

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİN (*Olea europaea* L. ) BİTKİSİNDE CBF/DREB TRANSKRİPSİYON  
FAKTÖRLERİNİ KODLAYAN GEN HOMOLOGLARININ MOLEKÜLER ANALİZLERİ**

**BESTE TACAL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
YRD.DOÇ.DR.ŞENAY VURAL KORKUT**

**İSTANBUL, 2011**

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ZEYTİN (*Olea europaea* L. ) BİTKİSİNDE CBF/DREB TRANSKRİPSİYON**  
**FAKTÖRLERİNİ KODLAYAN GEN HOMOLOGLARININ MOLEKÜLER**  
**ANALİZLERİ**

Beste TACAL tarafından hazırlanan tez çalışması 15.11.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Yrd.Doç.Dr.Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Yrd.Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Yrd.Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Yrd.Doç. Dr.Şener AKINCI

Marmara Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Bu alışma Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün  
28-01-07-01 numaralı projesiyle desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsünden yararlandığım çok değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr.Şenay VURAL KORKUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Maddi manevi her türlü desteği esirgemedi, her zaman yanımda olan çok sevgili anne ve babama en içten sevgilerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında ve hayatımın her aşamasında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan hayat arkadaşım Türker ASLAN'a minnettarlığımı sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitimini birlikte geçirdiğim sevgili arkadaşım Munise YURTSEVER'e ve laboratuvar çalışmalarımnda hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Kasım 2011

Beste TACAL

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
<b>BÖLÜM 1</b>	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Bitkilerde Stres .....	1
1.1.2 Soğuk Stresine Dayanıklılığın Moleküler Biyolojisi .....	2
1.1.2.1 Soğuk Sinyali Algısı.....	4
1.1.2.2 Bitkilerde Strese Verilen Yanıtta Kalsiyumun Görevi .....	5
1.1.2.3 ABA-Bağımlı Soğuk Sinyal İleti Yolağı .....	6
1.1.2.4 ABA-Bağımsız Soğuk Sinyal İleti Yolağı .....	6
1.1.2.5 Soğuk Aklimasyonunda Anlatımı Artan Genler ve Gen Ürünleri.....	7
1.1.2.6 Genlerin Kontrol Mekanizmaları .....	10
1.1.2.7 CBF/DREB Transkripsiyon Faktörleri .....	12
1.1.2.8 CBF Yolağının Düzenlenmesinde Rol Alan Diğer Transkripsiyon Faktörleri.....	14
1.1.3 AP2 Bölgesi .....	16
1.1.4 Zeytin .....	19
1.1.4.1 Zeytin ve Stres .....	24
1.2 Tezin Amacı.....	25
1.3 Hipotez.....	25
<b>BÖLÜM 2</b>	
MATERYAL VE METOD .....	27
2.1 Bitki Materyali .....	27
2.2 Tamponlar ve Çözeltiler.....	27
2.3 Moleküler Markörler .....	28

2.4	Enzimler .....	29
2.5	Kitler.....	29
2.6	Besiyerleri .....	29
2.7	Oligonükleotidler .....	30
2.8	Kullanılan Programlar .....	31
2.9	Zeytin Fidelerinin Büyütülmesi .....	31
2.10	Bitki Örneklerinin Alınması .....	31
2.11	RNA İzolasyonu .....	31
2.11.1	RNA İzolasyonu için Hazırlık.....	31
2.11.2	RNA İzolasyonu .....	32
2.11.3	Total RNA Miktarının Belirlenmesi .....	32
2.12	RNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi.....	33
2.12.1	Formaldehit Jeli Protokolü .....	33
2.12.1.1	Formaldehit Jeli için RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	33
2.12.2	Total RNA'dan mRNA İzolasyonu .....	33
2.12.3	mRNA Spot Testi .....	34
2.13	RACE.....	35
2.13.1	3'RACE .....	37
2.13.1.1	Total RNA'dan cDNA Sentezi .....	37
2.13.1.2	mRNA'dan cDNA Sentezi .....	38
2.13.2	5'RACE .....	40
2.13.2.1	Total RNA'dan cDNA Sentezi .....	40
2.13.2.2	cDNA'nın Saflaştırılması .....	40
2.13.2.3	cDNA'ya TdT Kuyruğu Takılması .....	41
2.13.2.4	PCR Reaksiyonu .....	41
2.14	Klonlama Aşamaları .....	41
2.14.1	PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması .....	41
2.14.2	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu .....	42
2.14.2.1	Ligasyon Reaksiyonu.....	44
2.14.3	Kompetan Hücrelerin Hazırlanması.....	44
2.14.4	Transformasyon.....	45
2.14.4.1	Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması .....	45
2.14.5	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi .....	45
2.14.6	Plazmit İzolasyonu .....	47
2.14.7	Plazmit Kontrol PCR.....	48

### BÖLÜM 3

SONUÇ VE ÖNERİLER .....	49
3.1 Bitki Örneklerinin Alınması .....	49
3.2 RNA İzolasyonu .....	49
3.3 mRNA Analizi .....	50
3.4 Primer Tasarlanması .....	51
3.5 3'RACE ile İlgili Sonuçlar .....	53
3.5.1 Total RNA'dan 3'RACE PCR Ürünlerinin Analizi .....	53
3.5.1.1 PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması .....	54

3.5.1.2	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu .....	54
3.5.1.3	Transformasyon.....	54
3.5.1.4	Plazmit İzolasyonu .....	56
3.5.1.5	Dizin Analizi ve Blast Sonuçları .....	56
3.5.2	mRNA'dan 3'RACE PCR Ürünlerinin Analizi .....	57
3.5.2.1	PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması .....	58
3.5.2.2	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu .....	59
3.5.2.3	Transformasyon.....	59
3.5.2.4	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi .....	60
3.5.2.5	Plazmit İzolasyonu .....	62
3.5.2.6	Plazmit Kontrol PCR.....	65
3.5.3	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri .....	65
3.6	5'RACE Sonuçları.....	68
3.6.1	Total RNA'dan 5'RACE PCR Ürünlerinin Analizi .....	68
3.6.1.1	PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması .....	69
3.6.1.2	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu .....	69
3.6.1.3	Transformasyon.....	69
3.6.1.4	Plazmit İzolasyonu .....	69
3.6.1.5	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri .....	70
3.7	Tartışma ve Öneriler .....	72
KAYNAKLAR.....		73
EK-A		
DİZİN ANALİZLERİ .....		84
A-1	Total RNA'dan 3'RACE Klonlanan PCR Ürünlerinin Dizin Analizi Sonuçları .....	84
A-2	Total RNA'dan 5'RACE Klonlanan PCR Ürünlerinin Dizin Analizi Sonuçları .....	85
A-3	mRNA'dan 3'RACE Klonlanan PCR Ürünlerinin Dizin Analizi Sonuçları .....	87
ÖZGEÇMİŞ.....		90

## SİMGE LİSTESİ

---

Bp	Baz çifti
Kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
pmol	Pikomol
U	Ünite
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/ hacim
$\mu$ l	Mikrolitre



## KISALTMA LİSTESİ

---

ABA	Absisik Asit
AP2	APETALA2
cDNA	Komplementer DNA
CBF	C Tekrar Bağlanma Faktörü
COR	Soğukla Düzenlenen
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
DREB	Kuraklık Duyarlı Element Bağlanma Faktörü
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
ERD	Kuraklığa Erken duyarlı
IPTG	İzopropil $\beta$ -D- tiogalaktozit
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE	cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/dakika
RT	Reverse Transkriptaz
X-gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D-galaktozit

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1	Abiyotik stres yanıtının genel modeli.....3
Şekil 1.2	Düşük sıcaklık ve dehidrasyon sinyal aktarımının transkripsiyonel basamakları.....5
Şekil 1.3	<i>Arabidopsis</i> 'de soğuğa yanıt transkripsiyonel ağının diyagramı.....9
Şekil 1.4	Şematik CBF1, 2 ve 3 promotorları.....11
Şekil 1.5	AP2/ERF genlerinin yapısı .....17
Şekil 1.6	Filogenetik analiz .....18
Şekil 1.7	CBF ve yakın ilişkili AP2 proteinlerinin aminoasit dizinlerinin hizalanması. ...19
Şekil 1.8	Dünya coğrafyasında zeytin üretimi yapılan ülkeler.....21
Şekil 1.9	Dünya zeytinyağı üretimi yüzdesi .....23
Şekil 1.10	Türkiye'de zeytin işletmelerinin bulunduğu iller .....24
Şekil 2.1	Total RNA'dan mRNA yapılışı .....34
Şekil 2.2	RACE metodunun şematik gösterimi .....35
Şekil 2.3	RACE metodunun şematik gösterimi .....36
Şekil 2.4	pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi.....42
Şekil 2.5	pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi.....43
Şekil 3.1	RNA'ların %1'lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi .....50
Şekil 3.2	Zeytin bitkisinin yapraklarından izole edilen mRNA örnekleri.....51
Şekil 3.3	CBF transkripsiyon faktörünün kısmi dizini.....52
Şekil 3.4	Primer3 programı primer tasarlama sonuç sayfası.....52
Şekil 3.5	Total RNA'dan 3'RACE cDNA sentezi sonrası yapılan sekonder PCR görüntüsü53
Şekil 3.6	Saflaştırılmış Total RNA 3'RACE Sekonder PCR'ların jel görüntüsü .....54
Şekil 3.7	Transformasyon sonrası oluşan tek kolonilerin mavi beyaz seçiliminin görüntüsü .....55
Şekil 3.8	Transformasyonlardan seçilen örneklerin çizgi ekimi görüntüsü .....55
Şekil 3.9	3'RACE ve 5'RACE PCR ürünlerini bulduran plazmitlerin EcoR1 ile kesim reaksiyonları.....56
Şekil 3.10	3'RACE'in PCR reaksiyonunun %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü. ....58
Şekil 3.11	Saflaştırılmış PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü .....59
Şekil 3.12	Rekombinant kolonilerin Xgal varlığında mavi-beyaz seçilimi.....60
Şekil 3.13	SP6+RF1 ve T7+RF2 primerleri ile kurulan koloni PCR'ın %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....61
Şekil 3.14	T7+RF1 ve SP6+RF2 primerleri ile kurulan koloni PCR'ın %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü .....62

Şekil 3.15	Plazmitlerin PstI ile kesilmiş formlarının %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü .....	63
Şekil 3.16	Plazmitlerin EcoR1 ile kesim reaksiyonlarının jel üzerinde görüntüsü .....	64
Şekil 3.18	Total RNA'lardan 5'RACE cDNA'nın PCR jel görüntüsü .....	68
Şekil 3.19	Saflaştırılmış 5'RACE PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü .....	69
Şekil 3.20	3'RACE ve 5'RACE PCR ürünlerini bulunduran plazmitlerin EcoR1 ile kesim reaksiyonları.....	70

## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 1.2	Dünya zeytinyağı tüketimi.....21
Çizelge 1.3	Dünya zeytinyağı ihracatı.....22
Çizelge 2.1	3'RACE PCR reaksiyonu 1 kurulum miktarları.....38
Çizelge 2.2	3'RACE PCR reaksiyonu kurulum miktarları.....39
Çizelge 2.3	Ligasyon reaksiyonu kurulmasında kullanılanlar ve miktarları.....44
Çizelge 2.4	1.Koloni PCR ve 2.Koloni PCR reaksiyonu madde ve miktarları.....47
Çizelge 3.1	Total RNA'dan 3'RACE PCR ürünlerinin BlastN sonuçları.....57
Çizelge 3.2	Dizin analizine gönderilen örneklerin isimlendirilmesi.....57
Çizelge 3.3.	Dizin analizine gönderilen örneklerin isimlendirilmesi.....66
Çizelge 3.4	mRNA'dan 3'RACE PCR ürünlerinin BlastN sonuçları.....67
Çizelge 3.5	Dizin analizine gönderilen örneklerin isimlendirilmesi.....71
Çizelge 3.6	5'RACE PCR ürünlerinin BlastN sonuçları.....71

---

**ZEYTİN (*Olea europaea* L. ) BİTKİSİNDE CBF/DREB TRANSKRİPSİYON  
FAKTÖRLERİNİ KODLAYAN GEN HOMOLOGLARININ MOLEKÜLER  
ANALİZLERİ**

Beste TACAL

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yard.Doç.Dr.Şenay VURAL KORKUT

Dondurucu sıcaklıklara maruz kalmadan önce, dondurucu olmayan düşük sıcaklık koşullarını yaşayan bitkilerin donma toleranslarında artış görülmektedir. Bu süreç, soğuk aklimitasyonu olarak adlandırılmaktadır. CBF/DREB1 (C-tekrarları bağlanma faktörleri/dehidrasyon tepki elementi bağlanma faktörü 1) genleri küçük bir transkripsiyonel aktivatör ailesini kodlar. Bu genler, donma toleransında ve soğuk aklimitasyonunda rol almaktadırlar.

Transkripsiyonel aktivatör CBF1 DNA bağlanması için AP2 bölgesine sahiptir ve soğuk aklimasyonu yanıtını düzenler. CBF geni ilk olarak *Arabidopsis thaliana* L.'da tanımlanmıştır. Daha sonra CBF homologları *Brassica napus* L., *Hordeum vulgare* L., *Zea mays* L., *Gossypium hirsutum* L., *Triticum aestivum* L., *Capsella bursa-pastoris*, *Populus* spp., *Eucalyptus* spp., *Prunus avium* L., *Malus baccata* L. türü bitkilerden izole edilmiştir.

CBF/DREB1 proteinleri AP2/ERF DNA bağlanma proteinleri ailesinin üyesidir. PKK/RPAGRxKFXETRHP ve DSAWR olmak üzere karakteristik 2 nükleotit dizinine sahiptir. CBF 213 aminoasitlik bir proteindir. N-ucu bölgesi (1-32), çekirdek sinyali (33-44), AP2 bölgesi (48-106) ve asidik bölge (107-213) içermektedir.

Bu çalışmada soğuk stresi verilen *Olea europaea* L. yapraklarından total RNA ve mRNA izolasyonları yapılmıştır. Laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan çalışmalarda elde edilen CBF1 AP2 kodlayıcı bölgenin dizinleri kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Bunlar tam uzunlukta cDNA elde etmek için uygulanan RACE reaksiyonlarında kullanılmıştır. 280, 300, 800 baz çifti büyüklüğünde çeşitli cDNA fragmanları sentezlenmiş ve bunlar PFEM-Teasy vektörüne klonlanarak dizin analizleri yaptırılmıştır. Blast analizleri yapıldığında cDNA'lar CBF'den farklı genlere benzerlik göstermiştir. 15 dk, 30 dk, 1 saat ve 4 saat stres verilmiş örneklerden total RNA izolasyonu ve klonlama çalışmaları devam etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Düşük sıcaklık, DRE/CRT, CBF, AP2 domaini, *Olea europaea* L.

**MOLECULAR ANALYSIS OF GENE HOMOLOGOUS ENCODING CBF/DREB  
TRANSCRIPTION FACTORS IN OLIVE (*Olea europaea* L. )**

Beste TACAL

Department of Biology  
MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Freezing tolerance in many plants is shown to increase after exposure to low non-freezing temperatures, a process called cold acclimation. CBF/DREB1 (C-repeat binding factor/ dehydration responsive element binding factor1 ) genes encode a small family of transcriptional activators that have been described as playing an important role in freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* L..

Transcriptional activator CBF1 has the AP2 domain for DNA binding and regulates the cold acclimation response. CBF gene was first identified in *Arabidopsis thaliana* L.. CBF homologous were isolated from *Brassica napus* L., *Hordeum vulgare* L., *Zea mays* L., *Gossypium hirsutum* L., *Triticum aestivum* L., *Capsella bursa-pastoris* L., *Populus* spp. , *Eucalyptus* spp. , *Prunus avium* L., *Malus baccata* L. and most of palms in further studies.

CBF/DREB1 proteins are member of AP2/ERF family of DNA-binding proteins that have two signature sequence PKK/RPAGRxKFXETRHP and DSAWR. CBF is a 213 amino acid protein that contains N-terminal region (1-32), Core signal (33-44), AP2 domain (48-106) and acidic region (107-213).

In this study total RNA and mRNA were isolated from *Olea europaea* L. leaves which were exposed to cold stress. Primers were designed using sequences of coding region of CBF/AP2 domain fragment which was cloned in our previous studies. The primers were used in RACE reactions to obtain full length cDNA. Several fragments of 280, 300, 800 bp were synthesized and these were cloned into pGEM-T easy vector. cDNA clones were sequenced and BLAST analysis were done. The sequences did not show any similarity to known sequences of CBF genes. Total RNA isolation from olive leaves which are exposed to cold 15 minutes, 30 minutes, 1 hour and 4 hours and new cloning experiments are under progress.

**Key Words:** Low temperature, DRE / CRT elements, CBF, AP2 Domain, *Olea europaea* L.



#### 1.1 Literatür Özeti

##### 1.1.1 Bitkilerde Stres

Düşük sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk tarımsal ürünlerin gelişimini, verimliliğini ve coğrafi dağılımını sınırlayan abiyotik stres faktörleridir. Her sene ani buzlanma ve soğuk geçen bahar mevsimleri önemli ürün kayıplarına sebep olmaktadır. Birçok bitki düşük sıcaklıklara karşılık donma toleransı göstererek yaşamını sürdürür. Dondurucu olmayan düşük sıcaklıklara maruz kalan bitkiler bu sürecin sonunda ortaya çıkan dondurucu sıcaklıklara dayanabilme kabiliyeti gösterirler. Bu olgu soğuk aklimitasyonu olarak adlandırılır [1]. Donma toleransı kabiliyetine sahip bitkiler soğuğun etkilerinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Soğuk aklimitasyonu sürecinde bu mekanizmalar harekete geçer ve hücrede gen anlatımının yeniden programlanması sonucu ortaya çıkan çoklu biyokimyasal ve metabolik değişimler gerçekleşir. Bu sayede bitkiler soğuk stresi için gerekli toleransı geliştirerek hayatta kalırlar.

Bitkiler soğuğa vermiş oldukları tepki bakımından farklılıklar gösterir. Tropikal ve subtropikal orjinli birçok bitki türü soğuğa karşı oldukça duyarlıdırlar. Dondurucu olmayan düşük sıcaklıklarda dahi zarar görebilmekte ve yok olabilmektedir. Örneğin pirinç, domates, mısır büyük ölçüde soğuk aklimitasyonu yeteneğinden yoksundur. Zeytin gibi bazı Türkiye tarımı için önemli olan bitkilerin soğuğa gösterdikleri dayanıklılıklarda varyeteler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Buna karşın ılıman

bölgelerdeki bitkiler soğuk hava koşullarına iyi uyum sağlamışlardır. Bu çevresel stresin etkilerinden koruyan ve hayatta kalmalarını sağlayan mekanizmalar geliştirmişlerdir [1].

Soğuğa uyumun en etkili göstergesi donma toleransının artmasıdır. Soğuğa uyum esnasında meydana gelen değişiklikler; lipid kompozisyonundaki değişim, şeker ve çözülmüş protein miktarlarının artması ve yeni izoenzimlerin ortaya çıkmasını içermektedir [1], [2], [3]. Bu değişimlerden bazılarının, özellikle lipid kompozisyonundaki değişiklikler, bitkilerde donma toleransının artması ile doğrudan alakalı olduğu bulunmuştur [3].

### **1.1.2 Soğuk Stresine Dayanıklılığın Moleküler Biyolojisi**

1970 yılında ilk kez Weiser tarafından [4] soğuğa uyumun gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Sonrasında model bitki *Arabidopsis thaliana* ve diğer bitkilerde protein ve RNA düzeyinde yapılan birçok çalışmayla bitkinin soğuğa uyum sürecinde gen ekspresyonunda değişiklikler olduğu kanıtlanmıştır [5], [6], [7], [8], [9]. Bu değişimlerden faydalanılarak gen kütüphanelerinin farklı taranması, mRNA farklı gösterimi gibi yöntemlerle soğuk stresi uygulamasıyla indüklenerek anlatımı gerçekleştirilen birçok gen klonlanmıştır.

İndüklenebilen bir karakter olarak soğuk aklimasyonu sırasında bitkide oluşan değişimler:

Düşük sıcaklık sinyalinin algılanması

Sinyallerin biyokimyasal süreçlere dönüşümü

Soğuğa spesifik sinyallerin hücre çekirdeğine transferi

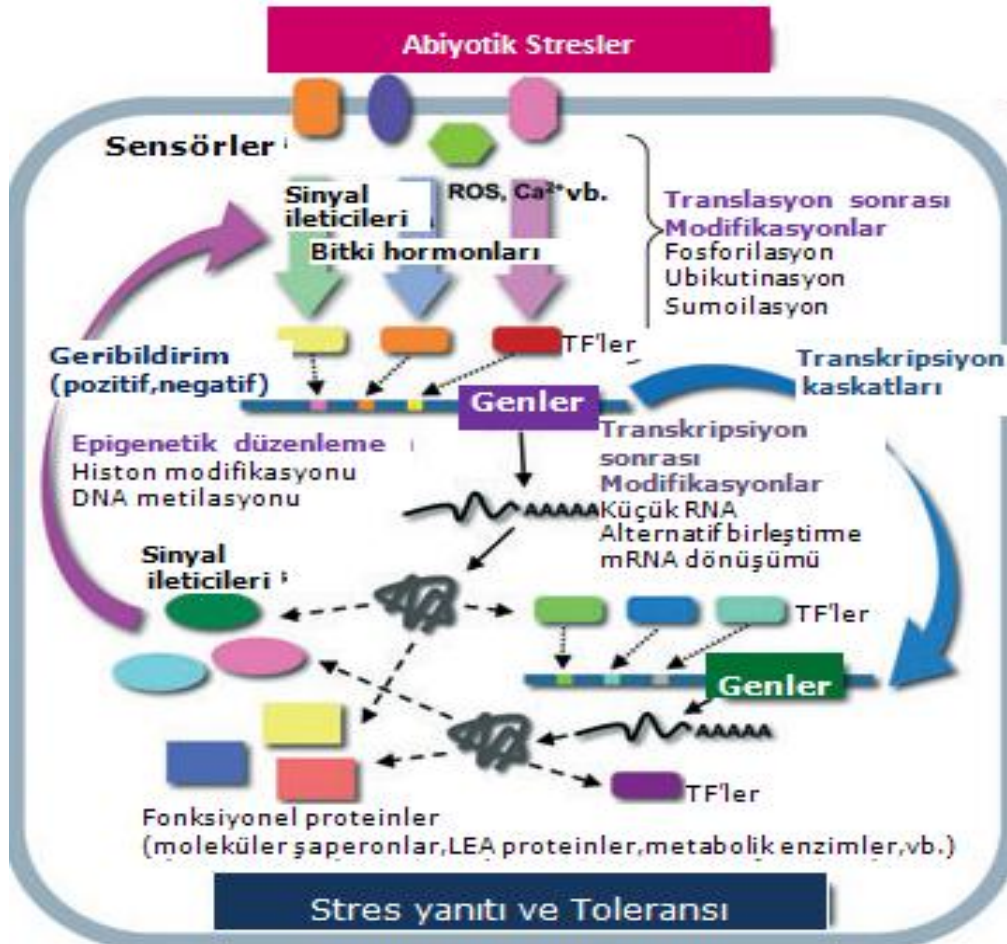
Soğuğa özel genlerin anlatımı

Gen ürünlerinin işlevleri doğrultusunda donma toleransının geliştirilmesi

Olarak özetlenebilir.

Abiyotik stres durumunun algılanmasıyla harekete geçen ve stres toleransı oluşturan tepkilerin bütünü bir çok organizmada ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Strese maruz kalan

hücredeki olayların bütünü şekil 1.1' de şematik olarak verilmiştir [10]. Öncelikle spesifik stres faktörü hücre zarındaki sensörler tarafından algılanarak ROS, Ca<sup>2+</sup> gibi sinyal ileticileri ile bitki hormonları harekete geçirilir. Bunlar çeşitli transkripsiyon faktörlerini uyararak stres genlerinin promotorlarına bağlanmalarını sağlarlar. Gen ürünleri kontrol mekanizmasında görev alan sinyal ileticileri veya direk olarak strese karşı korumada görev alan moleküler şaperonlar, metabolik enzimler, geç embriyogenez (LEA: late embryogenesis abundant) proteinleri olabilir. Stres genlerinin anlatımının kontrolü transkripsiyon ve sonrası, translasyon ve sonrası düzeylerde olabileceği gibi kromozom yapısı değişimleriyle de gerçekleşebilir.

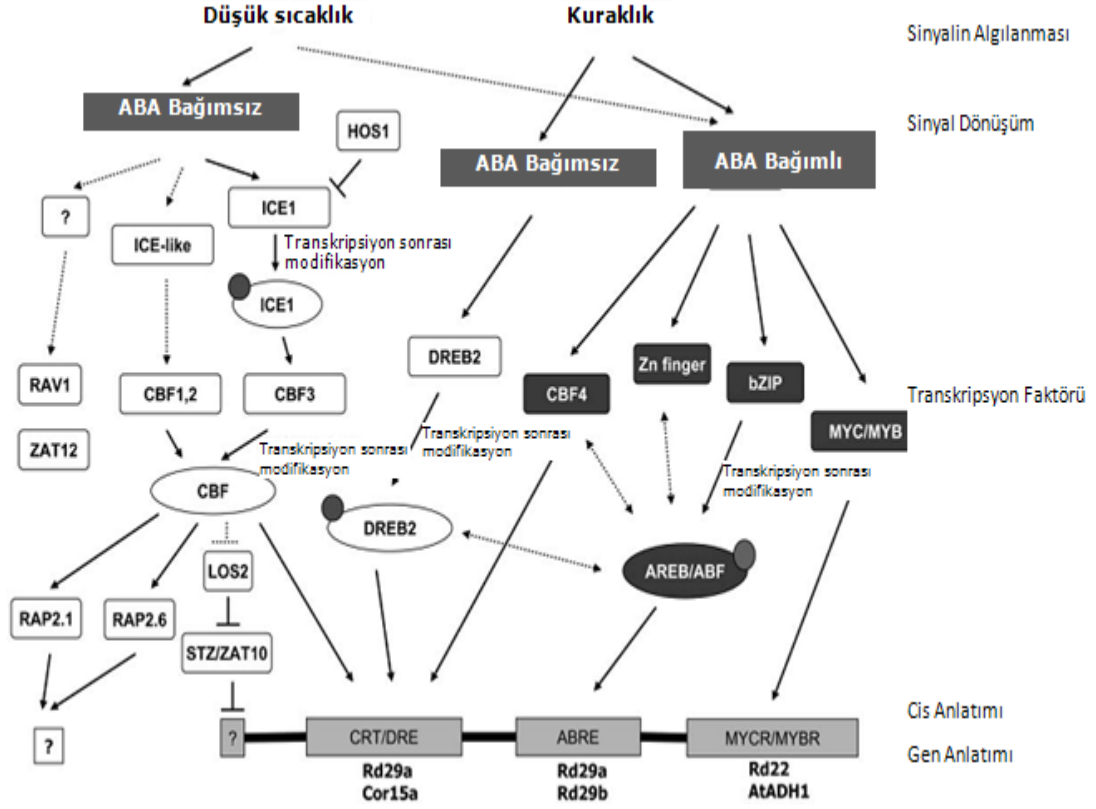


Şekil 1.1 Abiyotik stres yanıtının genel modeli [10]

### **1.1.2.1 Soğuk Sinyali Algısı**

Bitkilerin herhangi çevresel bir uyarıya verdikleri yanıt, hücrenin membranından çekirdeğine pek çok molekülün görev aldığı sinyal ileti yollarıyla gerçekleşir. Soğuk stresiyle ABA bağımlı ve ABA bağımsız iki ayrı sinyal ileti yolağı belirlenmiştir. Cis ve trans aktiviteli faktörlerin ABA ile indüklenen gen ekspresyonunda nasıl rol aldıkları farklı çalışmalarda kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir [11], [12], [13], [14]. Bununla birlikte birtakım ABA ile indüklenen genlerin anlatımının, ABA varlığı ve yokluğu olmak üzere her iki durumda da gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu veri göstermiştir ki; bu genler anlatımlarının gerçekleşmesi için ABA ihtiyacı göstermemektedirler. Fakat ABA varlığında soğuk ve kuraklık koşullarında tepki göstermektedirler [15], [16].

