

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİLERDE CBF/ DREB TRANSKRİPSİYON
FAKTÖRLERİNİ KODLAYAN GEN
HOMOLOGLARININ ZEYTİN (*Olea europaea*)
BİTKİSİNDEN İZOLASYONLARI**

Biyolog Gizem HACIMUTO

FBE Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

İSTANBUL , 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖNSÖZ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 BİTKİLERDE STRES	1
1.1.1 Stres Nedir?	1
1.1.2 Stres Faktörleri	2
1.1.2.1 Soğuk Aklimatasyonu	3
1.1.2.2 Kuraklık Stresi	5
1.1.2.3 Soğuk Kuraklık İlişkisi	6
1.1.3 Soğuk Stresiyle Uyarılan Genler	8
1.2 CBF/DREB TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ	10
1.2.1 CBF/DREB transkripsiyon Faktörleri	10
1.2.2 CBF/DREB Transkripsiyon Faktörü Homologları	16
1.3 AP2 DOMAIN	17
1.3.1 AP2/EREBP Ailesi	17
1.3.2 AP2 Domain	20
1.4 ZEYTİN	21
1.4.1 Taksonomisi , Yaşam Koşulları ve Tarihi	21
1.4.2 Türkiye ve Dünyada Zeytin Üretimi	22
1.4.3 Zeytin ve Stres	26
1.4.4 Zeytinin Geleceği	27
1.4.5 Zeytinde Klonlanan Genler	27
1.5 TEZİN AMACI	29
2. MATERYAL VE METOD	30
2.1 Bitki Materyali	30
2.2 Büyüme Koşulları	30
2.3 Bitki Örneklerinin Alınması	30
2.4 RNA İzolasyonu	30
2.4.1 RNA İzolasyonu için Hazırlık	30
2.4.2 RNA İzolasyonu	31
2.5 RNA'nın Agaro Jel Üzerinde Analizi	31

2.5.1	Spot Test	31
2.5.2	Formaldehit Jeli Protokolü	31
2.5.3	Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	32
2.6	cDNA Sentezi	32
2.7	cDNAların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltımı (Polymerase Chain Reaction –PCR)	32
2.7.1	Kullanılan Primerler	32
2.7.2	PCR Koşulları.....	33
2.7.3	DNA'nın Agaroze Jel Üzerinde Analiz	33
2.8	cDNAların Vektöre Ligasyonu.....	33
2.9	Ligasyon Reaksiyonu.....	36
2.10	Kompetan Hücrelerin Hazırlanması	36
2.11	Transformasyon	37
2.11.1	Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması	37
2.11.2	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	37
2.12	Plazmit İzolasyonu.....	37
2.13	Genomik DNA İzolasyonu	38
2.14	DNA 'nın Agaroze Jel Üzerinde Analiz.....	38
2.15	Genomik DNA'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	39
2.15.1	Kullanılan Primerler	39
2.15.2	PCR Koşulları.....	39
2.15.3	PCR Ürünlerinin Jel Üzerinde Analiz	39
2.16	DNAların Vektöre Ligasyonu.....	39
2.17	Transformasyon	40
2.17.1	Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması	40
2.17.2	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	40
2.18	Plazmit İzolasyonu.....	40
2.19	RACE.....	41
2.19.1	3'RACE	41
2.19.1.1	cDNA Sentezi	41
2.19.1.2	PCR Reaksiyonu.....	41
2.19.1.3	DNA'nın Agaroze Jel Üzerinde Analiz	42
2.19.1.4	Vektör Ligasyonu	42
2.19.1.5	Transformasyon	42
2.19.1.6	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	42
2.19.1.7	Plazmit İzolasyonu.....	42
2.19.2	5'RACE	43
2.19.2.1	cDNA Sentezi	43
2.19.2.2	Poli A Kuyruğu Takılması.....	43
2.19.2.3	Birinci PCR Reaksiyonu.....	43
2.19.2.4	İkinci PCR Reaksiyonu	43
2.19.2.5	DNA'nın Agaroze Jel Üzerinde Analiz	44
2.19.2.6	Vektör Ligasyonu	44
2.19.2.7	Transformasyon	45
2.19.2.8	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	45
2.19.2.9	Plazmit İzolasyonu.....	45
3.	SONUÇLAR.....	46
3.1	RT-PCR İle İlgili Sonuçlar	46
3.1.1	Bitki Örneklerinin Alınması	46
3.1.2	RNA İzolasyonu	46

3.1.3	cDNA Sentezi	49
3.1.4	PCR.....	49
3.1.5	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu	52
3.1.6	Transformasyon	52
3.1.7	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	52
3.1.8	Plazmit İzolasyonu.....	54
3.1.9	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	55
3.2	Genomik DNA'dan PCR İle İlgili Sonuçlar	58
3.2.1	Genomik DNA İzolasyonu	58
3.2.2	PCR.....	60
3.2.3	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu	62
3.2.4	Transformasyon	62
3.2.5	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	62
3.2.6	Plazmit İzolasyonu.....	65
3.2.7	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	66
3.3	RACE İle İlgili Sonuçlar	68
3.3.1	RACE (RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS).....	68
3.3.2	3'RACE	70
3.3.2.1	cDNA Sentezi	70
3.3.2.2	PCR.....	70
3.3.2.3	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu	72
3.3.2.4	Transformasyon	72
3.3.2.5	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	72
3.3.2.6	Plazmit İzolasyonu.....	74
3.3.2.7	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	75
3.3.3	5'RACE	76
3.3.3.1	cDNA Sentezi	76
3.3.3.2	Çoklu A Kuyruğu Takılması	76
3.3.3.3	Birinci PCR Reaksiyonu.....	76
3.3.3.4	İkinci PCR Reaksiyonu	76
3.3.3.5	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu	78
3.3.3.6	Transformasyon	78
3.3.3.7	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	78
3.3.3.8	Plazmit İzolasyonu.....	78
3.3.3.9	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	80
4.	TARTIŞMA.....	81
	KAYNAKLAR.....	82
	EKLER	91
	Ek 1: <i>Arabidopsis</i> CBF/DREB Transkripsiyon Faktörlerinin cDNA Dizileri	91
	CBF1/DREB1B (AB007788).....	91
	CBF2/DREB1C (AB007789).....	92
	CBF3/DREB1A (AB007787).....	93
	CBF4 (NM124578)	94
	Ek 2: Otsu Bitkilerde Mevcut CBF Homologları.....	95
	Ek 3 : Odunsu Bitkilerde Mevcut CBF Homologları.....	98
	Ek 4 : CBF/DREB Transkripsiyon Faktörleri Homologlarının Çoklu Dizin Hizalaması (Multiple Sequence Aligment) Sonuçları	100
	Ek 5 : Dizin Analizi Sonuçları.....	103

PGEMOEAP2.....	103
PGEMOEAP3.....	103
PGEMOEAP4.....	104
PGEMOEAP5.....	104
1HFR2	105
1HFR7	105
1HFR9	106
1HFR20	106
1HFR25	107
1HFR29	107
1HFR41	107
1HFR42	108
1HFR50	108
1HFR66	109
1GCFR1.....	110
1GCFR5.....	110
1GCFR16.....	111
1GCFR 41.....	111
1GCFR46.....	112
1HCFR7.....	112
1HCFR10.....	113
1HCFR19.....	113
1HCFR30.....	114
1HCFR41.....	114
Ek 6: Gemlik Ve Memecik Genomik DNA'sı Dizin Analizi Sonuçları	115
GFR 27	115
GFR30	115
GFR36	116
MFR3.....	116
MFR29.....	117
MFR38.....	117
MFR41.....	118
Ek 7 : 3'RACE Dizin Analizi Sonuçları.....	119
1G3R5.....	119
1G3R31.....	120
1G3R40.....	121
1H3R1.....	122
1H3R16.....	123
1H3R25.....	124
1H23R1.....	125
Ek 8 : 5'RACE Dizin Analizi Sonuçları.....	126
C51	126
C55	127
C59	129
C510	131
ÖZGEÇMİŞ.....	133

SİMGE LİSTESİ

bp:baz çifti

kb:kilobaz

Lt: litre

mg:miligram

ml : mililitre

mM : milimolar

pmol : pikomol

U : unit

UV:Ultraviyole

v/v: hacim/hacim

w/v: ağırlık/ hacim

µl : mikrolitre

KISALTMA LİSTESİ

ABA: Absisik Asit
CBF:C Tekrar Bağlanma Faktörü
COR: Soğukla Düzenlenen
DNA : Deoksiribonükleik Asit
DREB: Kuraklık Duyarlı Element Bağlanma Faktörü
EMSA: Elektroforetik Hareketlilik Kayma Analizi
ERD: Kuraklığa erken duyarlı
KIN: Soğukla Uyarılan
LTI: Düşük Sıcaklıkla Uyarılan
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE : cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı
RD: Kuraklığa duyarlı
RNA : Ribonükleik Asit
RPM: devir/dakika

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Çevresel stres faktörleri.....	2
Şekil 1.2 Soğuk aklimitasyonunun bitkiye etkileri	5
Şekil 1.3 Soğuk ve kuraklık streslerinin bitki üzerinde oluşturduğu benzer etkiler	7
Şekil 1.4 Sinyal ileti yolağı	9
Şekil 1.5 CBF 1 proteini.....	11
Şekil 1.6 CBF transkripsiyon faktörlerinin soğukla uyarımı ve soğuk direncinin artması	15
Şekil 1.7 AP2 Domainin multidimensional NMR ile belirlenen 3 boyutlu yapısı	19
Şekil 2.1 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi.....	34
Şekil 2.2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi.....	35
Şekil 3.1 0 dakika ,30 dakika,1,2,4,12 saat ,1 gün ve 1 haftalık RNAların miktarlarının belirlenmesin için Spot test.(Maniatis vd., 1982)	47
Şekil 3.2 0 dakika, 30 dakika,1,2,4,12 saat, 1 gün ve 1 haftalık RNA'ların %1 lik denatüre edici jel üzerinde görüntülenmesi	48
Şekil 3.3 PCR ürünlerinin %1lik agaroz jel üzerinde görüntüsü	50
Şekil 3.4 CBF1F ve R primerleriyle kurulan PCR ürünlerinin %1lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.....	51
Şekil 3.5 Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCRın %1lik Agaroz Jel üzerinde görüntüsü.	53
Şekil 3.6 Pst I enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1lik Agaroz Jel üzerinde görüntüsü.....	54
Şekil 3.7 Gemlik DNA'sının %1 lik Agaroz Jeldeki görünümü	58
Şekil 3.8 Memecik DNA'sının %1 lik Agaroz Jeldeki görünümü.....	59
Şekil 3.9 Memecik Genomik DNA' sı ile yapılan PCR'ın %1 lik Agaroz Jel Üzerindeki Görüntüsü.....	60
Şekil 3.10 Gemlik DNA Genomik DNA' sı ile yapılan PCR'ın %1 lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	61
Şekil 3.11 Memecik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen pozitif koloniler	63
Şekil 3.12 Gemlik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen pozitif koloniler	64
Şekil 3.13 Memecik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen , Not I ve NdeI ile kesilmiş plazmitler	65
Şekil 3.14 RACE metodunun şematik gösterimi	68
Şekil 3.15 RACE metodunun şematik gösterimi	69
Şekil 3.16 3'RACE in PCR reaksiyonunun %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	70

Şekil 3.17 Jelde saflaştırılarak yeniden kurulan 3'RACE PCr reaksiyonunu %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	71
Şekil 3.18 Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCRın %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.	73
Şekil 3.19 EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.....	74
Şekil 3.20 5'RACE İkinci PCR reaksiyonunun %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü	77
Şekil 3.21 Pst I enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiş plazmitlerin %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	79

