti, I., Morelli, G., and Chua, N.H., 1995. Ectopic Expression of the *Arabidopsis* Transcriptional Activator Athb-1 Alters Leaf Cell Fate in Tobacco. Plant Cell, 7, 11, 1773-1785.
- Ashraf, M., 2010. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. Biotechnology Advances, 28, 169-183.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, A., Wisman, E., Altamura, M.M., Ruberti, I., and Morelli, G., 2001. The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. Plant Physiology, 126, 2, 643-655.
- Baima, S., Sessa, G., Ruberti, I., and Morelli, G., 1995. A cDNA-Encoding *Arabidopsis-thaliana* Cytoplasmic Ribosomal-Protein L18. Gene, 153, 2, 171-174.
- Bartels, D., and Sunkar, R., 2005. Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 24, 1, 23-58.
- Bhatnagar-Mathur, P., Devi, M.J., Vadez, V., and Sharma, K.K., 2009. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress. Journal of Plant Physiology, 166, 11, 1207-1217.
- Blum, A., 1986. Breeding crop varieties for stress environments. Critical Reviews in Plant Sciences, 2, 199-237.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G., 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell, 7, 7, 1099-1111.
- Bray, E.A., 1997. Plant responses to water deficit. Trends in Plant Science, 2, 48-54. Campbell, M.K., 1991. Biochemistry. Harcourt Brace Jovanovich College Publishers, Fort Worth p. 622.

- Carabelli, M., Sessa, G., Baima, S., Morelli, G., and Ruberti, I., 1993. The *Arabidopsis* Athb-2 and Athb-4 genes are strongly induced by far-red-rich light. The Plant Journal, 4, 3, 469-479.
- Chen, H.H., Li, P.H., and Brenner, M.L., 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. Plant Physiology, 71, 362-365.
- Chen, T.H.H., and Murata, N., 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology, 5, 250-257.
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., and Sheen, J., 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. Plant Cell, 14, 2723-2743.
- Cheng, Z.Q., Targolli, J., Huang, X.Q., and Wu, R., 2002. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Breeding, 10, 1-2, 71-82.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J.K., 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. Journal of Experimental Botany, 55, 225-236.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S.Y., 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. Journal Biological Chemistry, 275, 1723-1730.
- Christmann, A., Moes, D., Himmelbach, A., Yang, Y., Tang, Y., and Gril, E., 2006. Integration of abscisic acid signalling into plant responses. Plant Biology, 8, 314-325.
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J., 2000. Genomics approaches to plant stress tolerance. Plant Biology, 3, 117-124.
- Çavdar, C., Sifil, A., ve Çamsarı, T., 1997. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Office Journal of the Turkish Nephrology, 3,4, 92-95.
- Çırak, C., ve Esenal, E., 2006 .Soyada kuraklık stresi. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 21, 2, 231-237.
- Deng, X., Phillips, J., Bräutigam, A., Engström, P., Johannesson, H., Ouwerkerk, P. B. F., Ruberti, I., Salinas, J., Vera, P., Iannacone, R., Meijer, Annemarie H., and Bartels, D.A., 2006. Homeodomain, leucine zipper gene from *Craterostigma plantagineum* regulates abscisic acid responsive gene expression and physiological responses. Plant Molecular Biology, 61, 3, 469-489.
- Diab, A.A., Teulat-Merah, B., This, D., Ozturk, N.Z., Benschler, D., and Sorrells, M.E., 2004. Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. Theoretical and Applied Genetics, 109, 7, 1417-1425.
- DiCristina, M., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P., Baima, S., Ruberti, I., and Morelli, G., 1996. The *Arabidopsis* Athb-10 (GLABRA2) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair development. The Plant Journal, 10, 3, 393-402.

- Ding, Z.H., Li, S.M., An, X.L., Liu, X.J., Qin, H.M., and Wang, D., 2009. Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Genetics and Genomics, 36, 1, 17-29.
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. The Plant Journal, 33, 4, 751-763.
- Eamens, A., Wang, M.B., Smith, N.A., and Waterhouse, P.M., 2008. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. Plant Physiology, 147, 2, 456-468.
- Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A., Baum, S.F., and Bowman, J.L., 2003. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HDZIP and KANADI genes. Current Biology, 13, 1768-1774.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y., Shinozaki K.Y., and Shinozaki, K., 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the point of convergence in the stress signaling networks. Current Opinion in Plant Biology, 9, 436-442.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 17, 3470–3488.
- Gehring, W. J., Muller, M., Affolter, M., Percival-Smith, A., Billeter, M., Qian, Y. Q., Otting, G., and Wuthrich, K., 1990. The structure of the homeodomain and its functional implications. Trends Genetic, 6, 323-329.
- Gehring, W.J., 1993. Exploring the homeobox. Gene, 135, 215-221.
- Gilmour, S.J., and Tomashow, M.F., 1991. Cold acclimation and cold regulated gene-expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 17, 1233-1240.
- Gong, W., Shen, Y.P., Ma, L.G., Pan, Y., Du, Y.L., Wang, D.H., Yang, J.Y., Hu, L.D., Liu, X.F., Dong, C.X., Ma, L., Chen, Y.H., Yang, X.Y., Gao, Y., Zhu, D., Tan, X., Mu, J.Y., Zhang, D.B., Liu, Y.L., Dinesh-Kumar, S.P., Li, Y., Wang, X.P., Gu, H.Y., Qu, L.J., Bai, S.N., Lu, Y.T., Li, J.Y., Zhao, J.D., Zuo, J., Huang, H., Deng, X.W., and Zhu, Y.X., 2004. Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. Plant Physiology, 135, 773–782.
- Guan, X., Stege, J., Kim, M., Dahmani, Z., Fan, N., Heifetz, P., Barbas, C.F., and Briggs, S.P., 2002. Heritable endogenous gene regulation in plants with designed transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99, 13296–13301.
- Guo, A., He, K., Liu, D., Bai, S., Gu, X., Wei, L., and Luo, J., 2005. DATF: A database of *Arabidopsis* transcription factors. Bioinformatics, 21, 2568–2569.
- Hanson, J., 2000. Functional characterization of the pointed cotyledon subclass of HDZIP genes in *Arabidopsis thaliana*. Doctoral Thesis, Uppsala universitet, Uppsala.