Stres uyarısının bir sinyal olarak algılanıp gen anlatımında değişimler oluşturması arasındaki safhalarda görev alan bir çok fosfataz, kinaz, farklı gruptaki transkripsiyon faktörleri görev alır .



Şekil 1.2 Düşük sıcaklık ve dehidrasyon sinyal aktarımının transkripsiyonel basamakları<sup>1</sup> iki yolakta da kalsiyum başlangıçta sinyal olarak görev almaktadır.

### 1.1.2.2 Bitkilerde Strese Verilen Yanıtta Kalsiyumun Görevi

#### Ca<sup>2+</sup>, Sekonder Haberci

Ca<sup>2+</sup> bitki hücrelerinde önemli bir sekonder habercidir. Ca<sup>2+</sup>un sitosolik konsantrasyonundaki değişim sinyal ağının önemli bir unsurudur. Bitki hücreleri gelişimsel ve çevresel uyarıcılara bu sinyal ağı ile tepki verir [17], [18], [19]. Her uyarı (örneğin düşük sıcaklık), karakteristik bir Ca<sup>2+</sup> değişikliğine sebebiyet verir. Bu değişiklikler farklı kalsiyum algılama mekanizmaları veya tepki elementleri ile teşhis edilir [18], [20], [21], [22], [23].

<sup>1</sup> Küçük daireler fosforilasyon gibi posttranskripsiyonel modifikasyonları temsil etmektedir. Şeklin altında dikdörtgen ile gösterilen kısımlar alt listede verilen promotor bölgeleri ile birlikte transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgeleridir. Çift oklu çizgiler cross talkları göstermektedir. [17]

### **Ca<sup>2+</sup> Dış Taşıyıcıları**

Tüm ökaryotlar gibi bitkilerinde sitosolik Ca<sup>2+</sup> taşınması için iki ana yolu bulunmaktadır: yüksek affiniteli Ca<sup>2+</sup>-ATPaz'ları ve düşük affiniteli Ca<sup>2+</sup> değiştiricileri. Bu iki aktif taşıyıcı, Ca<sup>2+</sup>'un sitosolden dışarı çıkmasını sağlarlar. Bu sayede plazma zarında ve hücre içi zarda oluşabilecek aşırı elektrokimyasal gradiyenti engellerler. Ca<sup>2+</sup>-ATPaz'ların transkripsiyonel olarak soğuk stresi tarafından dzenlendiği kanıtlanmıştır [24].

### **Ca<sup>2+</sup> Dekoderleri**

Nükleustaki yükseltgenmiş Ca<sup>2+</sup> transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve aktivitelerini ayarlar [25]. Ca<sup>2+</sup>'un direk etkisi, oluşan bu kompleks için yeterli olmayabilir. Hücreler arasında Ca<sup>2+</sup> değişimlerinin şekillenmesiyle sistematik modifikasyonlar meydana gelir. Ca<sup>2+</sup> değişimleri mesajlarının şifrelerinin, farklı uyarılara karşı uygun hücrel tepkilerin oluşması adına özölmesi gerekir. Bu gizli mesajların evrilmesinden Ca<sup>2+</sup> dekodeleleri sorumludur.

#### **1.1.2.3 ABA-Bağımlı Soğuk Sinyal İleti Yolağı**

Fitohormon absisik asit (ABA) tohum olgunlaşması ve dormanside önemli rol oynar. Ayrıca vejetatif dokuların kuraklık, tuzluluk ve soğuk gibi abiyotik evre streslerine adaptasyonunda da görev alır. ABA stomaların kapanmasını organize eder ve birçok genin anlatımının dzenlenmesini sağlar. Bu genler vejetatif doku ve tohumlarda dehidrasyon toleransında görev alır.

ABA'nın tetiklediği gen anlatımının yönlendiricileri farklı birçok sınıfa ait olan transkripsiyon faktörlerini barındırır. bZIP, MYC/MYB, HD-Zip, inko parmak ve ABI3/VP1 bu sınıflara ait ailelere örnek olarak gösterilebilir. bZIP transkripsiyon faktörü dimer olarak ABA yanıt elementlerine (ABRE) bağlanır.

#### **1.1.2.4 ABA-Bağımsız Soğuk Sinyal İleti Yolağı**

Donma toleransının arttırılması ile ilgili çok sayıda genin gün ışığına çıkması, genlerden hangilerinin en merkezde olduğu sorusunu akla getirmektedir. Bu soruya cevap bulmak

adına atılan adımlardan biri; ağırlıklı olarak soğuk aklimasyonu sırasında tetiklenen COR proteinlerini kodlayan bir grup gene odaklanmaktadır [26], [27]. Bu COR genlerinden bir kısmı LTI (düşük sıcaklıkla indüklenen), CAS (soğuk aklimasyonuna spesifik), KIN (soğukla indüklenen), RD (kurağa duyarlı) olarak adlandırılmaktadır [28], [29], [30], [31].

COR genlerinin promotor analizleri bu yolağın, genlerin stres indüksiyonuna aracılık eden ardışık elementler içerdiğini analiz etti. Bu elementleri belirleyen ve onları bağlayan birtakım transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. CBF ve diğer transkripsiyon faktörlerinden ileriki bölümlerde bahsedilecektir.

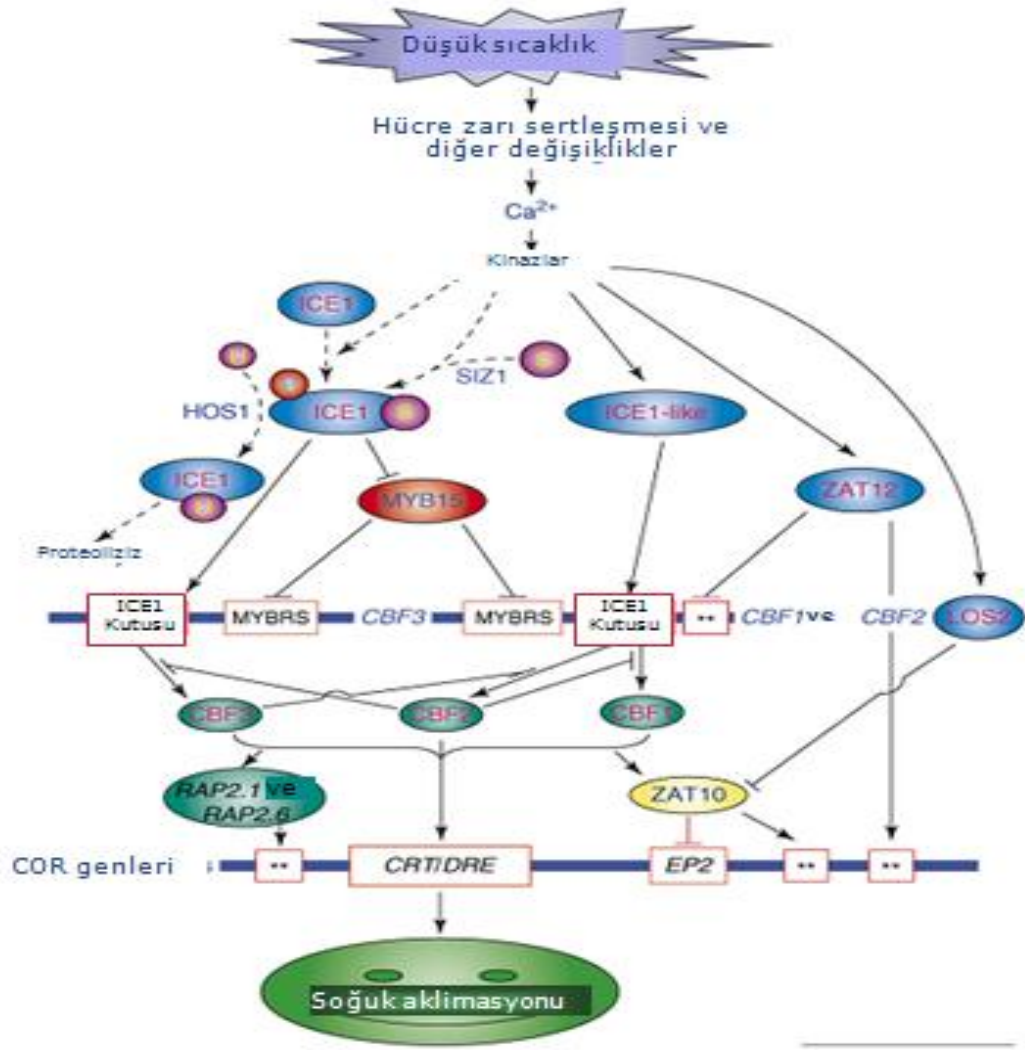
#### **1.1.2.5 Soğuk Aklimasyonunda Anlatımı Artan Genler ve Gen Ürünleri**

Soğuk aklimasyonu sırasında meydana gelen gen anlatımındaki değişikliklerin keşfi, antifriz moleküler mekanizmaların incelenmesinin başlangıcı oldu. Ayrıntılı transkript profil analizleri, *Arabidopsis* genomundaki genlerin %10' undan fazlasının soğuk aklimasyonu sırasında düzenlendiğini ortaya koydu [32], [33], [34], [35]. Mikroarray teknolojisi ve diğer işlevsel genomik yöntemleri kullanılarak yapılan transkriptom analizleri sayesinde stres ile uyarılan birçok gen belirlenmiştir [36], [37]. Stres koşulları altında işlevleri olan genler önemli metabolik proteinleri üreterek hücreleri stresten korudukları gibi strese yanıt sürecindeki sinyal iletimi genlerinin düzenlenmesinde de rol almaktadırlar. Buradan hareketle bu gen ürünleri iki gruba ayrılmaktadır [32], [33], [34].

Birinci grup stres toleransında görev alan şaperonlar, LEA proteinleri, ozmotin, antifriz proteinleri, mRNA bağlanma proteinleri, prolin gibi ozmolit biyosentezindeki anahtar enzimler, su kanal proteinleri, şeker, prolin transportörleri, detoksifikasyon enzimleri, yağ asidi metabolizması enzimleri, proteinaz inhibitörleri, ferritin ve lipid transfer proteinleri. Stres ile uyarılan bu genlerden bazılarının; LEA proteinleri, ozmolit biyosentez anahtar enzimleri ve detoksifikasyon enzimleri gibi, transgenik bitkilerde çok fazla miktarda anlatımları gerçekleşmiş ve stres toleranslı fenotipler üretilmiştir [38], [39]. Bu sonuçlar stres ile uyarılan genlerin ürünlerinin kesin olarak stres yanıtında rol aldıklarını göstermektedir.

İkinci grup; stres yanıtında işlevi olan gen ekspresyonunu ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alan protein faktörlerini içerir. Ayrı ayrı ya da işbirlikli olarak stresle tetiklenen genleri düzenleyen ve gen ağını kuran çok çeşitli transkripsiyon faktörlerini içerir. Günümüzde bu genlerin birçoğunun işlevleri tam olarak anlaşılmamıştır.





Şekil 1.3 *Arabidopsis*'de soğuğa yanıt transkripsiyonel ağının diyagramı<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Soğuk aklimasyonu için soğuk stresi ile uyarılan kalsiyum sinyali önemlidir. Soğuk stresi ICE1 proteinini aktive eder. Bu da CBF ve diğer transkripsiyon faktörlerini indükler. C2H2 çinko parmak transkripsiyonel baskılayıcı CBF'ler tarafından pozitif olarak düzenlenir. Los2 tarafından negatif olarak düzenlenir. Bu çinko parmak transkripsiyonel baskılayıcılar CBF'lerin ve onların hedef molekülü COR genlerinin anlatımını baskılar. [40]

### 1.1.2.6 Genlerin Kontrol Mekanizmaları

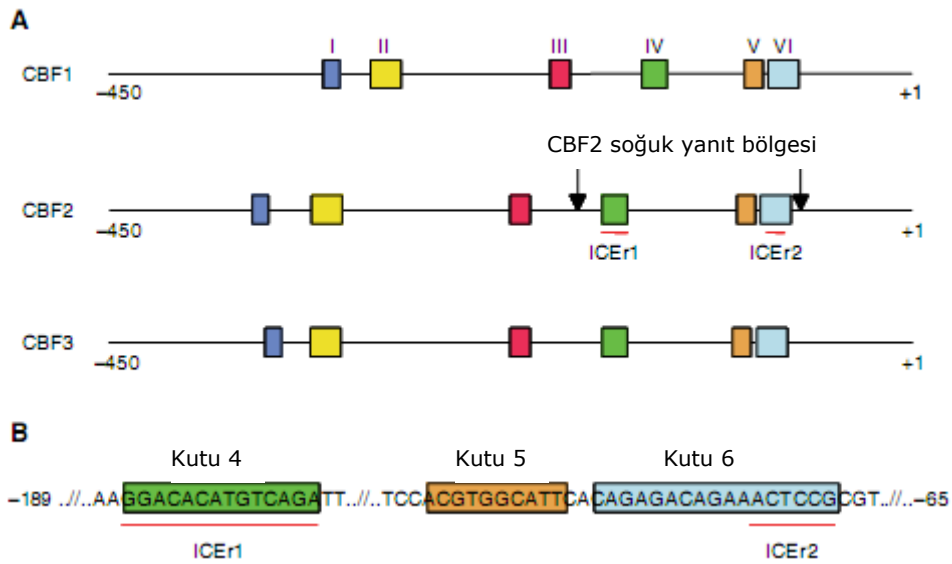
#### Promotor Analizleri

CBF'ler C-tekrarları bağlama faktörleri veya dehidrasyona duyarlı element bağlama faktörleri (DREB1s) diye bilinen transkripsiyon faktörleri familyası olarak tanımlanmıştır [41]. DRE 'lerin soğuk düzenleyici gen anlatımında nasıl bir rolü olduğunu anlayabilmek için kritik adım DNA düzenleyici elementler ile etkileşim halinde olan proteinlerin yapısını saptamak olmuştur. Bu ekseninde Thomashow vd.'nin (1996) yapmış olduğu çalışmalarla *Arabidopsis* bitkisinde bir transkripsiyon faktörünün DRE DNA düzenleyici elemente bağlanarak düşük sıcaklık koşullarında transkripsiyonun düzenlenmesinde rol aldığı tespit edilmiştir.

*Arabidopsis*'de soğuk stresi yanıtında COR genlerinin ABA bağımsız anlatımını kontrol ettiği teşhis edilmiştir. Bu transkripsiyon faktörleri, Etilene duyarlı element bağlama protein/APETALA2 (EREBP/AP2) familyası [41] ve DREB altfamilyasına [42] aittir. Bu alt familya ilaveten 6 alt gruba (A-1'den A-6'a) ayrılmaktadır. DREB1/CBF gibi genler A-1 alt grubuna aittir. Düşük sıcaklıkla tetiklenir ve soğuğa duyarlı stres genlerinin birçoğunun anlatımını etkinleştirirler. Oysa A-2 alt grubuna ait olan DREB2 gibi genler genel olarak ozmotik strese duyarlı gen anlatımında rol oynarlar [43], [44], [45]. *Arabidopsis*'de soğukla uyarılan 3 CBF/DREB1 geni saptanmıştır. Bunlar; CBF1/DREB1b, CBF2/DREB1c, CBF3/DREB1a olarak bilinmektedir [46]. Bu faktörler, soğuğa ve dehidrasyona duyarlı DNA düzenleyici elementlere (DREs) bağlanırlar. Ayrıca C-tekrarları (CRTs) olarak da bilinirler. CRT/DRE elementleri, soğuk stresi altında transkripsiyonu uyarmak için yeterli olan CCGAC ana dizinlerini içerirler.

Bitkilerin düşük sıcaklıkla birlikte nasıl bir değişim geçirdiğini anlamak adına çalışmalar yapılmaktadır. C-tekrarlı dehidrasyon cevap elementi (DRE: dehydration responsive element) cis aktiviteli DNA düzenleyici elementin tanımlanması da bu alanda atılan önemli bir adım olmuştur [19], [18]. Element, 5 baz çiftlik CCGAC çekirdek dizinlerinden yola çıkarak C-tekrarlı olarak belirtilmektedir [20]. Soğuk ile düzenlenen bitki genlerinin

birçoğunun promotorunda birden fazla kopyası bulunmaktadır. *Arabidopsis* genleri COR15a [47] ve COR78/RD29A [19] ve *Brassica napus* geni BN115 [18] örnek teşkil etmektedir. *Arabidopsis* COR15A delesyonunun analizi ile C-tekrarlarının cis aktiviteli soğuk düzenleyici DNA elementinin bir parçası olabileceği belirlendi. Bu ilk kez Yamaguchi-Shinozaki ve Schinozaki tarafından ispatlandı [19]. COR78/RD29A promotorunda 2 adet 9 baz çiftlik (TACCGACAT) DNA elementini içeren C tekrarlarının reporter genle (GUS:beta-glukuronidaz) birleştirilmesi ile, soğuk düzenleyici gen anlatımının uyarıldığı gözlemlendi. Bundan başka bu DNA elementlerinin dehidrasyon ile birlikte de uyarıldığı bulundu. Buna bağlı olarak C-tekrarlarını içeren bu elementler DRE olarak isimlendirildi.



Şekil 1.4 (A) Şematik CBF1, 2 ve 3 promotorları (Renkli kutular promotorlarda bulunan korunmuş dizin bölgelerini temsil etmektedir.)

(B) CBF2 promotorunun soğuk yanıt bölgesinin detayları

### 1.1.2.7 CBF/DREB Transkripsiyon Faktörleri

İlk olarak Stockinger vd. [41] 24kDa büyüklüğünde CBF1 kodlayan geni *Arabidopsis thaliana*'dan izole etmişlerdir. CBF1 'in C tekrarlarına bağlanmasını *Escherichia coli*'de anlatımı gerçekleşen rekombinant CBF1 proteini kullanarak jel mobilite tahlilleri ile kanıtlamışlardır.

Soğuk aklimasyonu daha öncede bahsedildiği üzere CRT/DRE DNA elementleri aracılığıyla COR genlerinin uyarılması varlığında gerçekleşir. CRT/DRE dizinlerine bağlanan transkripsiyon faktörü CBF1'in anlatımının yükselmesi ile COR gen anlatımı tetiklenir ve donma toleransında artış gözlenir [48].

Jaglo-Ottosen vd. (1998) [48] aklimasyon sürecine girmemiş *Arabidopsis* bitkisine CBF1 kodlayan bir cDNA yerleştirilmesi ile transgenik *Arabidopsis* bitkisi elde ettiler. Aklimasyon süreci yaşamamış yabancı bir *Arabidopsis* bitkisine kıyasla bu bitkide, soğukla indüklenen gen anlatımının daha çok gerçekleştiğini gözlemlediler. Bu veri ile birlikte CBF1 transkripsiyon faktörünün aklime edilmemiş bitkilerde donma toleransını arttırdığı sonuca varılmıştır.

Yamaguchi vd. (1998) tarafından maya bir-hibrid tarama sistemi kullanılarak soğuk ve kuraklık stresi verilmiş *Arabidopsis* bitkisinden daha önce elde edilmiş olan cDNA kütüphanelerinin rehberliğinde *Arabidopsis*'den DRE bağlanma proteinini kodlayan 3 homolog cDNA (DREB1A,DREB1B,DREB1C) izole edildi . Burada izole edilen DREB1B'in Jaglo-Ottosen vd. (1998)'nin [48] bildirdikleri CBF1 ile özdeş olduğu tespit edildi. DREB1 proteinlerinin soğuk stresi altında gerekli olan genlerin anlatımını şiddetli bir şekilde indüklediği ortaya konuldu. CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C or CBF3/DREB1A [27].

DREB1c/CBF2; DREB1b/CBF1 ve DREB1A/CBF3 anlatımlarını olumsuz yönde düzenlemektedir. CBF2/DREB1c geni engellenmiş bir *Arabidopsis* mutantının soğuğa dayanıklılık kapasitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda kuraklık ve tuzluluk streslerinde de daha fazla dayanıklılık göstermiştir [47], [40].

ICE1 , SIZ1, CAMTA [49], [50], [51], [52], CBF ekspresyonunun gerçekleşmesinde rol alan genlerdir. HOS10 ve MYB15 ise CBF aktivitesini olumsuz yönde etkileyen

düzenleyicilerdir [40]. CBF/DREB1 yolağı soğuk aklimasyonu için tek düzenleyici kaskat değıldir.

Günümüzde soğuk uyumundaki rolü ile en iyi anlaşılmiş olan genetik sistem Arabidopsis CBF soğuk tepki yolağıdır. CBF/DREB1 proteinleri AP2/ERF DNA bağı protein ailesine aittir. Arabidopsis thaliana da 140'dan fazla üyesi mevcuttur. CBF geni anlatımı 1 saat düşük sıcaklıkla tetiklenir ve kodlanan transkripsiyonal faktörler dönüşümlü olarak soğuğa dayalı birçok genin anlatımını aktive eder [41], [49].

CBF regulonu çok sayıda gene sahiptir [32], [53], [54], [27], [55]. Bu genler soğuk düzenleyici genlerin %12' i kadarı ile ilişkilidir [32], [54]. Arabidopsis'de temel olarak anlatım fazlaca gerçekleştiğinde, stressiz koşullarda ve transgenik bitkilerde donma, kuraklık ve tuz toleransı ile başa çıkma durumlarında CBF genleri düzenledikleri genlerin anlatımını tetikler [56], [48], [57].

Aynı karakteristik elementleri taşıyan CBF ortologlarının Arabidopsis thaliana'da olduğu gibi diğer başka bitkilerde de varlığı tespit edildi. Bunlara otsu bitkilerden Brassica napus L. [58], Lycopersicon esculentum [59], Oryza sativa L. [60] ve Capsicum annuum L. [61], [62], ve odunsu bitkilerden ise Prunus avium L. [63] örnek olarak verilebilir. Ayrıca, Arabidopsis'deki gibi Brassica napus L.' daki 2 Brassica CBF benzeri genlerin fazla miktarda anlatımının gerçekleşmesi donma toleransının artmasına olanak sağlamaktadır [64]. Bununla birlikte, bitki türleri arasında CBF soğuk yolağında bazı yapısal ve gen düzenlemesini etkileyen farklılıklar gözlemlenmiştir. Örneğin soğuğa duyarlı bir tür olan L.esculentum'da CBF regulonu, A.thaliana gibi soğuğa toleranslı bitkilerin regulonundan daha küçük ve fonksiyon açısından pek fazla farklılık göstermez. Bu durum düşük sıcaklıklarda bitki davranışlarındaki farklılıkları kısmen açıklar [65].

Buğdayda yapılan bir araştırma ile, soğuk stresi uygulandığı zaman rekombinant türlerle karşılaştırıldığında, CBF genlerinin indüksiyonunda büyük ölçüde farklılıklar olduğu tespit edildi [66].

Bitkide soğuk stresi yanıtında önemli bir role sahip olduklarından, CBF'ler ve bunların düzenleyici yolları hakkında pek çok çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğunda CBF/DREB1 anlatımının direk düzenleyicileri tanımlanmıştır.

*Arabidopsis* CBF soğuk yolağının homolog bileşenleri; kolza (*Brassica napus*), soya fasülyesi (*Glycine max* L. Merr ), brokoli (*Brassica oleracea* L.), domates (*Lycopersicon esculentum* L.), bezelye (*Medicago sativa* L.), tütün (*Nicotiana tabacum* L.), kiraz (*Prunus avium*), buğday (*Triticum aestivum* ), çavdar (*Secale cereale*), mısır (*Zea mays*), pirinç (*Oryza sativa*), çilek (*Fragaria ananassa* Duchesne) ve arpa (*Hordeum vulgare*) gibi birçok bitkide bulunmuştur [58], [67], [68], [69], [60], [70], [71].

#### **1.1.2.8 CBF Yolağının Düzenlenmesinde Rol Alan Diğer Transkripsiyon Faktörleri**

Gilmour vd. (1998)'un [56] yapmış olduğu çalışmalarda CBF transkriptlerinin düşük sıcaklık uygulanmasından 15 dk sonra çoğaldığı görülünce CBF promotorunu tanıyan bir transkripsiyon faktörünün hazırda bulunabileceği önerilmiştir. Bundan yola çıkılarak CBF ekspresyonunun tetikleyicisi olan ICE aktivatörünün varlığıyla ilgili hipotez ortaya atılmıştır. ICE aktivatörünün, tüm CBF gen promotorlarında bulunan ICE kutusunu tanıyarak bunlara bağlandığı düşünülmektedir. Orta dereceli sıcaklıklarda ICE inaktif olarak bulunmaktadır. Bitki düşük sıcaklığa maruz kaldığında fosforile olarak transkripsiyonu gerçekleştirebilmektedir [72]. ICE, soğuk aklimasyonunda rolleri olan CBF haricindeki genlerin ekspresyonunun tetiklenmesinde de görev almaktadır. HOS regülatörü ise CBF'in ekspresyonunun negatif düzenleyicisi olarak görev alır. *In vitro* ve *in vivo* ubiquitinasyon araştırmalarından yola çıkarak HOS'un aracılığıyla ICE1'in poliubiquitinasyonunun gerçekleştirildiği tespit edilmiştir [73].

Proteinlerin sumoilasyon/desumoilasyonunun soğuk aklimasyonunda çok önemli rolleri olduğu tespit edildi [74]. Sumoilasyon post-translasyonel protein modifikasyonudur. SUMO (small ubiquitin-related modifier) E3 ligazlarına tabii olan işlemlerde SUMO proteinleri protein substratlarına bağlanır. Desumoilasyonda ise SUMO proteinleri SUMO proteazları ile hedef moleküllerinden ayrılır. Bu durum hedef proteinleri proteozomal degradasyondan korumaktadır. Çünkü sumoilasyon ubikütinasyonu engeller [75]. SIZ1'in, *Arabidopsis* SUMO E3 ligaz, soğuk stresi sırasında

SUMO'nun bağlanabilmesi için gerekmektedir. SIZ1 mutantlarının soğuga karşı aşırı duyarlı olduğu bilinmektedir. Ayrıca SIZ1 mutantlarında CBF ve hedef COR genlerinin soğuk ile indüklenmesinin ciddi şekilde azaldığı bilinmektedir. Ne var ki bu durum CBF'in negatif regülatörü olan MYB15 'nin soğuk ile indüklenmesini meydana getirmektedir. ICE1'in proteolizini kolaylaştıran HOS10'un aksine, SIZ1 soğuk aklimasyonu sırasında SUMO'nun ICE1 K393'ü ile konjuge olmasına aracılık etmektedir. Bu da ICE1'in poliubiquitinasyonunu azaltmaktadır. ICE1'in K393R süstitüsüyonu, SIZ1 aracılığıyla oluşan sumoilasyonu bloke eder. Soğuk stresinde mutant ICE1'in çok fazla miktarda anlatımının gerçekleştiği transgenik bitkilerde MYB15 anlatımı artmaktadır. ICE1 mutant bitkilerde olduğu gibi bu bitkilerin de soğuga karşı aşırı hassasiyet gösterdikleri gözlemlenmiştir. Burdan yola çıkarak SIZ1 aracılığıyla gerçekleşen sumoilasyon ICE1 stabilitesini ve aktivitesini kolaylaştırmaktadır. Bu da CBF anlatımının ve MYB15 baskılanmasının gerçekleşmesi için gerekmektedir [74].