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1 CBF1,2,3 ve 4 aligmnet analizi.....	13
Çizelge 1.2 CBF Transkripsiyon faktörlerinin duyarlı oldukları stres faktörleri	14
Çizelge 1.3 Zeytinin taksonomik sınıflandırması.....	21
Çizelge 1.4 Başlıca ülkelerde zeytin ağaçlarının dağılımı ve zeytin ekili alanlar	23
Çizelge 1.5 Dünya zeytin üretimi	23
Çizelge 1.6 Türkiye 'de mevcut zeytin ağacı sayısı	24
Çizelge 1.7 Türkiyenin zeytin üretimi	25
Çizelge 2.1 PCR Reaksiyonunda kullanılan primerler.....	32
Çizelge 2.2 Ligasyon reaksiyonu kurulmasında kullanılanlar ve miktarları	36
Çizelge 2.3 Genomik DNA'dan PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	39
Çizelge 2.4 3'RACE yöntemi PCR reaksiyonunda kullanılan primerler	41
Çizelge 2.5 5'RACE birinci ve ikinci PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizinleri	44
Çizelge 3.1 Dizin analizine gönderilen örneklerin adlandırılması	55
Çizelge 3.2 RT-PCR ile İlgili Dizin analizi ve Blast sonuçları.....	57
Çizelge 3.3 Memecik ve Gemlik genomik DNA ile ilgili dizin analizi ve blast sonuçları	67
Çizelge 3.4 3'RACE dizin analizi ve benzerlik analizleri.....	75
Çizelge 3.5 5'RACE dizin analizi ve benzerlik analizleri.....	80

ÖNSÖZ

Çalışma konusunun ve araştırma yöntemlerinin belirlenmesinde , deneylerin yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi sırasında desteğini ve yönlendirici yardımlarını gördüğüm bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Tez Danışmanım Yard.Doç.Dr. Şenay Vural Korkut'a içtenlikle teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ,

Hayatım boyunca desteklerini eksik etmeyen ailem ve dostlarıma ,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Düşük sıcaklık, bitkilerde, dağılım, büyüme ve üremeyi sınırlandıran en yaygın çevresel streslerden biridir. Düşük sıcaklık stresi, dünya çapında ürün kayıplarına ve çeşitli düzeylerde hücrel ve moleküler cevaplara neden olur.

Bitkilerde kuraklık, düşük sıcaklık ve tuzluluk uyarımlı genlerin promotorlarında bulunan bir cis-acting element olan DRE/CRT, bu genlerin anlatımına yol açar. DRE/CRT elementleri her iki yanında farklı nükleotidler bulunabilen, CCGAC dizisi taşırlar. CBF/DREB1, bu cis-acting elementlere bağlanır ve strese bağlı gen anlatımını kontrol eder.

CBF geni ilk Arabidopsis bitkisinde saptanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarla, *Brassica napus*, Arpa (*Hordeum vulgare*), Mısır (*Zea mays*), Pamuk (*Gossypium hirsutum*), Buğday (*Triticum aestivum*), *Brassica napus*, *Capsella bursa-pastoris*, Kavak (*Populus spp.*), Ökalyptus (*Eucalyptus spp.*), Kiraz (*Prunus avium*), Elma (*Malus baccata*) ve pek çok palmiye türü gibi bitkilerden izole edilmiştir.

CBF/DREB1 proteinleri, PKK/RPAGRxKfxETRHP ve DSAWR işaret dizisini taşıyan, AP2/ERF DNA bağlanma proteinleri ailesine mensuptur. CBF1 protein dizisi 213 aminoasitten oluşmuş olup, N-sonlanma bölgesi (1–32 aminoasitler arası), potansiyel çekirdek lokalizasyon sinyali (33–44), AP2 Domaini (48–106) ve asidik bölge (107–213) olmak üzere dört bölgedir.

Tezin amacı, CBF/DREB gen homologlarını zeytin bitkisinden (*Olea europae*) izole etmektir.

Anahtar Kelimeler: Düşük sıcaklık, DRE/CRT, CBF, AP2 domaini, *Olea europae*

ABSTRACT

Low temperature is, one of the most common environmental limitations affecting distribution, growth and productivity of plants. Low temperature stress causes yield losses of many crop species worldwide and plant responses may be at cellular and molecular level to low temperature.

A cis-acting element, DRE/CRT (Dehydration responsive elements / C repeats), is involved in gene expression in response to drought, low-temperature and high salinity, in higher plants. DRE / CRT elements have CCGAC core sequence with different flanking nucleotides. CBF/DREB1 bind to these cis-acting elements and control stress dependent gene expression.

CBF gene was first identified in *Arabidopsis thaliana*. CBF homologous were isolated from *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Gossypium hirsutum*, *Triticum aestivum*, *Capsella bursa-pastoris*, *Populus* spp. , *Eucalyptus* spp. , *Prunus avium*, *Malus baccata* 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).

The aim of the thesis is to isolate the homologous of genes that encode CBF/DREB proteins in olive plant (*Olea europaea*) .

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

1. GİRİŞ

1.1 BİTKİLERDE STRES

1.1.1 Stres Nedir?

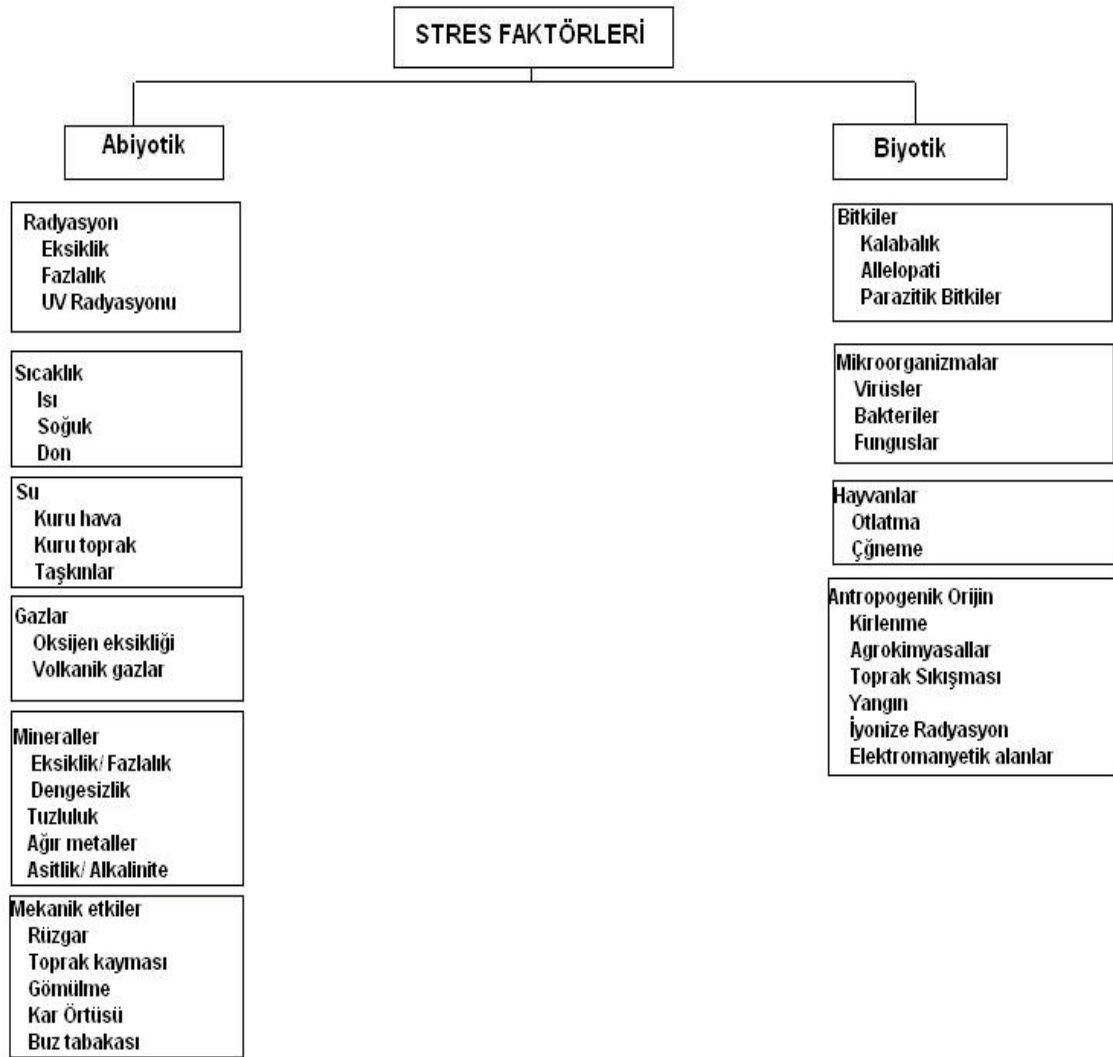
Dünyamızın coğrafi yapısı ve içinde bulunduğumuz mevsimsel değişiklikler nedeniyle bitkinin büyüme ve gelişme için gereken en uygun koşulları her zaman bulabilmesi mümkün değildir. Yeryüzünde bitki büyümesine elverişli olan bölgeler kadar, kurak, aşırı tuzlu alanlar, kuzey ve güney kutupları gibi bitki büyümesi için kısıtlı zaman ve koşullara sahip, büyüme ve gelişmeyi yavaşlatan bölgeler de mevcuttur(Weiser, 1970). Böyle bölgelerde bitkiler sürekli ya da kesintili olarak, olumsuz koşullara maruz kalırlar. Bitkilerin gelişimlerini yavaşlatan ve/veya durduran ve fizyolojilerinde değişimlere sebep olan tüm etmenlere genel olarak çevresel stres adı verilir (Xiong ve Zhu, 2001; Seki vd., 2003). Stres koşulları, organizmanın tüm fonksiyonları üzerinde çeşitli seviyelerde değişikliklere yol açar. Bu stres koşullarının yarattığı negatif etkiler başlangıçta telafi edilebilir veya geridönüşümlü iken, zamanla kalıcı hale gelir. Yaşanan stres nedeniyle organizmanın yaşamsal fonksiyonları gerilemeye başlar, stres devam ettikçe gerileme de devam eder. Organizmanın başa çıkabileceği düzeyi geçtiğinde ise, kronik hastalık ortaya çıkar ve bunun sonucunda ölümcül veya geri dönüşümsüz zararlar oluşur (Larcher,1998).

Çevresel ve içsel tüm faktörlerin değişimi bitki için stres unsuru oluşturabilir. Bu durumu belirleyen faktörün dozudur. Bitkinin stres faktörleri karşısında gösterdiği tepki , o faktörün yapısına ve yoğunluğuna bağlı olduğu kadar , bitkinin fizyolojisine , yaşına adaptasyon derecesine, mevsime ve maruz kalış süresine göre değişir (Lichtenthaler ,1996;1998).

Stres faktörünün bitkide oluşturduğu etkiler, bitki türüne özgün olabilir ya da tüm bitkilerde görülebilir. Bu etkiler arasında bazı enzimlerinin aktivitesinde farklılıklar, sekonder metabolit, antioksidan ve stres metabolitlerinin sentezlenmesinde ve birikiminde değişimler sayılabilir. Bu durum absisik asit, jasmonik asit etilen gibi stres hormonlarının ortaya çıkışı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca stres koşullarında membran potansiyeli ve madde taşınımında değişimler, solunumda artış, fotosentezde azalma veya engellenme, büyümede gerilik gibi durumlar ortaya çıkmaktadır (Levitt, 1980; Shinshi,2008).