- Hanson, J., Johannesson, H., and Engstrom, P., 2001. Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HDZip gene ATHB13. Plant Molecular Biology, 45, 3, 247-262.
- Hanson, J., Regan, S., and Engstrom, P., 2002. The expression pattern of the homeobox gene ATHB13 reveals a conservation of transcriptional regulatory mechanisms between *Arabidopsis* and hybrid aspen. Plant Cell Reports, 21, 1, 81-89.
- Henriksson, E., 2004. The HDZip class I transcription factors in *Arabidopsis thaliana* Characterization of HDZip genes involved in the mediation of environmental signals. Doctoral Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B., and Grill, E., 2002. Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. The Embo Journal, 21, 12, 3029-3038.
- Hjellstrom, M., Olsson, A.S.B., Engstrom, O., and Soderman, E.M., 2003. Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene ATHB7 in transgenic *Arabidopsis* causes a suppression of stem elongation growth. Plant Cell and Environment, 26, 7, 1127-1136.
- Hjellström, M., 2002. Drought stress signal transduction by the HD-Zip Transcription Factors ATHB6 and ATHB7. Doctoral Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Hobbs, S.L.A., Warkentin, T.D., and DeLong, C.M.O., 1993. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. Plant Molecular Biology, 21, 1, 17-26.
- Hu, X.J., Zhang, Z.B., Xu, P., Fu, Z.Y., Hu, S.B., and Song, W.Y., 2010. Multifunctional genes: the cross-talk among the regulation networks of abiotic stress responses. Biologia Plantarum, 54, 213-223.
- Iannaccone, P., Petrozza, R., Armentano, A., Taddonio, N., Sagace, G., Johannesson, G., Engstrom, H. and Cellini, P. Analysis of salt and drought tolerance in transgenic tomato over expressing the *Arabidopsis* transcription factor ATHB7R, 3rd International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine and the 2nd International Congress of Stress Research Cell Stress & Chaperones, 2007. Budapest. Volume 12.
- Iannaccone, R., Perito, A., Taddonio, G., Viggiano, V., Cellini, F. and Vera, P., Transgenic tomato overexpressing the homeobox gene H52. XLVIII SIGA, Annual Congress, 2004. Lecce.
- Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A., and Shinozaki, K., 2005. RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. DNA Research, 12, 247-256.
- Jacobson, M.D., 1996. Reactive oxygen species and programmed cell death. Trends in Biochemical Sciences, 21, 83-86.
- Jiao, Y., Yang, H., Ma, L., Sun, N., Yu, H., Liu, T., Gao, Y., Gu, H., Chen, Z., Wada, M., Gerstein, M., Zhao, H., Qu, L.J., and Deng, X.W., 2003. A genome-wide analysis of blue-light regulation of *Arabidopsis* transcription factor gene expression during seedling development. Plant Physiology, 133, 1480-1493.

- Johannesson, H., Wang, Y., and Engstrom, P., 2001. DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. Plant Molecular Biology, 45, 1, 63-73.
- Jones, H.G., 1992. Plants and Microclimate. Cambridge University Press, Cambridge p. 428.
- Jung, S., 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. Plant Science, 166, 459-466.
- Kalefetoğlu, T., and Ekmekçi, Y., 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms (Review). G.U. Journal of Science, 18, 4, 723-740.
- Karim, S., Aronsson, H., Ericson, H., Pirhonen, M., Leyman, B., Welin, B., Mantyla, E., Palva, E.T., Van Dijck, P., and Holmstrom, K.O., 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. Plant Molecular Biology, 64, 4, 371-386.
- Kim, S., Kang, S.Y., Cho, D.I., Park, J.H., and Kim, S.Y., 2004. ABF2 an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. The Plant Journal, 40, 75-87.
- Kissinger, C., Liu, B.S., Martin-Blanco, E., Kornberg, T.B., and Pabo, C.O., 1990. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. Cell, 63, 579-90.
- Kozlowski, T.T., and Pallardy, S.G., 1997. Physiology of Woody Plants. Academic Press, San Diego p. 168.
- Kubo, H., Peeters, A.J.M., Aarts, M.G.M., Pereira, A., and Koornneef, M., 1999. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 11, 7, 1217-1226.
- Lalk, I., and Dörffling, K., 1985. Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. Plant Physiology, 63, 287-292.
- Lang, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B., and Palva, E.T., 1994. Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology, 104, 1341-1349.
- Lassner, M.W., Peterson, P., and Yoder, J.I., 1989. Simultaneous amplification of multiple DNA fragments by polymerase chain reaction in the analysis of transgenic plants and their progeny. Plant Molecular Biology Reporter, 7, 2, 116-128.
- Lee, Y.H., and Chun, J.Y., 1998. A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. Plant Molecular Biology, 37, 2, 377-384.
- Lee, Y.H., Oh, H.S., Cheon, C.I., Hwang, I.T., Kim, Y.J., and Chun, J.Y., 2001. Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene Athb-12. Biochemical and Biophysical Research Communications, 284, 1, 133-141.
- Leung, J., Merlot, S., Gosti, F., Bertauche, N., Blatt, M.R., and Giraudat, J., 1998. The role of ABI1 in abscisic acid signal transduction: from gene to cell. Symposia of the Society for Experimental Biology, 51, 65-71.

- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York p. 497.
- Lichtenhaler, H.K., 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. Journal of Plant Physiology, 148, 4-14.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Hinozaki, K., 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an SEREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 10, 1391-1406.
- Liu, X.L., Hua, X.J., Guo, J., Qi, D.M., Wang, L.J., Liu, Z.P., Jin, Z.P., Chen, S.Y., and Liu, G.S., 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. Biotechnology Letters, 30, 7, 1275-1280.
- Luo, Y., Liu, Y.B., Dong, Y.X., Gao, X.Q., and Zhang, X.S., 2009. Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis* by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment. Journal of Plant Physiology, 166, 4, 385-394.
- Masclaux, F.G., Pont-Lezica, R., and Galaud, J.P., 2005. Relationship between allelic state of T-DNA and DNA methylation of chromosomal integration region in transformed *Arabidopsis thaliana* plants. Plant Molecular Biology, 58, 3, 295-303.
- Mattsson, J., Soderman, E., Svenson, M., Borkird, C., and Engstrom, P., 1992. A new homeobox-leucine zipper gene from *Arabidopsis-thaliana*. Plant Molecular Biology, 18, 5, 1019-1022.
- McCarty, D.R., 1995. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 46, 71-93.
- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. 1984. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. Nature, 308, 428-433.
- McKersie, B., Murnaghan, J., and Bowley, S., 1997. Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. Acta Physiologiae Plantarum, 19, 4, 485-495.
- McKersie, B.D., and Leshem, Y., 1994. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands p. 256.
- McKersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E., and Leprince, O., 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiology, 111, 4, 1177-1181.
- Meijer, A.H., DeKam, R.J., d'Erfurth, I., Shen, W., and Hoge, J.H.C., 2000. HD-Zip proteins of families I and II from rice: interactions and functional properties. Molecular and General Genetics, 263, 12-21.
- Meinhard, M., and Grill, E., 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphates 2C from *Arabidopsis*. FEBS Letter, 508, 443-446.

- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., and Giraudat, J., 2001. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. The Plant Journal, 25, 295-303.
- Mueller, L.A., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J., Van, E.J., Stack, S., Choi, D., Kim, B.D., Chen, M.S., Cheng, Z.K., Li, C.Y., Ling, H.Q., Xue, Y.B., Seymour, G., Bishop, G., Bryan, G., Sharma, R., Khurana, J., Tyagi, A., Chattopadhyay, D., Singh, N.K., Stiekema, W., Lindhout, P., Jesse, T., Lankhorst, R.K., Bouzayen, M., Shibata, D., Tabata, S., Granell, A., Botella, M.A., Giuliano, G., Frusciante, L., Causse, M., Zamir, D., 2005. The tomato sequencing project, the first cornerstone of the international Solanaceae project (SOL). Comparative and Functional Genomics, 6, 153-158.
- Nordin, K., Heino, P., and Palva, E.T., 1991. Separate signal pathways regulate the expression of a low temperature induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Molecular Biology, 16, 1061-1071.
- Nottingham, S., 1998. Eat Your Genes-How Genetically Modified Food is Entering Our Diet. Zed Books Ltd, London, New York p. 256.
- Oh, S.J., Jeong, J., Kim, E.H., Yi, N., Yi, S.I., Jang, I.C., Kim, Y.S., Suh, S.C., Nahm, B.H., and Kim, J.K., 2005. Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants. Plant Cell Reports, 24, 3, 145-154.
- Oh, S.J., Kim, Y.S., Kwon, C.W., Park, H.K., Jeong, J.S., and Kim, J.K., 2009. Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. Plant Physiology, 150, 3, 1368-1379.
- Ohashi-Ito, K., and Fukuda, H., 2003. HD-Zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (*Zinnia*)/ATHB-15 (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. Plant and Cell Physiology, 44, 12, 1350-1358.
- Ohashi-Ito, K., Demura, T., and Fukuda, H., 2003. Analysis of the HD-Zip III homeobox gene ZeHB-13 in relation to vascular differentiation in *Zinnia*. Plant and Cell Physiology, 44, S170-S170.
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I., and Aoyama, T., 2001. Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene ATHB-2. The Plant Journal, 25, 4, 389-398.
- Ollson, A.S.B., Engström, P., and Söderman, E., 2004. The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology, 55, 663-677.
- Olsson, A., 2005. HDZip I Transcription Factors in *Arabidopsis thaliana*. Doctoral Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N., and Clark, S.E., 2001. REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. The Plant Journal, 25, 2, 223-236.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., and Gürel, E., 2004. Bitki Biyoteknolojisi, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya s.456.