Transkripsiyon faktörlerinin geri bildirimli olarak baskılanması, soğuga duyarlı gen anlatımının düzenlenmesinde soğuk ile indüklenen transkriptomun optimizasyonunun sağlanması için anahtar görevi görmektedir. CBF'lerin upstream transkripsiyon faktörleri tarafından ters yönde regülasyonları yapılır. Örneğin; MYB15 (R2R3-MYB protein ailesi) soğuk olmadığında bile eksprese olur. MYB15, CBF promotorları içerisindeki MYB tanıma elementlerine (MYBRS) bağlanabilir [76]. ZAT12 transkriptom analizlerinde ZAT12 regülonunun en az 24 soğuk standart gen takımı (COS) içerdiği saptanmıştır. Bunlardan 9'unun soğukla indüklenen, 15'inin de soğukla baskılanan genler olduğu tespit edilmiştir [35]. Başka bir C2H2 çinko parmak proteini olan LOS2'nin de soğuk stres koşullarında ZAT10 promotorundaki MYC tanıma elementlerine bağlanıp, ZAT10 ekspresyonunu baskıladığı görülmektedir [77]. Kısa süreli ekspresyon analizleri, ZAT10'un RD29A (CBF hedef geni) EP2 dizinindeki (negatif regülatörlerin bağlandığı bir cis element) A(G/C)T promotor cis elementine spesifik olarak anlatımı baskıladığını göstermiştir [77]. ZAT10 ve ZAT12'nin abiyotik stres düzenleyici transkripsiyonel networkte aynı hedefe yönelmiş iki düğüm noktası olarak işlevleri vardır [78], [79].

## ZAT12

Farklı çevresel stres koşullarına benzer tepkiyi gösteren CBF yolağı haricinde bir de ZAT12'nin görev aldığı yolak bulunmaktadır. ZAT12, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> çinko parmak proteini olup küçük bir gen grubunun üyesidir. ZAT12, soğuk stresi de dahil olmak üzere farklı streslere yanıt olarak kararlı bir transkript seviyesinde bulunmuştur. Transgenik bitkilerde yapılan analizlerle ZAT12'nin soğuk aklimasyonunda ve oksidatif strese yanıtta rol aldığı ortaya çıkarılmıştır [35].

ZAT12 soğuk tepki yolağı, CBF soğuk tepki yolağı ile etkileşim halindedir. Genlerin çalışma mekanizmalarında çakışmalar bulunmaktadır. Bu çakışmalar, ZAT12 ve CBF regülasyonunun birlikte çalışmasından kaynaklanmaktadır. Her iki transkripsiyon faktörüne ve düşük sıcaklığa cevaben dört adet genin ekspresyonunda artış meydana gelirken, 3 adet genin ekspresyonunda düşüş gözlemlenmektedir. Buna bağlı olarak, belirli soğuk genlerinin ekspresyonunu koordineli bir şekilde ZAT12 ve CBF soğuk tepki yolaklarının düzenlemekte olduğu görülmektedir. Bundan başka, ZAT12'nin konstitüif ekspresyonunun CBF1-3 genlerinin indüksiyonunu azalttığı da gözlemlenmiştir. Bu da, ZAT12 regülasyonunun CBF soğuk tepki yolağının negatif yönde düzenlenmesinde de rol aldığını ortaya koymaktadır [40], [35].

### 1.1.3 AP2 Bölgesi

Etilen endojen bir bitki hormonudur. Bitki gelişiminde ve büyümesindeki çimlenme, senesans, epinasti, absisyon ve meyve oluşumu gibi birçok durumu etkiler [80]. En çok çalışılan bitki hormonlarından biridir. Etilen ile indüklenen bir takım genlerde etilenle düzenlenen cis bölgeleri tanımlanmıştır [81], [82], [83], [84]. Bu cis düzenleyici bölgelerle spesifik olarak etkileşimde olan çeşitli proteinler de tespit edilmiştir [85], [86], [87], [83].

*Nicotiana spp'* deki etilen ile indüklenen PR (patojenle ilgili) protein genlerinin 5' upstream bölgelerinin karşılaştırılması ile 11 baz çiftlik bir dizin belirlenmiştir (TAAGAGCCGCC) [88], [89], [90]. Bu bölgeden GCC kutusu (GBD) olarak bahsedilmektedir. GCC kutusunun etilene duyarlı element (ERE) olduğu ispatlanmıştır. Etilene bağımlı transkripsiyonu artırdığı bilinmektedir. Tütün EREBP'leri ile ilgili olan



cDNA'lar klonlanmış ve karakterize edilmiştir. EREBP'ler ERE ile spesifik olarak etkileşimde olan bağlanma proteinleridir. EREBP'lerin DNA bağlanma bölgeleri 59 aminoasitlik bir bölgedir.

APETALA2 (AP2) domaini (ayrıca bazen AP2/etilene duyarlı element bağlanma faktörü [ERF] domaini veya ERF/AP2 domaini olarak adlandırılır) AP2/ERF diye adlandırılan geniş bir DNA bağlanma protein gen ailesini belirtir.



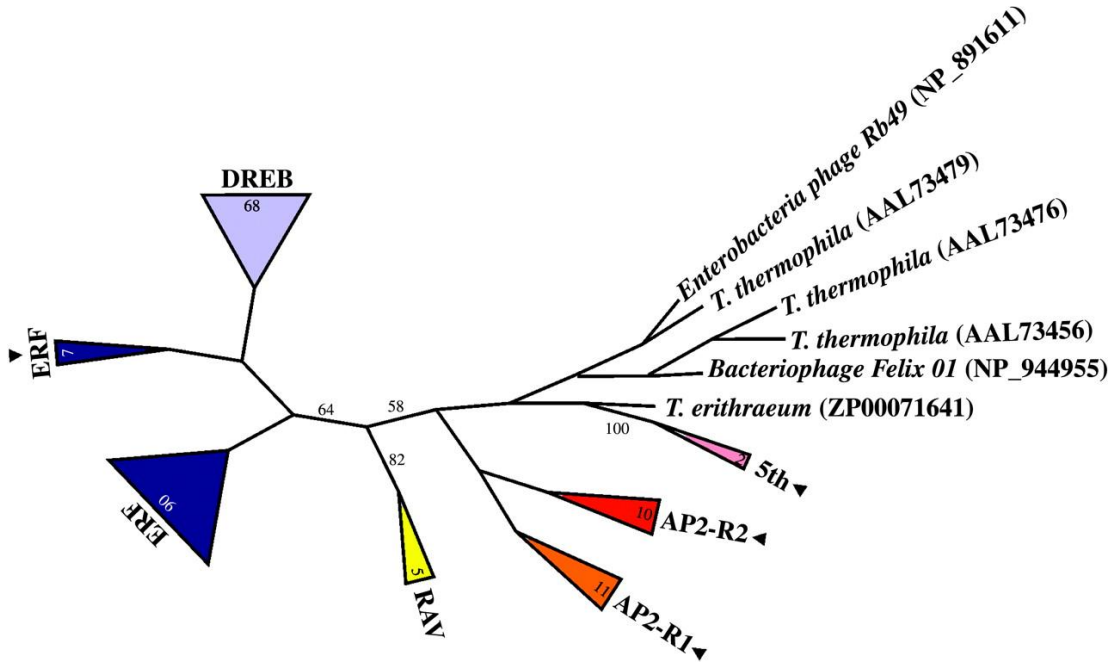
Şekil 1.5 AP2/ERF genlerinin yapısı [91]

AP2/ERF genleri AP2 domaini bulundurma sayılarına göre sınıflara ayrılır.

Birinci sınıf; iki AP2 domaini barındıran (AP2-like) proteini kodlar ve AP2 [92], AINTEGUMENTA (ANT) [93], [94] ve Glossy15 (GL15) [95] içerir .

İkinci sınıf; sadece bir AP2 domaini olan proteini (ERF-like) kodlar. Bunlar; TINY [96], AtEBP [97], ve ABI4 [98] proteinlerini içerir.

AP2/ERF genlerinin üçüncü sınıfı ise; RAV1 ve RAV2'yi kapsar. [91] Bunlar AP2 ve B3 olmak üzere iki farklı DNA bağlanma domaini olan proteinleri kodlar [99].



Şekil 1.6 Filogenetik analiz<sup>3</sup>

*Arabidopsis* AP2, AP2/ERF ailesinin içinde en iyi çalışılmış genidir. AP2, floral meristemin kurulmasında [92], [101], ve floral homeotik gen anlatımının düzenlenmesinde *Arabidopsis*'de merkezi bir rol oynar [102], [103], [104]. AP2' de iki adet AP2 domaini vardır. Her bir AP2 domaini 68 aa'dan oluşur. 18 aa çekirdek bölgededir. Amfipatik alfa sarmal formundadır [92], [105]. Bu domainler AP2 işlevi için son derece elzemdir [92].

AP2 'a ek olarak *Arabidopsis*'de AP2 domainini kodlayan diğer genler de çalışılmıştır. ANT (AP2-like) [93], [94], CBF1 (ERF-like) [41] gibi. AP2-like genleri gelişim sürecinde anahtar rol oynayan genler iken, ERF-like genleri biyotik ve çevresel strese tepki mekanizmalarında görev almaktadırlar. Sakuma vd. (2002) *Arabidopsis*'de DNA bağlanma bölgelerindeki benzerliğe dayanarak AP2/ERF genlerini 5 sınıfın üyesi olarak gruplandırmıştır. Bunlar; AP2 alt familyası (14 gen), RAV alt familyası (6 gen), DREB alt familyası (55 gen), ERF alt familyası (65 gen) ve (beşinci grup; 4 gen) diğerleridir.

<sup>3</sup> Bitki AP2 domainlerinin ve yeni keşfedilen bitki harici AP2 domainlerin NJ(yakınlık bağlantısı) ağacı[100]

HvCBF1	VYKGVRRRN-	PGRWVCEVRE	PHSK-QRIWL	GTFETAEMAA	RAHDVAALAL	RGRAA-CLNF	AD
AtDREB1A	IYRGVRRRN-	SGKWVCEVRE	PNKK-TRIWL	GTFQTAEMAA	RAHDVAALAL	RGRSA-CLNF	AD
AtCBF2	IYRGVRQRN-	SGKWVCELRE	PNKK-TRIWL	GTFQTAEMAA	RAHDVAALAL	RGRSA-CLNF	AD
AtCBF1	IYRGVRQRN-	SGKWVSEVRE	PNKK-TRIWL	GTFQTAEMAA	RAHDVAALAL	RGRSA-CLNF	AD
BnDREB	VYRGVRLRN-	SGKWVCEVRE	PNKK-SRIWL	GTFLTAEIAA	RAHDVAALAL	RGKSA-CLNF	AD
NtREP111b	VYRGVRKRN-	SDKWVCELRE	PNKK-SRIWL	GTFPSAEMAA	RAHDVAALAL	RGRSA-CLNF	AD
NtREP111a	VYRGVRKRN-	SGKWVCEVRE	PNKQ-SRIWL	GTFPSAEMAV	RAHDVAALAL	RGRSA-CLNF	AD
OsDREB1A	VYRGVRRRGP	AGRWVCEVRE	PNKK-SRIWL	GTFATAEAAA	RAHDVAALAL	RGRGA-CLNF	AD
AtTINY	VYRGVRKRN-	WGKWVSEIRE	PRKK-SRIWL	GTFPSPEMAA	RAHDVAALSI	KGASA-ILNF	PD
BCBF1	LYRGVRRRGR	VGQWVCEVRV	PGIKGSRLWL	GTFNPPEMAA	RAHDAAVLAL	SGRAA-CLNF	AD
BCBF	VYRGVRRRGN	TERWVCEVRV	PGKRGARLWL	GTATAEVAA	RANDAAMLAL	GGRSATCLNF	AD
BCBF3	VYRGVRRRGN	TERWVCEVRV	PGKRGARLWL	GTATAEVAA	RANDAAMLAL	GGRSATCLNF	AD
OsCBF	VFRGVRRWGC	AGRWVCKVRV	PGSRGDRFWI	GTSDTAEBETA	RTHDAAMLAL	CGASA-SLNF	AD
Consensus	vyrGVR.Rn.	.g.WVcevRe	P.kk.sRiWl	GTF.taEmaa	RahDvAaalal	rGrSA.cLNF	ad

Şekil 1.7 CBF ve yakın ilişkili AP2 proteinlerinin aminoasit dizinlerinin hizalanması<sup>4</sup>

#### 1.1.4 Zeytin

Zeytin *Oleaceae* familyasının bir üyesidir. Bu familya *Fraxinus* (dişbudak), *Forsythia* (altın çanak), *Forestiera* (*F. Neomexicana*), *Ligustrum* (kurtbağrı), *Syringa* (leylak), *Olea* (zeytin) cinslerini bünyesinde barındırır. Ticari zeytinler *Olea europaea* L. türüne aittir. Dünya üzerinde tropikal ve subtropikal bölgelerde yetişen 20 kadar *Olea* türü bulunmaktadır. Yalnızca *O.europaea* L. yenilebilen meyveler üretmektedir. Zeytin ağacı uzun ömürlü her daim yeşil bir ağaçtır. Bazı türlerinin 100 yıl kadar yaşadığı rapor edilmiştir.

<sup>4</sup> *Arabidopsis* AtDREB1A (AB007787), AtCBF2 (AF074601), AtCBF1 (U77378) ve AtTiny (X94698); tütün NtACRE111A (AF11530) ve NtACRE111B (AF211531); *B.napus* BnDREB (AF084185); pirinç OsDREB1A (BAA90812) ve OsCBF (AF243384); arpa BCBF (AF239616), BCBF1 (AF298230) ve BCBF3 (AF298231) [106].

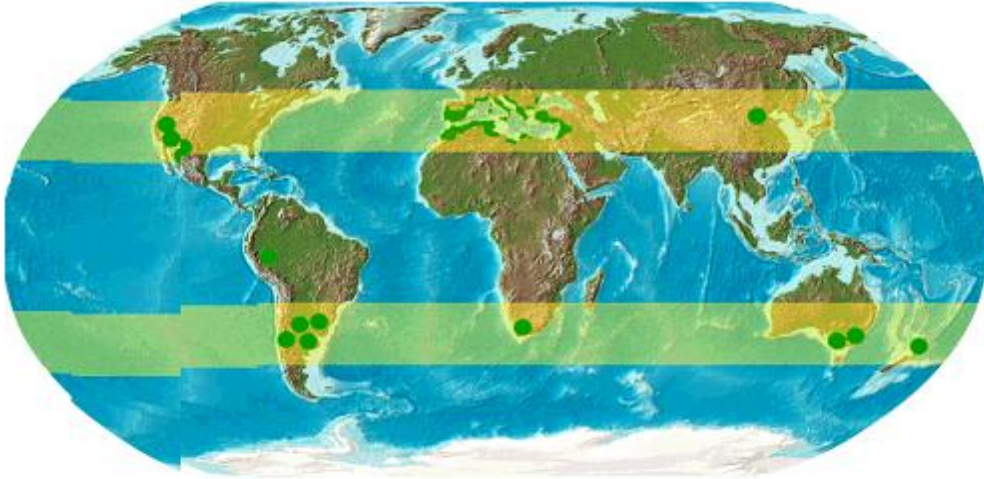
Çizelge 1.1 *Olea europaea*'nın taksonomisi

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Lamiales
Familya	Oleaceae
Cins	<i>Olea</i>
Tür	<b><i>O.europaea</i></b>

Zeytin ağacı tarımına, tarih öncesi çağlarda Akdeniz havzası doğu bölgesinde başlanmıştır. Akdeniz havzası tarafından çevrelenen alanlar dünya zeytinyağı üretiminin %90'ını sağlamaktadırlar. İşlenmesi, toplanmasındaki zorluklar ve üretim alanlarındaki kısıtlı mahsul eldesi sebebiyle zeytinyağı yüksek ücretlendirilen bir üründür. Buna rağmen yüksek kalitesi ve sağlıklı bileşenlerden oluşması nedeniyle tüm dünyada tüketimi sürekli artmaktadır.

Çizelge 1.2 Dünya zeytinyağı tüketimi (1.000 TON) [107]

ÜLKELER	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
AB	1.997,5	2.079,0	1.918,0	1.905,0	1.868,0	1.854,5	1.856,5
Avustralya	34,5	32,5	34,5	47,5	35,0	37,0	37,5
Brezilya	23,5	26,5	26,0	34,5	40,0	42,0	42,5
ABD	216,5	215,5	223,0	248,0	246,0	254,0	260,0
Suriye	150,0	135,0	79,0	110,0	80,0	110,0	120,0
Fas	70,0	38,0	55,0	65,0	65,0	70,0	70,0
Tunus	56,0	44,0	38,0	45,0	50,0	35,0	35,0
Türkiye	46,0	60,0	50,0	80,0	85,0	97,0	98,0
Diğer	288,5	293,0	267,0	263,5	285,5	326,0	319,5
Toplam	2.882,5	2.923,5	2.690,5	2.798,5	2.754,5	2.825,5	2.839,0



Şekil 1.8 Dünya coğrafyasında zeytin üretimi yapılan ülkeler

*Olea europaea* L. Akdeniz bölgesinde oldukça yaygın bir bitki türüdür. Bitki kurak iklimlere iyi adapte olmuştur. Su stresine karşı uzun süre canlılığını koruyabilir [108].

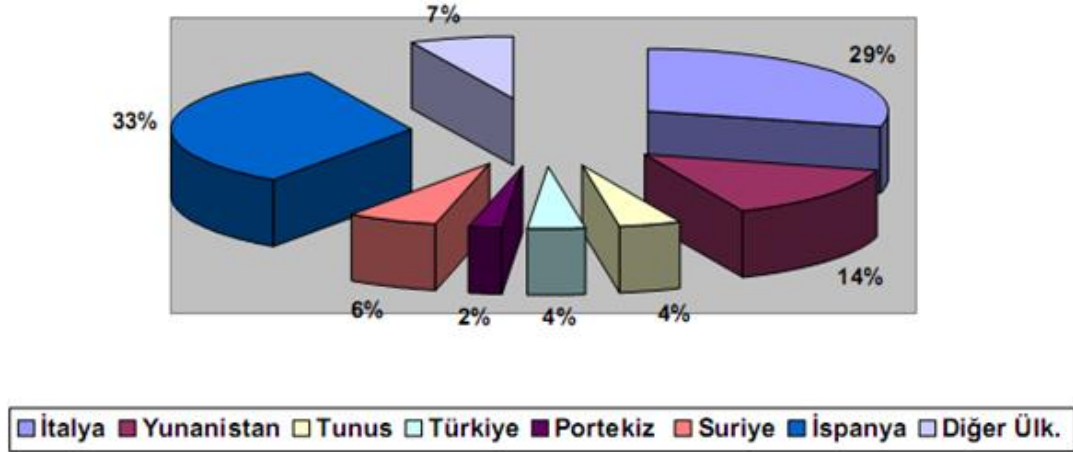
Zeytin her daim yeşil olan ve yağının karakteristik özelliğinden dolayı ekonomik değeri yüksek olan bir ağaç çeşididir. Donmaya karşı düşük tolerans gösteren ılıman iklim bitkisidir [109]. Bu düşük tolerans soğuk bölgelerdeki tarımını kısıtlamaktadır. Halbuki soğuk bölgelerde olgunlaşma sonrası süreç yavaş olduğunda yağının kalitesi artmaktadır [110]. Soğuk bölgelerde yetişen zeytin ağaçlarından elde edilen ekonomik değeri yüksek olan yağı elde edebilmek için soğuk iklimlerde zeytin ağaçlarının hayatta kalabilmesini sağlayacak bir yol bulmak büyük önem arz etmektedir. Dormansi olmayan diğer ağaçlar gibi zeytin ağaçlarının anatomik seviyede soğuk semptomları ifade etmesi haftalar almaktadır. Bu semptomlar; tilosis, kambiyal hücrelerin ölümü, suberifikasyon ve hücre duvarlarının lignifikasyonu olaylarını içerir [111], [112].

Türkiye'nin önemli tarımsal ihraç ürünlerinden biri olan zeytin ve zeytinyağı, ülkemiz potansiyeli dikkate alındığında, mevcut sorunların çözüme kavuşturulmasıyla, özellikle de Avrupa Birliğine katılım sürecinde, tarım sektörümüz için rekabet gücü olan ürünlerden biri olacaktır.

Çizelge 1.3 Dünya zeytinyağı ihracatı (1.000 TON) [107]

ÜLKELER	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10
AB	324,5	330,5	310,5	351,0	357,0	373,5	385,0
Tunus	209,0	98,0	115,5	175,0	130,0	110,0	110,0
Suriye	28,0	36,0	35,0	40,0	20,0	15,0	30,0
Fas	20,5	31,0	21,0	4,5	2,0	16,0	18,0
Arjantin	5,5	12,5	16,0	15,0	18,5	15,5	13,0
Türkiye	46,0	93,5	73,0	45,0	15,0	24,0	48,0
Diğer	24,0	32,0	32,5	31,5	20,0	27,0	28,0
Toplam	657,5	633,5	603,5	662,0	562,5	581,0	632,0

2008/2009 sezonunda zeytin dikim alanı 774.370 ha'dır. 2008/2009 sezonu verilerine göre ülkemiz zeytin üretiminin yaklaşık % 65'i yağ üretimine gitmektedir. Kalanı ise sofralık olarak işlenmektedir.



Şekil 1.9 Dünya zeytinyağı üretimi yüzdesi [113].

Ülkemizde zeytin üretimi yapılan alanlarda artış olmasına karşılık, üretimde dalgalanmalar vardır. Ülkemizin batısında, Çanakkale'den Muğla'ya kadar uzanan Ege Bölgesi zeytin ağacının en iyi yetişme şartlarına sahiptir. Memecik ve Ayvalık en önemli iki çeşidi oluşturmaktadır. Manisa'nın Akhisar yöresinde yeşil sofralık Domat ve Siyah sofralık Uslu çeşitleri ile son yıllarda yayılan Gemlik çeşidi önemli çeşitlerdir. Marmara Bölgesinde, zeytin ağaçları daha çok İznik ve Gemlik Körfezi gibi rüzgarlara kapalı yerlerde kesif olarak yerleşmiştir. Bölgenin en iyi sofralık çeşidi "Gemlik"tir.



Şekil 1.10 Türkiye’de zeytin işletmelerinin bulunduğu iller [114].

#### 1.1.4.1 Zeytin ve Stres

Zeytinler genellikle kuraklığa dayanıklı bitkilerdir. Bu karakteristik özellik farklı kültürlerde çeşitlilik gösterir. Diğer bir çevresel karakteristik özelliği soğuk hasarına gösterdiği dayanıklılıktır. Yunanistan’da kuzey bölgesine ait olan kültürler soğuğa karşı dayanıklılıkları fazla iken, güney bölgesine ait olan kültürlerin kuraklığa karşı dayanıklılıkları fazladır [115].

Zeytin ağaçlarında soğuk stresi farklı hücre ve doku seviyelerindeki değişikliklerle meydana gelmektedir [116]. Hücre zarları soğuk hasarından ilk etkilenen bölgedir. Soğuk aklimatizasyonu sırasında, ilgili enzimlerin aktivitelerinin gerçekleşmesini sağlayarak zar akışkanlığını koruyan mekanizmaların aktivasyonu gerçekleşir [46]. Bu mekanizmaların aktivitasyonları ile lipid kompozisyonunda değişiklikler meydana gelir. Kriyoprotektanlarda ve soğuğa duyarlı, aklimatizasyon ile ilgili genlerin aktivasyonunu gerçekleştiren sinyal iletiminde rol alan sekonder habercilerde artış meydana gelir [116], [46].

Zeytin bitkisi ayrıca tuzluluğa karşı da dayanıklılık gösteren bitkilerdendir. Diğer bitkilerle kıyaslandığında zeytin bitkisi, tuzluluğa bir turuncgil bitkisinden daha fazla bir palmiyeden ise daha az dayanıklıdır [117]. Therios ve Misopolinos (1988) tarafından 3 yıllık bir zeytin bitkisinin 80mM’den daha düşük bir NaCl konsantrasyonunda zarar görmedikleri tespit edilmiştir. Tuzluluk toleransı iyon atılım mekanizmaları ve Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup>



iyonlarının kökte tutulmaları ile ilişkilidir [118], [119]. Loreto ve Bongi (1987) [120]'a göre tuzluluğun belli bir eşik değerin üzerinde olması bitki morfolojisini değiştirmektedir. Stomaların çevresel değişikliklere olan hassasiyetinde azalma görülür ve yaprak kalınlığı azalır.

Tuzluluğa maruz kalan zeytin ağaçlarında su miktarında azalma görülür [121]. Bu azalma hücresel seviyede dehidrasyon ve osmotik strese sebep olan dış solüsyonlardaki yüksek tuz konsantrasyonundan kaynaklanır.

Kök bölgesinde biriken tuz ozmotik stresin artmasına ve hücre iyon dengesinin bozulmasına sebep olur.  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $NO^{-3}$  gibi önemli maddelerin alımının azaltılmasını tetikler ve  $Na^+$  ve  $Cl^-$  'un hücre içerisinde toksik seviyelerde birikimini tetikler [122], [123]. Bu öncül stresler reaktif oksijen elementlerinin üretimini artırır [124], hormonal değişimlere sebep olur [125], karbonhidrat metabolizmasını değiştirir [126], bazı enzimlerin aktivitelerini azaltır [127].

## 1.2 Tezin Amacı

Yapılan çalışma ile ilk olarak *Arabidopsis thaliana*' da klonlanan ve abiyotik stres dayanıklılığını belirleyen genlerin anlatımlarının kontrolünde görev yapan CBF/DREB transkripsiyon faktörlerinin, diğer pek çok bitkide olduğu gibi zeytinde de homologlarının bulunması ve bunların tam uzunluktaki cDNA'larının klonlanması amaçlanmaktadır.

## 1.3 Hipotez

Zeytin çevresel streslerden kuraklığa çok dayanıklı soğuk ve tuzluluğa da orta derecede dayanıklılık göstermektedir. Bitkilerin farklı çevresel streslere benzer tepkiler vermesinden yola çıkarak soğuk stresi ile anlatımı artan CBF/DREB genlerinin zeytin bitkisinde de bulunduğu öngörülerek araştırma grubumuzda CBF proteinlerini klonlama çalışmalarına başlanmıştır. Daha önceki bir çalışmada 250 bp'lik CBF kısmi cDNA'sı klonlanmıştır. Kısmi dizinler kullanılarak genin 3' ve 5' uçlarının elde edilip edilmeyeceği araştırılacaktır. Bu genlerin klonlanması zeytindeki soğuğa dayanıklılık mekanizmasını anlamada önemli bir adım olacaktır. CBF genleri klonlandıktan sonra, bu genlerin

ekspresyonu bakımından soğuğa dayanıklı varyeteler ve daha az dayanıklı varyeteler arasında farklılıklar olup olmadığına bakılacaktır.