1.1.2 Stres Faktörleri

Stres faktörleri biyotik veya abiyotik olarak ikiye ayrılır. Biyotik stres faktörleri, patojenler, mikroorganizmalar, nematodlar, böcekler ve diğer bitkilerle girilen rekabet, Abiyotik stres faktörleri ise kuraklık, sıcaklık, tuzluluk, don, radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler, elektromanyetik alandır (Larcher, 1998). Stres faktörlerinin sınıflandırılması şekil 1.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Çevresel stres faktörleri (Larcher, 1998)

Yaygın olarak görülen abiyotik stres faktörleri, soğuk, kuraklık ve tuzluluk stresleri, bitkinin hücresel düzeyde su alımı üzerinde etkili olarak, özellikli olmayan reaksiyonlara, yaralanmalara ya da direnç mekanizmalarına yol açarken, aynı zamanda, tarımsal ve ekonomik açıdan büyük kayıplara da neden olmaktadır (Cushman, 2000; Beck, 2007).

1.1.2.1 Soğuk Aklimatasyonu

Yukarda anlatıldığı gibi, bitkiler doğal ortamlarında pek çok stres koşulu ile karşılaşır ve hayatta kalabilmek için , bu koşulları dengeleyecek ya da etkisini azaltacak çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirirler. Soğuk stresi, bitkilerin gelişimi, coğrafi dağılımı ve hayatta kalması üzerinde en büyük etkiye sahip çevresel faktördür. Bitkiler soğuk($0-10^{\circ}\text{C}$) ve donma ($< 0^{\circ}\text{C}$) karşısında türlerine ve yaşadıkları bölgeye bağlı olarak değişebilen tepkiler gösterirler (Zhu, 2007). Tropik ve Subtropik bölge bitkileri hem soğuk hem de donma karşısında hassastır. Buna karşın, ılıman bölge bitkileri yalnızca soğuk değil donma stresine karşı da dirençlidirler ve -5°C ile -30°C arasında hayatta kalabilirler (Hughes ve Dunn, 1990).

Bitkiler düşük sıcaklık karşısında sergiledikleri tavır itibariyle 3 kategoriye ayrılabilirler:

- a) Düşük Sıcaklığa Hassas Türler: Bu bitkilerde sıcaklık 10°C 'nin altına düştüğünde onarılamaz hasarlar meydana gelir.
- b) Düşük Sıcaklığa Hassas Olmayan Türler: Bu türlerde ısı 0°C 'nin üzerindeyken primer yaralanma gerçekleşmez
- c) Düşük Sıcaklığa Toleranslı Türler: Bu bitkiler gerçekleşen sekonder yaralanmaları dahi onarabilir (Sharma, 2005).

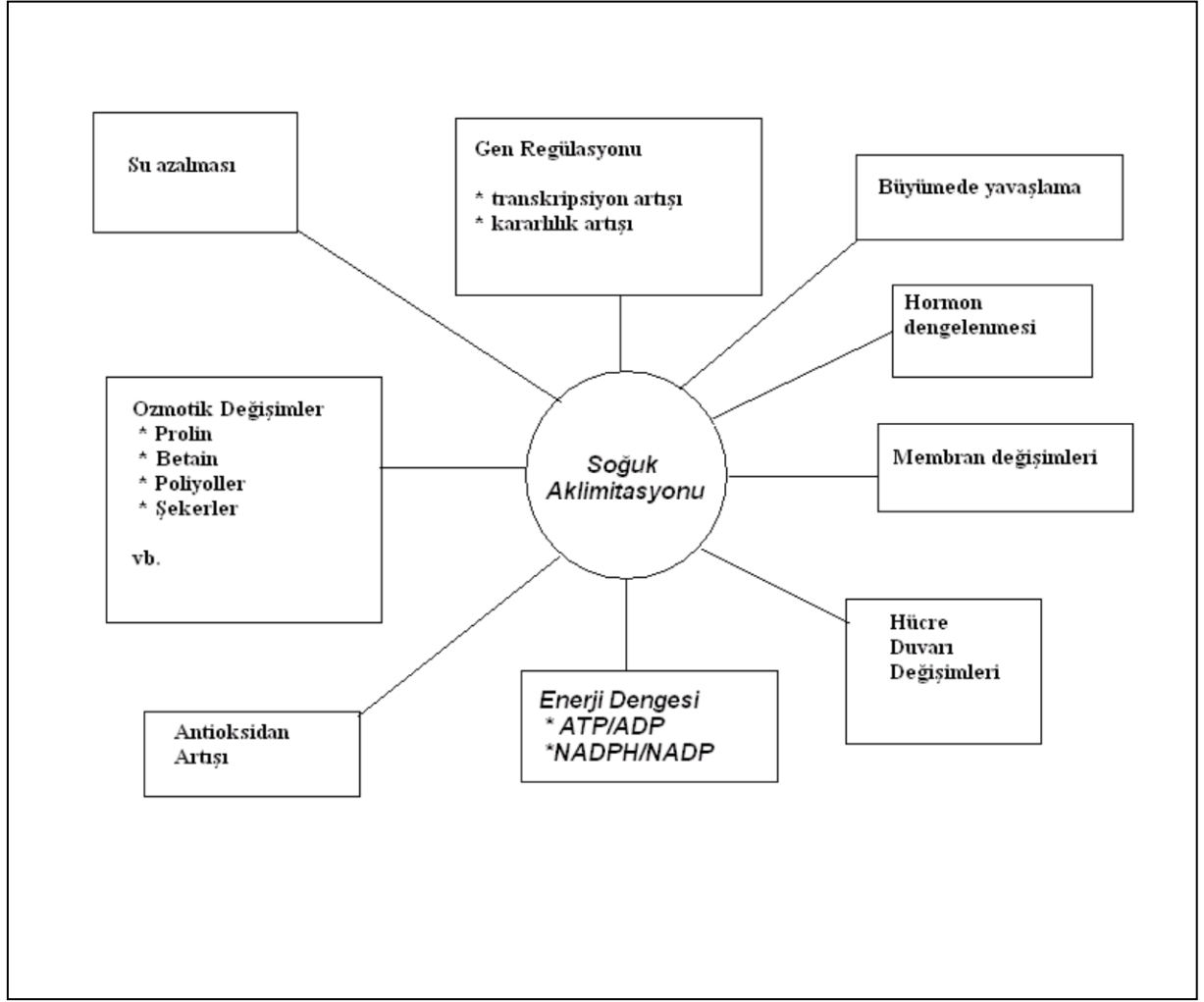
Düşük sıcaklık stresinin etkisi ya da yoğunluğu, etki derecesine ve korunmasızlığa bağlıdır. $0-15^{\circ}\text{C}$ arasındaki düşük sıcaklıklar bitkilerde yaralanmalara sebebiyet vermektedir. Soğuk yaralanması, yüzey yaralarına, su kaybına, kurumaya, dokularda bozulmaya, etilen üretimine, metabolit kaybına ve meyvelerin raf ömrünün kısılmasına yol açar. Soğuk yaralanması primer ve sekonder etki gösterir. Primer etkide, zarar geri dönüşlüdür. Ancak sekonder etki, primer etkinin sonucudur; plazma membranında ve hücre metabolizmasında geriye dönüşü olmayan zararlara sebebiyet verir (Zhu, 2007).

Ilıman bölge bitkileri, düşük ancak dondurucu olmayan sıcaklıklara maruz kaldıklarında, soğuğa karşı direnç geliştirmeye başlarlar. Bu olaya “Soğuk Aklimitasyonu” denir (Thomashow, 1998). Ancak tropik ve subtropik bölge bitkilerinin böyle bir adaptasyon kapasitesi yoktur (Zhu, 2007).

Soğuk aklimitasyonu süresince bitkide fizyolojik ve moleküler düzeyde pek çok değişiklik meydana gelir. Örneğin, membranın lipid kompozisyonu değişir, hücreleri dehidrasyondan koruyan proteinler (osmoprotektan biyosentezinden sorumlu enzimler, LEA (Late embryogenesis abundant) proteinleri, antifriz proteinleri, şaperonlar, detoksifikasyon enzimleri) sentezlenir, ozmolitler (prolin, betain, poliyol) birikir, transkripsiyon ürünleri, protein kinaz, fosfoinositid metabolizması gibi gen ürünleri ortaya çıkar, ABA miktarı kısa süreliğine artar, bitki büyümesi azalır ya da durur (Kasuga, 1999; Seki, 2003; Chinnusamy, 2002). Ayrıca yapılmış olan bir çalışmada soğuk aklimitasyonu sırasında elektron taşınımı ve metabolizma arasındaki enerji dengesinin bozulduğunu ve PSII ‘nin uyarıldığını göstermiştir (Huner vd., 1998).

Pek çok araştırmacı, yaptıkları çalışmalarda, çeşitli bitki türlerinde, soğuk aklimitasyonunun gen anlatımını teşvik ettiğini göstermişlerdir (Guy vd.,1985 ; Mohapatra vd.,1988 ;1989 ; Catevelli ve Bartels,1990;Kurkela ve Franck 1990).

Soğuk aklimitasyonunun etkileri özet olarak şekil 1.2 de gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Soğuk aklimitasyonunun bitkiye etkileri (Xin ve Browse, 2000)

1.1.2.2 Kuraklık Stresi

Kuraklığın en basit tanımı “bir bölgedeki nem miktarının geçici dengesizliğin o bölgedeki su kıtlığı ile ilişkisi” olup, 1997 yılında imzalanan Birleşmiş Milletler Çölleşme ile Mücadele sözleşmesine göre ise “yağışların kaydedilen normal düzeylerinin önemli ölçüde altına düşmesi sonucu arazi ve kaynak üretim sistemlerini olumsuz olarak etkileyen ve ciddi hidrolojik dengesizliklere yol açan doğal bir olay” olarak tanımlanmıştır. Dünya üzerinde stres faktörlerinin etkilediği bölgeler göz önüne alındığında %26 ile en büyük pay kuraklık stresinindir. Kuraklık stresi, hem tarım yapılabilecek bölgelerin daralmasına, hem de ürün veriminin düşmesine yol açar.