- Peach, C., and Velten, J., 1991. Transgene expression variability (position effect) of cat and gus reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. Plant Molecular Biology, 17, 1, 49-60.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B., and Loureiro, M.E., 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. The Plant Science, 167, 1307-1314.
- Prescott, A., and Martin, C., 1987. A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNAs in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 4, 219-224.
- Ramachandra, R.A., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P., and Sumithra, K., 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (*Morus alba* L.) cultivars. Environmental and Experimental Botany, 52, 33-42.
- Ratcliffe, O.J., Riechmann, J.L., and Zhang, J.Z., 2000. Interfascicularfiberless1 is the same gene as revoluta. Plant Cell, 12, 3, 315-317.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G., 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among Eukaryotes. Science, 290, 2105-2110.
- Riechmann, J.L., Ratcliffe, O.J., 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. Current Opinion in Plant Biology, 3, 423-434.
- Ruberti, I., Sessa, G., Lucchetti, S., and Morelli, G., 1991. A novel class of plant-proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. The EMBO Journal, 10, 7, 1787-1791.
- Salisbury, F.B., and Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Co., California p. 682.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S., and Koshiba, T., 2002. The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 32, 1011-1022.
- Schena, M., and Davis, R.W., 1994. Structure of homeobox-leucine zipper genes suggests a model for the evolution of gene families. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91, 18, 8393-8397.
- Schena, M., Lloyd, A.M., and Davis, R.W., 1993. The hat4 gene of arabidopsis encodes a developmental regulator. Genes and Development, 7, 3, 367-379.
- Schrick, K., Nguyen, D., Karlowski, W.M., and Mayer, K.F.X., 2004. START lipid/sterol binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. Genome Biology, 5, R41.1-15.
- Scott, M.P., and Weiner, A.J., 1984. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushitarazu loci of *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81, 4115-4119.

- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K., 2002a. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. Functional and Integrative Genomics, 2, 282–291.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K., 2002b. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. The Plant Journal, 31, 279–292.
- Selçuk, F., 2004. Evaluation of Salt Tolerance in Sto Transformed *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* Plants. Doctoral Thesis, Middle East Technical University, Ankara.
- Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I., 1993. The Athb-1 and Athb-2 Hd-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA-binding specificities. The EMBO Journal, 12, 9, 3507-3517.
- Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I., 1997. DNA-binding specificity of the homeodomain-leucine zipper domain. Journal of Molecular Biology, 274, 3, 303-309.
- Sessa, G., Steindler, C., Morelli, G., and Ruberti, I., 1998. The *Arabidopsis* athb-8, -9 and -14 genes are members of a small gene family coding for highly related hd-zip proteins. Plant Molecular Biology, 38, 4, 609-622.
- Sgherry, C.L.M., Pinzino, C., and Navari-Izzo, F., 1996. Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O²⁻ production related to the composition of thylakoid membranes. Physiologia Plantarum, 96, 446-452.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. Plant Physiology, 115, 327-334.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology, 3, 217–223.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58, 221-227.
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist, 125, 27-58.
- Soderman, E., Hjellström, M., Fahleson, J., and Engstrom, P., 1999. The HD-Zip gene ATHB6 in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. Plant Molecular Biology, 40, 6, 1073-1083.
- Soderman, E., Mattsson, J., Svenson, M., Borkird, C., and Engstrom, P., 1994. Expression patterns of novel genes encoding homeodomain leucine-zipper proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology, 26, 1, 145-154.

- Somerville, C., and Koornneef, M., 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. Nature Reviews Genetics, 3, 883-889.
- Soppe, W.J.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M., and Peeters, A.J.M., 2000. The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeodomain gene. Molecular Cell, 6, 4, 791-802.
- Söderman, E., Mattsson, J., and Engström, P., 1996. The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. The Plant Journal, 10, 2, 375-381.
- Srivastava, L.M., 2002. Abscisic acid and stress tolerance in plants. In: *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*, Elsevier Science, U.S.A., p. 381-412.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G., and Ruberti, I., 1999. Shade avoidance responses are mediated by the *ATHB-2* HD-Zip protein, a negative regulator of gene expression. Development, 126, 19, 4235-4245.
- Sunkar, R., Kapoor, A., and Zhu, J.K., 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. Plant Cell, 18, 8, 2051-2065.
- Suprunova, T., Krugman, T., Distelfeld, A., Fahima, T., Nevo, E., and Korol, A., 2007. Identification of a novel gene (*Hsd4*) involved in water-stress tolerance in wild barley. Plant Molecular Biology, 64, 1-2, 17-34.
- Takatsuji, H., 1998. Zinc-finger transcription factors in plants. Cellular and Molecular Life Sciences, 54, 582-596.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W., and Comai, L., 1995. The *revoluta* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis-thaliana*. Development, 121, 9, 2723-2735.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 14, 796-815.
- Tsai-Hung, H., Chia-Wen, L., Ruey-Chih, S., Chiu-Ping, C., Sanjaya, Y.C.T., and Ming-Tsair, T.C., 2010. A tomato bZIP transcription factor, *SlAREB*, is involved in water deficit and salt stress response. Planta, 231, 1459-1473.
- Uno, Y., Furuhashi, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97, 11632-11637.
- URL-1. <http://ayhanunlu.trakya.edu.tr/dersler/homeogen.ppt.html> (6 Nisan 2011, 11:58)
- URL-2. http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ-g_w0bpvDi0w6yL1dDiqn5lkxLW_o93beO2OqK aI4IJh4cmwF 6 Nisan 2011, 20:45
- URL-3. http://people.cs.vt.edu/heath/talks/EXPRESSO_TALKS/Maryland_Expresso.ppt.html (6 Nisan 2011, 17:20)
- URL-4. <http://www.cs.uiuc.edu/homes/sinhas/img/DAILYILLINI.jpg> (6 Nisan 2011, 17:28)