### MATERYAL VE METOD

#### 2.1 Bitki Materyali

1 yaşındaki *Olea europaea* L.Gemlik kültüvarı Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

#### 2.2 Tamponlar ve Çözeltiler

Tampon veya çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1' lik solusyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
TE çözeltisi (1 X), pH 8.0	10 mM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
Etanol	% 75- 80 stok solüsyonu hazırlandı.
Etidyum bromür stok solüsyonu ( EtBr)	5 mg/ ml EtBr' e steril deiyonize su ilave edildi.
MOPS ( 5 X)	0.2 MOPS pH 7, 50 mM NaOAc, 50 mM EDTA ve DEPC' li su bir gece inkübe edildikten sonra otoklavlandı.
RNA loading çözeltisi	1mM EDTA, pH 8.0, % 0.4 bromfenol mavisi ve % 50 gliserol karışımı, DEPC' li su ilave edildi.
dNTP karışımı	20 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.

EDTA solüsyonu	250 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl karışımı hazırlandı. pH 8.0'e ayarlandı.
TBE çözeltisi (5 X)	54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1 L saf suya tamamlandı.
DNA loading çözeltisi	250 mM Tris-HCl pH 7.5, % 0.2 bromfenol mavisi, % 0.2 ksilen siyanol ve % 40 gliserol karışımı
Ampisillin stok solüsyonu	100 mg/ ml ddSu ilave edildi. Filtreden geçirildi. – 20 °C' de bekletildi.
X- Gal stok solüsyonu	50 mg 5-bromo-4- kloro-3-indol $\beta$ - D- galaktozidaz 1ml DMF( di metil formamid) de çözüldü. Alümiyum folyo ile sarılarak -20 °C' ye kaldırıldı.
IPTG stok solüsyonu	1 M ( 240 mg/ml) izopropanol $\beta$ -D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20 °C' de saklandı.

### 2.3 Moleküler Markörler

RiboRuler high range RNA Ladder ( n/ 2 $\mu$ l)	6000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 500 bp ve 200 bp bantları gözlenir.
MassRuler DNA Ladder Low Range	1 X' lik TBE' de 1031 bp ile 80 bp arasında toplam 11 bant gözlenir.
Pst1 ile kesilmiş $\lambda$ DNA	%1' lik agarozda 11501 bp ile 247 bp arasında toplam 17 bant gözlenir.

## 2.4 Enzimler

Taq polimeraz	Qiagen Taq DNA Polymerase Fermentas Long PCR System
---------------	--

## 2.5 Kitler

cDNA sentez kiti	ROCHE High Fidelity cDNA Synthesis Kit
RACE kiti	Roche 5'/3' RACE Kit 2nd Generation
mRNA izolasyon kiti	Qiagen Oligotex mRNA Spin- Column
3'RACE kiti	Invitrogen 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends
5'RACE kiti	Invitrogen 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0
Jel pürifikasyon kiti	QIAquick Gel Extraction Kit
Ligasyon kiti	Promega pGEM-T Easy Vector Systems
Plazmit izolasyon kiti	Roche High Pure Plasmid Isolation Kit

## 2.6 Besiyerleri

### Luria Broth (LB)

Besin çeşidi	Miktarı
Tripton	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 1lt' ye tamamlandı. pH 7'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 30 dakika otoklavlandı.

Katı LB için sıvı 1L LB'ye 15 g Agar ilave edildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı.

## SOB

Besin çeşidi	Miktarı
Tripton	10 g
Yeast extract	2,5 g
NaCl	0,292 g
MgCl <sub>2</sub>	1,015 g
KCl	0,093 g

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 500mL'ye tamamlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı.

SOC için 98 g SOB' ye 2 mL glikoz ilave edildi.

## 2.7 Oligonükleotidler

Primerin Adı	Primer Dizini
Oligo d(T)-anchor	5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTTTTTTTTTTTTTTTTTV – 3'
PCR Anchor	5' –GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C -3'
RF1	5'- AGGCCGGAAGAAGTTTCAC-3'
RF2	5'-CAGGCCGGAAGAAGTTTCAC -3'
AP	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'
AUAP	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTAC -3'
AAP	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIGIIGGGIIG -3'
SP1	5'-CCA CGT TGT GAG CTC TCG CAG-3'

## **2.8 Kullanılan Programlar**

### **Chromas**

Vektör dizilerinin çıkartılması için kullanılan ve internetten indirilebilen bir programdır. Dizilerin kromatogram dosyalarını açar ve programa girilmiş olan vektör dizinlerini uzaklaştırır.

### **Primer3**

PCR primerlerini tasarlamak için kullanılan programdır. Ayrıca hibridizasyon problemlerini ve primerleri dizinlemede de kullanılır.

## **2.9 Zeytin Fidelerinin Büyütülmesi**

Zeytin fidanlarının yaprakları yıkanarak olası zirai ilaç kalıntıları uzaklaştırıldı ve fidanlar temiz saksılara dikildi. Ortam koşullarına uyum sağlamaları için bitkiler bir hafta süreyle 22 °C'de, 14 saat gündüz / 15 °C'de, 10 saat gece periyodunda, gündüz 150  $\mu\text{mol M}^2\text{s}^{-1}$  ışık, gece ise karanlık olacak şekilde tutuldu.

Bir haftanın sonunda, 4 °C'de, 14 saat gündüz / 2 °C'de, 10 saat gece periyodunda, gündüz 150  $\mu\text{mol M}^2\text{s}^{-1}$  ışık, gece ise karanlık olacak şekilde 10 gün süreyle soğuk stresi verildi.

## **2.10 Bitki Örneklerinin Alınması**

Bir haftalık büyüme sonunda, stres verilmeden hemen önce bitkiden yaprak örneği alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80 °C'de saklandı. Daha sonra sırası ile 15 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, bir gün, bir hafta ve on gün sonunda yaprak örnekleri alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80 °C'de saklandı.

## **2.11 RNA İzolasyonu**

### **2.11.1 RNA İzolasyonu için Hazırlık**

RNA'lar kolaylıkla yıkılabilen moleküllerdir. Bu nedenle izolasyondan önce kullanılacak havan ve havaneleri, tüm cam ve plastik malzemeler %0,1'lik DEPC'li su içerisinde bir

gece bekletildi, daha sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Yine benzer şekilde, izolasyonda kullanılacak tüm solüsyonlara ve saf suya %0,1 oranında DEPC ilave edilerek bir gece boyunca bekletilip 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak kullanıldı.

### **2.11.2 RNA İzolasyonu**

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örneği, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde toz haline getirilerek, 2 ml lik mikro santrifüj tüpüne alındı.

Her 100 mg örnek için 1 ml Trizol Reagent (Invitrogen) ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 1 ml Trizol Reagent için, 0,2 ml olacak şekilde Kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalanarak, 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 12000 xg hızda 4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda tüpün içindeki karışım, alt kırmızı faz, interfaz ve renksiz üst faz olmak üzere üçe ayrıldı. RNA üst fazdadır.

Üst faz alınarak, 0,5 ml izo-propanol ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12000 xg hızda 4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi. RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml %75 lik etanol eklenip, 7500 xg hızda 4 °C'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dökülüp pellet kurutuldu. Kuruyan pellet 50 µl DEPC'li su içerisinde çözülerek, 55 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Örnekler -80 °C'de saklandı.

### **2.11.3 Total RNA miktarının Belirlenmesi**

Trizolle çıkartılmış RNA' ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. RNA' ların konsantrasyonları  $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times$  sulandırma faktörü formülüyle hesaplandı.



## **2.12 RNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi**

### **2.12.1 Formaldehit Jeli Protokolü**

Tüm elektroforez aparatları DEPCI'yi su ile yıkanarak temizlendi. % 1 lik jel hazırlamak için, 0,4 gram Agaroz (Applichem), 8ml 5X MOPS, 25 ml su ile çözüldü, 60 °C'ye soğutuldu. İçersine 60 °C'ye ısıtılmış 7 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü.

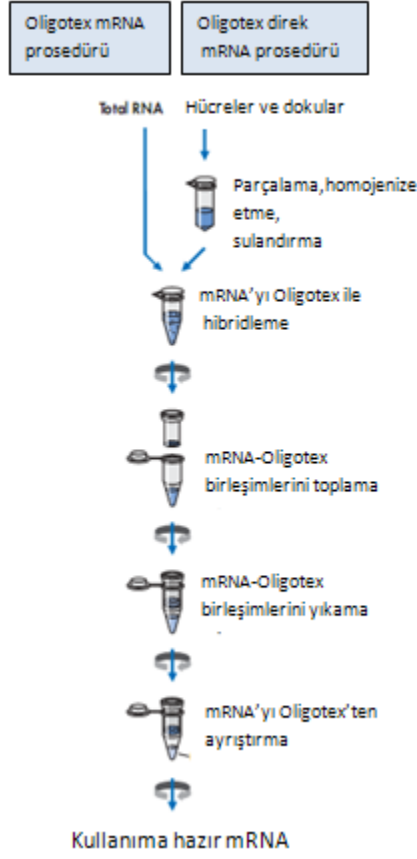
#### **2.12.1.1 Formaldehit Jeli için RNA Örneklerinin Hazırlanması**

4,5 µl RNA'ya, 2 µl 5X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 1 µl Etidyum bromid ilave edilerek, 55 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Bu karışıma 4 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

### **2.12.2 Total RNA'dan mRNA İzolasyonu**

mRNA izolasyonu Oligotex mRNA Spin- Column Protokolü kullanılarak yapıldı. Bitki örneklerinden çıkarılan total RNAlar, toplam miktar 0,25- 0,50 mg ve son hacim 500 µl olacak şekilde 500 µl RNaz free water, 30 µl Oligotex süspansiyonu ve 500 µl OBB tamponu ile karıştırılarak mRNA izolasyonunda kullanıldı.

Sekonder yapıların yok edilmesi için RNA çözeltisi, 70 °C' de 5 dakika ve 25 °C' de 10 dakika inkübe edildikten sonra 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra pellet 2 defa 500 µl OW 2 tamponu ile yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika Small spin columnda santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra kolonda kalan mRNA' lar, 70 °C' de bekletilen 10 µl OEB tamponu ile 2 defa yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 1 dakika santrifüjlenerak 1. ve 2. elüsyonlar oluşturuldu. Oluşturulan mRNA elüsyonları -80 °C' de saklandı.



Şekil 2.1 Total RNA'dan mRNA yapılışı  
(Qiagen Oligotex mRNA spin column kiti protokolünden modifiye edilmiştir)

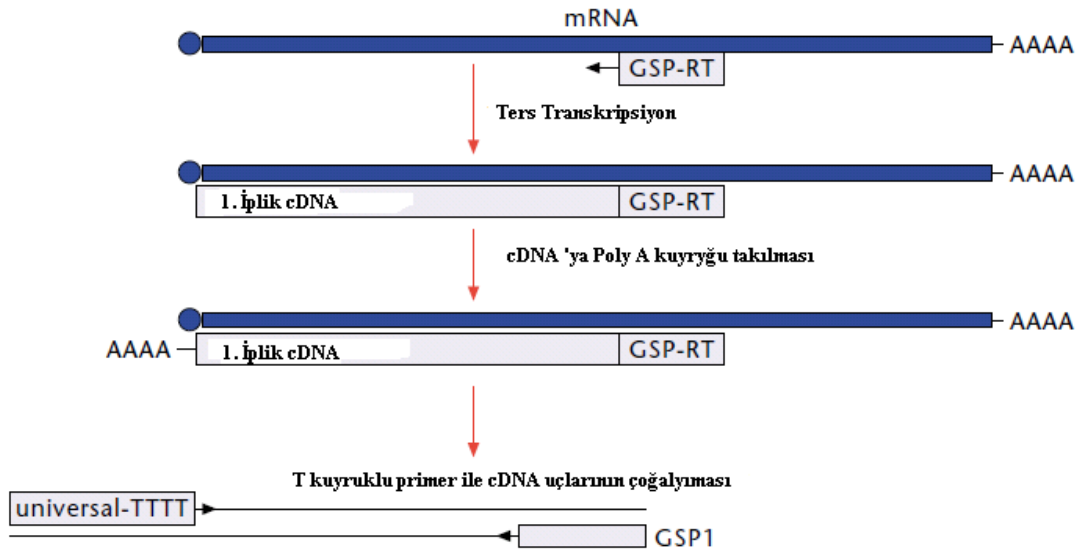
### 2.12.3 mRNA Spot Testi

mRNA miktarını belirlemek amacıyla, 0.25 g Agaroz, 20 ml DEPCli su ile çözüldü, 60 °C'ye soğutuldu. İçerisine 3 µl Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

Kontrol RNA' sı ( 1µg/ 1µl) 20, 40, 100 ve 200 kez sulandırılarak, sırası ile 50 ng, 25 ng, 10 ng ve 5 ng'lık sulandırma serileri oluşturuldu. Jele 1 µl spotlandı. İzole edilen 1. ve 2. elüsyon mRNA'larda jele 1µl spotlandı. Örnekler jel üzerine damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Elde edilen fotoğraf üzerinde kontrol RNA' sı göz önüne alınarak miktar hesabı yapıldı.

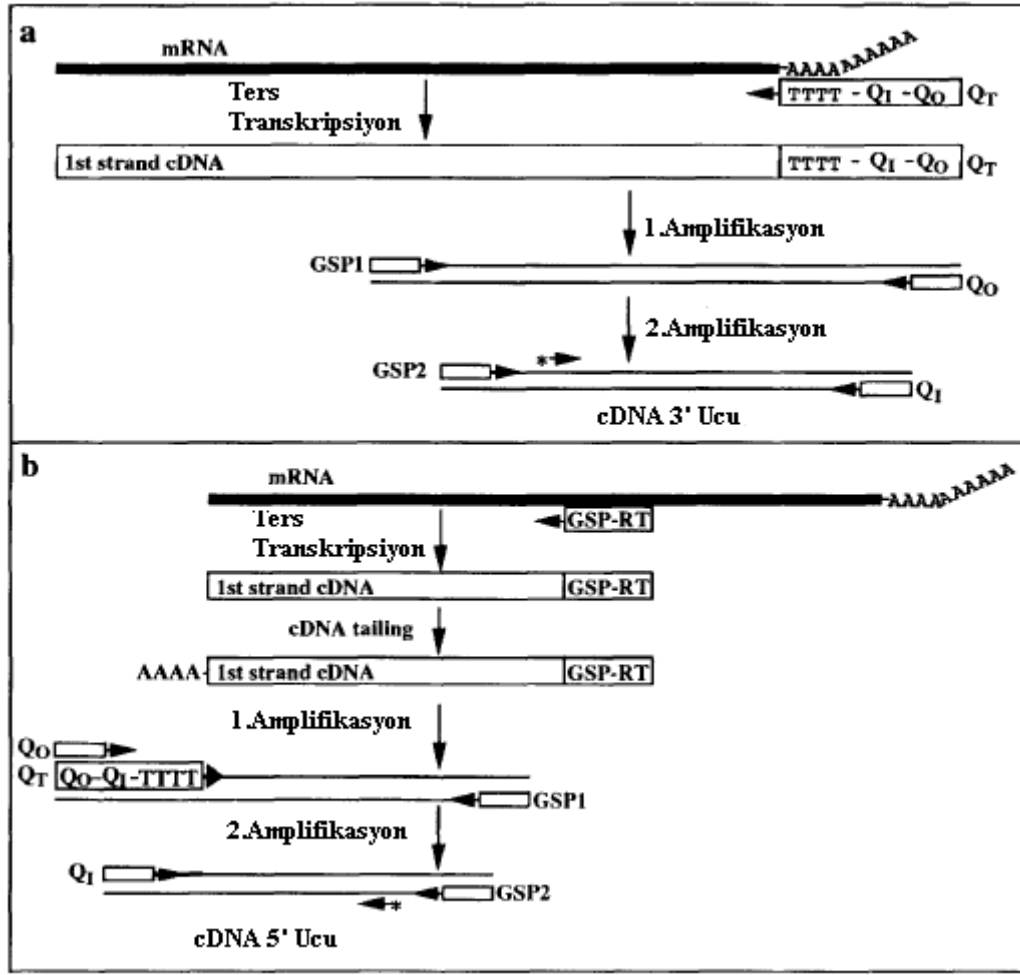
### 2.13 RACE

RACE ( Rapid Amplification of cDNA Ends) , kelime anlamı olarak cDNA uçlarının hızlı çoğaltımı olup, dizinleri tam olarak bilinmeyen cDNAların uzatılarak tam uzunlukta cDNAlar elde edilmesine yarayan PCR temelli bir yöntemdir. Bu yöntemin kullanılabilmesi için , klonlanmak istenen genin küçük bir kısmının dizininin bilinmesi gerekmektedir [128].Dizini bilinen kısım kullanılarak gene özgü bir primer tasarlanır. Bu primer aracılığı ile RNA'dan cDNA sentezlenir. cDNA'nın ucuna Poly A kuyruğu takıldıktan sonra, T kuyruklu primer ve gene özgü primer ile çoğaltım yapılır [129]. RACE yöntemi Şekil 2.2'de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.2 RACE metodunun şematik gösterimi [128].  
(GSP: Gene özgü primer)(RT:Reverse Transkriptaz)

Kullanılan primerler ve reaksiyonun işleyişi açısından 3' RACE ve 5' RACE olarak 2 'ye ayırmak mümkündür. 3'RACE ve 5' RACE şekil 2.3'de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.3 RACE metodunun şematik gösterimi  
a – 3'RACE , b- 5'RACE [129]

### **2.13.1 3'RACE**

Öncelikle Total RNA'dan 3'RACE yöntemi ile cDNA sentezlettirildi. En son aşamada dizin analizine gönderilen örneklerin Blast analizleri sonucunda istenilen CBF benzerlikleri oluşmadığından mRNA kalıp olarak kullanılmak üzere 3'RACE yöntemi tekrarlanmıştır.

#### **2.13.1.1 Total RNA'dan cDNA Sentezi**

Soğuk stresi verilmemiş, 1 günlük soğuk stresi verilmiş,1 haftalık soğuk stresi verilmiş ve 10 günlük soğuk stresi verilmiş total RNA kalıp olarak kullanılarak Invitrogen 3'RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı gibi cDNA sentezi yapıldı. 4 µg mRNA steril su ile 11 µl'ye tamamlandı ve AP primeri (500nM) eklendi. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. 10x PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), dNTP (500µM), DTT (10 mM) eklenip 42 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyona 200 U Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 42 °C'de 90 dakika ve 70 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 2 U RNase H eklenerek 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

#### **PCR Reaksiyonu**

200 µl lik PCR tüpü içerisinde 2 µl kalıp cDNA, dNTP(200 µM), RF1 ve RF2 primer (200 nM) ve AUAP primer (200 nM), 2,5U Polimeraz enzimi koyulup, 50 µl'ye tamamlandı. Taq Polimeraz enzimi PCR karışımı 94<sup>0</sup> C'ye ulaştıktan sonra ve 1 dakika geçtikten sonra reaksiyona eklenmiştir.

PCR Döngüsü:

94<sup>0</sup> C de 3 dakika denatüre edildikten sonra,

94<sup>0</sup> C 15 saniye denatürasyon,

55<sup>0</sup> C 30 saniye primer bağlanması

72<sup>0</sup> C 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı.

72<sup>0</sup> C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp, -20<sup>0</sup> C de saklandı.

Daha parlak bantlar elde etmek üzere yapılan 1.PCR'dan elde edilen PCR ürünlerinden 1 µl kullanılarak PCR aynı koşullarda tekrarlanmıştır. Bu aşama sekonder PCR olarak adlandırılmaktadır.

Çizelge 2.1 3'RACE PCR Reaksiyonu 1 Kurulum Miktarları (µl)

	cDNA	Qiagen Taq Polimeraz	5X Qiagen Tamponu	10X Q Solüsyonu	dNTP	RF1	RF2	AUAP Primeri	PCR H <sub>2</sub> O
RF1	1	0,5	10	5	1	1	-	1	30,5
RF2	1	0,5	10	5	1	-	1	1	30,5

### DNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1 lik jel hazırlamak için 0,8 gr Agaroz (Aplichem) , 80 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60<sup>0</sup> C ' ye soğutulup içerisine etidyum bromid eklenerek jel tepsisine döküldü. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 V'ta 80 dakika yürütüldü.

### 2.13.1.2 mRNA'dan cDNA Sentezi

1 haftalık soğuk stresi verilmiş mRNA kalıp olarak kullanılarak Invitrogen 3'RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı gibi cDNA sentezi yapıldı. 4 µg mRNA steril su ile 11 µl'ye tamamlandı ve AP primeri (500nM) eklendi. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. 10x PCR Buffer, MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), dNTP (500µM), DTT (10 mM) eklenip 42 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyona 200 U Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 42 °C'de 90 dakika ve 70 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 2 U RNase H eklenerek 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

### PCR Reaksiyonu

200 µl lik PCR tüpü içerisinde 2 µl kalıp cDNA, dNTP(200 µM), RF1 ve RF2 primer (200 nM) ve AUAP primer (200 nM), 2,5U Polimeraz enzimi koyulup, 50 µl'ye tamamlandı.

Taq Polimeraz enzimi PCR karışımı 94<sup>0</sup> C'ye ulaştıktan sonra ve 1 dakika geçtikten sonra reaksiyona eklenmiştir.

PCR Döngüsü:

94<sup>0</sup> C de 7 dakika denatüre edildikten sonra,

94<sup>0</sup> C 30 saniye denatürasyon,

56<sup>0</sup> C 30 saniye primer bağlanması

72<sup>0</sup> C 30 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı.

72<sup>0</sup> C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp, -20<sup>0</sup> C de saklandı.

Çizelge 2.2 3'RACE PCR reaksiyonu kurulum miktarları (µl)

	Qiagen enzimi RF1 ile	Qiagen enzimi RF2 ile	Fermentas enzimi RF1 ile	Fermentas enzimi RF2 ile	Fermentas + DMSO+RF1	Fermentas + DMSO+RF2
cDNA	2	2	2	2	2	2
Qiagen Tamponu	5	5	-	-	-	-
Q solüsyonu	10	10	-	-	-	-
LongPCR Tamponu	-	-	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	-	-	3	3	3	3
DMSO Dimetilsülfoksit	-	-	-	-	2,5	2,5
dNTP	1	1	1	1	1	1
Qiagen Enzimi	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fermentas Enzimi	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5
RF1 Primeri	1	-	1	-	1	-

RF2 Primeri	-	1	-	1	-	1
AUAP Primeri	1	1	1	1	1	1
PCR H <sub>2</sub> O	29,5	29,5	36,5	36,5	34	34

### **DNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi**

%1 lik jel hazırlamak için 0,8 gr Agaroz (Aplichem) , 80 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60<sup>0</sup> C ' ye soğutulup içerisine etidyum bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 V'ta 80 dakika yürütüldü.

### **2.13.2 5'RACE**

#### **2.13.2.1 Total RNA'dan cDNA Sentezi**

Soğuk stresi verilmemiş,1 haftalık soğuk stresi verilmiş ve 10 günlük soğuk stresi verilmiş RNA'lardan Invitrogen 5'RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde cDNA sentezi yapıldı. 4 µg total RNA'ya SP1 (100nM) eklenip steril su ile 15,5 µl'ye tamamlandı. 10 dakika 70 °C'de denatüre edildi. 10 PCR buffer, MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), dNTPs (400µM), DTT (10mM) eklenerek hacim 24 µl'ye tamamlandı. 42 °C'de 1 dakika inkübe edilip 200U ters transkriptaz enzimi eklendi. 90 dakika 42 °C'de, 70 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Karışım kısa süre santrifüj edilip 37°C'ye yerleştirildi ve 1 µl RNase karışımı eklendi.

#### **2.13.2.2 cDNA'nın Saflaştırılması**

cDNA'nın saflaştırılması 5'RACE kiti dâhilindeki S.N.A.P. kolonlar kullanılarak kullanım kılavuzunda anlatıldığı gibi yapıldı.



### **2.13.2.3 cDNA'ya TdT Kuyruğu Takılması**

200 µl'lik tüplerde 6 µl DEPC ile muamele edilmiş su, 5x Tailing Buffer, dCTP (200 µM) ve 10 µl saflaştırılmış cDNA karıştırıldı. 94 °C'de 3 dakika inkübe edildikten sonra, 1 µl TdT eklendi. 37 °C'de 10 dakika ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

### **2.13.2.4 PCR Reaksiyonu**

5 µl kalıp cDNA, 10x Qiagen PCR Buffer, 5x Q Solution, dNTPs (200 µM), SP1 primeri (400 nM) ve AAP primeri (400 nM), 2,5U Taq Polimeraz enzimi koyulup, 50 µl'ye su ile tamamlandı.

PCR Döngüsü:

94 °C'de 2,5 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 90 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C'lik son uzatma aşaması yapıldı. Reaksiyonlar buz üzerine alınarak -20 °C'ye kaldırıldı.

### **DNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi**

%1 lik jel hazırlamak için 0,8 gr Agaroz (Aplichem) , 80 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60<sup>0</sup> C ' ye soğutulup içerisine etidyum bromid eklenerek jel tepsinine döküldü.

Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 V'ta 80 dakika yürütüldü.