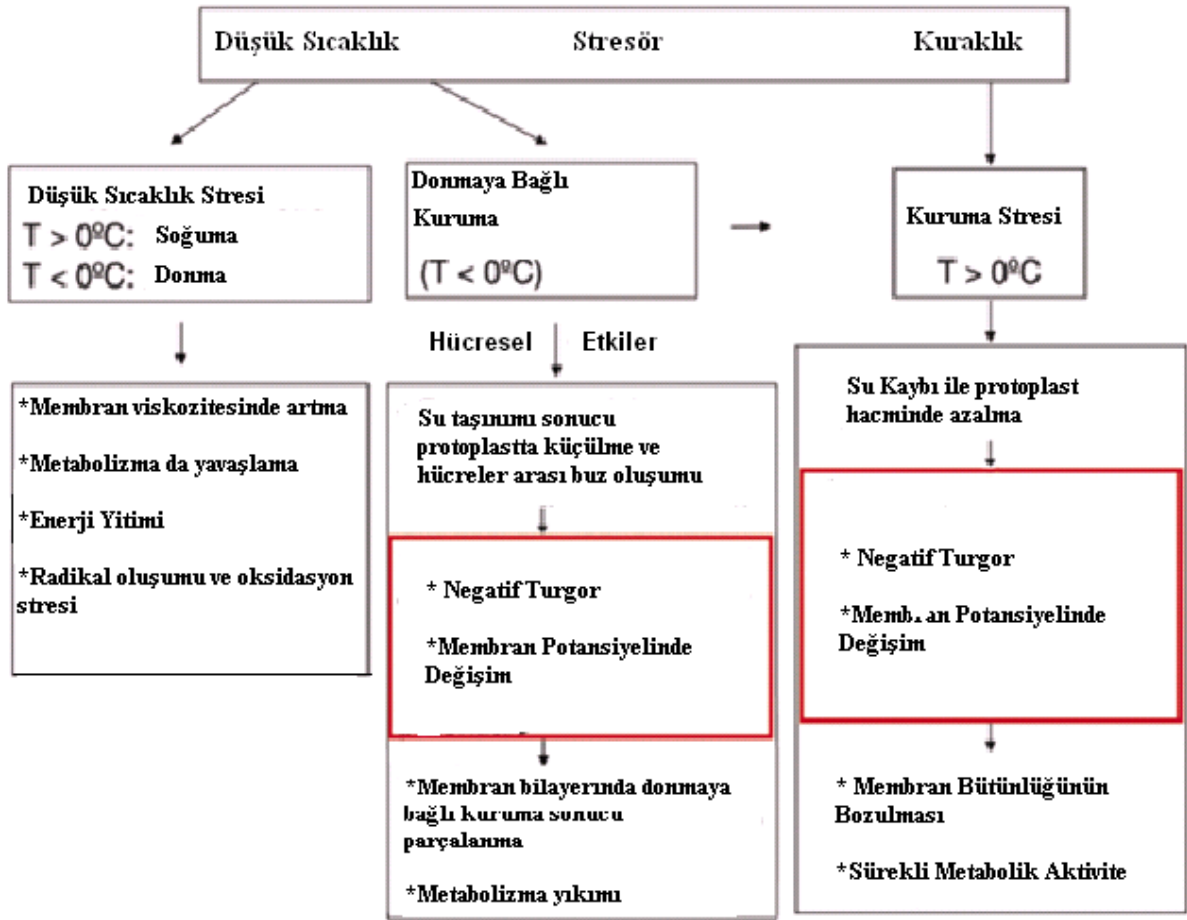
Kuraklık bitki gelişiminde görünür bir biçimde azalmaya neden olur. Kuraklık Smirnoff(1998) tarafından ikiye ayrılmıştır. Birincisi su noksanlığı olup, su kapsamının %70 olduğu durumlar için kullanılan bir terimdir. Bu durumda stomalar kapanır, gaz değişimi kısıtlanır. İkinci durum ise Kuruma olup, metabolizma ve hücre yapısının bozulduğu ve en sonunda da enzimatik reaksiyonların durma noktasına geldiği aşamadır.

Bitkilerde su kaybı sonucu turgor basıncı düşer, böylece plazma membranının yapısı değişir, fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşır. Böylece membran jel fazına geçmiş olur. Bu fazda membran lipitlerinin kinetik enerjileri daha az, hareketleri lateral ve rotasyondur. Su kaybı sonucu hücre hacmi azalır, plazma membranı ve tonoplast çöker, ileri safhalarda ise yırtılabilir. Bu yırtılma sonucu hidolitik enzimlerin serbest kalması ve otolizle sonuçlanabilir (Kalefetoğlu vd.,2005; McKersie vd., 1994; Salisbury, 1992) .

Kuraklık stresi sonucunda gözlenen bir diğer hasar nükleik asit degradasyonu olup, Kessler tarafından kuraklık stresine maruz kalmış olan yapraklarda RNAaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Kessler, 1961).

1.1.2.3 Soğuk Kuraklık İlişkisi

Bitki dokularında, hücre duvarları ve interselüler boşluklarda dondurucu sıcaklık karşısında buz oluşumu gerçekleşir. Hücre dışı buz oluşumunun nedeni, sitoplazmanın donma noktasının intraselüler sıvıdan yüksek oluşu ve sitoplazmanın donmayı engelleyici partiküller ve bakteriyal proteinler taşımasıdır (Xin ve Browse, 2000). Hücre dışında, intraselüler boşluklarda buz oluştuğunda, ortamda su azaldığından hücre dışı su potansiyeli düşer, sitoplazmadaki su plazma ozmozla intraselüler alana geçer (Thomashow, 1998). Hücreler, içerde su azlığı yaşandığından, donma stresine ilaveten kuraklık stresiyle de karşı karşıya kalmış olurlar. Bu nedenle iki stresin hücrede oluşturduğu etkiler benzerlik gösterir. İki stresle de aynı genlerin anlatımında artış olur (Smallwood ve Bowles,2002; Beck vd.,2007). Soğuk ve kuraklığın bitki üzerindeki etkileri şekil 1.3'te özetlenmiştir.



Şekil 1.3 Soğuk ve kuraklık streslerinin bitki üzerinde oluşturduğu benzer etkiler (Beck vd.,2007).

1.1.3 Soğuk Stresiyle Uyarılan Genler

1970 yılında, gen anlatımının soğuk aklimitasyonu ile değişebileceğinin ileri sürülmesinden sonra (Weiser,1970), 1985 yılında soğuk aklimitasyonu ile gen anlatımının değiştiği gösterilmiştir (Guy vd.,1985). Bunları , Arabidopsis thaliana da gen anlatımının soğukla değiştiğinin kanıtlanması ve soğuk aklimitasyonu ile donma direncinin geliştiğinin gösterilmesi izlemiştir (Kurkela ve Frank ,1990 ; Gilmour vd.,1998).

Yapılan çalışmalar sonucu soğuk stresiyle uyarılan genler;

COR (Cold Regulated) : Soğukla Düzenlenen

KIN (Cold Induced) : Soğukla Uyarılan

LTI (Low-Temperature Induced): Düşük Sıcaklıkla Uyarılan

RD (Responsive to Dehydration): Kuraklığa duyarlı

ERD (Early Responsive to Dehydration): Kuraklığa erken duyarlı

olarak adlandırılmıştır (Shinozaki, 2000; Zhu, 2007).

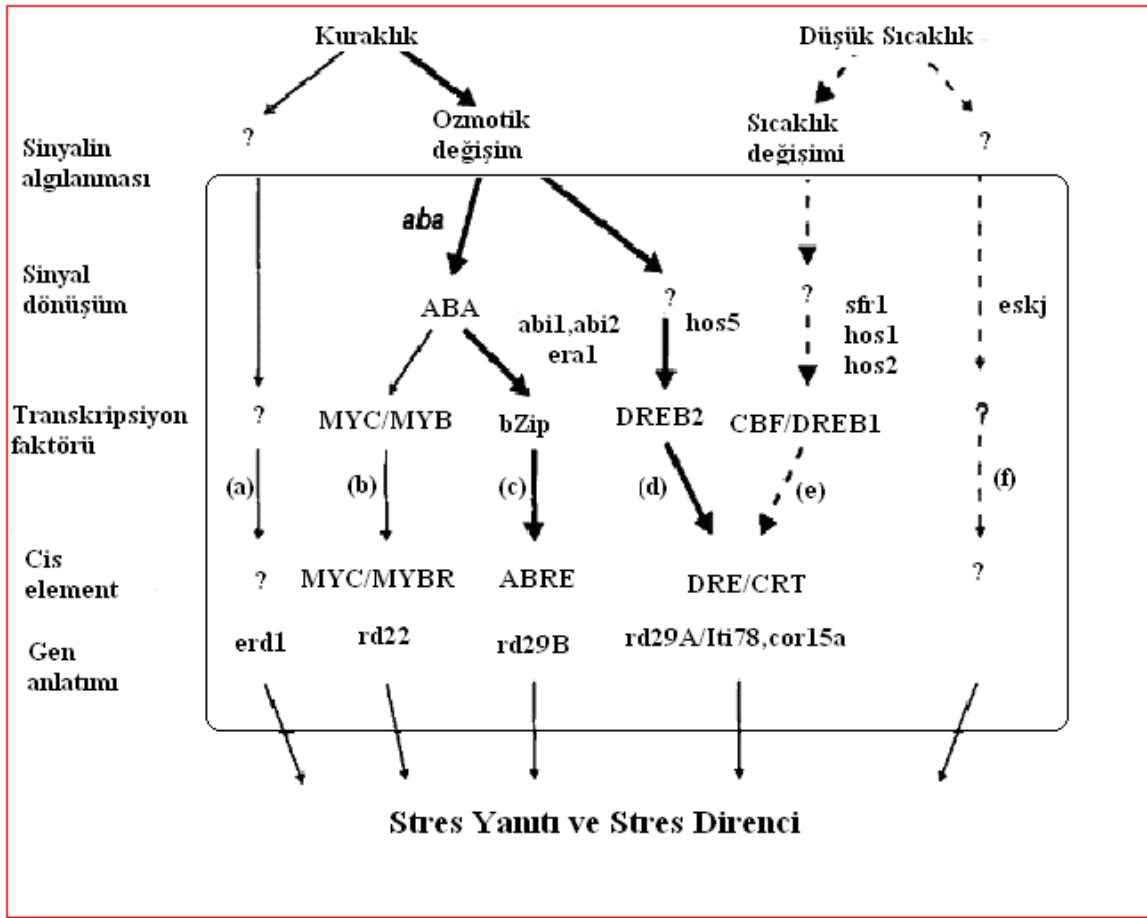
Hajela ve arkadaşları , soğuk stresi verdikleri bitkilerde, gen anlatımının değiştiğini Northern Blot Analizi ile göstermiş ve ilk kez COR genini izole etmiş ve klonlamışlardır (Hajela vd., 1990). Bu genlerin fazla anlatım yapması bitkinin soğuk direncini artırır (Artus vd.,1996 ; Uemura vd.,1996).

COR genleri, ABRE (abscisic acid responsive elements), DRE/CRT (dehydration responsive elements), MYB (myeloblastosis) ya da MYC (myelocytomatosis) promotor bölgelerine sahiptir. (Chinnusamy vd., 2006).

Hakkında en çok çalışma yapılmış olan COR genleri, cor78/RD29A, cor15A, kin1 ve cor 6.6/Kin2 olup, soğuk uygulaması, ABA ve su azlığı ile tetiklendikleri kanıtlanmıştır. Bu genlerin her biri promotor dizileri içersinde C-tekrar (CRT) ve Dehidrasyon duyarlı element (DRE) motiflerini taşırlar (Thomashow, 1998; Stockinger vd., 2001; Lee vd., 2003).

Cor 15a'nın promotor bölgesinde belirlenen CCGAC dizisi, cis-acting (C-Repeat/Dehydration Responsive Element, CRT/DRE) elementtir (Baker vd.,1994;Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki,1994). Maya bir hibrit sistemi kullanılarak CRT bölgesine bağlanan bir transkripsiyon faktörünün varlığı saptanmış, bu faktöre CRT Bağlanma Faktörü 1, CBF1 adı verilmiştir (Stockinger vd.,1997).

Pek çok gen aynı anda hem soğuk hem de kuraklık stresi ile uyarılırlar. Strese cevap veren genlerin anlatımlarının farklı düzenlenmeleri moleküler ve genomik analizler ile kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar stres koşulları karşısında bitkilerde, Absisik Asit (ABA) sentezinin arttığını ve bazı stres genlerinin ABA ile düzenlendiğini göstermektedir. (Xiong vd., 2002; Shinozaki vd., 2003). Stres genlerinin ABA ya bağımlı ve ABA dan bağımsız olarak düzenlendiği sinyal ileti yolları vardır. Bunlar şekil 1.4 'te özetlenmiştir.