- Hengel, V., A.J., Barber, C., and Roberts, K., 2004. The expression patterns of arabinogalactan-protein AtAGP30 and GLABRA2 reveal a role for abscisic acid in the early stages of root epidermal patterning. The Plant Journal, 39, 1, 70-83.
- Vinocur, B., and Altman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology, 16, 2, 123-132.
- Wang, Y., Henriksson, E., Söderman, E., Henriksson K. N., Sundberg, E., and Engström, P., 2003. The *Arabidopsis* homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in *Arabidopsis*. Developmental Biology, 1, 228-239.
- Wang, Y.J., Hao, Y.J., Zhang, Z.G., Chen, T., Zhang, J.S., and Chen, S.Y., 2005. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. Journal of Plant Physiology, 162, 2, 215-223.
- Warren, A.J., 2002. Eukaryotic transcription factors. Current Opinion in Structural Biology, 12, 107–114.
- Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Liebich, I., Krull, M., Matys, V., Michael, H., Schacherer, F., Thiele, S., and Urbach, S., 2001. The TRANSFAC system on gene expression regulation. Nucleic Acids Research, 29, 281–283.
- Xiong, L., and Zhu, J.K., 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and abiotic perspectives. Physiologia Plantarum, 112, 152-166.
- Xiong, Y., Liu, T., Tian, C., Sun, S., Li, J., and Chen, M., 2005. Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. Plant Molecular Biology, 59, 191–203.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold stress-responsive promoters. Trends in Plant Science, 10, 88–94.
- Yilmaz, A., Nishiyama, M.Y., Fuentes, B.G., Souza, G.M., Janies, D., Gray J., and Grotewold, E., 2009. GRASSIUS: a platform for comparative regulatory genomics across the grasses. Plant Physiology, 149, 171–180.
- Zhong, R.Q., and Ye, Z.H., 1999. IFL1, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. The Plant Cell, 11, 11, 2139-2152.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annual Review of Plant Biology, 53, 247-273.

EKLER

Ek Tablo 1. DNA izolasyon solüsyonları-1

DNA EKSTRAKSİYON TAMPONU	
Sorbitol	0,35M
Tris	0,1M
EDTA 2Na	0,005M

* pH 7,5

** Kullanılmadan hemen önce 0,02M Sodyum bisülfid eklenir.

Ek Tablo 2. DNA izolasyon solüsyonları-2

NUCLEI LYSIS TAMPONU	
Tris (pH 7,5)	0,2 M
EDTA	0,05 M
NaCl	2 M
CTAB	% 2 w/v

Ek Tablo 3. RNA izolasyon solüsyonları-1

RNA EKSTRAKSİYON TAMPONU	
Tris (pH 8)	50 mM
LiCl	150 mM
EDTA (pH 8)	5 mM
SDS	% 5
DEPC'li H ₂ O	

* pH 9,0

Ek Tablo 4. RNA izolasyon solüsyonları-2

TE (10:1)	
Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Ek Tablo 5. Elektroforez solüsyonu

50X TAE Tamponu (1000 ml)	
Tris baz	242 g
EDTA	18,6 g

*pH 8,0 (Glasial asetik asit ile ayarlanır.)

**Oda sıcaklığında saklanır.

Ek Tablo 6. Jenerasyonlar ve kopya sayıları

Örnekler	Trans. grubu	Kopya sayısı	Jenerasyon	Örnek No
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	1
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	2
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	3
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	4
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	5
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	6
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	7
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	8
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	9
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	10
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	11
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	12
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	13
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	14
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	15A
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	15B
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	16
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	17
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	18
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	19
MA 624#ATHB7	1-3	1	T1	20
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	21
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	22
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	23
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	24
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	25
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	26
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	27
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	28
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	29
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	30
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	31
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	32
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	33
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	34
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	35
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	36A
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	36B
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	37
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	38
MA 624#ATHB7	5-8	2	T1	39
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	40

Ek Tablo 6'nin devamı

MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	41
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	42
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	43
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	44
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	45
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	46
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	47
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	48
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	49
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	50
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	51
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	52
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	53
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	54
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	55
MA 624#ATHB7	7-6	2	T1	56
ATHB7 #4	20	1	T6	57
ATHB7 #4	20	1	T6	58
ATHB7 #4	20	1	T6	59
ATHB7 #4	20	1	T6	60
ATHB7 #4	20	1	T6	61
ATHB7 #3	20	1	T6	62
ATHB7 #3	20	1	T6	63
ATHB7 #3	20	1	T6	64
ATHB7 #3	20	1	T6	65
ATHB7 #3	20	1	T6	66
ATHB7 #3	20	1	T6	67
ATHB7 - 20	20	1	T0	68A
ATHB7 - 20	20	1	T0	68B
ATHB7 - 20	20	1	T0	69
ATHB7 - 20	20	1	T0	70
ATHB7 - 20	20	1	T0	71
ATHB7 - 20	20	1	T0	72
ATHB7 - 20	20	1	T0	73A
ATHB7 - 20	20	1	T0	73B
ATHB7 - 20	20	1	T0	74A
ATHB7 - 20	20	1	T0	74B
ATHB7 - 20	20	1	T0	75
ATHB7 - 20	20	1	T0	76
ATHB7 - 20	20	1	T0	77
ATHB7 - 20	20	1	T0	78
ATHB7 - 20	20	1	T0	79
ATHB7 - 20	20	1	T0	80