## **2.14 Klonlama Aşamaları**

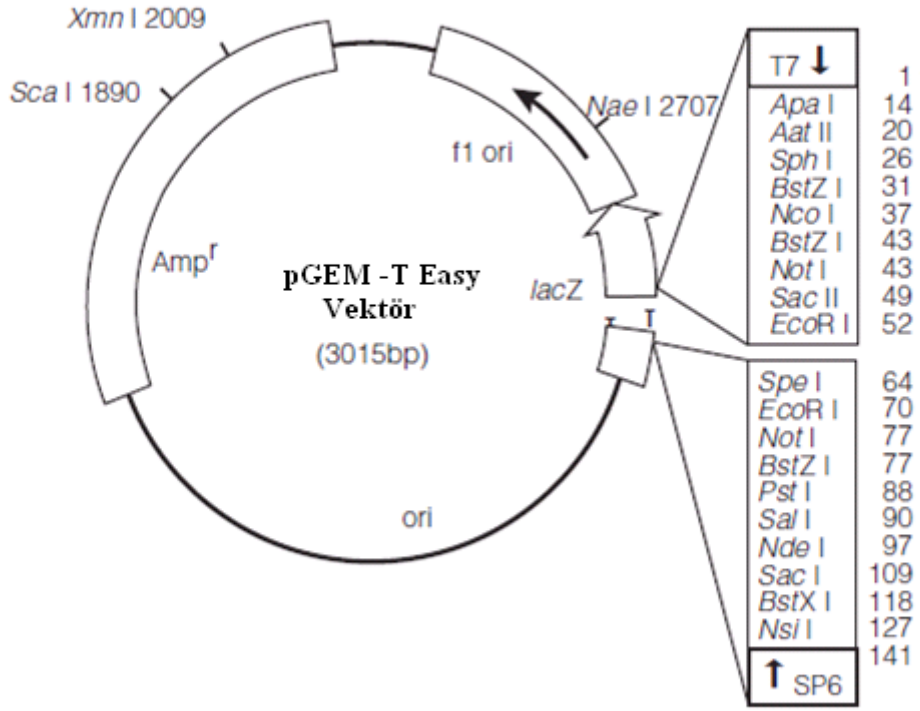
### **2.14.1 PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması**

PCR ürünlerinin pürifikasyonu Qiaquick Jel Ekstraksiyon Kiti ile kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde yapıldı. Fragman agaroz jelden bistüri yardımı ile kesilip 2 ml'lik tüplere alındı. Jel hacminin 3 katı kadar QG tamponu eklenip 50 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. QIAquick kolonlarına aktarılarak 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. 0,5 ml QG tamponu eklenip 17900 xg hızda santrifüj edildi. Bu basamak bir kez daha tekrar edildi. 0,75 ml PE tamponu eklenip 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. QIAquick kolonları 1,5 ml'lik temiz

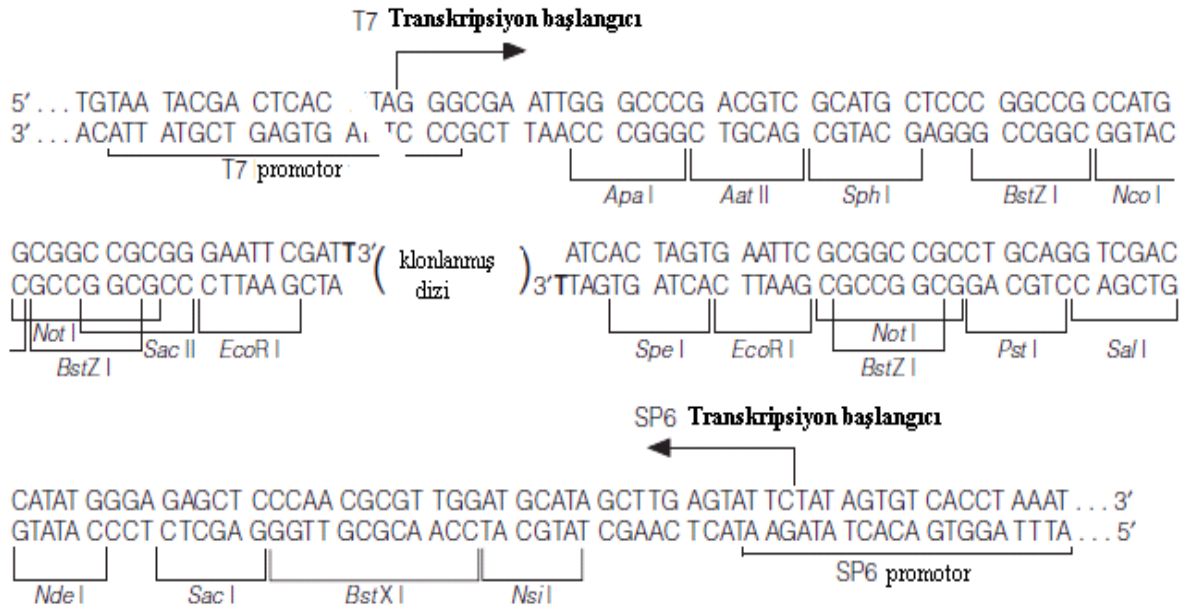
tüplere alınarak 15 µl steril su eklenerek 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. Aynı filtre kullanılarak 15 µl steril su ile örneklerin 2.elüsyonları da aynı şekilde hazırlandı.

### 2.14.2 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

Pürifiye edilmiş PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. pGEM-T Easy vektörünün Şematik gösterimi Şekil 2.4' de ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 2.5'de verilmiştir (Promega Vektör Kullanım Kılavuzu ).



Şekil 2.4 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.5 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi

### 2.14.2.1 Ligasyon Reaksiyonu

Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği şekilde hazırlanmıştır. Ligasyon reaksiyonları kurularak 4 °C de 24 saat inkübe edildi. Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi vektör DNA'sı ile cDNA oranları 1/3 ve 1/2 arasında olacak şekilde hazırlandı. Ligasyonlar, 4 °C'de 24 saat inkübe edildi. Örnek reaksiyon kurulumu Çizelge 2.3'de gösterilmektedir. Miktarlar klonlanacak cDNA konsantrasyon ve boyutuna göre Promega vektör klavuzundaki formüle bağlı olarak değişmektedir.

Çizelge 2.3 Ligasyon reaksiyonu kurulmasında kullanılanlar ve miktarları (µl)

	Standart
2X Ligasyon Buffer	5 µl
pGEM T Easy Vektör	0,5 µl
DNA Ligaz	1 µl
PCR Ürünü	3,5 µl
H2O	1,5 µl
TOPLAM	10 µl

### 2.14.3 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Ultra kompetan hücreler Inoue ve arkadaşlarının (1990) [130] optimize ettiği protokoldeki gibi hazırlandı. 250ml SOB içersine katı besiyerinde 16 saat büyütülen E.coli DH5α kolonilerinden 5–10 koloni ekilerek 22 °C de 20–24 saat kadar OD<sub>600</sub>, 6,6 ya ulaşana kadar büyütüldü. 10 dakika buzda bekletildikten sonra 3000xg hızda 4 °C de 10 dakika santrifüjlendi. 80 ml soğuk TB içersinde çözülüp, 10 dakika buzda bekletildi.

3000 xg hızda 4 °C de 10 dakika santrifüjlendikten sonra 80 ml soğuk TB içerisinde çözülüp % 7 si kadar DMSO ilave edildi. 10 dakika buzda bekletilerek, sıvı azot ile dondurularak -80 °C de saklandı.

#### **2.14.4 Transformasyon**

##### **2.14.4.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması**

2.14.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ultra kompetan hücrelerden 200µl'si ile vektöre bağlanmış DNA dan 5 µl'si karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 42 °C' de 1 dk tutulduktan sonra buzun üzerine alınarak 300 µl SOC ilave edilerek, 37 °C'de 250 rpm hızda 1 saat büyütüldü.

Transformasyon karışımı katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 °C'de 16 saat büyütüldü. Katı besi yerleri içine plazmid almış kolonilerin seçimi için 100 µg/ml Ampisillinle ve rekombinant plazmidlerin seçimi için 0,5mM IPTG ve 30 µg/ml X- GAL içermektedir.

Mavi renkte gözlemlenen koloniler içlerine cDNA almadan kapanmış plazmidleri bulunan hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise cDNA'ları alarak kapanmış plazmidler bulunan hücrelerden oluşmaktaydı.

##### **2.14.5 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi**

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA'yı taşıyıp taşımadıkları kontrol etmek amacı ile koloniler kürdanla alınarak 100 µl su içerisinde çözülür. 100 °C'de 10 dakika tutulduktan sonra, 1,5 µl'si kalıp olarak kullanıldı. 10x Qiagen PCR Buffer, 5x Q Solution, dNTPs (0,625 mM), ileri primer (0,625 mM) ve geri primer (0,625 mM) primer, 2,5U Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) koyulup 50 µl'ye tamamlandı. Koloni PCR yapıldı. Koloni PCR koşulları 2.13.1.2'de belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek çizgi ekim yapılarak, 37 °C'de 16 saat büyütüldüler.

2.13.1.2'de bahsedilen mRNA'dan yapılan cDNA'nın PCR örneklerinin transformasyonu sonucu PCR ürünlerinin kullanılan pGEM-Teasy vektörüne içine eklenip eklenmediğini kontrol etmek amacıyla Çizelge 2.4'de miktarları verilen 4 farklı kombinasyonda PCR reaksiyonu kuruldu. Strateji belirlenirken pGEM-T easy vektöründe PCR ürününü içine alan bölgenin iki ucunda bulunan Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'de gösterilen T7 ve SP6 primerleri ile gene özgün primer kullanılmıştır. Farklı primerler ile PCR yapılmasının nedeni hangi primer kombinasyonunun bir arada iyi çalışılacağına bilinmemesidir.

1.kombinasyon:SP6+RF1 primeri 2.kombinasyon:T7+RF2 primeri 3.kombinasyon:  
T7+RF1 primeri 4.kombinasyon: SP6+RF2 primeri şeklinde belirlenmiştir.

Çizelge 2.4 1.Koloni PCR ve 2.Koloni PCR reaksiyonu madde ve miktarları (µl)

1.Koloni Pcr	RF1 primeri örnekleri	RF2 primeri örnekleri	2.Koloni Pcr	RF1 primeri örnekleri	RF2 primeri örnekleri
Örnek	2	2	Örnek	2	2
Qigen Polimeraz	0,4	0,4	Qigen Polimeraz	0,4	0,4
PCR tamponu	5	5	PCR tamponu	5	5
Q Solüsyonu	10	10	Q Solüsyonu	10	10
RF1	1	-	RF1	1	-
RF2	-	1	RF2	-	1
<b>SP6</b>	<b>1</b>	-	<b>SP6</b>	-	<b>1</b>
<b>T7</b>	-	<b>1</b>	<b>T7</b>	<b>1</b>	-
dNTP	1	1	dNTP	1	1
PCR H <sub>2</sub> O	29,6	29,6	PCR H <sub>2</sub> O	29,6	29,6
Total Hacim	50	50	Total Hacim	50	50

#### 2.14.6 Plazmit İzolasyonu

2.19.2'de anlatıldığı biçimde belirlenen kolonilerde büyüme görülürse, ampicilin (100 µg/ml) içeren 5ml Luria-Bertani 37 °C'de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı.

Kültür bitene kadar santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü, üzerine RNAz içeren süspansiyon çözeltisinden 250 µl ilave edilerek hücreler yeniden çözüldü. 250 µl Lizis çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 350 µl Binding çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 13000 xg hızda 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant filtrelere pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı atıldı. Yüksek nükleaz aktivitesini engellemek için, filtrelere 500 µl Yıkama Çözeltisi I pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Hücreleri yıkamak için filtrelere 700 µl Yıkama Çözeltisi II pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı atıldı ve filtre kurutulmak için 13000 xg hızda 1 dakika santrifüjlendi. DNA'yı filtreden ayırmak için filtre temiz tüpe alınıp, üzerine 75 µl Elution çözeltisi eklenip 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpe geçen DNA -20°C de saklandı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi, vektör içinde PCR ürünü bulunup bulunmadığı kontrol edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

#### **2.14.7 Plazmit Kontrol PCR**

pGEM-T easy vektörünün iki ucunda bulunan T7 ve SP6 promotor kısımlarından tasarlanan T7 ve SP6 primerleri ile plazmitlerin PCR ürünü içinde bulundurup bulundurmadıklarını kontrol etmek için plazmitler kalıp olarak kullanılarak PCR yapıldı. Primerler hariç diğer tüm koşullar 2.13.1.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.



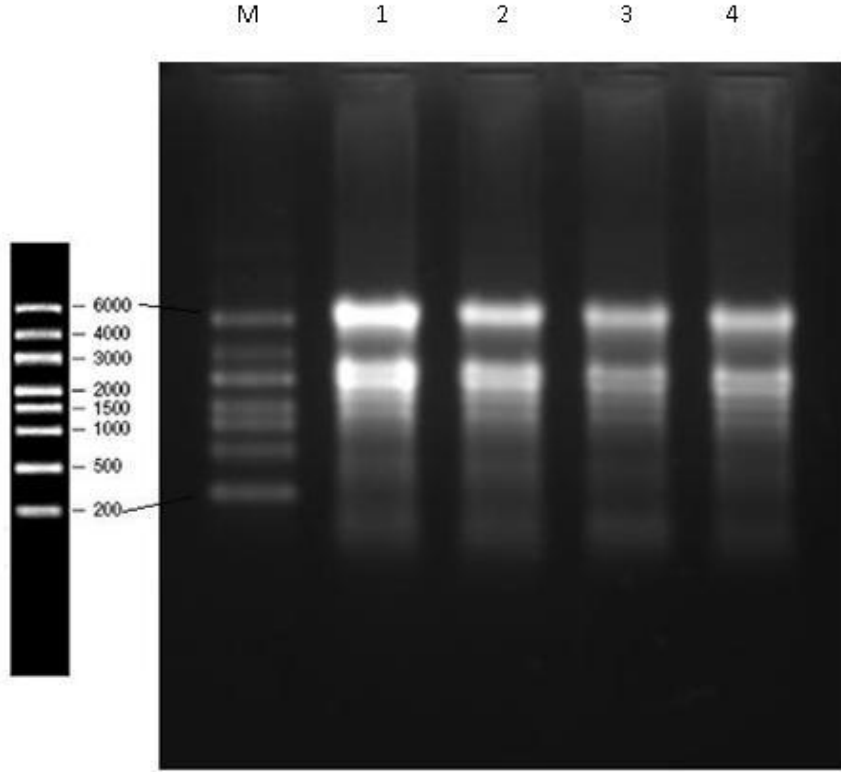
### SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 2.1 Bitki Örneklerinin Alınması

Bitkiye stres verilmeden önce yaprak örnekleri alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklandı. Örnek alınmasından sonra bitki 2.10'da belirtilen stres koşulları uygulandı. 15 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 12 saat, bir gün, bir hafta ve on gün örnekleri alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve  $-80^{\circ}\text{C}$  'de saklandı.

#### 3.2 RNA İzolasyonu

Yapraklardan RNA izolasyonu 2.11'de anlatıldığı biçimde yapıldı. 2.12.1'de hazırlanışı anlatılan %1'lik formaldehit jeline yüklenerek (Şekil 3.1) kalitesi belirlendi.

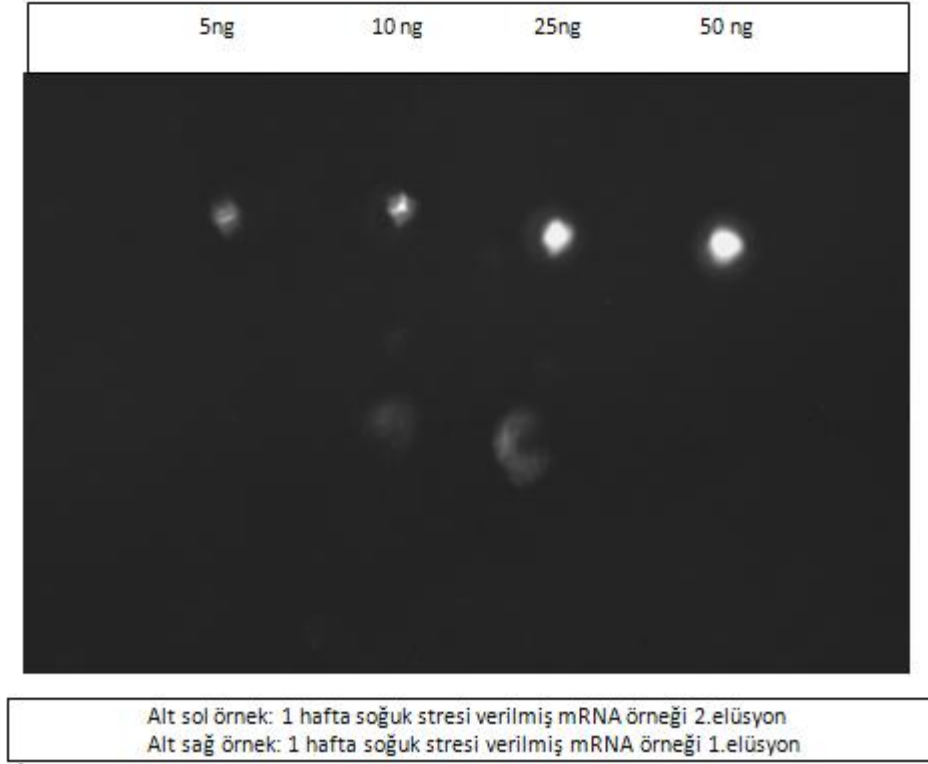


şekil 3.1 RNA'ların %1'lik formaldehit jeli üzerinde görüntenmesi

M: High Range RNA Ladder, 1. Kontrol RNA örneği, 2. 1 gün soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 3. 1 hafta soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 4. 10 gün soğuk stresi verilmiş örnek

### 3.3 mRNA Analizi

Zeytin bitkisinin yapraklarından elde edilen total RNA'dan mRNA izolasyonu 2.12.2' de anlatıldığı biçimde yapıldı. 2.12.3'de anlatıldığı üzere spot test uygulandı. mRNA spotlarının UV ışığı altında görüntenüsü konsantrasyonu bilinen bir mRNA' nın görüntenüsü ile karşılaştırılarak mRNA miktarları belirlendi.



Şekil 3.2 Zeytin bitkisinin yapraklarından izole edilen mRNA örnekleri

### 3.4 Primer Tasarlanması

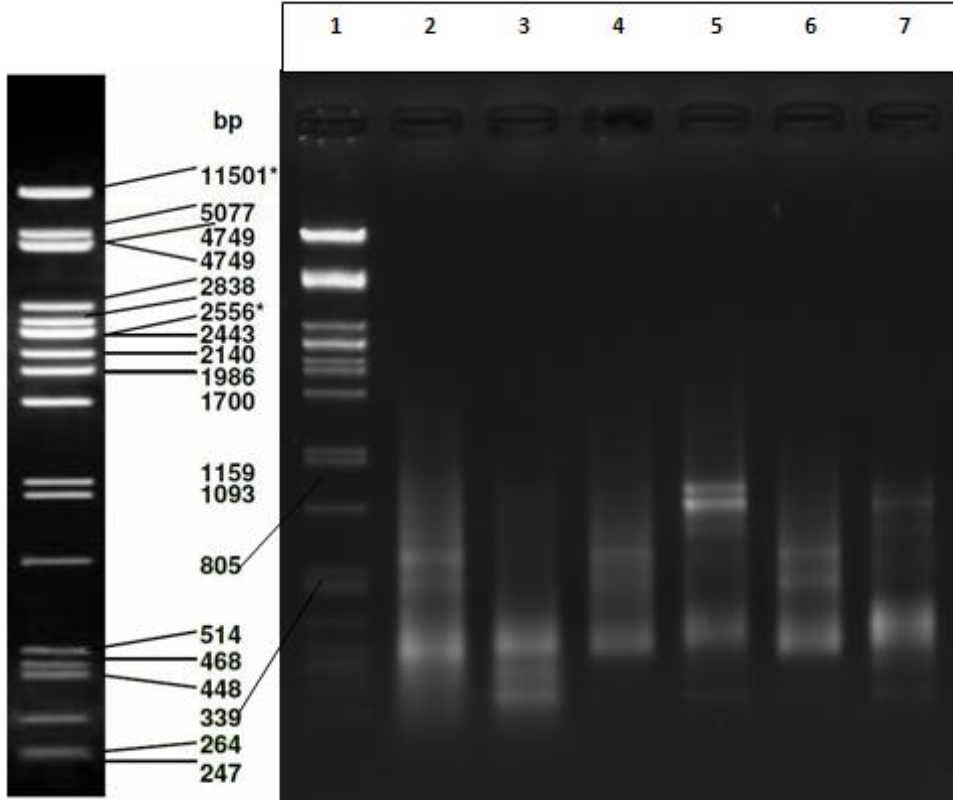
Laboratuvarımızda daha önceden yapılmış olan deneyler sonucunda dizin analizinden gelen sonuçlardan Şekil 3.3'de nükleotit sıralaması verilen GCFR1 dizini kullanılarak 3'RACE'de kullanılmak üzere Bölüm 2.7'deki çizelgede dizinleri verilen RF1 ve RF2 primerleri tasarlanmıştır. (Şekil 3.3'de kalın yazılan kısım RF1; altı çizili kısım RF2'yi göstermektedir.



### 3.5 3'RACE İle İlgili Sonuçlar

#### 3.5.1 Total RNA'dan 3'RACE PCR Ürünlerinin Analizi

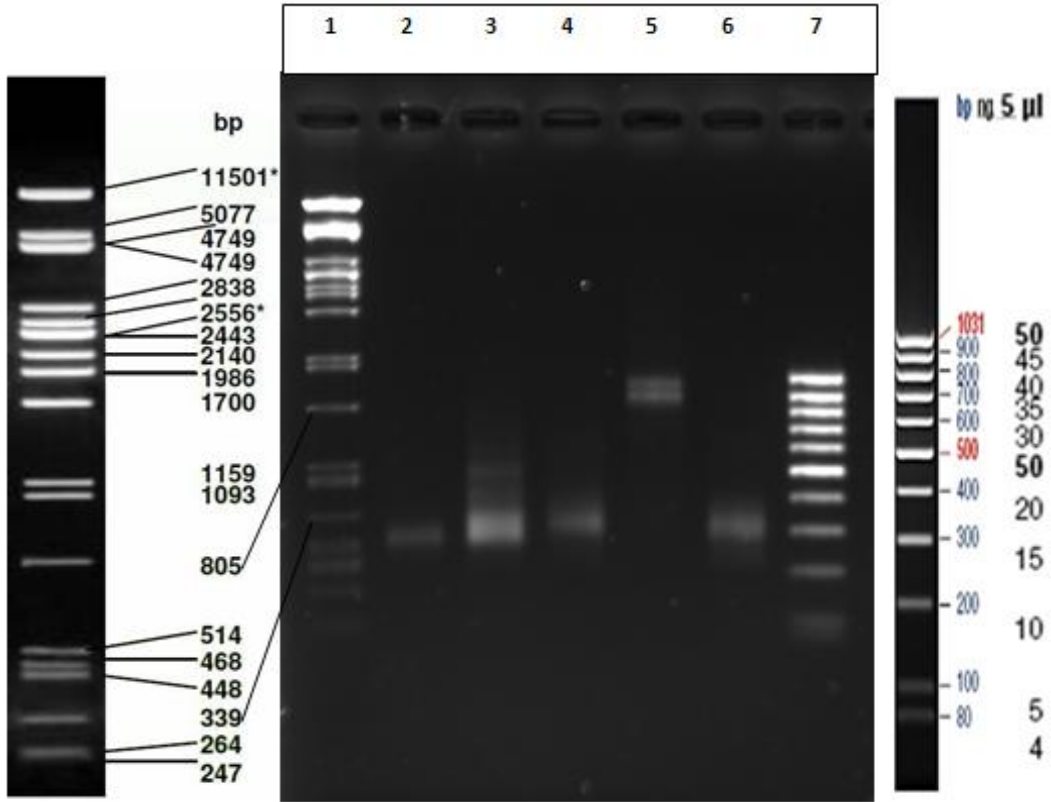
2.13.1.1'de anlatıldığı gibi Invitrogen RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde cDNA sentezi yapıldı. Bu cDNA kalıp olarak kullanılarak 2.13.1.1'de belirtilen koşullarda sekonder PCR yapıldı.



Şekil 3.5 Total RNA'dan 3'RACE cDNA sentezi sonrası yapılan sekonder PCR görüntüsü

1.  $\lambda$  PstI
2. Stres verilmemiş RNA'dan RF1 primeri ile (kısaltılmışı:ORF1)
3. Stres verilmemiş RNA'dan RF2 primeri ile (ORF2)
4. 1 hafta stres verilmiş RNA'dan RF1 primeri ile (HRF1)
5. 1 hafta stres verilmiş RNA'dan RF2 primeri ile (HRF2)
6. 10 gün stres verilmiş RNA'dan RF1 primeri ile (ONRF1)
7. 10 gün stres verilmiş RNA'dan RF2 primeri ile (ONRF2)

### 3.5.1.1 PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması



Şekil 3.6 Saflaştırılmış Total RNA 3'RACE Sekonder PCR'ların jel görüntüsü

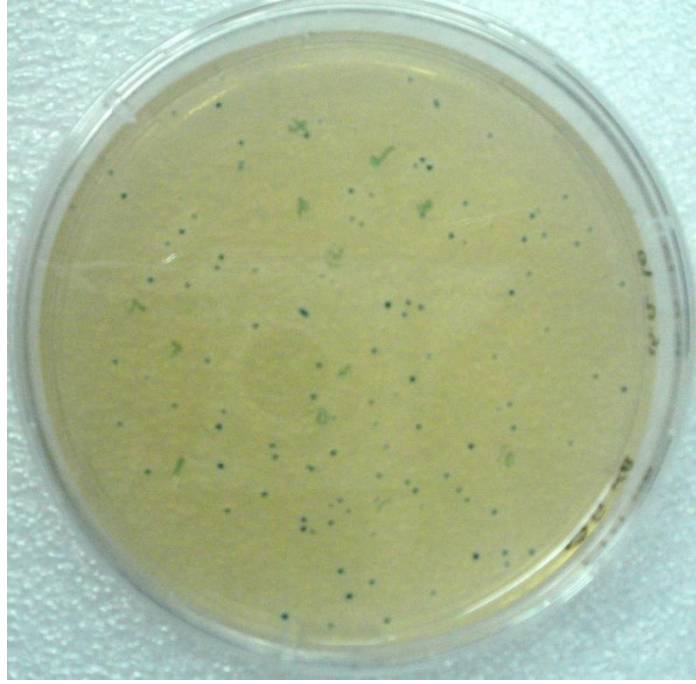
1.  $\lambda$  PstI 2.1 hafta stres verilmiş RNA'dan RF1 primeri ile (kısaltılmışı:HRF1)
3. 10 gün stres verilmiş RNA'dan RF1 primeri ile (ORF1)
4. 1 hafta stres verilmiş RNA'dan RF2 primeri ile küçük bant (HRF2KB)
5. 1 hafta stres verilmiş RNA'dan RF2 primeri ile büyük bant (HRF2BB)
6. 10 gün stres verilmiş RNA'dan RF2 primeri ile (ONRF2)
7. DNA miktar cetveli

### 3.5.1.2 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren ve jelden saflaştırılan Şekil 3.6'da bulunan jelde 2,3,4,5 ve 6 numaralı sırada görülen örnekler 2.14.2'de anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

### 3.5.1.3 Transformasyon

2.14.4'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 3.7 Transformasyon sonrası oluşan tek kolonilerin mavi beyaz seçiliminin görüntüsü

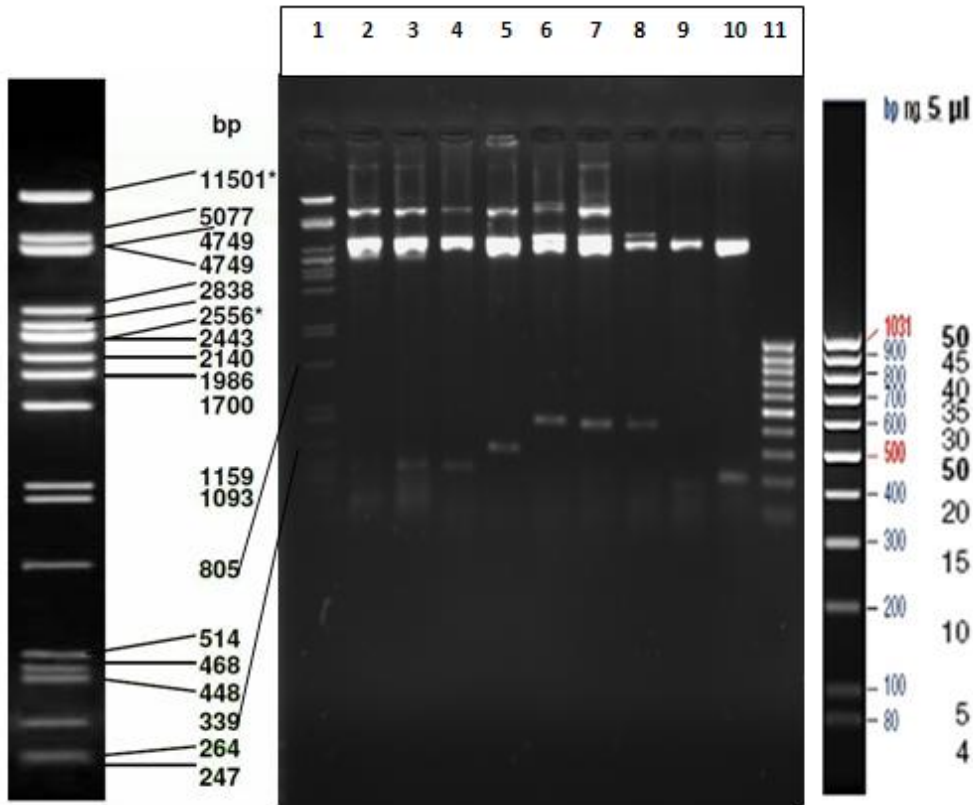


Şekil 3.8 Transformasyonlardan seçilen örneklerin çizgi ekimi görüntüsü

### 3.5.1.4 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.14.6'de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

İzole edilen plazmitler EcoR1 enzimi ile kesilerek içinde cDNA barındırıp barındırmadıkları tespit edildi.