Şekil 1.4 Sinyal ileti yolağı, (a) ve (b) ABA-bağımlı, (c), (d), (e) ve (f) ABA-bağımsız (Shinozaki vd., 2003)

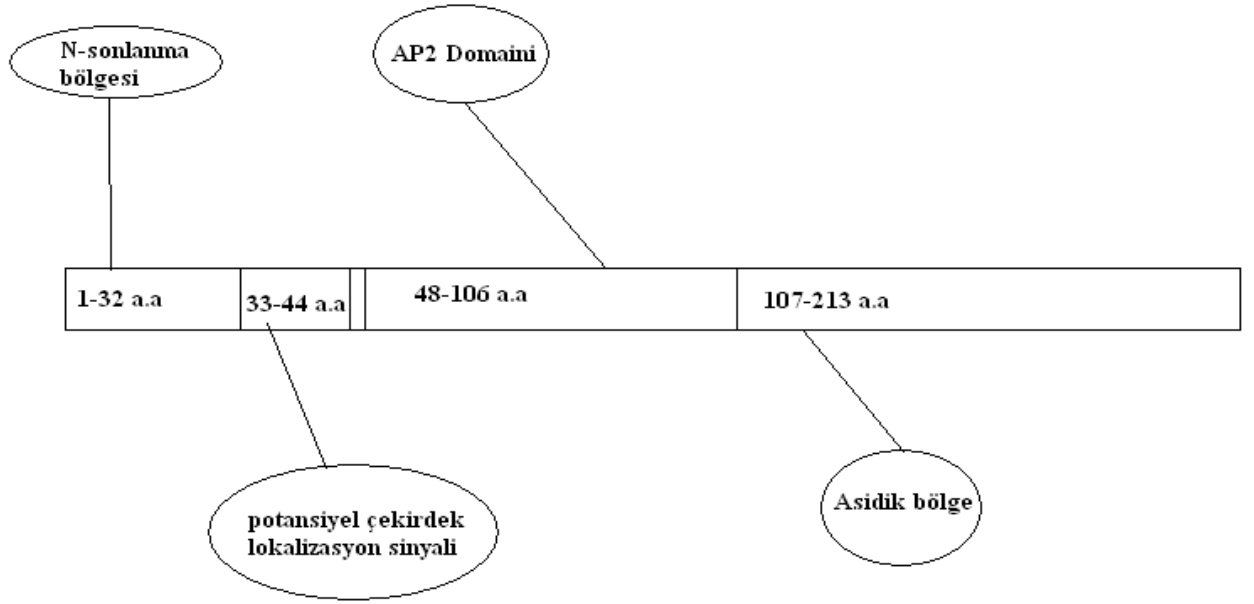
1.2 CBF/DREB TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

1.2.1 CBF/DREB transkripsiyon Faktörleri

Soğuk aklimitasyonu ve düşük sıcaklıkla düzenlenen genlerle ilgili olarak yapılan çalışmalar son on yıl içerisinde yoğunluk kazanmıştır. Bu çalışmalar ile Arabidopsis bitkisinde bulunan, CBF/DREB transkripsiyon faktörleri ayrıntılı biçimde incelenmiş ve en iyi anlaşılan sistem olmuştur. CBF/DREB1 proteinleri AP2/ERF DNA bağlanma proteinleri ailesine mensuptur ve soğuk ve dehidrasyona duyarlı DNA düzenleme elementi olan DRE (C tekrar bölgesi CRT olarak da adlandırılır) bölgesine bağlanır (Badawi, 2006).

CRT/DRE elementleri soğuk stresi karşısında gen anlatımını uyararak CCGAC dizisini barındırırlar ve pek çok soğuk uyarımlı genin yapısında mevcuttur. Ancak CBF/DREB1 genlerinin promotorları CCGAC dizisini içermemesine karşın düşük sıcaklıkla uyarılır. Bu uyarım promotorlarındaki özel cis-elementler sayesinde gerçekleşir(Jaglo-Ottosen vd.,1998).

CBF1 protein dizisi 213 aminoasitten oluşmuş olup, N-sonlanma bölgesi, C-terminal transkripsiyonel aktivasyon bölgesi ve aralarında kalan çekirdek lokalizasyon sinyali ve AP2 domainden kısımlarından oluşur. N-sonlanma bölgesi (1-32 aminoasitler arası), potansiyel çekirdek lokalizasyon sinyali (33-44), AP2 Domaini (48-106) ve asidik bölge (107-213) biçimindedir (Riechman ve Meyerowitz,1998 ; Wang vd., 2005).



Şekil 1.5 CBF 1 proteini

CBF1, ilk olarak 1997 yılında Stockinger ve arkadaşları tarafından klonlanmıştır. Cor 15a geni, yine aynı grup tarafından *Arabidopsis* 'twn klonlanmış soğuk uyarımlı bir gen olup promotor bölgesinde CRT elementini taşır. CBF1 geninin klonlanmasında mayada bir hibrit yöntemi kullanılmıştır (Stockinger vd., 1997). 1998 yılında ise Liu ve arkadaşları tarafından soğuk ve kuraklık stresi altında büyütülen bitkilerden DREB1ve DREB2 adını verdikleri iki gen izole edilmiştir (Liu vd.,1998). DREB1 ve CFB1 genlerinin birbirlerine özdeş oldukları gösterilmiş , bu çalışmadan sonra CBF/DREB olarak adlandırılmaya başlanmıştır (Shinwari vd.,1998). Daha sonra yapılan çalışmalarda CBF2 , CBF3 ve CBF4 olarak adlandırılan transkripsiyon faktörlerini bularak, CBF1'in yalnız olmadığını kanıtlamıştır (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki,2001;Haake vd.,2002). Bunların yanında henüz fonksiyonları belirlenememiş olan CBF5(At1g12610) ve CBF6 (At1g63030) transkripsiyon faktörleri de saptanmıştır.

Arabidopsis CBF1,CBF2 ve CBF3 proteinleri , sırası ile DREB1B, DREB1C ve DREB1A olarak da bilinmektedir (Stockinger vd., 2001). Bu transkripsiyon faktörleri COR promotoru içindeki CRT(C-repeat)/DRE (Dehydration Responsive Element)bölgesine bağlanır (Baker vd.,1994;Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki,1994;Gilmour vd., 1998).

CBF1, CBF2 ve CBF3 proteinlerini kodlayan genler *Arabidopsis* 'in 4 numaralı kromozomu üzerinde olup,%85 benzerlik göstermektedirler (Thomashow, 2001). Intron içermezler (Medina vd.,1999). Bu dört transkripsiyon faktörü yapısal olarak birbirine oldukça benzerdir(Çizelge 1.1).

CBF	MN-SFSAFSEMFG--SDYEP---QGGDYCPTLATSCP
CBF2	MN-SFSAFSEMFG--SDYESSVSSGGDYIPTLASSCP
CBF3	MN-SCSAFSEMFG--SDYESPVSSGGDYSPKLATSCP
CBF4	MNPFYSTFPDSFLSISDHRSPVSDSSECSPKLASSCP
CBF	NSGKWSEVREPNNKTRIWLGTFTQTAEMAARAHDAALALGRSACLN
CBF2	NSGKWCEVREPNNKTRIWLGTFTQTAEMAARAHDAALALGRSACLN
CBF3	NSGKWCEVREPNNKTRIWLGTFTQTAEMAARAHDAALALGRSACLN
CBF4	NSGKWCEVREPNNKSRIWLGTFTVEMAARAHDAALALGRSACLN
CBF	STCAKDIQKAAAEAAALAFQDETCDTTTTDHGLDMEETMVEAIYTPE-----QSEGAFYMD
CBF2	STCAKDIQKAAAEAAALAFQDEMCDATT-DHGFDMEETLVEAIYTAE-----QSENAFYMH
CBF3	STCAKEIQKAAAEAAALNFQDEMCHMTTDAHGLDMEETLVEAIYTPE-----QSQDAFYMD
CBF4	TTCPKEIQKAAAEAAAFQNETTTEGS-KTAAEAEAAAGEGVREGERRAEQNGGVFYMD
CBF	EETMFGMPTLLDNMAEGMLLPPPSVQWNHNYDGEDGD-VSLWSY--
CBF2	DEAMFEMPSLLANMAEGMLLPLPSVQWNHNEVDGDDDDVSLWSY--
CBF3	EEAMLGMSSLLDNMAEGMLLPPSPVQWNYNFDVEGDDD-VSLWSY--
CBF4	DEALLGMPNFFENMAEGMLLPPPEVGWNHN-DFDGVGD-VSLWSFDE

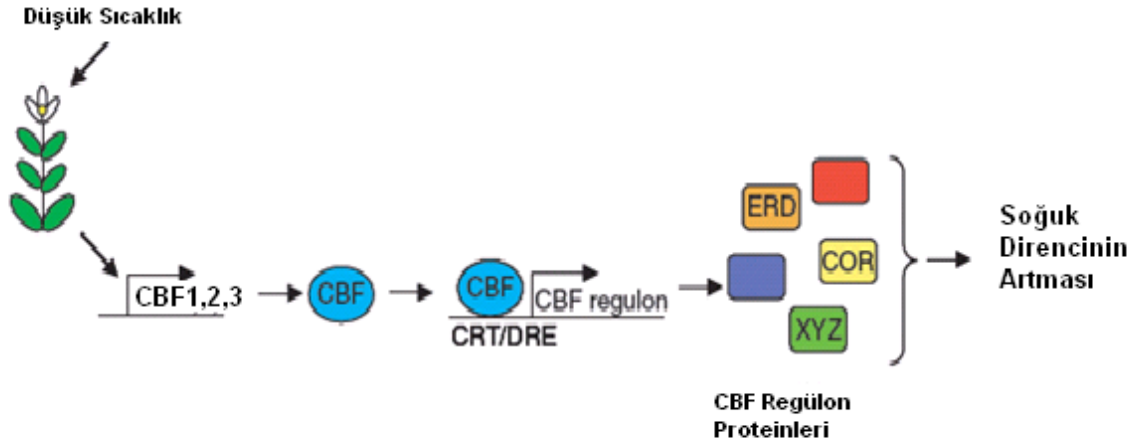
Çizelge 1.1 CBF1,2,3 ve 4 alimnet analizi, Gri bölge AP2 domaini göstermektedir.

Yakın zamanda yapılan iki çalışma , farklı yerlerde yetişen *A. thaliana* kùltivarlarının CBF transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgelerinde , dizin farklılıkları olduğunu göstermiştir (Lin vd.,2008;McKhann vd.,2008).

CBF 1 , 2 ve 3 yalnızca düşük sıcaklıkla değil ,farklı stres faktörleri ile de uyarılırken , CBF4 kuraklıkla uyarılır (Haake vd.,2002). CBF transkripsiyon faktörlerinin uyarıcı stres faktörleri Çizelge 1.2 ‘de, CBF transkripsiyon faktörlerinin soğukla uyarımı şekil1.6 ‘ da basitçe gösterilmiştir.