Ek Tablo 6'nin devamı

ATHB7 - 20	20	1	T0	81
ATHB7 - 20	20	1	T0	82
ATHB7 - 20	20	1	T0	83
ATHB7 - 20	20	1	T0	84
ATHB7 - 20	20	1	T0	85
ATHB7 - 20	20	1	T0	86
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	87
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	88
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	89
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	90
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	91
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	92
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	93A
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	93B
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	94
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	95
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	96
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	97
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	98
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	99
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	100
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	101
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	102
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	103
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	104
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	105
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	106A
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	106B
ATHB7 - 1 MA-SL-1714	20	1	T0	107
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	108
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	109
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	110
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	111
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	112
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	113
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	114
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	115A
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	115B
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	116
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	117
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	118
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	119
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	120

Ek Tablo 6'nin devamı

ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	121
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	122
ATHB7 TF-STRES 5	20	1	T0	123
ATHB7 TF 7	20	1	T0	124
ATHB7 TF 7	20	1	T0	125
ATHB7 TF 7	20	1	T0	126
ATHB7 TF 7	20	1	T0	127
ATHB7 TF 7	20	1	T0	128
ATHB7 TF 7	20	1	T0	129
ATHB7 TF 7	20	1	T0	130
ATHB7 TF 7	20	1	T0	131
ATHB7 TF 7	20	1	T0	132
ATHB7 TF 7	20	1	T0	133
ATHB7 TF 7	20	1	T0	134
ATHB7 TF 7	20	1	T0	135
ATHB7 TF 7	20	1	T0	136
ATHB7 TF 7	20	1	T0	137
ATHB7 TF 7	20	1	T0	138
ATHB7 TF 7	20	1	T0	139
ATHB7 TF 7	20	1	T0	140
ATHB7 TF 7	20	1	T0	141
ATHB7 TF 7	20	1	T0	142
ATHB7 TF 7	20	1	T0	143
ATHB7 TF 7	20	1	T0	144
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	145A
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	145B
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	146
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	147
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	148
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	149
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	150
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	151
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	152
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	153
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	154A
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	154B
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	155
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	156
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	157
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	158
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	159
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	160
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	161

Ek Tablo 6'nin devamı

ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	162
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	163A
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	163B
ATHB7 - 20 #12-9	20	1	T2	164
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	165A
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	165B
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	166
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	167
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	168
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	169
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	170
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	171
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	172
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	173
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	174
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	175
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	176
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	177
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	178
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	179
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	180
ATHB7 - 20 #12-23	20	1	T2	181
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	182
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	183
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	184
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	185
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	186
THB7 20#12-169	20	1	T6	187
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	188A
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	188B
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	189
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	190A
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	190B
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	191
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	192
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	193
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	194
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	195
THB7 20#12-169	20	1	T6	196
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	197
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	198
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	199
ATHB7 20#12-169	20	1	T6	200

Ek Tablo 6'nin devamı

MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	201
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	202
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	203
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	204
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	205
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	206
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	207
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	208
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	209
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	210
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	211
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	212
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	213
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	214
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	215
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	216
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	217
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	218
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	219
MA 624#ATHB7 20-12	20	1	T1	220

Ek Tablo 7. ATHB7 spesifik primerler ile yapılan PZR amplifikasyon sonuçları

I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATHB7-85	ATHB7-101	ATHB7-152	ATHB7-146	ATHB7-75*	ATHB7-151	ATHB7-104	ATHB7-205	ATHB7-82	ATHB7-16	ATHB7-127	ATHB7-199*
B	ATHB7-81	ATHB7-198	ATHB7-157	ATHB7-25	ATHB7-110	ATHB7-192	ATHB7-156	ATHB7-2	ATHB7-194	ATHB7-73A*	ATHB7-65	ATHB7-137
C	ATHB7-188 B	ATHB7-123	ATHB7-112	ATHB7-61	ATHB7-15A*	ATHB7-89	ATHB7-154B*	ATHB7-68B	ATHB7-111	ATHB7-203	ATHB7-117*	ATHB7-84
D	ATHB7-190A	ATHB7-79	ATHB7-3	ATHB7-68A	ATHB7-115A	ATHB7-106A	ATHB7-36A*	ATHB7-128	ATHB7-98	ATHB7-29*	ATHB7-148*	ATHB7-21
E	ATHB7-155	ATHB7-70	ATHB7-196	ATHB7-195	ATHB7-132	ATHB7-207	ATHB7-197	ATHB7-201	ATHB7-107	ATHB7-102	ATHB7-77	ATHB7-14*
F	ATHB7-161	ATHB7-5	ATHB7-189	ATHB7-158	ATHB7-184*	ATHB7-115B*	ATHB7-193	ATHB7-124	ATHB7-220	ATHB7-188A	ATHB7-17	UC82-3
G	ATHB7-190B	ATHB7-103	ATHB7-86	ATHB7-114	ATHB7-45	ATHB7-149*	ATHB7-130	ATHB7-160	ATHB7-202	ATHB7-63	ATHB7-185*	628
H	ATHB7-150	ATHB7-162	ATHB7-67	ATHB7-121*	ATHB7-154A*	ATHB7-209	ATHB7-138	ATHB7-191	ATHB7-215	ATHB7-11*	ATHB7-19*	Kör