Şekil 3.9 3'RACE ve 5'RACE PCR ürünlerini bulunduran plazmitlerin EcoR1 ile kesim reaksiyonları

- 1.λPst2.HRF1/5
- 3.HRF1/6
- 4.HRF2KB4
- 5.ONRF1/2
- 6.HSP1BB7
- 7.HSP1BB8
- 8.HSP1BB9
- 9.HSP1KB11
- 10.ONRF1/1

### 3.5.1.5 Dizin Analizi ve Blast Sonuçları

Total RNA'lardan elde edilen Şekil 3.9'da görülen PCR ürünleri klonlanarak dizin analizine gönderildi. Dizin analizinden gelen sonuçlar Chromas programı ve NCBI internet sitesi kullanılarak nükleotit düzeyinde BLAST yapıldı. Benzerlikler saptanmaya



çalışıldı.Yapılan bu analizler sonucunda klonlanan fragmanlarla CBF geni arasında benzerliğe rastlanmadı. Örneklerin dizin analizine gönderildiği firmadan kaynaklı yanlış okunma olabileceği de düşünüldüğünden daha sonra klonlanan fragmanlar analiz için farklı firmaya gönderilmiştir.Örneklerin bazılarının benzerlik göstermiş olduğu organizmalar Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 Total RNA’dan 3’RACE PCR ürünlerinin BlastN sonuçları

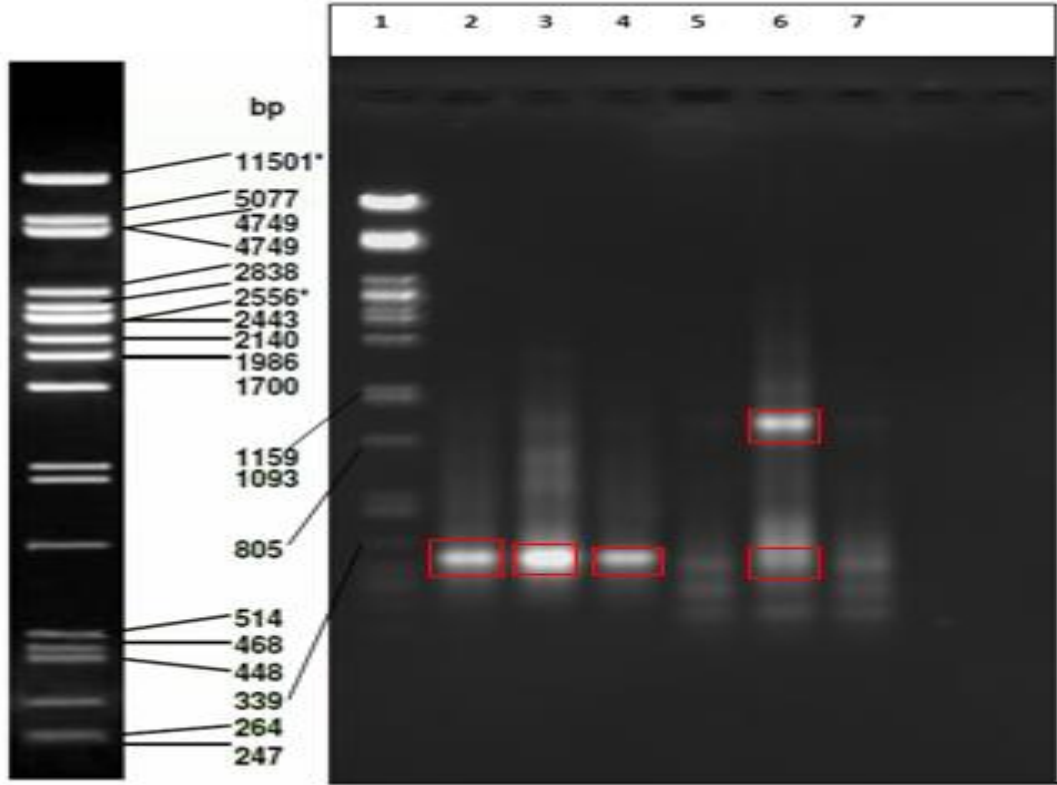
İsim	Primerler	Dizin Uzunluğu	RNA	BLASTN	Skor
ONRF1/2	RF1-AUAP	299	10 günlük stres verilmiş	<i>Hordeum vulgare</i> Alt tür. vulgare cDNA klon	46.4
HRF1/6	RF1-AUAP	219	1 hafta stres verilmiş	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA klon	68

Çizelge 3.2 Dizin analizine gönderilen örneklerin isimlendirilmesi

Transformasyon	Plazmitlere Verilen İsim
1 haftalık RF1 primeri ile	HRF1/5,HRF1/6
10 günlük RF1 p.	ONRF1/2,ONRF1/1
1haftalık RF2 p.	HRF2KB4

### 3.5.2 mRNA’dan 3’RACE PCR Ürünlerinin Analizi

1 haftalık soğuk stresi verilmiş mRNA’lardan Invitrogen RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde cDNA sentezi yapıldı.

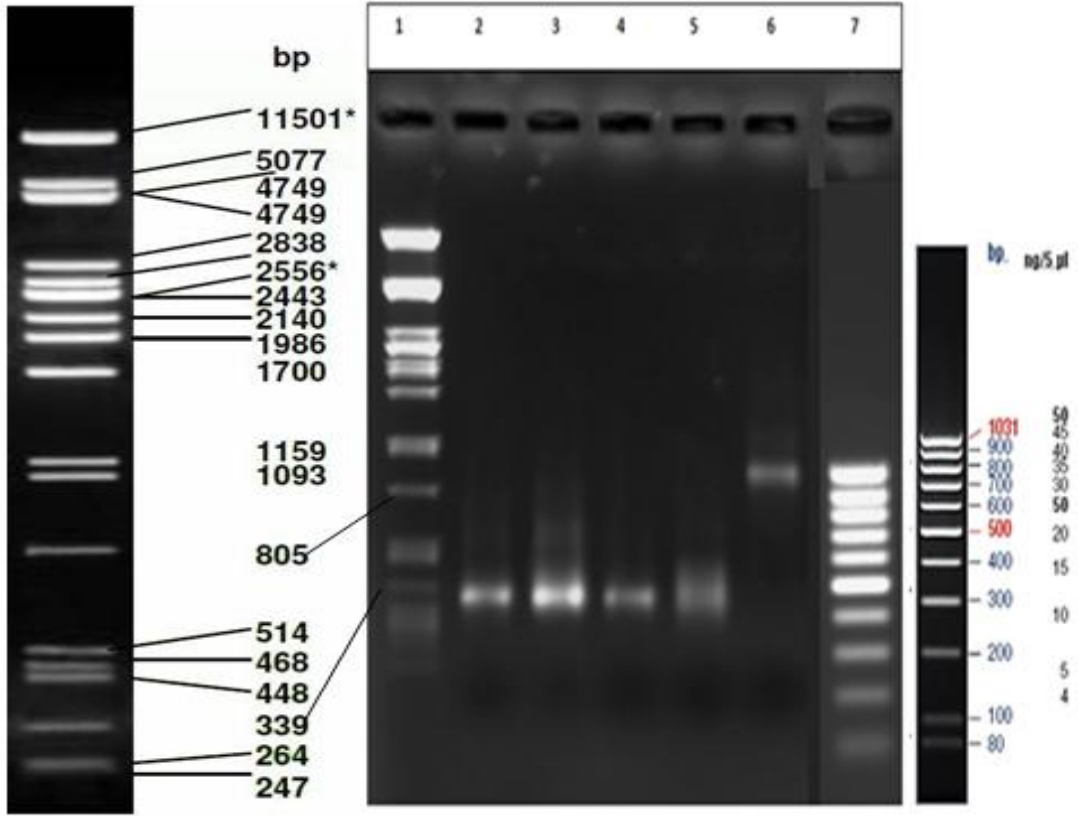


Şekil 3.10 3'RACE'in PCR reaksiyonununun %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.

1.  $\lambda$  PstI
2. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF1 primeri+Qiagen enzimi ile
3. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF1 primeri+Fermentas enzimi ile
4. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF1 primeri+Fermentas enzimi+DMSO
5. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF2 primeri+Qiagen enzimi ile
6. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF2 primeri+Fermentas enzimi ile
7. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF2 primeri+Fermentas enzimi+DMSO

### 3.5.2.1 PCR Ürününün Agaroz Jelden Safılaştırılması

QIAquick Gel Extraction Kiti protokolünde anlatıldığı şekilde Şekil 3.10'da kırmızı dikdörtgenler ile işaretlenmiş PCR ürünleri jelden kesilerek safılaştırıldı.



Şekil 3.11 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

1.  $\lambda$  PstI
2. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF1 primeri+Qiagen enzimi ile
3. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF1 primeri+Fermentas enzimi ile
4. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF1 primeri+Fermentas enzimi+DMSO
5. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF2 primeri+Qiagen enzimi ile
6. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF2 primeri+Fermentas enzimi küçük bant
7. 1 hafta stres verilmiş mRNA'dan RF2 primeri+Fermentas enzimi büyük bant
8. DNA miktar cetveli

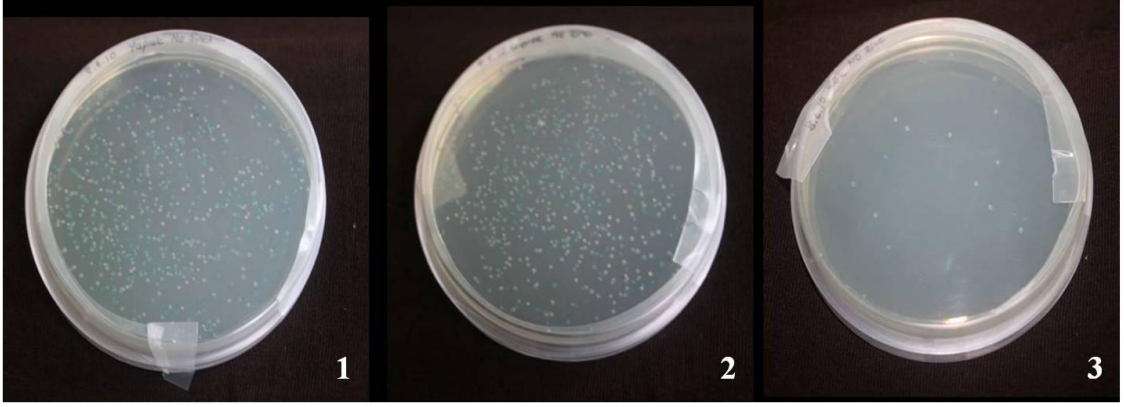
### 3.5.2.2 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren ve jelden saflaştırılan Şekil 3.9'de bulunan jelde 2,3,4,5 ve 6 numaralı sırada görülen örnekler 2.14.2'de anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

### 3.5.2.3 Transformasyon

2.14.4'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. 1 hafta stres verilmiş örneklerden yapılmış PCR sonucunda jelden kesilerek saflaştırılan PCR ürünleri sırasıyla RF1Q (RF1

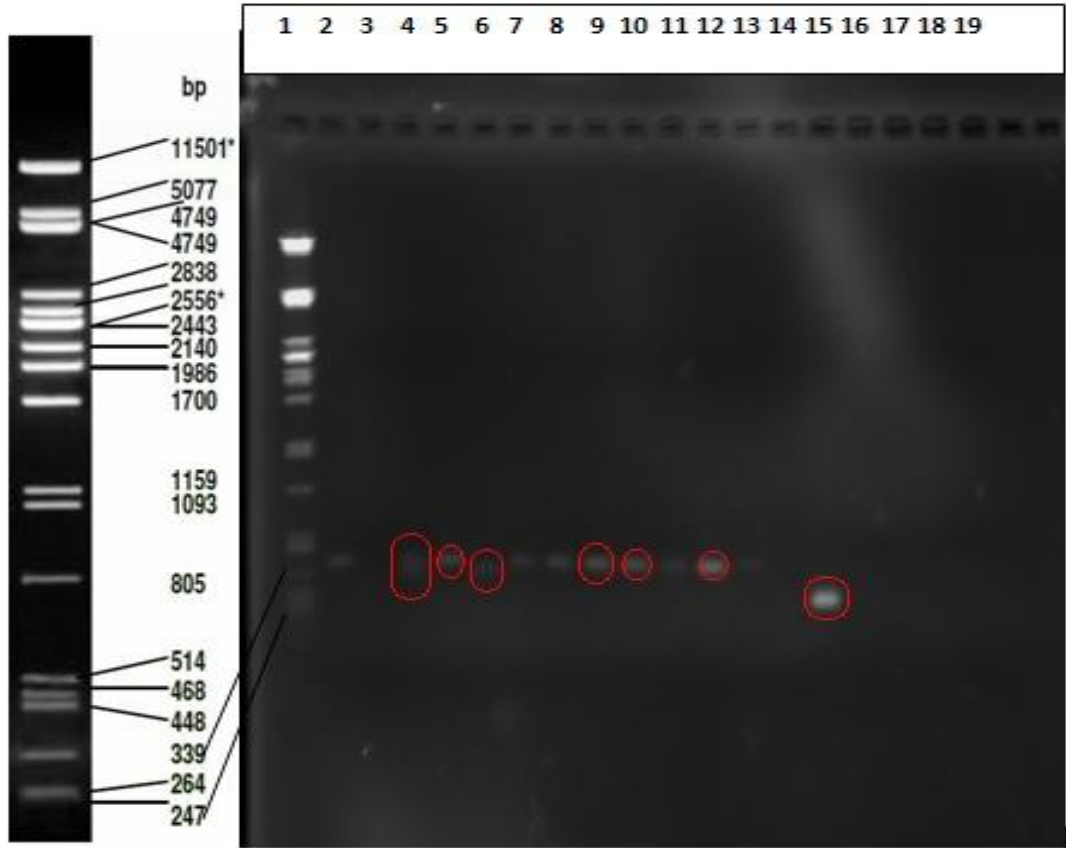
primeri+Qiagen enzimi ile), RF1F (RF1+Fermentas enzimi ile), RF1 F/D (RF1+Fermentas enzimi+DMSO), RF2Q (RF2 primeri+Qiagen enzimi ile),RF2FKB (RF2+Fermentas enzimi ile küçük boyuttaki bant), RF2FBB (RF2+Fermentas enzimi ile büyük boyuttaki bant) olarak isimlendirildi. Transformasyonlardan her bir örnek 300 µl olacak miktarda 3'er petriye yayıldı. 16 saat sonra her bir örneğe ait 3 petriden yaklaşık 10 tane beyaz tek koloni seçilip çizgi ekim yapıldı.



Şekil 3.12 Rekombinant kolonilerin Xgal varlığında mavi-beyaz seçilimi

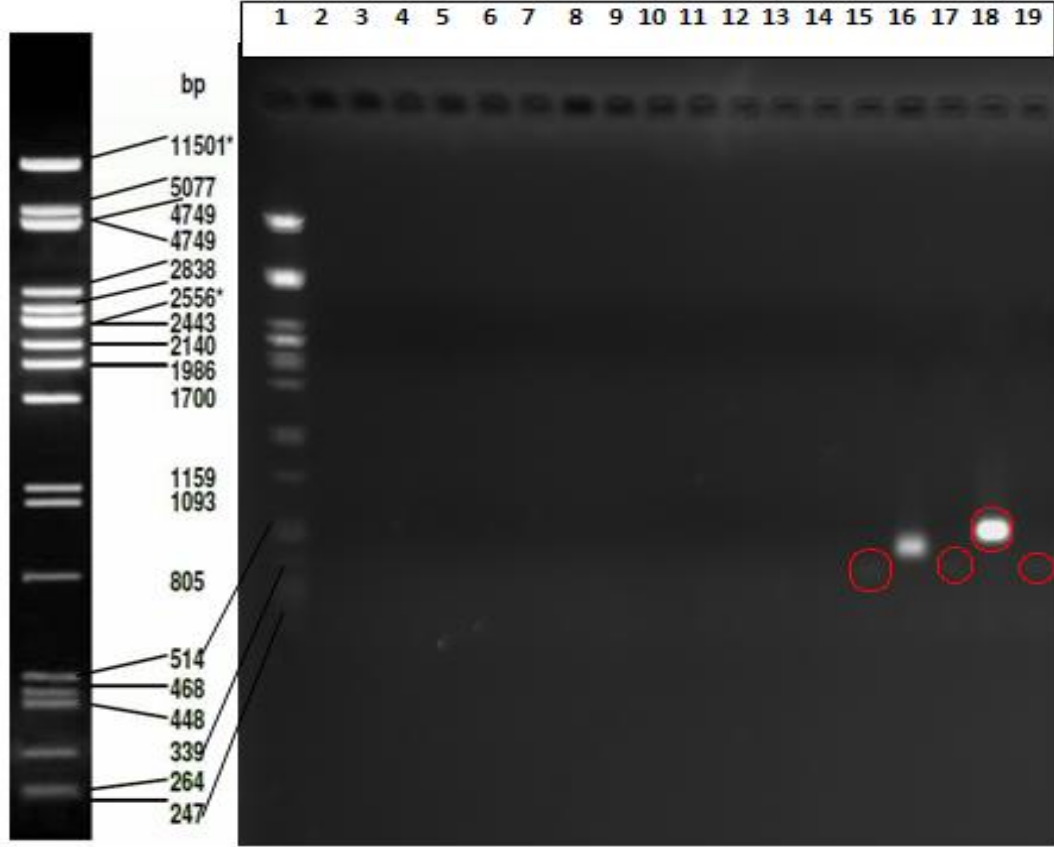
#### 3.5.2.4 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Çizgi ekimlerden 4 tane seçilip reaksiyonun etkinliğini kanıtlamak için 2.14.5'de anlatıldığı şekilde koloni PCR kuruldu (Çizelge 2.4).



Şekil 3.13 SP6+RF1 ve T7+RF2 primerleri ile kurulan koloni PCR'ın %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

1.Lambda PST 2.RF1 Q 1 SP6 3.RF1 Q 6 SP6 4.RF1 Q 10 SP6 5.RF1 Q 11 SP6 6.RF1 F 2 SP6 7.RF1 F 5 SP6 8.RF1 F 6 SP6 9.RF1 F 7 SP6 10.RF1 F/D 1 SP6 11.RF1 F/D 2 SP6 12.RF1 F/D 10 SP6 13.RF1 F/D 11 SP6 14.SP6+RF1 negatif kontrol 15.RF2 FKB 1 T7 16.RF2 FKB 2 T7 17.RF2 FKB 6 T7 18.RF2 FKB 7 T7 19.RF2 FBB 1 T7 20.T7+RF2 negatif kontrol



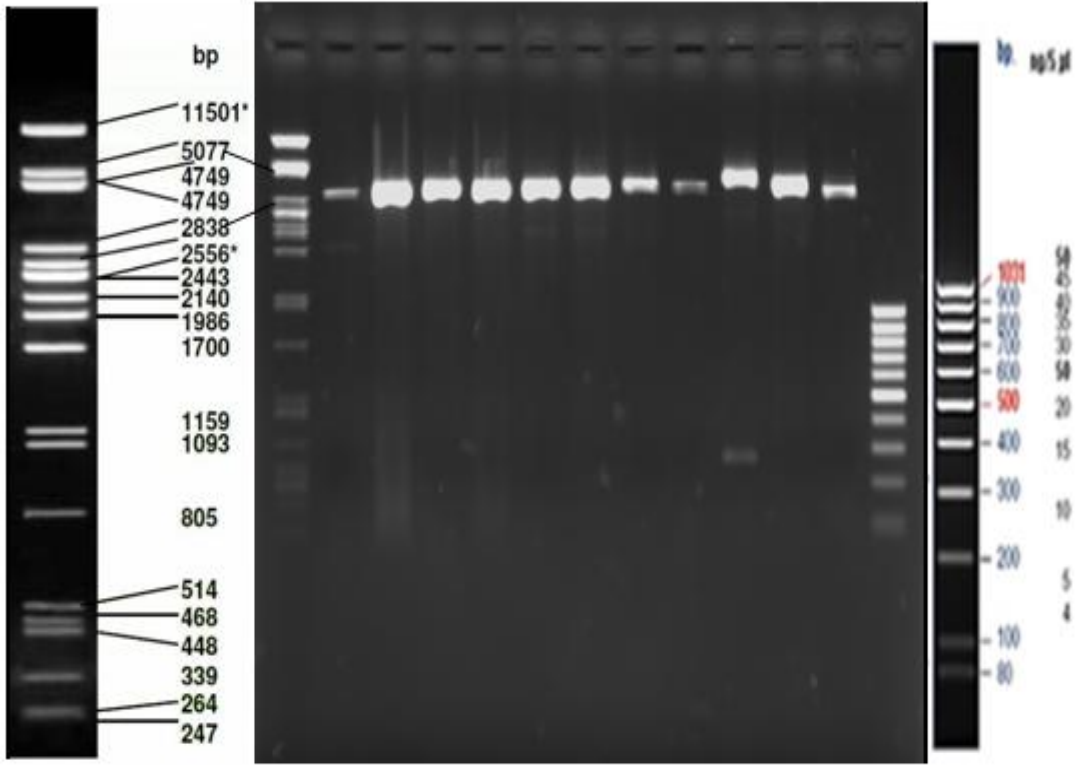
Şekil 3.14 T7+RF1 ve SP6+RF2 primerleri ile kurulan koloni PCR'ın %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

1.Lambda PST 2.RF1 Q 1 T7 3.RF1 Q 6 T7 4.RF1 Q 10 T7 5.RF1 Q 11 T7 6.RF1 F 2 T7  
7.RF1 F 5 T7 8.RF1 F 6 T7 9.RF1 F 7 T7 10.RF1 F/D 1 T7 11.RF1 F/D 2 T7 12.RF1 F/D 10  
T7 13.RF1 F/D 11 T7 14.T7+RF1 negatif kontrol 15.RF2 FKB 1 SP6 16.RF2 FKB 2 SP6  
17.RF2 FKB 6 SP6 18.RF2 FKB 7 SP6 19.RF2 FBB 1 SP6

### 3.5.2.5 Plazmit İzolasyonu

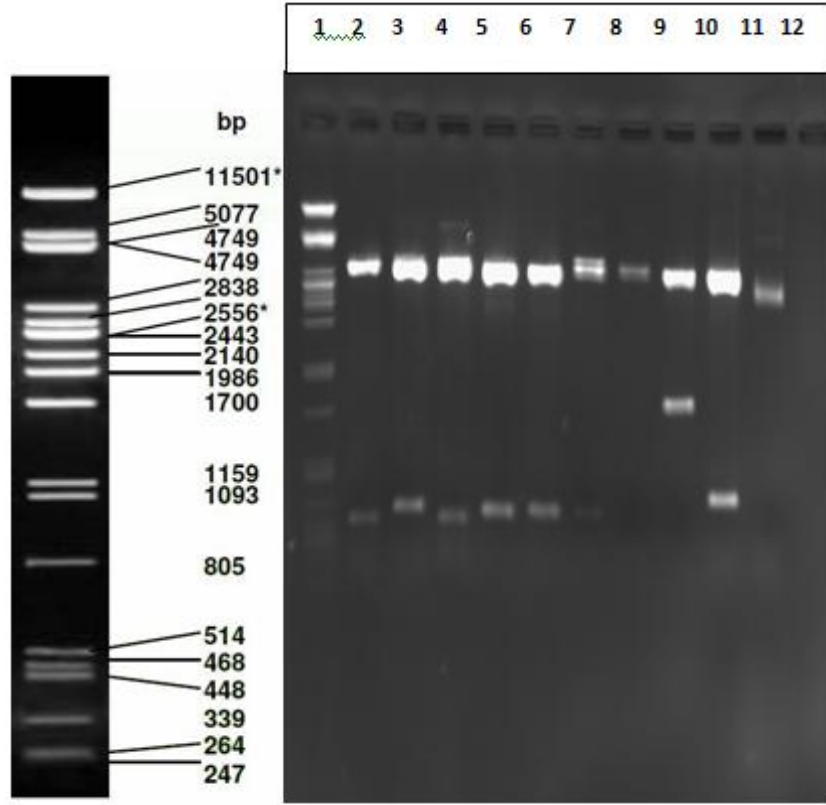
İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden ( Şekil 3.13 ve 3.14'de kırmızı daire ile işaretli olanlar) Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.14.6'da belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

İzole edilen plazmitler Pst I enzimi ile kesilerek lineer hale getirildi.



Şekil 3.15 Plazmitlerin PstI ile kesilmiş formlarının %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

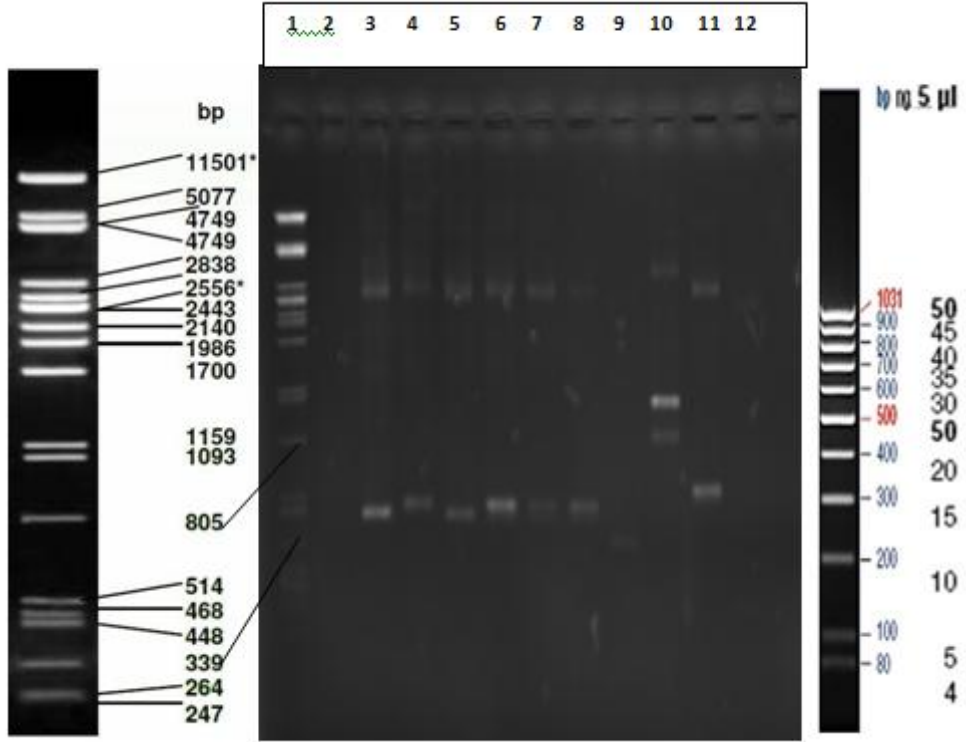
- 1.λ PstI
- 2.pGEM-T easy
- 3.RF1Q10
- 4.RF1Q11
- 5.RF1F2
- 6.RF1F7
- 7.RF1F/D1
- 8.RF1F/D10
- 9.RF2FKB1
- 10.RF2FKB6
- 11.RF2FKB7
- 12.RF2FBB1
- 13.DNA miktar cetveli



Şekil 3.16 Plazmitlerin EcoRI ile kesim reaksiyonlarının jel üzerinde görüntüsü  
1.λ PstI 2.RF1Q10 3.RF1Q11 4.RF1F2 5.RF1F7 6.RF1F/D1 7.RF1F/D10 8.RF2FKB1  
9.RF2FKB6 10.RF2FKB7 11.RF2FBB1



### 3.5.2.6 Plazmit Kontrol PCR



Şekil 3.17 SP6+T7 primerleri ile yapılan Plazmit PCR'ının jel üzerindeki görüntüsü

1.λ PstI 2.RF1Q10 3.RF1Q11 4.RF1F2 5.RF1F7 6.RF1F/D1 7.RF1F/D10 8.RF2FKB1  
9.RF2FKB6 10.RF2FKB7 11.RF2FBB1 12.DNA miktar cetveli

### 3.5.3 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Şekil 3.17'de görülen örneklerin 9.sıradaki RF2FKB1 örneği hariç diğer hepsi dizin analizi için Biogen firmasına gönderildi.