Transkripsiyon Faktörü	Duyarlı Olduğu Stres	Kaynak
CBF1	Soğuk, Kuraklık, Mekanik uyarım, ABA, Protein inhibisyonu, Işık	Liu vd.,1998 , Gilmour vd.,1998 , Knight vd., 2004 , Zarka vd.,2003 , Fowler vd.,2005
CBF2	Soğuk, Kuraklık, Mekanik uyarım, ABA, Protein inhibisyonu, Işık	Liu vd.,1998 , Gilmour vd.,1998 , Knight vd., 2004 , Zarka vd.,2003 , Fowler vd.,2005
CBF3	Soğuk, Kuraklık, Mekanik uyarım, ABA, Protein inhibisyonu, Işık	Liu vd.,1998 , Gilmour vd.,1998 , Knight vd., 2004 , Zarka vd.,2003 , Fowler vd.,2005
CBF4	Kuraklık	Haake vd.,2002

Çizelge 1.2 CBF Transkripsiyon faktörlerinin duyarlı oldukları stres faktörleri



Şekil 1.6 CBF transkripsiyon faktörlerinin soğukla uyarımı ve soğuk direncinin artması (Van Buskirk and Thomashow, 2006)

CBF anlatımı bitkilerde donma toleransını arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Jaglo-Ottosen vd., 1998; Liu vd., 1998; Kasuga vd., 1999). CBF1 ve CBF2 nin fazla anlatım yapması , bitkide morfolojik anormalliklere, prolin ve şeker üretiminin artmasına yol açar. Ayrıca CBF1, CBF2 ve CBF3 e fazla anlatım yaptırılması sonucu benzer gen setlerinin uyarıldığı da gösterilmiştir (Gilmour vd., 2004).

CBF transkripsiyon faktörlerinin klonlanmalarından sonra, bu transkripsiyon faktörlerinin homologlarının başka bitki türlerinde var olabileceği düşünülerek çeşitli gruplar tarafından çalışmalar yapılarak, pek çok monokotiledon ve dikotiledonda varlıkları kanıtlanmıştır.

1.2.2 CBF/DREB Transkripsiyon Faktörü Homologları

Aralarında buğday, arpa, mısır gibi önemli tarım ürünlerini ve çeşitli model bitkilerinde bulunduğu pek çok otsu bitkinin soğuk stresi karşısında hayatta kalabilmeleri, bu bitkilerde de CBF/DREB transkripsiyon faktörlerinin varlığını sorgulamaya yönlendirmiştir. Önceleri *Arabidopsis thaliana* CBF dizileri kullanılarak, daha sonraları bulunan CBF homologlarının dizileri de göz önüne alınarak, gene özgü ya da AP2 domain primerleri ve dejenere primerler tasarlanmıştır. Bu primerler kullanılarak ters transkripsiyon PCR yöntemiyle cDNA'lar elde edilmiştir. Bu cDNA'larla cDNA Kütüphaneleri kurulmuş, elde edilen pozitif klonların Blast analizleri yapılarak, *Arabidopsis thaliana* 'nın CBF genlerine benzerlikleri ölçülmüştür. Bir diğer yaygın yöntem ise RACE olup, AP2 primerleri ile elde edilen bölgenin 3' ve 5' uçlarından uzatılarak tam uzunlukta bir gen bölgesi elde edilmiştir.

CBF/DREB Homologlarına sahip bitki türleri arasında Arpa (*Hordeum vulgare*) , Mısır (*Zea mays*) , Pamuk (*Gossypium hirsutum*), Buğday (*Triticum aestivum*), Kolza (*Brassica napus*), *Capsella bursa-pastoris* sayılabilir. Otsu bitkilerde mevcut CBF homologları Ek 2 'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Otsu bitkilerde CBF/DREB homologlarının keşfedilmeye başlanmasından sonra, benzer çalışmalar odunsu bitkiler içinde yapılmaya başlanmış ve ekonomik değeri yüksek olan meyve ve sanayi ağaçlarında bu genin varlığı araştırılmıştır. Aralarında pek çok palmye türünün de bulunduğu 30 kadar ağaç türünde de gen homologlarının varlığı kanıtlanmıştır.

Bu türler arasında Kavak (*Populus spp.*) , Ökalyptus (*Eucalyptus spp.*) , Kiraz (*Prunus avium*), Elma (*Malus baccata*) başta sayılabilir. Odunsu bitkilerde bulunan CBF homologları Ek 3 'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

1.3 AP2 DOMAIN

1.3.1 AP2/EREBP Ailesi

Bitki gelişimi ve hormona bağlı gen anlatımında görev yapan AP2/EREBP ailesi, bitkiye özgü olup, AP2 domain adı verilen yaklaşık 60–70 aminoasitlik, korunmuş bir bölge haricinde benzerlik göstermezler (Kizis vd. 2001).

AP2/EREBP ailesine mensup üyeler, epidermal hücrelerin karakterinin ve çiçek organ özelliklerinin belirlenmesi, ovül ve tohum gelişimi gibi bitkinin büyüme gelişme evrelerinde önemli rol oynadıkları gibi, çeşitli abiyotik stres koşulları karşısında da görev aldıkları bilinmektedir (Riechmann ve Meyerowitz, 1998).

AP2/EREBP ailesi, sahip oldukları AP2 domain sayılarına göre çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmuşlardır.

Birinci sınıf 2 adet AP2 domain taşıyan proteinleri içerir:

- APETALA 2(AP2) (Jofuku vd., ,1994)
- AINTEGUMENTA (ANT) (Eliot vd.,1996 ; Klucher vd.,1996)
- Glossy 15 (G15) (Moose ve Sisco, 1996)

İkinci sınıf 1 adet AP2 domaine sahip üyelerden oluşur:

- ERF (Ohme-Takagi ve Shinshi, 1995)
- TINY (Wilson vd.,1996)
- AtEBP (Buttner ve Singh, 1997)
- AB14 (Finkelstein vd.,1998)
- DREB (Liu vd.,1998)

Üçüncü sınıf ise 2 farklı DNA bağlanma bölgesi, AP2 ve B3 e sahip, RAV1 ve RAV2 dir. (Kim vd.,2005).

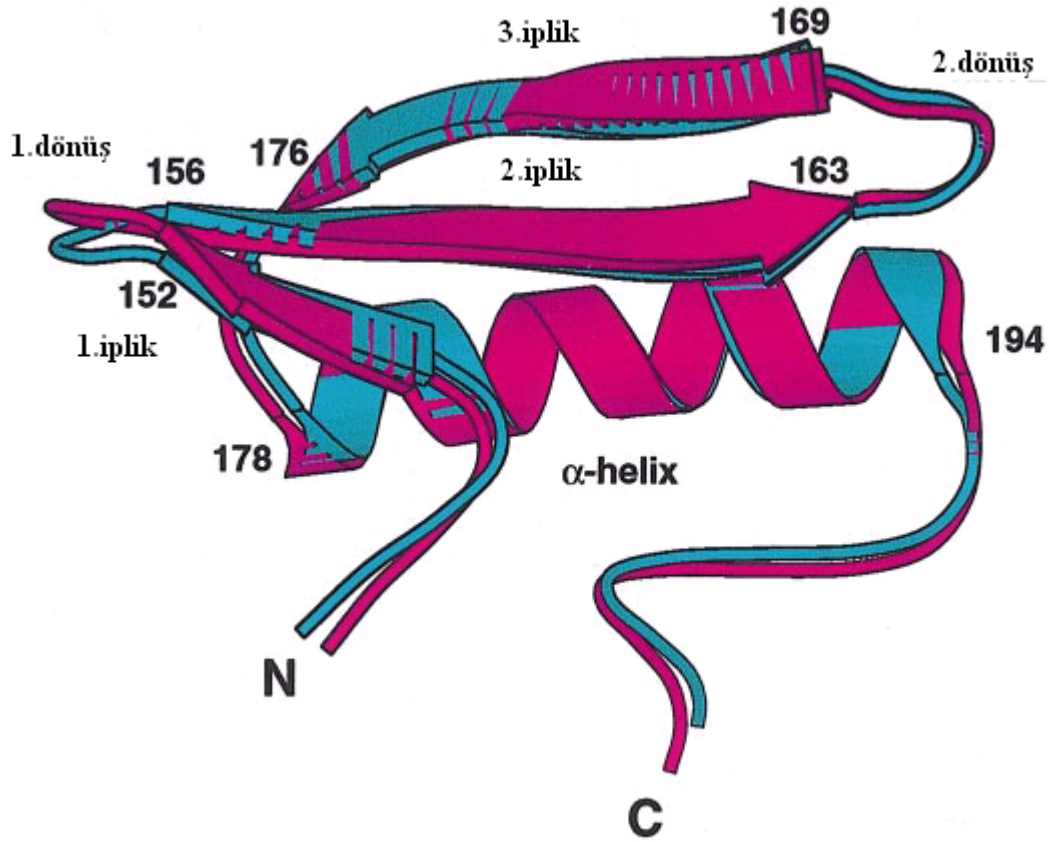
Ancak bazı kaynaklar bu sistematığı daha farklı yaparak , AP2 ve ANT proteinlerini bir subfamilya , tek AP2 domain taşıdığı gerekçesiyle de ERF , DREB ve RAV proteinlerini ise başka bir subfamilya altında toplamaktadır (Shigyo vd.,2006).

Sakuma ise 2002 yılında yaptığı çalışmasında, *Arabidopsis thaliana* 'nın AP2 domaine sahip 146 transkripsiyon faktörünü sahip oldukları AP2 domain kopya sayısı ve dizin özelliklerine göre 5 subfamilyaya ayırmıştır.

- 1- DREB
- 2- ERF
- 3- AP2
- 4- RAV
- 5- Diğer

DREB ve ERF subfamilyaları, WLG motifi içeren bir tek AP2 domain taşırlar ve toplam 120 üyeye sahiptirler. AP2 Subfamilyası mensuplarının 2 AP2 Domaini vardır. RAV subfamilyasının 6 mensubu olup, bunlar AP2 domaini takiben B3 DNA bağlanma bölgesine de sahiptirler. Geri kalan 4 protein ise diğer adı altında toplanmıştır ve WLG motifi içermeyen, bir tek AP2 domain ile karakterizedirler (Magnani vd., 2004).

Bu domainler, belirli dizileri tanır ve bağlanırlar. ERF proteinindeki AP2 domain, GCC Kutusuna (AGCCGCC; G2-G5-C7) , ANT içersindeki 2 AP2 domain ise gCAC(A/G)N(A/T)TcCC(a/g)ANG(c/t) dizisine bağlanır. Allen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ERF proteinindeki AP2 domainin yapısını Multidimensional NMR ile belirlenmiştir. Bu yapı şekil 1.6 'da şematik olarak gösterilmektedir.60 aminoasitlik AP2 domain üç antiparalel β -sheet ve 1 α -heliks yapısından oluşur(Ohme-Takagi ve Shinshi, 1995). AP2 domain diğer bağlanma proteinlerinin aksine , -sheet yapısında bulunan Arg ve Trp aminoasitlerinden AGCCGCC dizisine ile bağlanır (Allen vd.,1998).



Şekil 1.7 AP2 Domainin multidimensional NMR ile belirlenen 3 boyutlu yapısı (Allen vd.,1998)

Büttner ve Singh, yaptıkları çalışmada *Arabidopsis thaliana* 'dan AtEBP adını verdikleri, patojen enfeksiyonu durumunda görev yapan bir gen izole etmişlerdir. Bu genin GCC kutusuna bağlandığı EMSA ve DNase I Footprinting analizleri ile gösterilmiştir. (Büttner ve Singh, 1997).

Arabidopsis Transkripsiyon Faktörleri Veritabanı'na (DATF - Database of Arabidopsis Transcription Factors) göre Arabidopsis genomunda AP2 domain içeren 146 transkripsiyon faktörü mevcuttur. CBF1 6 üyesi ile AP2nin küçük bir altailesi olup, PKK/RPAGRxKFxETRHF ve DSAWR belirteç dizilerini taşırlar (Jaglo vd.,2001).