2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATHB7-10	ATHB7-211	ATHB7-214	ATHB7-36B	ATHB7-116*	ATHB7-13	ATHB7-171	ATHB7-40	ATHB7-32*	ATHB7-170*	ATHB7-181	ATHB7-26
B	ATHB7-134	ATHB7-4	ATHB7-57	ATHB7-60	ATHB7-175	ATHB7-94	ATHB7-87	ATHB7-174	ATHB7-142	ATHB7-30*	ATHB7-182	ATHB7-172
C	ATHB7-15B	ATHB7-8	ATHB7-7	ATHB7-73B	ATHB7-6*	ATHB7-76	ATHB7-210	ATHB7-217	ATHB7-71	ATHB7-173	ATHB7-80	ATHB7-91
D	ATHB7-38	ATHB7-131	ATHB7-125	ATHB7-106B	ATHB7-55	ATHB7-122*	ATHB7-62	ATHB7-88	ATHB7-153*	ATHB7-108	ATHB7-12*	ATHB7-34*
E	ATHB7-64	ATHB7-1	ATHB7-74B	ATHB7-99	ATHB7-129	ATHB7-200	ATHB7-59*	ATHB7-22	ATHB7-18	ATHB7-113	ATHB7-97	ATHB7-33
F	ATHB7-206	ATHB7-139	ATHB7-58	ATHB7-168	ATHB7-109	ATHB7-44	ATHB7-204*	ATHB7-78	ATHB7-118	ATHB7-208	ATHB7-120*	UC82-1
G	ATHB7-66	ATHB7-147	ATHB7-43	ATHB7-143	ATHB7-135	ATHB7-92	ATHB7-133	ATHB7-69*	ATHB7-212	ATHB7-178	ATHB7-31*	628
H	ATHB7-136	ATHB7-51	ATHB7-9	ATHB7-37	ATHB7-126	ATHB7-56	ATHB7-54	ATHB7-23*	ATHB7-164*	ATHB7-72*	ATHB7-105	Kör

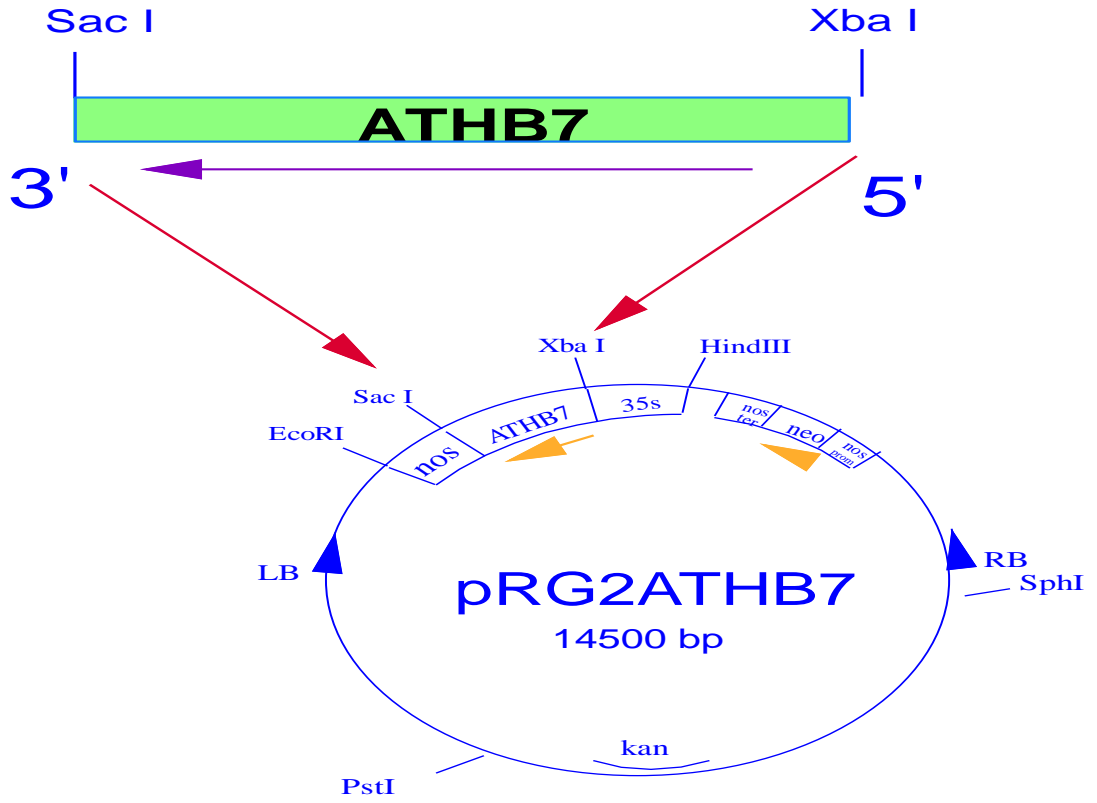
3	1	2	3	4	5	6	7
A	ATHB7-186	ATHB7-48	ATHB7-42	ATHB7-167*	ATHB7-165B*	ATHB7-90	ATHB7-140
B	ATHB7-48	ATHB7-176	ATHB7-50	ATHB7-119	ATHB7-216	ATHB7-46*	UC82-2
C	ATHB7-41	ATHB7-179	ATHB7-48	ATHB7-219	ATHB7-95	ATHB7-177	628
D	ATHB7-100	ATHB7-49	ATHB7-159	ATHB7-166	ATHB7-145B*	ATHB7-39	Kör
E	ATHB7-145A*	ATHB7-28	ATHB7-187	ATHB7-52	ATHB7-47	ATHB7-180	
F	ATHB7-163A*	ATHB7-53*	ATHB7-165A*	ATHB7-93B	ATHB7-20	ATHB7-27	
G	ATHB7-141	ATHB7-35	ATHB7-144	ATHB7-96	ATHB7-93A	ATHB7-74A	
H	ATHB7-24	ATHB7-163B	ATHB7-83	ATHB7-169	ATHB7-218	ATHB7-183	