Çizelge 3.3 Dizin analizine gönderilen örneklerin isimlendirilmesi

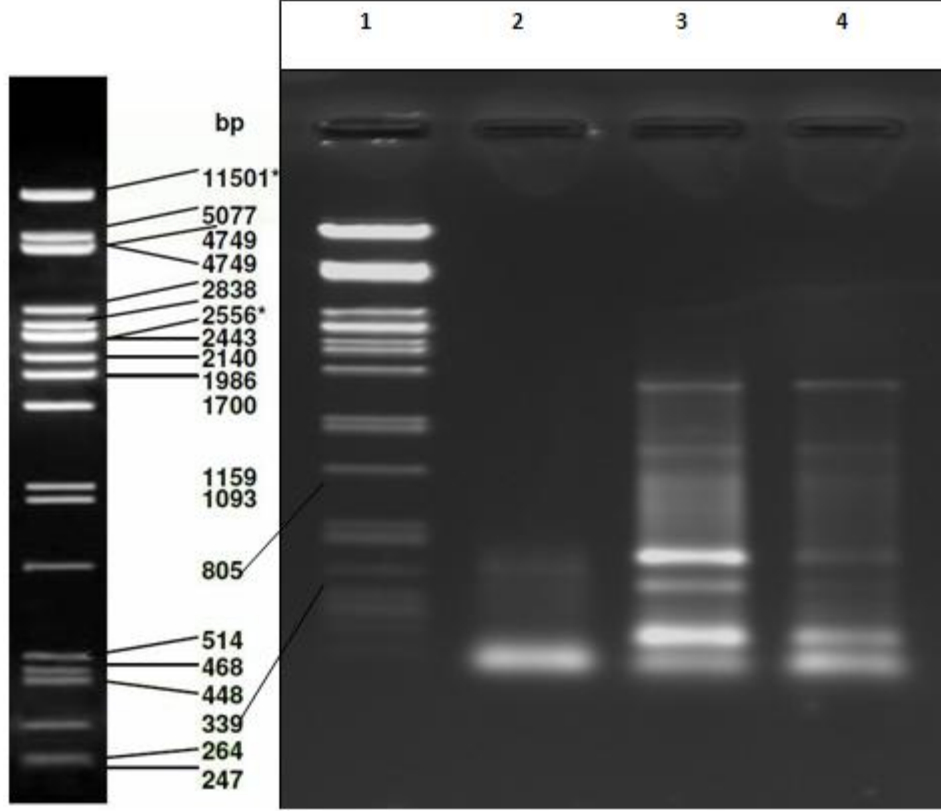
<b>Transformasyon</b>	<b>Plazmitlere Verilen İsim</b>
1 haftalık RF1+Q	RF1Q10, RF1Q11
1 haftalık RF1+F	RF1F2, RF1F7
1haftalık RF1+F+DMSO	RF1F/D1, RF1F/D10
1 haftalık RF2+F	RF2FKB1,RF2FKB6, RF2FKB7, RF2FBB1

Çizelge 3.4 mRNA'dan 3'RACE PCR ürünlerinin BlastN sonuçları

İsim	Primerler	Dizin Uzunluğu	RNA	BLASTN	Skor
RF1 Q10	F1-AUAP	<b>264</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Lactobasillus johnsonii</i> FI9785 genom	<b>44.6</b>
RF1Q11	F1-AUAP	<b>309</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Homo sapiens</i> MYO5B	<b>44.6</b>
RF1F2	F1-AUAP	<b>261</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Lotus japonicus</i> genomik DNA	<b>44.6</b>
RF1F7	F1-AUAP	<b>299</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Hordeum vulgare</i> tahmini protein mRNA	<b>46.4</b>
RF1F/D 1	F1-AUAP	<b>301</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Hordeum vulgare</i> tahmini protein mRNA	<b>46.4</b>
RF1F/D10	F1-AUAP	<b>294</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Hordeum vulgare</i> tahmini protein mRNA	<b>46.4</b>
RF2FKB1	F2-AUAP	<b>165</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Vitis vinifera</i> kontig	<b>39.2</b>
RF2FKB6	F2-AUAP	<b>899</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Nicotiana tabacum</i> karbonik anhidraz mRNA	<b>583</b>
RF2FKB7	F2-AUAP	<b>366</b>	1 hafta stres verilmiş	<i>Arabidopsis lyrata</i> alt türü glukoz-1-fosfat adelintransferaz mRNA	<b>199</b>

### 3.6 5'RACE Sonuçları

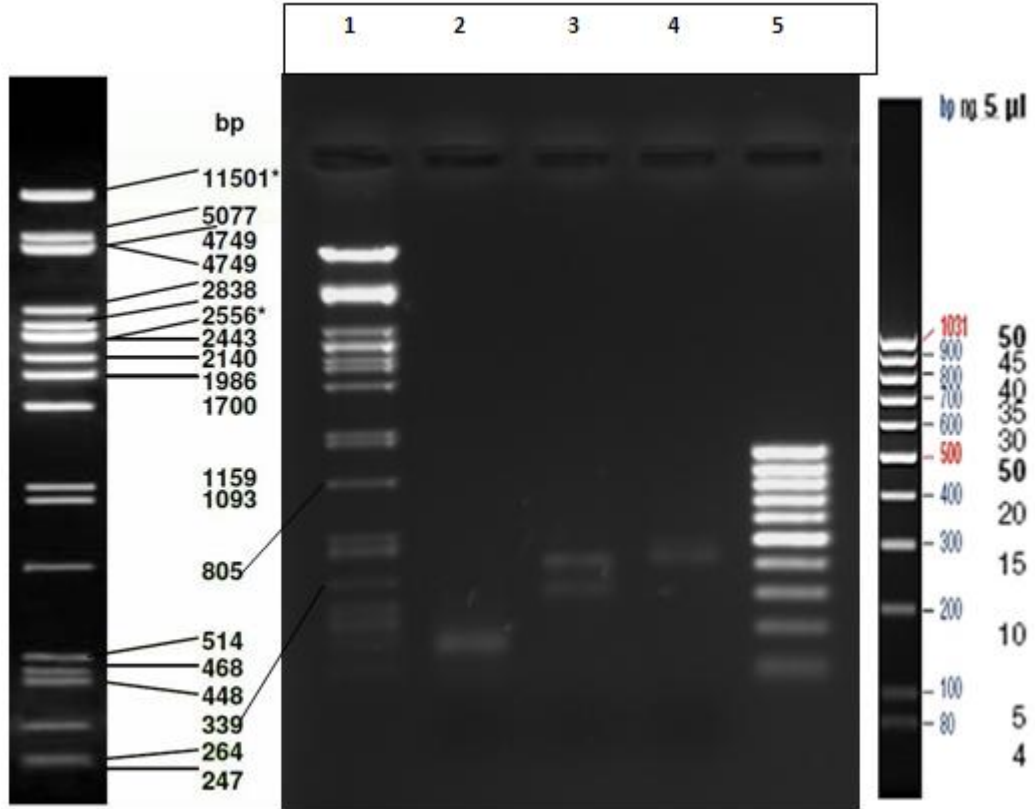
#### 3.6.1 Total RNA'dan 5'RACE PCR Ürünlerinin Analizi



Şekil 3.18 Total RNA'lardan 5'RACE cDNA'nın PCR jel görüntüsü

1.  $\lambda$  Pst 2. Stres verilmemiş RNA'dan SP1 primeri ile (kısaltılışı:OSP1)
3. 1 hafta stres verilmiş RNA'dan SP1 primeri ile (HSP1)
4. 10 günlük stres verilmiş RNA'dan SP1 primeri ile (ONSP1)

### 3.6.1.1 PCR Ürününün Agaroza Jelden Saflaştırılması



Şekil 3.19 Saflaştırılmış 5'RACE PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü

### 3.6.1.2 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

2.14.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleşmiştir.

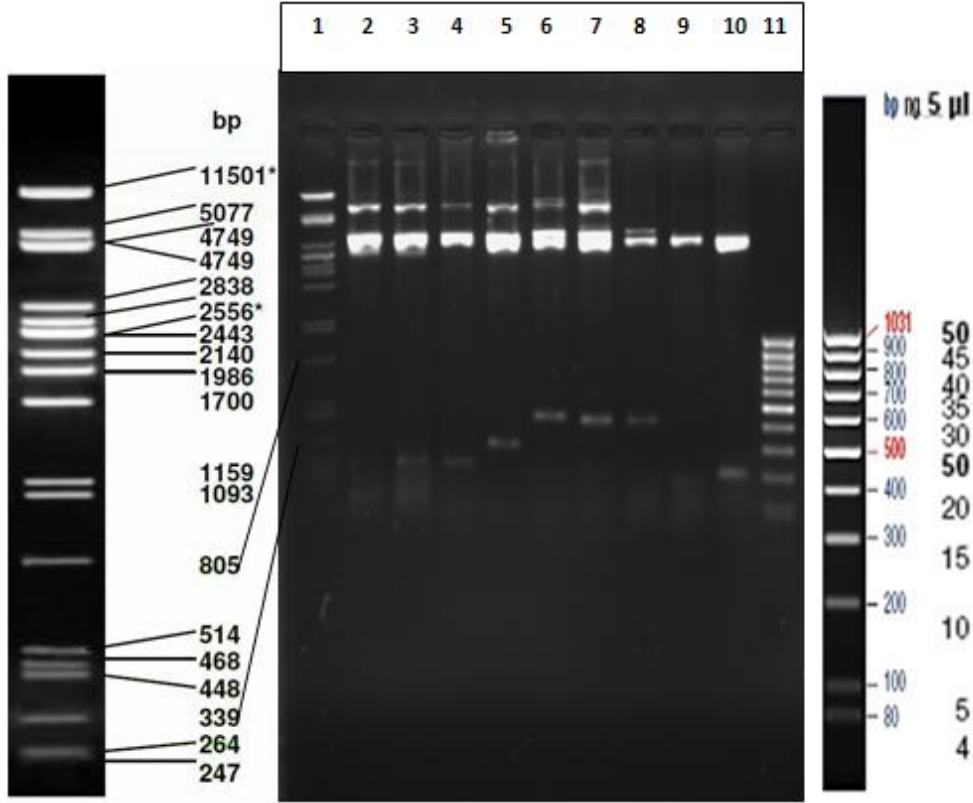
### 3.6.1.3 Transformasyon

2.14.4'de anlatıldığı gibi uygulanmıştır.

### 3.6.1.4 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.14.6'da belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

İzole edilen plazmitler EcoR1 enzimi ile kesilerek içlerinde PCR ürünü olup olmadığı kontrol edildi.



Şekil 3.20 3'RACE ve 5'RACE PCR ürünlerini bulunduran plazmitlerin EcoR1 ile kesim reaksiyonları

- 1.λPst2 2.HRF1/5 3.HRF1/6 4.HRF2KB4 5.ONRF1/2 6.HSP1BB7 7.HSP1BB8 8.HSP1BB9  
9.HSP1KB11 10.ONRF1/1

### 3.6.1.5 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Şekil 3.20'de görülen örneklerin hepsi dizin analizi için İyontek firmasına gönderildi.

Gelen sonucun vektör dizinleri CHROMAS programı ile çıkartıldı ve BLASTN programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Yapılan bu analizler sonucunda klonlanan fragmanlarla CBF geni arasında benzerliğe rastlanmadı. Örneklerin dizin analizine gönderildiği firmadan kaynaklı yanlış okunma olabileceği de düşünüldüğünden daha sonra klonlanan fragmanlar analiz için farklı firmaya gönderilmiştir. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.5 Dizin analizine gönderilen örneklerin isimlendirilmesi

Transformasyon	Plazmitlere Verilen İsim
1 haftalık SP1 p.	HSP1BB7,HSP1BB8,HSP1BB9,HSP1KB11

Çizelge 3.6 5'RACE PCR ürünlerinin BlastN sonuçları

İsim	Primerler	Dizin Uzunluğu	RNA	BLASTN	Skor
HSP1BB9	SP1-AUAP	410	1 hafta stres verilmiş	<i>Vitis aestivalis</i> 26S rRNA geni	590
HSP1KB11	SP1-AUAP	149	1 hafta stres verilmiş	<i>Olea europaea</i> kısmi 25S rRNA geni	168
HSP1BB7	SP1-AUAP	429	1 hafta stres verilmiş	<i>Olea europaea</i> kısmi 26S rRNA geni	672

### 3.7 Tartışma ve Öneriler

CBF familyasının bitki türüne göre değişen sayılarda üyesi vardır. Bu sayı *Arabidopsis thaliana* da 6 iken, *Hordeum vulgare* de 14 türdür. CBF genleri, soğukla uyarılırlar ve boyları yaklaşık olarak eşittir.

Stres verilen bitkilerden total RNA ve mRNA izolasyonları yapılmıştır. Laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan çalışmalardan elde edilen CBF1 AP2 kodlayıcı bölgenin dizinleri kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Bunlar tam uzunlukta cDNA elde etmek için uygulanan 3'RACE ve 5'RACE reaksiyonlarında kullanılmıştır. Total RNA'dan 3'RACE yöntemi ile 250 bp büyüklüğünde elde edilen cDNA'lar klonlanmış ve dizin analizleri yaptırılmıştır.

Total RNA'dan 5'RACE yöntemi ile farklı boylarda fragmanlar elde edilmiştir. Bunlarda klonlanarak dizin analizine gönderilmiştir. Elde edilen dizinler CBF genleri dışındaki genlere benzerlik göstermiştir. Bunların içinde 26S ribozomal RNA gibi genlerde mevcuttur. Total RNA'dan yapılan RACE reaksiyonları ribozomal RNA gibi genlerin klonlanmasına sebep olduğundan CBF genine elde etme olasılığımızı arttırmak adına mRNA kalıp olarak kullanılarak 3'RACE reaksiyonları tekrarlanmıştır. Elde edilen 300, 800 bp boyutlarında cDNA'lar klonlanmış ve dizin analizine gönderilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar, istediğimiz CBF genine benzerlik göstermemiştir. RACE yönteminde kullanılan primer dizinleri ve PCR koşullarına göre beklenen sonuçtan farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bunun dışında zeytinde CBF geni ilk kez klonlanmıştır. Bu genlerin zeytinde anlatımı ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Daha kısa süreli stres verilmiş örneklerden klonlama çalışmaları devam etmektedir. Ayrıca transkripsiyon faktörleri ekspresyonlarının maksimum düzeye ulaştığı zaman aralıklarında bile diğer genlerle karşılaştırıldıklarında hücrede az miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle başlangıç materyali olarak daha fazla total RNA kullanılacaktır.



## KAYNAKLAR

---

- [1] Levitt,J., (1980). "Responses of plants to environmental stresses" , Academic Pres, New York.
- [2] Sakai,A. ve Larcher,W., (1987). "Frost Survival of Plants. Responses and Adaptations to Freezing Stress", Springer-Verlag, Berlin.
- [3] Steponkus,P.L. ve Lynch,D.V., (1989). "Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation", J Bioenerg Biomembr 21: 21-41.
- [4] Weiser,C.J., (1970). "Cold resistance and injury in woody plants", Science 169: 1269-1278
- [5] Gilmour,S.J., Hajela,R.K. ve Thomashow,M.F., (1988). " Cold acclimation in Arabidopsis thaliana", Plant Physiol 87: 745-750.
- [6] Guy,C.L., Niemi,K.J. ve Brambi,R., (1985). " Altered gene expression during cold acclimation of spinach", Proc Natl Acad Sci USA 82: 3673-3677.
- [7] Meza-Basso,L., Alberdi,M., Raynal,M., Ferrero-Cadinanos,M.L. ve Delseny,M., (1986). "Changes in protein synthesis in rapeseed (Brassica napus) seedlings during a low temperature treatment", Plant Physiol 82: 733-738.
- [8] Mohapatra,S.S., Poole,R.J. ve Dhindsa,R.S., (1987). " Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimation of alfalfa" , Plant Physiol 84: 1172-1176.
- [9] Robertson,A.J., Gusta,L.V., Reaney,M.J.T. ve Ishikawa,M., (1987). "Protein synthesis in bromegrass (Bromus inermis Leyss) cultured cells during the induction of frost tolerance by abscisic acid or low temperature", Plant Physiol 84: 1331-1336.
- [10] Hirayama,T. ve Shinozaki,K., (2010). "Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future", The Plant Journal 61, 1041–1052.

- [11] Chandler,P.M. ve Robertson,M., (1994).” Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance”, *Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 113–141.
- [12] Giraudat,T., Parcy,F., Bertandre,N., Gosti,F., Leung,J., Morris,P.C., Bouvier-Durand,M. ve Vartanian,N., (1994). “ Current advances in abscisic acid action and signaling”, *Plant Mol. Biol.*26, 1557–1577.
- [13] Ingram,J. ve Bartels,D., (1996). “The molecular basis of dehydration tolerance in plants”, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*47, 377–403.
- [14] Shinozaki,K. ve Yamaguchi-Shinozaki,K., (1997). “Gene expression and signal transduction in water-stress response”, *Plant Physiol.* 115, 327–334.
- [15] Thomashow,M.F., (1994). “Arabidopsis thaliana as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance In *Arabidopsis*”, E.Meyerowitz and C. Somerville, eds (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 807–834.
- [16] Shinozaki,K. ve Yamaguchi-Shinozaki,K., (1996). “Molecular responses to drought and cold stress”,*Curr. Opin. Biotechnol.* 7,161–167.
- [17] Zhang,J.Z., Creelman,R.A. ve Zhu,J.K., (2004). “From Laboratory to Field. Using Information from Arabidopsis to Engineer Salt, Cold, and Drought Tolerance in Crops”, *Plant Physiology*, June 2004, 135: 615–621.
- [18] Sanders,D., Pelloux,J., Brownlee,C. ve Harper,J.F., (2002). “Calcium at the crossroads of signaling”, *Plant Cell* 14: 401–417.
- [19] Dodd,A.N., Jakobsen,M.K., Baker,A.J., Telzerow,A., Hou,S.W., Laplaze,L., Barrot,L., Poethig,R.S., Haseloff,J. ve Webb,A.A.R., (2006). “Time of day modulates low-temperature Ca<sup>2+</sup> signals in Arabidopsis”, *Plant J* 48: 962–973.
- [20] Klimecka,M. ve Muszynska,G., (2007). “Structure and functions of plant calcium- dependent protein kinases”, *Acta Biochim Pol* 54: 219–233.
- [21] Knight,H., Trewavas,A.J. ve Knight,M.R., (1996). “Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after cold acclimation”, *Plant Cell* 8: 489–503.
- [22] Plieth,C., Hansen,U.P., Knight,H. ve Knight,M.R., (1999). “Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response”, *Plant J* 18: 491–497.
- [23] Knight,H. ve Knight,M.R., (2001). “Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk”, *Trends Plant Sci* 6: 262–267.
- [24] George,L., Romanowsky,S.M., Harper,J.F. ve Sharrock,R.A., (2008). “TheACA10 Ca<sup>2+</sup> -ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in Arabidopsis”, *Plant Physiol* 146: 716–728.
- [25] Kim,M.C., Chung,W.S., Yun,D. J. ve Cho,M.J., (2009). “Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants”, *Mol Plant* 2: 13–21.

- [26] Hajela,R.K., Horvath,D.P., Gilmour,S.J. ve Thomashow,M F., (1990). "Molecular cloning and expression of cor (cold-regulated) genes in Arabidopsis thaliana", Plant Physiology, August 1990, 93(4) : 1246-1252.
- [27] Gilmour,S.J., Fowler,S.G. ve Thomashow,M.F., (2004). "Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities", Plant Molecular Biology, March 2004, 54(5) :767-781.
- [28] Kurkela,S. ve Franck,M., (1990). "Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible Arabidopsis gene", Plant Molecular Biology, February 1990, 15(2) :137-144.
- [29] Yamaguchi-Shinozaki,K., Koizumi,M., Urao,S. ve Shinozaki,K., (1992). "Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein", Plant Cell Physiology, 33(3): 217-224.
- [30] Monroy,A.F., Castonguay,Y., Laberge,S., Sarhan,F., Vezina,L.P. ve Dhindsa,R.S. (1993). "A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature", Plant Physiology, 102(3): 873-879.
- [31] Nordin,K., Vahala,T. ve Palva,E.T., (1993). "Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh", Plant Molecular Biology , 21(4): 641-653.
- [32] Fowler,S. ve Thomashow,M.F., (2002). "Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multipleregulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway", The Plant Cell, 14 (8): 1675-1690.
- [33] Kreps,J.A., Wu,Y., Chang,H., Zhu,T., Wang,X. ve Harper,J.F., (2002). "Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress", Plant Physiology, 130(4): 2129-2141.
- [34] 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. ve Shinozaki,K., (2002). "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(3): 279-292.
- [35] Vogel,J.T., Zarka,D.G., Van Buskirk,H.A., Fowler,S.G. ve Thomashow,M. F., (2005). "Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis", The Plant Journal, 41(2): 195-211.
- [36] Shinozaki,K., Yamaguchi-Shinozaki,K. ve Seki,M., (2003). "Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses", Current Opinion in Plant Biology, 6(5): 410-417.

- [37] Seki,M., Satou,M., Sakurai,T., Akiyama,K., Iida,K., Ishida,J., Nakajima,M., Enju, A., Narusaka,M., Fujita,M., Oono,Y., Kamei,A., Yamaguchi-Shinozaki,K. ve Shinozaki,K., (2004). "RIKEN Arabidopsis full length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions", *Journal of Experimental Botany*, 55(395): 213-223.
- [38] Holmberg,N. ve Bulow,L., (1998). "Improving stress tolerance in plants by gene transfer", *Trends in Plant Science*, 3(2): 61-66.
- [39] Cushman,J.C. ve Bohnert,H.J., (2000). "Genomic approaches to plant stress tolerance", *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2): 117-124.
- [40] Chinnusamy,V., Zhu,J. ve Zhu,J.K., (2007). "Cold stress regulation of gene expression in plants", *TRENDS in Plant Science* 12(10).
- [41] Stockinger,E.J., Gilmour,S.J. ve Thomashow,M.F., (1997). "Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit", *Plant Biology, Proc Natl Acad Sci*, 94: 1035–1040.
- [42] Chen,M., Xu,Z., Xia,L., Li,L., Cheng,X., Dong,J., Wang,Q. ve Ma,Y., (2009). "Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean (*Glycine max* L.)", *J Exp Bot* 60: 121–135.
- [43] Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007), "Gene networks involved in drought stress response and tolerance", *J Exp Bot* 58: 221–227.
- [44] Nakashima,K. ve Yamaguchi-Shinozaki,K., (2006). "Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants", *Plant Physiol* 126: 62–71.
- [45] Nakashima,K., Ito,Y. ve Yamaguchi-Shinozaki,K., (2009). "Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses", *Plant Physiol* 149: 88–95.
- [46] Thomashow,M.F., (2001). "So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!", *Plant Physiology* 125: 89–93.
- [47] Novillo,F., Alonso,J.M., Ecker,J.R. ve Salinas,J., (2004), "CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis", *Proc Natl Acad Sci* 101: 3985–3990.
- [48] Jaglo-Ottosen,K.R., Gilmour,S.J., Zarka,D.G., Schabenberger,O. ve Thomashow,M.F., (1998). "Arabidopsis CBF1 Overexpression Induces COR Genes and Enhances Freezing Tolerance", DOI: 10.1126/science.280.5360.104, 104; 280.
- [49] Yamaguchi-Shinozaki,K. ve Shinozaki,K., (2006). "Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses", *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781–803.

- [50] Miura,K., Jin,JB. ve Hasegawa,P M., (2007). "Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants", *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 495–502.
- [51] Zhu,J., Dong,C.H. ve Zhu,J.K., (2007) "Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation", *Curr Opin Plant Biol* 10: 290–295.
- [52] Doherty,C.J., Van, Buskirk, H.A., Myers,S.J. ve Thomashow,M.F., (2009)."Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance", *Plant Cell*, 21, 972–984.
- [53] Seki,M., Narusaka,M., Abe,H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki,Y. ve Shinozaki,K., (2001). "Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray", *The Plant Cell* 13, 61–72.
- [54] Cook,D., Fowler,S., Fiehn,O. ve Thomashow,M.F., (2004), "A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 15243–15248; Derleyen: Kayal, W. E., Navarro, M., (2006) "Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold", *Journal of Experimental Botany*, 57(10): 2455–2469.
- [55] Maruyama,K., Sakuma,Y., Kasuga,M., Ito,Y., Seki,M., Goda,H.,Shimada,Y., Yoshida,S., Shinozaki,K. ve Yamaguchi-Shinozaki,K., 2004, "Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems", *The Plant Journal* 38: 982–993.
- [56] Gilmour,S J., Zarka,D.G., Stockinger,E.J., Salazar,M.P., Houghton,J.M. ve Thomashow,M.F., (1998), "Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression", *The Plant Journal* 16: 433–442.
- [57] Kasuga,M., Liu,Q., Miura,S., Yamaguchi-Shinozaki,K. ve Shinozaki,K., (1999), "Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor", *Nature Biotechnology* 17: 287–291.
- [58] Jaglo-Ottosen,K.R., Kleff,S., Amundsen,K.L., Zhang,X., Haake,V., Zhang,J.Z., Deits,T. ve Thomashow,M.F., (2001), "Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species", *Plant Physiology* 127: 910–917.
- [59] Hsieh,T.H., Lee,J.T., Charng,Y.Y. ve Chan,M.T., (2002) Tomato plant ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress", *Plant Physiology* 130: 618–626
- [60] Dubouzet,J.G., Sakuma,Y., Ito,Y., Kasuga,M., Dubouzet,E.G., Miura,S., Seki,M., Shinozaki,K. ve 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: 751–763.
- [61] Kim,S., An,C.S., Hong,Y.N. ve Lee,K.W., (2004), “Cold-inducible transcription factor, CaCBF, is associated with a homeodomain leucine zipper protein in hot pepper (*Capsicum annuum* L.)”, *Molecules and Cells* 18: 300–308.
- [62] Hong,J.P. ve Kim,W.T., (2005), “Isolation and functional characterization of the Ca-DREBLP1 gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang), *Planta* 220: 875–888.
- [63] Kitashiba,H., Ishizaka,T., Isuzugawa,K., Nishimura,K., Suzuki,T., (2004), “Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in *Arabidopsis* confers salt and freezing tolerance”, *Journal of Plant Physiology* 161: 1171–1176.
- [64] Savitch,L.V., Allard,G., Seki,M., Robert,L.S., Tinker,N.A., Huner,N.P., Shinozaki, K. ve Singh,J., (2005), “The effect of overexpression of two Brassica CBF/DREB1-like transcription factors on photosynthetic capacity and freezing tolerance in *Brassica napus*”, *Plant and Cell Physiology* 46: 1525–1539.
- [65] Zhang,X., Fowler,S.G., Cheng,H., Lou,Y., Rhee,S.Y., Stockinger,E.J. ve Thomashow,M.F., (2004), “Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*”, *The Plant Journal* 39: 905–919.
- [66] Vagujfalvi,A., Aprile,A., Miller,A., Dubcovsky,J., Delugu,G., Galiba,G. ve Cattivelli,L., (2005), “The expression of several Cbf genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat”, *Molecular Genetics and Genomics* 274: 506–514.
- [67] Choi,D., Rodriguez,E.M. ve Close,T.J., (2002). “Barley Cbf3 gene identification, expression pattern, and map location”, *Plant Physiology*, 129(4): 1781-1787.
- [68] Gao,M., Allard,G., Byass,L., Flanagan,A.M. ve Singh,J., (2002). “Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*”, *Plant Molecular Biology*, 49(5): 459-471.
- [69] Owens,C.L., Thomashow,M.F., Hancock,J.F. ve Iezzoni,A.F., (2002). “CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry”, *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 127: 489-494.
- [70] Vagujfalvi,A., Galiba,G., Cattivelli,L. ve Dubcovsky,J., (2003). “The cold regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A”, *Molecular Genetics and Genomics*, 269(1): 60-67.
- [71] Francia,E., Rizza,F., Cattivelli,L., Stanca,A.M., Galiba,G., Toth,B., Hayes,P.M., Skinner,J.S. ve Pecchioni,N., (2004), “Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a ‘Nure’ (winter) x ‘Tremois’ (spring) barley map”, *Theoretical and Applied Genetics*, 108(4): 670-680.