1.3.2 AP2 Domain

AP2 domain, bitkiye özgü olup, yaklaşık 60 aminoasitlik bir DNA bağlanma bölgesi taşıyan bir DNA bağlanma birimidir (Ohto vd., 2004). İlk kez Jofuku ve arkadaşları tarafından 1994 yılında *Arabidopsis* 'te bulunan, çiçek ve tohum gelişiminden sorumlu APETALA2 geninde saptanmıştır (Jofuku vd., 1994). Bu gen diğer çiçeklenme genlerinin aksine MADS domaini yerine 2 adet AP2 domain taşımaktadır (Okamuro vd., 1997 ; Wessler , 2005) .

AP2 domain, 2 bölge içerir:

- 1- 20 aminoasitlik bazik ve hidrofilik kısımca zengin - YRG element
- 2- Amfipatik , α - heliks yapıda RAYD elementi

2002 yılında ,bir siliyat olan *Tetrahymena thermophila* 'da AP2 domainin bulunmasını Siyanobakterlerden *Trichodesmium erythraeum* 'da, ve virüslerden *Enterobacteria phage RB94* ve *bacteriophage Felix 01* 'de varlığını bulunması izlemiştir (Wuitschick,2002; Wuitschick vd.,2004; Wessler, 2005). Bu çalışmalar AP2 domain'in bitki âlemi dışında varlığını kanıtlamıştır. Bu kanıt filogenetik ve evrim çalışmalarının yapılmasını yön vermiştir.

Yapılan çalışmalar, kuraklık, tuzluluk, soğuk ve ABA gibi abiyotik stres koşulları ile patojen enfeksiyonu karşısında görev yapan transkripsiyon faktörlerinin AP2 domain taşıdığını göstermektedir (Sakuma vd.,2002; Onate-Sanchez ve Singh , 2002 ; Gutterson ve Reuber, 2004; Song vd.,2005).

1.4 ZEYTİN

1.4.1 Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Tarihi

Zeytin, genellikle ılıman iklimin hüküm sürdüğü 30⁰ ve 40⁰ enlem ve boylamları arasında yayılış gösteren, boyları 10–15 metreyi bulabilen, yavaş büyüyen, her dem yeşil ağaçlardır (Seçmen ve ark, 2000).

Tüm toprak çeşitlerinde yaşayabilen zeytin, genellikle 200 metrenin altında termomediterran kuşak ve 200 ila 500 m arasında hüküm süren mezo mediteran kuşakta yaygın olarak, soğuğa karşı hassas olduğundan 500 metreden yükseklerde ise nadiren görülür (Roudriguez-Ariza ve Moya, 2005).

Zeytinin mensubu olduğu *Oleaceae* familyası, 25 genus ve 500–600 kadar türe sahiptir. Zeytinin ayrıntılı taksonomik sınıflandırması çizelge 1.3’de gösterilmektedir.

Kingdom	<i>Plantae</i>
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Class	<i>Magnoliopsida</i>
Subclass	<i>Asteridae</i>
Order	<i>Scrophulariales</i>
Familya	<i>Oleaceae</i>
Genus	<i>Olea</i>

Çizelge 1.3 Zeytinin taksonomik sınıflandırması (Türkiye Taksonomik Veri Tabanı
<http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1.jsp>)

Olea cinsine ait, Asya, Afrika, Akdeniz havzası ve Okyanusya'ya dağılmış 30 kadar tür mevcuttur (Besnard ve ark, 2002). Türlerin içersinde meyvelerinin tüketilen ve yağ elde edilebilmesi nedeniyle ekonomik değeri en yüksek olan tür *Olea europaea* dır. Kromozom sayısı $2n = 46$ olup, iki varyetesi mevcuttur (Baldoni ve ark, 2006).

Olea europaea L.subp. *oleaster*

Olea europaea L.subp. *europaea*

Olea europaea L.subp. *oleaster* alçak irtifada, Akdeniz havzası, Ege sahilleri, Lübnan ve İsrail'in kıyı şeridi, Tunus, Cezayir, Fas, Güney İspanya ve Güney İtalya da yetişen, meyveleri küçük, yağ içeriği düşük bir varyete olup, Anadolu'da Delice olarak adlandırılmaktadır. *Olea europaea* L.subp. *europaea* ise yine Akdeniz Havzası içersinde yetiştirilen, iklimsel istekleri oldukça benzer, meyveleri büyük ve yağ içeriği yüksek olan alttürdür (Zohary ve Spiegel-Roy, 1975).

Zeytinin, bugün *Olea europaea* L.subp. *oleaster* olarak adlandırılan varyeteden, M.Ö. 4000 yıllarında, Akdeniz havzasının doğusunda ehlileştirildiği, çeşitli göçlerle doğudan batıya doğru tüm bölgeye yayıldığı bilinmektedir (Hatzopoulos ve ark, 2002). Yapılan çekirdek, plastid ve mitokondrial DNA analizleri ve parmakizi profillemeye çalışmaları *Olea europaea* L.subp. *europaea* nın *oleaster* 'den kültüre edildiğini göstermektedir (Besnard vd., 2001; 2002; Koçkar ve Ilıkçı, 2003; Elbaum ve ark, 2006). Ayrıca kültürarlar arasındaki çeşitlilikleri gösteren çalışmalar da mevcuttur (Besnard vd.,2001;Contento vd.,2002).

1.4.2 Türkiye ve Dünyada Zeytin Üretimi

Zeytinin dünyadaki toplam üretim alanı yaklaşık 10 milyon hektar kadar olup, tarım ürünleri toplamının %60 ı kadardır (Rugini ve ark, 2006). Zeytin, dünya üzerinde 30'dan fazla ülkede yetişebilir ancak yalnızca Akdeniz iklimine benzer koşulların görüldüğü bölgelerde tarımı yapılabilir. Dünya zeytin üretiminin %97 si, zeytinyağı üretiminin % 98'i ve tüketiminin %88'i bu ülkelerde yapılmaktadır (Bedestenci ve Vuruş, 2000).

Zeytin üretimi ve sahip olduğu zeytin ağacı sayısı bakımından Türkiye, İspanya, İtalya ve Yunanistan'ın ardından dördüncü sırada yer almaktadır. Veriler çizelge 1.4 ve 1.5 de gösterilmiştir.

	Ağaç Sayısı (milyon)	Alan (000 hektar)
İspanya	218	2239
İtalya	189	1147
Yunanistan	123	729
Türkiye	95,7	897
Tunus	59	1624
Portekiz	53	340
Fas	40	480
Suriye	28	453

Çizelge 1.4 Başlıca ülkelerde zeytin ağaçlarının dağılımı ve zeytin ekili alanlar (IOOC, 1999)

ÜLKELER	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
İspanya	1.773	4.467	3.840	4.279	3.395	4.944	5.284
İtalya	3.289	2.195	3.081	2.549	3.765	2.821	2.975
Yunanistan	1.731	1.950	1.700	2.068	2.197	2.349	2.200
Türkiye	515	1.800	520	1.650	600	1.800	600
Tunus	350	1.250	1.550	950	1.125	1.000	600
Fas	436	800	450	650	386	400	400
Suriye	423	648	403	785	401	866	425
Portekiz	320	284	300	286	334	260	280
Cezayir	131	313	319	124	363	217	300
Dünya Toplamı	9.880	14.781	13.063	14.486	13.742	14.745	14.353

Çizelge 1.5 Dünya zeytin üretimi (1000 Ton) (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, FAO)

Türkiye sahip olduğu mevcut ağaç sayısını geçen 20 yıl içerisinde %50, aldığı ürün miktarını ise % 150 arttırmıştır. Veriler çizelge 1.6 ve 1.7 de gösterilmektedir.

	Toplam	Meyve Veren	Meyve Vermeyen
1987	85 585	79 000	6 585
1988	85 646	79 319	6 327
1989	85 710	79 460	6 250
1990	86 560	80 600	5 960
1991	87 705	81 520	6 185
1992	87 088	81 260	5 828
1993	87 163	81 703	5 460
1994	88 147	82 192	5 955
1995	87 581	81 437	6 144
1996	89 740	83 200	6 540
1997	95 730	85 780	9 950
1998	93 450	85 850	7 600
1999	95 500	87 130	8 370
2000	97 770	89 200	8 570
2001	99 000	90 000	9 000
2002	101 600	91 700	9 900
2003	102 750	92 250	10 500
2004	107 100	94 950	12 150
2005	113 180	96 625	16 555
2006	129 265	97 773	31 492

Çizelge 1.6 Türkiye ‘de mevcut zeytin ağacı sayısı (DİE 2006)

	TOPLAM	SOFRALIK	YAĞLIK
1987	600 000	173 080	426 920
1988	1 100 000	218 000	882 000
1989	500 000	162 000	338 000
1990	1 100 000	337 000	763 000
1991	640 000	181 000	459 000
1992	750 000	231 000	519 000
1993	550 000	200 000	350 000
1994	1 400 000	350 000	1 050 000
1995	515 000	206 000	309 000
1996	1 800 000	435 000	1 365 000
1997	510 000	200 000	310 000
1998	1 650 000	430 000	1 220 000
1999	600 000	240 000	360 000
2000	1 800 000	490 000	1 310 000
2001	600 000	235 000	365 000
2002	1 800 000	450 000	1 350 000
2003	850 000	350 000	500 000
2004	1 600 000	400 000	1 200 000
2005	1 200 000	400 000	800 000
2006	1 766 749	555 749	1 211 000

Çizelge 1.7 Türkiye'nin zeytin üretimi (DİE 2006)

1.4.3 Zeytin ve Stres

Yapılan çeşitli çalışmalar ile Zeytinin kuraklık, tuzluluk ve soğuk streslerine karşı dirençli olduğunu kanıtlanmıştır.

Kuraklığa dirençli olan zeytin , gaz değişimini indirgeyerek, transpirasyonu kontrol ederek ve yaprak kök arasında yüksek su potansiyeli gradiyenti kurarak su azlığına dayanabilir (Dichio vd., 2005).

Tuz stresi su alımını azaltır, yapraklarda kütikula kalınlaşır, mezofil tabakası ise CO₂ girişini sınırlandıracak biçim alır, yaprak kalınlaşır. Ayrıca yüksek tuzluluk, meyve ağırlığını ve ürün miktarını azaltmakta, ancak yaş içeriğini etkilememektedir (Chartzoulakis, 2005).

Tüm bitkilerde olduğu gibi, soğuk stresi karşısında zeytinin en hassas organı tomurcuklardır, onları sırasıyla sürgünler, yapraklar ve kökler izler. Yapraklarda parankima hücreleri ölür, kısmi kuruma ve kahverengileşme başlar, sürgünlerin apikal bölgeleri yanar (Gomez del Campo, 2005) . Bu stres, üst epidermis hücrelerini %26,3 , üst palizat parankiması hücrelerini %27,9, sünger parankiması hücrelerini %10,2 alt palizat parankiması hücrelerini %45,6 ve alt epidermis hücrelerini %51,5 oranında artırır (Bosabalidis vd.,2002).

Donma, bitkilerin iletim borularında buz kristalleri oluşumuna neden olur. Buz hücrelerarası boşluğa yayılarak hücre içi ve hücre dışında farklı basınç oluşumuna yol açar. Böylece hücre difüzyona uğrar. Dehidrasyon, donmuş hücrelerin uğradığı bir diğer stres olup, donma dirençli fenotiplerin neden aynı zamanda kuraklık dirençli de olduğunun yanıtıdır (Gomez del Campo, 2005).

Bartolozzi ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada soğuk aklimitasyonunun zeytinde donma direncini arttırdığını göstermişlerdir (Bartolozzi vd.,2001).