* ATHB7 geni bakımından pozitif olarak belirlenen örnekler

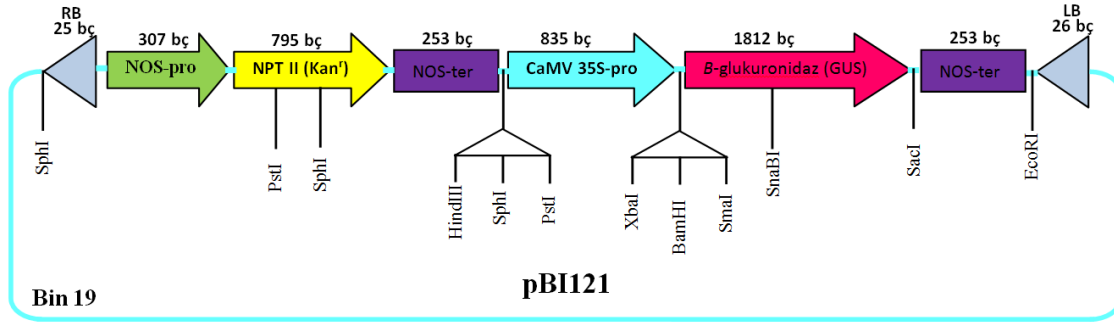
Ek Tablo 8. ATHB7 ve NPT II spesifik primerler ile yapılan PZR amplifikasyon sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATHB7-75*	ATHB7-130*	ATHB7-199*	ATHB7-69*	ATHB7-12*	ATHB7-167*	ATHB7-188B	ATHB7-195	ATHB7-63	ATHB7-60*	ATHB7-213*	ATHB7-142
B	ATHB7-15A*	ATHB7-73A*	ATHB7-14*	ATHB7-23*	ATHB7-120*	ATHB7-165B*	ATHB7-190A	ATHB7-184*	ATHB7-65	ATHB7-200	ATHB7-130*	ATHB7-71
C	ATHB7-184*	ATHB7-29*	ATHB7-116	ATHB7-32*	ATHB7-31*	ATHB7-145B*	ATHB7-190B	ATHB7-192	ATHB7-185	ATHB7-62*	ATHB7-5*	ATHB7-18
D	ATHB7-154A*	ATHB7-11*	ATHB7-6*	ATHB7-153*	ATHB7-34*	ATHB7-46*	ATHB7-198	ATHB7-197	ATHB7-199*	ATHB7-59*	ATHB7-158	ATHB7-41*
E	ATHB7-115B*	ATHB7-117*	ATHB7-76	ATHB7-164*	ATHB7-145A*	ATHB7-127*	ATHB7-196	ATHB7-193	ATHB7-64*	ATHB7-182	ATHB7-121	ATHB7-90
F	ATHB7-149*	ATHB7-148*	ATHB7-122*	ATHB7-170*	ATHB7-163A*	628	ATHB7-189	ATHB7-191	ATHB7-66	ATHB7-186	ATHB7-3*	628
G	ATHB7-154B*	ATHB7-185*	ATHB7-59*	ATHB7-30*	ATHB7-53*	UC82	ATHB7-67*	ATHB7-194	ATHB7-57*	ATHB7-187	ATHB7-13*	UC82
H	ATHB7-36A*	ATHB7-19*	ATHB7-204*	ATHB7-72*	ATHB7-165A*	Kör	ATHB7-61*	ATHB7-188A	ATHB7-58	ATHB7-183	ATHB7-56*	Kör

* ATHB7 ve NPT II geni bakımından pozitif olarak belirlenen örnekler



Ek Şekil 1. Ana iskeleti Bin 19'dan türevlenmiş olan pBI121 isimli plazmit modifiye edilerek oluşturulmuş pRG2 ekspresyon vektörü.



Ek Şekil 2 Transformasyon çalışmalarında kullanılan ikili vektörün (Bin 19 dan türevlenmiş olan pBI121) sirküler formu (BI121 14758 bç uzunluğunda ve GenBank erişim numarası AF485783).

ÖZGEÇMİŞ

01.03.1986 yılında İstanbul'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2004 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans öğreniminden 2008 yılında Bölüm Birinciliği ile mezun oldu. 2009 yılında Rize Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2010 yılında Metapontum AGROBIOS/İtalya'da (Short Term Scientific Mission/STSM kapsamında) 4 ay süreyle öğrenim gördü. Şu anda Rize Üniversitesi'nde öğretim elemanı olarak görevine devam etmektedir.