- [72] Teige,M., Scheikl,E., Eulgem,T., Doczi,R., Ichimura,K., Shinozaki,K., Dangl,J.L. ve Hirt,H., (2004). "The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis", *Molecular Cell*, 15(1): 141-152.
- [73] Dong,C., Hu,X., Tang,W., Zheng,X., Kim,Y., Lee,B. ve Zhu,J.,(2006). "A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stres", *Molecular and Cell Biology*, 26(24): 9533-9543.
- [74] Miura,K., Jin,J., Lee,J., Yoo,C.Y., Stirm,V., Miura,T., Ashworth,E.N., Bressan,R. A., Yun,D. ve Hasegawa,P.M., (2007). "SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis", *Plant Cell*, 19(4): 1403-1414.
- [75] Ulrich,H.D., (2005). "Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: A plea of no contest", *Trends in Cell Biology*, 15(10): 525-532.
- [76] Agarwal,M., Hao,Y., Kapoor,A., Dong,C., Fujii,H., Zheng,X. ve Zhu,J.,(2006). " A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance", *Journal of Biological Chemistry*, 281(49): 37636-37645.
- [77] Lee,H., Guo,Y., Ohta,M., Xiong,L., Stevenson,B. ve Zhu, J., (2002). "LOS2, a genetic locus required for cold responsive transcription encodes a bi-functional enolase", *EMBO Journal*, 21(11): 2692-2702.
- [78] Davletova,S., Schlauch,K., Coutu,J. ve Mittler,R., (2005). "The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis", *Plant Physiology*, 139(2): 847-856.
- [79] Mittler,R., Kim,Y., Song,L., Coutu,J., Coutu,A., Ciftci-Yilmaz,S., Lee,H., Stevenson, B. ve Zhu,J., (2006). "Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stres", *FEBS Letters*, 580(28-29): 6537-6542.
- [80] Abeles,F.B., Morgan,P.W. ve Saltvet,M.E. Jr., (1992). *Ethylene in Plant Biology*, 2nd ed. (San Diego, CA: Academic Press, Inc.).
- [81] Broglie,K.E., Biddle,P., Cressman,R. ve Broglie,R., (1989). "Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco", *Plant Cell* 1,599-607.
- [82] Deikman,J., Kline,R. ve Fischer,R.L., (1992). "Organization of ripening and ethylene regulatory regions in fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*)", *Plant Physiol.* 100: 2013-2017.
- [83] Meller,Y., Sessa,G., Eyal,Y. ve Fluhr,R., (1993). "DNA-protein interactions on a cis-DNA element essential for ethylene regulation", *Plant MOI. Biol.* 23: 453-463.
- [84] Vogeli-Lange,R., Fründt,C., Hart,C.M., Nagy,F. ve Meins,F.Jr., (1994). "Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I p-1,3-glucanase B promoter", *Plant MOI. Biol.* 25: 299-311.

- [85] Deikman, J. ve Fischer, R.L., (1988). "Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato", *EMBO J.* 7: 3315-3320.
- [86] Cordes, S., Deikman, J., Margossian, L.J. ve Fischer, R.L., (1989). "Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato", *Plant Cell* 1: 1025-1034.
- [87] Holdsworth, M.J. ve Laties, G.G., (1989). "Site-specific binding of a nuclear factor to the carrot extensin gene is influenced by both ethylene and wounding", *Planta* 179: 17-23.
- [88] Ohme, M. ve Shinshi, H., (1990). "Structure and expression of a tobacco P-1,3-glucanase gene", *Plant Mol. Biol.* 15: 941-946.
- [89] Eyal, Y., Meller, Y., Lev-Yadun, S. ve Fluhr, R., (1993). "A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression", *Plant J.* 4: 225-234.
- [90] Hart, C.M., Nagy, F. ve Meins, F.Jr., (1993). "A 61 bp enhancer element of the tobacco P-1,3-glucanase B gene interacts with one or more regulated nuclear proteins", *Plant Mol. Biol.* 21: 121-131.
- [91] Kagaya, Y., Ohmiya, K. ve Hattori, T., (1999). "RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants", *Nucleic Acids Res.* 27:470-478.
- [92] Jofuku, K.D., Denboer, B.G.W., Montagu, M.V. ve Okamoto, J.K., (1994). "Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2", *Plant Cell* 6: 1211-1225.
- [93] Elliott, R.C., Betzner, A.S., Huttner, E., Oakes, M.P., Tucker, W.Q.J., Gerentes, D., Perez, P. ve Smyth, D.R., (1996). "AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth", *Plant Cell* 8:155-168.
- [94] Klucher, K.M., Chow, H., Reiser, L. ve Fischer, R.L., (1996). "The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2", *Plant Cell* 8:137-153.
- [95] Moose, S. P., ve Sisco, P.H., (1996). "Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity", *Genes Dev.* 10:3018-3027.
- [96] Wilson, K.D., Swinburne, L. J. ve Coupland, G., (1996). "A dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an Arabidopsis gene related to APETALA2", *Plant Cell* 8:659-671.
- [97] Buttner, M., ve Singh, K.B., (1997). "Arabidopsis thaliana ethylene responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5961-5966.



- [98] Finkelstein,R.R., Wang, M.L., Lynch, T. J., Rao,S. ve Goodman,H.M., (1998). "The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein", *Plant Cell* 10:1043–1054.
- [99] Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. ve Goodman, H. M., (1992). "Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning", *Plant Cell* 4:1251–1261.
- [100] Magnani, E., Sjölander K. ve Hake S., (2004). "From Endonucleases to Transcription Factors: Evolution of the AP2 DNA Binding Domain in Plants", *The Plant Cell*, Vol. 16: 2265–2277.
- [101] Riechmann,J.L., ve Meyerowitz,E., (1998). "The AP2/EREBP family of plant transcription factors", *Biol. Chem.* 379:633–646.
- [102] Bowman,J.L., Drews,G.N. ve Meyerowitz,E.M., (1991). "Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell-types late in flower development", *Plant Cell* 3:749–758.
- [103] Jack,T., Brockman,L.L. ve Meyerowitz,E.M., (1992). "The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens", *Cell* 68:683–697.
- [104] Mandel,M.A., Bowman,J.L., Kempin,S.A., Ma,H., Meyerowitz,E.M. ve Yanofsky, M.F., (1992). "Manipulation of flower structure in transgenic tobacco", *Cell* 71:133–143.
- [105] Allen,M., Yamasaki,K., Ohme-Takagi,M., Tateno,M. ve Suzuki,M., (1998). "A novel mode of DNA recognition by a betasheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA", *EMBO J.* 17:5484–5496.
- [106] Xue,G.P., (2002). "An AP2 domain transcription factor HvCBF1 activates expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a(G/a)(C/t)CGAC motif", [*Biochimica et Biophysica Acta* 157763– 7].
- [107] Zeytin ve zeytinağı raporu ağustos 2010 teşkilatlandırma genel müdürlüğü
- [108] Bonghi,G. ve Palliotti,A., (1994). "Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops", New York: CRC Press.
- [109] Larcher,W., (1970). "Kälteresistenz und Überwinterungsvermögen mediterraner HolzpXanzen", *Oecologia Plant* 5:267–286.
- [110] Palliotti,A. ve Bonghi,G., (1996). "Freezing injury in the olive leaf and effects of mexuidide treatment", *J Horti Sci* 71:57–63.
- [111] Mazzolani,G., (1954). "Su alcuni eVetti del freddo in giovani rami di olivo (*Olea europaea* L.)", *Ann Bot* 24:449–459.
- [112] Fabbri,A. ve Ferrini,F., (1989). "Osservazioni anatomiche sui danni da freddo invernali in rami di piante adulte di ulivo", *Act of the congress "Agrometeorologia, Agricoltura e Ambiente"*, 21–23 November. Florence, Italy

- [113] Ege Zeytin ve Zeytinyağı İhracatçıları Birliği 2005/2006 Çalışma Raporu Tahmini
- [114] 2010 Yılı Zeytin ve Zeytinyağı Raporu  
<http://tgm.sanayi.gov.tr/DocumentList.aspx?catID=1061&lng=tr> 15.10.2011
- [115] Hatzopoulos,P., Banilas,G., Giannoulia,K., Gazis,F., Nikoloudakis,N., Milioni,D. ve Haralampidis,K., (2002). “Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree”, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104: 574–586.
- [116] D’Angeli,S. ve Altamura,M.M., (2007). “Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization”, Planta 225: 1147–1163.
- [117] Ayers,R.S. ve Westcot,D.W., (1976). “Water quality for agriculture”, FAO Irrigation and Drainage Paper 29: 1–96.
- [118] Tattini, M., Ponzio, C., Coradeschi, M.A., Tafani, R. ve Traversi, M.L., (1994). “Mechanisms of salt tolerance in olive plants”, Acta Horticult. 356: 181–184.
- [119] Chartzoulakis,K., Loupassaki,M., Bertaki,M. ve Androulakis,I., (2002)b. “Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO<sub>2</sub> assimilation rate of six olive cultivars”, Scientia Horticult. 96:235–247.
- [120] Loreto,F. ve Bongi,G., (1987). “Control of photosynthesis under salt stress in the olive”, In: Prodi, F., Rossi, F., Cristoferi, G. (Eds.), International Conference on Agrometeorology, Fondazione Cesena Agricoltura, Cesena.
- [121] Therios,I.N. ve Misopolinos,N.D., (1988). “Genotypic response to sodium chloride salinity of four major olive cultivars (*Olea europea* L.)”, Plant Soil 106: 105–111.
- [122] Marschner,H., (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants, second ed. Academic Press, London.
- [123] Zhu,J.K., (2001). “Plant salt tolerance”, Trends Plant Sci. 6: 66–71.
- [124] Melloni,D.A., Oliva,M.A., Martinez,C.A., Cambraia,J., (2003). “Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress”, Environ. Exp. Bot. 49: 69–76.
- [125] Munns,R., (2002). “Comparative physiology of salt and water stress”, Plant Cell Environ. 25: 239–250.
- [126] Gao, Z., Sagi,M. ve Lips,S.H., (1998). “Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity”, Plant Sci. 135: 149–159.
- [127] Munns,R., (1993). “Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses”, Plant Cell Environ., 16: 15–24.
- [128] Frohman,M.A., (1994). “On Beyond Classic RACE, PCR Methods And Application”, Cold Spring Harbour Laboratory , 40-58.
- [129] Frohman,M.A., Dush,M.K. ve Martin,GR., (1988). “Rapid production of full-length cDNA’s from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific

oligonucleotide primer”, Proc Natl Acad Sci U S A. 85(23): 8998-9002.

- [130] Inoue,H., Najima,H. ve Okayama,H., (1990). “High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids”, Gene, 96(1): 23-28.

---

## DİZİN ANALİZLERİ

### A-1 Total RNA'dan 3'RACE Klonlanan PCR Ürünlerinin Dizin Analizi Sonuçları

HRF2KB4 Boyutu:220 bp

```
GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAT
CCCTAATAAGTGAAGTATTTATACCCGATAGCTCTTGAAATGTTATTTTTAAAACAATGACCTTA
AACTAAGGGACACGACGGATATGAAAACTTATAAAATTACATCAAGTGCATACATTATTTCC
CCGGGAACTTCTTCCGGCCTA
```

HRF1/6 Boyutu: 220 bp

```
CTAGGGGAGTGAAGCTGAGGAAGCCAAAAAGCAGCTCGAAGAAGCAGGTGCTAAAGTCTCA
ATCGCTTAGGGTTTTTTTGTCCCTTTTTTATATATTATTTCTTTTTTCAATTAAATATCAAA
TTGTATGGAAAT
```

HRF1/5 Boyutu: 232 bp

```
TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAAGCGAAAAAGCAGCTCGAAGAGGCAGGTGCTAAAGTGTCCA
TTGCTTAGCCTTTTCAATTAGTGATAAATTTGAATGAATAGTTCTAGATGCAGTGCAGTGAAT
TCGATTTAAACCAAACATTCCATTACGATTTCTGGGTTTGAACCGAACTGAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA
```

ONRF1/1 Boyutu: 177 bp

AGGGGAGTGAAGCTGAGGACTAAATAGTTCGAAAGCTACCGGTATTAGATCCTATCCTAATGT  
TATTGTATGTAACGAGAGATAAGTTCATAGGTAAATCGACGAAGATAAGAGTTTTTCTTAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

ONRF1/2 Boyutu: 300 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGACAAAGGTGATGAGCTCGCGAGCTCTTGTGGCAGTGACC  
ATGAAGATGAGGCAGAAGAGCAGGAGCAGGACAGCGAGCCTGAGCCACCAAAAAGAAGA  
AGGGCAAAGGCAATGGCAGCAACTGATCAGCAGAAGGCAGACAGAACGAGGGAGGCAGCC  
AAAAGGTGATGTTGTCCGGCGCGACACGACGCCATGCGGAGATGCCATGCACATGCAATCAA  
AGCAGGAATAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

## **A-2 Total RNA'dan 5'RACE Klonlanan PCR Ürünlerinin Dizin Analizi Sonuçları**

HSP1KB11 Boyutu: 150bp

CCACGTTGTGAGCTCTCGCAGTTTCACAGTCTGAATTAATTCATACTTACACATGCATGGCTTA  
ATCTTTGAGACAAGCATATGACTACTGGCAGGATCAACCAGGTACCCCCCCCCCCCCCCCCC  
GTAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

HSP1BB9 Boyutu: 411 bp

GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGACCCAGGTCAGGCGGGATCA  
CCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATCCCCTAGTAA  
CGGCGAGCGAACCGGGA

HSP1BB7 Boyutu:430 bp

GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGCCCTTGAAAATCCGGAGGACCGAGT  
ACCGTCCGCGCCCGGTCGTACTCATAACCGCATCAGGTCTCCAAGGTGAACAGCCTCTGGTCA  
ATGGAACAATGTAGGCA

HSP1 OB1Ç Boyutu: 353 bp

GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGCGGTTAGGGAGGGGNANNNNNNNGNNGGGGAGN  
GGNNGGNNNNNGNNGGGGGGAGAAGAGGGAGGAGGANAGAGAGGGAGAGGGGAGAGAAA  
GGGAGAGGGAGAAGGAGAAGAAGAGGGAGGGAGGAAGAAGAGGGAAAGAAAGGAGAAG  
GGGAGAAAGAAAGAAGAAGAAGGAAGNNGGGAGGGAAAGAGGAGGAAAGGGAAGAAGAA

AGGGAAGAGGAGGGAAGAAGAGAAAGAGAGGGGGAGGGGAGAAGAAGAGAAGGAAAAA  
GAGGGGAGAGAAGGGGAGGAAAAAGGAAGGGAGAAAGAGAAGAAGGGAAAAANAGGGA  
GAAAA

HSP1BB8 Boyutu: 1483 bp

GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGTCTTGCTCGCGCTATTGTCGT  
GGCCTCTGACGGGGACAGTCTTCCCTGCTATGCGGTCTAATGGTTCACCCCGCGTCGGATATA  
CTCCGCAGTGGTGAAGACGACCGAGTGTCTATCCTTAGATTGTCTGACTGAATGATCATCC  
GCTCATCCACCGATACGCGTCCCAGACTCTTACTTTGAATGTACGTTTTTATTCTCGTGCTGTG  
GGGGAACCCCTGATCCTACCATGCCGCTTGTGTGCTTATTGCGTTTTGGTATCTCGTTCTTTTT  
CGCGTATGTGAATGTCGGTCTGTGTGAATATGCTCCGATTCTACCTGCCTACCTCCGCGGT  
CTTGCGGCGGGTACTGTAGTTAGTGCCTTTTTCTTGGCGTTGATGGGAGGTAGCGGCTCTTC  
TTCTTTACGTCTACTACCGGGGCTGGGCCTCCGTTTTACCCTTTGGCACTGATTGTTTGT  
TCCGGATGTGGCTGCTGGTACTGATAATGTAATTGCTTAACTGTTTCTTCTTTGTTAAATCGC  
CGGAGTCTAAACTCAACTCCTCGTGGTCCGGCTTGGTCGCGCTTTTTCGCATTCTGTGGGGGT  
TGTTTCTGGTTTTGTCTTCTTGTCTTCTGCGTCTCGTTTGTCTTTGTCATTCTCTTTCTAGGTTTGC  
ATGTTTTTCAGGGGTATACCATTCTGTTTTATTATTCGCTCTNGAGATGCACAGTTCCTAGATT  
ATAACTTCAAAAATAACGCGGGGACCCTCATGGAGGGGGCGCTATGTGTTTTTTTTTATCTC  
TCCTCACATCTTTCCGCTTCTCTTCACTTCTCCGCGTTGCTGCCGTTTTGTCTTTTTCCCT  
GTCAATGTACGTTCTCTACTGTTTCCCCTAATCTGTTTGTGCGTGTGTTGGTTTTGGTCCGAGG  
AGTCACAGCGCGGCGGCTATCACTTCGCTTATTTGGGTATCTCATGACACTCATATTAACC  
CCTTGTTGACGTGGTATATTATATCTTTGTCTTCACTTATTATTGTTTACGATGATCACTAGTTA  
CTAGTGAGAGCAATGGCACAGGGGTGTCGACTACCGAGTATCATTATAATACGTCGGCTGCT  
GAATAGGCGATCCGTCTTAAAGTTTACCTTAGAATCTCCTCACAAGGGCGCTTCTGCTTCGATT  
GACTATCGCGTGACGCGTTATTGTTCTCTACGTTGCGTTCTCGTGTGAGGGCACTGAGTGT  
TGTAGTGTGTTGGGGATGGATGTCTATTTGACTTGTGTTTTTTCTTGCTGTGTACGGATGCTTA  
TTTTACTGTAGGGTTTTATAGCCGTGCTGTATTGAAGCTTATGCTTACCGGGTTAGATACAT  
AATTACGTATGCATCAAGGTGGGGCCTAGTGGTCTATTTGTTTCACTCCGGCTGTGTCTGTGC  
ATGTTTCG

### A-3 mRNA'dan 3'RACE Klonlanan PCR Ürünlerinin Dizin Analizi Sonuçları

RF1Q10 264 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGAAGAGTAACGACACAAATCAGAGTTTTTCTCCTAAGATTT  
ACACATCCTTTCATTGCCTAGTAGATTTTATTTGTTTCCAGGATTCCATCCGTTAAAGACATTTTT  
ACGGTATTGCAGTTTCAATTTTGCTACTTTCTATTGGAGAACGCCCATGAGATTTGCTATTTTAG  
AGTAAAAATGAATTATTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACG  
CGTGGCCA

RF1Q11 309 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGGGAAGAAACCAGGTGTTGACTGTTTGGCTGGAATGGCTGT  
CACACAAGGGAGTCGGTCAATGTTTTTCACTCATCGAGATTATCATGGAGTGTTTTATCTGCC  
TGGCATTGGAAGGATGTCTTCACTTCTAACACCGGTGTATGCCTCATAAGCTGCCCTTTGG  
GATCTGATGAACCTTGCCATTGCGTTGGCTGTTCTGCTGCAAATCAGAAAATGCTATTGCG  
AAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

RF1F2 261 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGAAGAGTAACGACACAAATCAGAGTTTTTCTCCTAAGATTT  
ACACATCCTTTCATTGCCTAGTAGATTTTATTTGTTTCCACGATTCCATCCGTTAAAGACATTTTT  
ACGGTATTGCAGTTTCAATTATGCTACTTTCTATTGGAGAACGCCCATGAGATTTGCTATTTTA  
GAGTAAAAATGAATTATTGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCG  
TGGCCA

RF1F7 299 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGACAAAGGTGATGAGCTCGCGAGCTCTTGTGGCAGTGACC  
ATGAAGATGAGGCAGAAGAGCAGGAGCAGGACAGCGAGCCTGAGCCACCAAAAAAGAAGA  
AGGGCAAAGGCAATGGCAGCAACTGATCAGCAGAAGGCAGACAGAACGAGGGAGGCAGCC  
AAAAGGTGATGTTGTCCGGCGCGACACGACGCCATGCGGAGATGCCATGCACATGCAATCAA  
AGCAGGAATAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

RF1F/D 1 301 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGACAAAGGTGATGAGCTCGCGAGCTCTTGTGGCAGTGACC  
ATGAAGATGAGGCAGAAGAGCAGGAGCAGGACAGCGAGCCTGAGCCACCAAAAAAGAAGA

AGGGCAAAGGCAATGGCAGCAACTGATCAGCAGAAGGCAGACAGAACGAGGGAGGCAGCC  
AAAAGGTGATGTTGTCCGGCGCGACACGACGCCATGCGGAGATGCCATGCACATGCAATCAA  
AGCAGGAATAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

RF1 F/D 10 295 bp

TAGGGGAGTGAAGCTGAGGAGGACAAAGGTGATGAGCTCGCGAGCTCTTGTGGCAGTGACC  
ATGAAGATGAGGCAGAAGAGCAGGAGCAGGACAGCGAGCCTGAGCCACCAAAAAAGAAGA  
AGGGCAAAGGCAATGGCAGCAACTGATCAGCAGAAGGCAGACAGAACGAGGGAGGCAGCC  
AAAAGGTGATGTTGTCCGGCGCGACACGACGCCATGCGGAGATGCCATGCACATGCAATCAA  
AGCAGGAATAAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

RF2FKB1 165 bp

GGCCCGCGTCTGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTCTTGAAATGTTATTTTTAGA  
ACAATGACCTTAAACTAAGGTACACGACGGATATGAAAGACTTATAAAATTACATCAAGTGCA  
TACATTATTTCCCGTGAAACTTCTCCGGCCTA

RF2FKB6 899 bp

CAGGCTCCACAGTTCAAAGCTTCCTTTTACAAAATCATAATATCCTCCCTTTAGCGCCAAAGTTT  
TCTTACCAATCCTTCTCTAACAAATGGATAACTCAGCAGGTTCCAAGTGATACATTCAGTGC  
TTCCTTCTCACATAGTCCACACTGATCCGCGAAAGGTGCATTCCAAGCTCGGCTTTCACCTTG  
GCCTTTGCAGGTAAACAGATCTTCAACCCAGTCTCGATGAAGTCAGTGGAGGTGGATCCATCA  
TCAGAGAGAGACATGAGCCCCTTGATTCTCCACATGCACTGTGTCCAATGACTATGATTTCT  
TAACCTTTAGGTGAAGAACAGCATACTCGATGGCAGACCCAACCTCCAGAGTATCTAACCTTAT  
CATAGGCAGGGACCATGTTAGCAATGTTTCGGACCATGAATGCCTCTCCCGGGTGCAAATTCA  
GGACGTGTGACGGGCAGACACGTGAATCGGAGCAGGCAAATACCATATACGTTGGGCTCTGG  
CCTTTGGCAAGTTCACCATACAAGGCTGGATTTTTCTCATATTTCTCTTTTTGAAGTGGACAAA  
GCCATTTTTAGCTGCTCAACAGTGTGGAAACGGTGGTTTTGTCAACCGTTGCCAACTCTGCT  
TTAATCTGATCAATTTTTGCTGCAGCCACTGGTGCCAATCCTCTATTCTCACTGAGAAGTTTTTG  
AAGTCCGGCAATGGCTTCTCGTACTCTTCCCATATCTTCTCTCAAATGGGGTGGATGATA  
GGAGCAGGAGCAGCAAAAACAGGCTTATTTGAATGAGACTCGGTGGAGAATTAGACGACG  
CTTGACAAAGTACGAAGGGGCGTCTTGTAGGGAAGAATTAGGAATGAGGGAAGTAAGTGC  
GCATCCGTTA



RF2FKB7 366 bp

AGGCCGGAAGAAGTTTCACAACAAGAGAGCAATTATTGACAAGAATGCTCGAATTGGAGAGA  
ATGTGAAGATCATTAAACATCGACGACGTGCAAGAGGCTGCAAGAGAGACAGATGGTACTTC  
ATCAAGAGTGGTATTGTTACTGTGATTAAGGATGCTTTAATTCCCAGCGGATCAGTTATTTGAA  
AGTCGCCTTTATAATTCTTCAACAGAAGCTGTTTCTTGTTCTGATCCTATAAGATCTAGCTTAG  
ACTAGGATCGGGGAAGGTGCAATGTAAAGTTTGATCAAATTCCAAAACACATAATAAATATA  
ATTCTAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCA

RF2FBB1 889 bp

TAGCACATACCTGAAATCCCTATCTTCCGAGCCACTATGGCGGCCCGCTGCAGGTGACCATA  
TGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCT  
TGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAA  
CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT  
TAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATG  
AATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCAC  
TGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAA  
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA  
AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGA  
CGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT  
ACCATGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTTCCGAACCTGCCGCTTACCC  
GGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTTCGGGAAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCACGCTGGTA  
AGTATCTCAGTTTCGATGTAAGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCCGA  
TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCCGTAACTATCCATCTTGAACCTCAACCCGGTAGACAACAA  
CTTATT

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Beste TACAL  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 23.11.1984 İstanbul  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : bestetacal@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y.Lisans	Moleküler Biyoloji	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2008
Lise	Fen Bilimleri	Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi	2002

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2006-2008	Atatürk Fen Lisesi	Biyoloji Öğretmeni stajyerliği
06.2007-10.2007	Shaws Supermarket	Sales Assistant

## **YAYINLARI**

### **Bildiri**

1. Beste Tacal, Gizem Hacımuto, Şenay Vural Korkut, (2011). "Isolation of the homologues of genes encoding CBF1/DREB1 proteins from Olive (*Olea europaea*)", Current Opinion in Biotechnology, Volume 22, Supplement 1, Pages 144.