1.4.4 Zeytinin Geleceği

Ekonomik değerinin fazlalığı nedeniyle, Avustralya, Güney Amerika gibi anavatanı olmayan ölkelerde de tarımının yapılmaya başlanması, zeytin hakkında yapılan çalışmaları oldukça fazlalaştırmıştır. Bu çalışmalar ile

- 1) Otofertil türlerin geliştirilebilmesi
- 2) Meyve olgunlaşmasının hızlanması, yağ miktarı ve kalitesinin arttırılması
- 3) Coğrafi ve iklimsel isteklerinin genişletilebilmesi
- 4) Biyotik ve abiyotik strese dirençlilik kazandırılması

hedeflenmektedir (Rugini vd., 2006).

Ayrıca iklim koşullarına dirençlilik kazandırma, hasat rejiminin geliştirilmesi ile bir sonraki sezonun ürününün arttırılması, elde edilen yağın miktar ve kalitesinin arttırılması amacı ile pek çok çalışma yürütölmektedir (Hatzopoulos vd. 2002).

1.4.5 Zeytinde Klonlanan Genler

Zeytin ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, diğer bitkilere nazaran strese dayanıklılığı belirleyen mekanizmalar ile ilgili yapılmış pek az çalışma bulunmakta, bunlarda stresin neden olduğu fizyolojik değişimler, yıllık ürün alımını ve zeytinyağı miktarını ne kadar etkilediğı ile ilgili çalışmalardır. Soğuk stresi ve aklimitasyonu ile ilgili çalışmalar ise son birkaç yıl içersinde artmış, bu çalışmalarda çeşitli kùltivarların soğuk karşısındaki dirençleri karşılaştırılmış, antioksidan enzimlerin ve dehidrin benzeri proteinlerin değişimleri ölçölmüştür (Barranco vd.,2005; Cansev vd.,2009).

2000 yılında *Arabidopsis thaliana*' da bulunan DGAT geni, dejenere primerler kullanılarak bulunmuş ve klonlanmıştır (Giannoulia vd. 2000). Bir diğer klonlanmış olan FAD2 geni ise , oleik asitin linoleik aside dönüştürülmesinde görev yapar (Hernandez vd.,2005). Yağ metabolizmasında görevi bulunan oleosin geni zeytinde klonlanmış ve çeşitli anlatım çalışmaları yapılmıştır. Oleosin 165 a.a lik bir gen olup çeşitli gelişim evrelerinde önemli rol oynamaktadır. (Giannoulia vd.,2007). OePIP 2.1 geni ise kuraklık stresi karşısında güçlü downregulasyon göstermektedir (Secchi vd.,2007). Osmotin geni ise, absisik asit, etilen, patojen enfeksiyonu ve düşük sıcaklıkla uyarılan bir gen olup, programlı hücre ölümünde görev yapar (D'angeli S. ve Altamura M.M., 2007).

Zeytinde soğuk stresi tarafından uyarılan genlerle ilgili olarak yapılan en kapsamlı çalışma soğuk stresi verilmiş zeytinlerden SSH Kütüphanesi kurulmasıdır. Bu kütüphaneden elde edilen 4 klon SAG3 , FF301 , SABP ve SABS olup , SAG3 YCF2 proteinine, FF301 Tirozin Kinaz katalitik domainine , SABp *Vigna radiata*'nın Cab genine, SABS ise BSP ye yüksek benzerlik göstermektedir (Bernardi vd.,2008).

1.5 TEZİN AMACI

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 klonlanması amaçlanmaktadır.

Bu sebeple, stres verilen bitkilerden total RNA izolasyonu yapılacak, oligodT primerleri kullanılarak cDNA sentezlenecek, daha sonra bütün bitkilerde korunmuş bir bölge olan AP2 kısımları göz önüne alınarak hazırlanan primerler ile gen bölgeleri çoğaltılacaktır. Çoğaltılan bölgeler pGEM TEasy vektörüne klonlanacak, dizin analizi yaptırılacak, tam uzunlukta cDNA elde etmek için RACE yöntemi kullanılacaktır. RACE ile elde edilen tam uzunluktaki cDNAların benzerlikleri BLAST analizi ile saptanacaktır.

Ayrıca, McKhann ve arkadaşlarının 2008 tarihli yayınından yola çıkılarak Memecik ve Gemlik kültürlerinin AP2 domainleri karşılaştırılacaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali

1 yaşındaki *Olea europaea gemlik* k ltivarı Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

2.2 Büyüme Koşulları

Zeytin fidanları temiz saksılara dikildi ve yaprakları yıkanarak olası zirai ilaç kalıntıları uzaklaştırıldı. Ortam koşullarına uyum sağlamaları için bitkiler bir hafta süreyle 14/10 saat gündüz/ gece, 22   C /15   C gündüz / gece periyodunda, gündüz 150  mol M²s⁻¹ ışık, gece ise karanlık olacak şekilde tutuldu.

Bir haftanın sonunda, 14/10 saat gündüz/ gece, 4   C /2   C gündüz / gece periyodunda, gündüz 150  mol M²s⁻¹ ışık, gece ise karanlık olacak şekilde 1 hafta süreyle soğuk stresi verildi.

2.3 Bitki  rneklerinin Alınması

Bir haftalık büyüme sonunda, stres verilmeden hemen önce bitkiden yaprak  rneęi alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80   C 'de saklandı. Daha sonra sırası ile 15 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 12 saat, bir gün ve bir hafta sonunda yaprak örnekleri alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80   C 'de saklandı.

2.4 RNA İzolasyonu

Soğuk stresi verilmiş bitkilerde 2.3 de belirtilen zamanlarda alınan yaprak örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı.

2.4.1 RNA İzolasyonu için Hazırlık

RNAlar kolaylıkla yıkılabilen moleküllerdir. Bu nedenle izolasyondan önce kullanılacak havan ve havanelleri, tüm cam ve plastik malzemeler %0,1 'lik DEPCli su içersinde 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.

2.4.2 RNA İzolasyonu

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örneği, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde toz haline getirilerek, 2 ml lik mikro merkezkaç 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 İso-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 DEPCli su içerisinde çözülerek, 55 °C de 10 dakika inkübe edildi. Örnekler -80 °C de saklandı.

2.5 RNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

2.5.1 Spot Test

RNA miktarını belirlemek amacıyla, 0,40 gram Agaroz (Applichem), 40 ml 1X Fosfat tamponu ile çözüldü, 60 °C ye soğutuldu. İçersine 20 µl (mg/ml) Etidium bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

Kontrol RNA'sı (µg/ µl) 2,5, 5, 25 ve 50 kez sulandırılarak, sırası ile, 200 ng, 100ng, 20ng ve 10ng'lık örnekler elde edildi. Jele 1 µl spotlandı.

İzole edilen RNA'lar da 10, 20, 40, 50 ve 100 kez sulandırıldı. Jele 1'er µl spotlandı. Elde edilen fotoğraf üzerinde kontrol RNAsı göz önüne alınarak miktar hesabı yapıldı.

2.5.2 Formaldehit Jeli Protokolü

Tüm elektroforez aparatları DEPCli su ile yıkanarak temizlendi. % 1 lik jel hazırlamak için, 0,40 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.

2.5.3 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması

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

2.6 cDNA Sentezi

cDNA sentezi için ROCHE High Fidelity cDNA Sentez kiti kullanıldı. 3 µl total RNA'ya 1 µl oligo d(T) primer ve 7,4 µl su eklenip, 65 ° C de 10 dakika ve 4 ° C de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun üzerine , 4 µl reaksiyon Buffer(5X) , 2 µl dNTPs (10mM) , 1 µl DTT , 0,5 µl Protector RNaz Inhibitör (40U/ µl) ve 1,1 µl Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 55 ° C 1 saat ve 85 ° C de 5 dk inkübe edildi. -20 ° C 'de saklandı.

2.7 cDNAların Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltımı (Polymerase Chain Reaction –PCR)

2.7.1 Kullanılan Primerler

PCR reaksiyonları için 2 set primer hazırlandı. CBF1F ve CBF1R primerleri için, bugüne kadar klonlanan CBF homologlarının dizinleri hizalanmış ve bu dizinlerin AP2 domainleri göz önüne alınarak tasarlanmıştır. Primerlerin tasarımında kullanılan dizinler ve alignmant Ek 4 'te verilmiştir. F ve R primerleri ise Gamboa ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları yayın göz önüne alınarak sentezlettirilmiştir.

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Primerin Adı	Primer Dizini
CBF1F	5'- CCG AAG AAG CGC GCT GGA AGG AAG -3'
CBF1R	5' - CTC AAC TTC GAC TCC GCA TGG CGG – 3'
F	5' - AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TT -3
R	5' - CCA AGC CGA GTC AGC GAA GTT – 3'

Çizelge 2.1 PCR Reaksiyonunda kullanılan primerler

2.7.2 PCR Koşulları

500 µl lik PCR tüpü içersine, 1 µl kalıp cDNA, 5 µl Qiagen PCR Buffer (10 X), 10 µl Q Solution (5X), 1 µl dNTPs (10mM), 1 µl forward primer (20 mM) ve 1 µl reverse primer (20 mM) , 0,5 µl Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı.

PCR döngüsü ise şöyledir. 94⁰ C de 4 dakika denatüre edildikten sonra, 94⁰ C 30 saniye denatürasyon, 56⁰ C 30 saniye primer bağlanması ve 72⁰ C 30 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72⁰ C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp, -20⁰ C de saklandı.

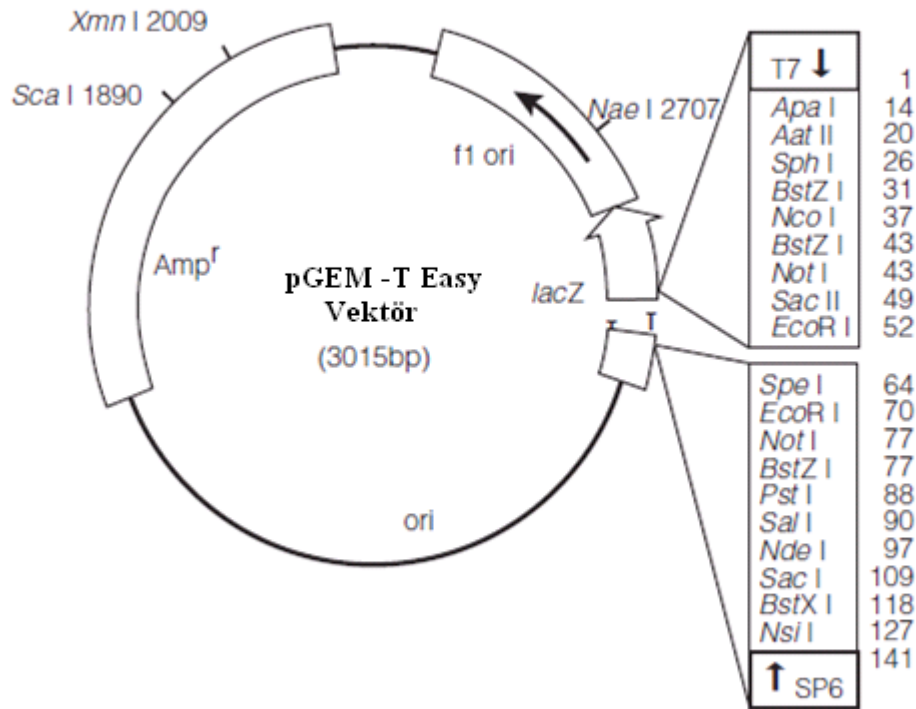
Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

2.7.3 DNAnın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

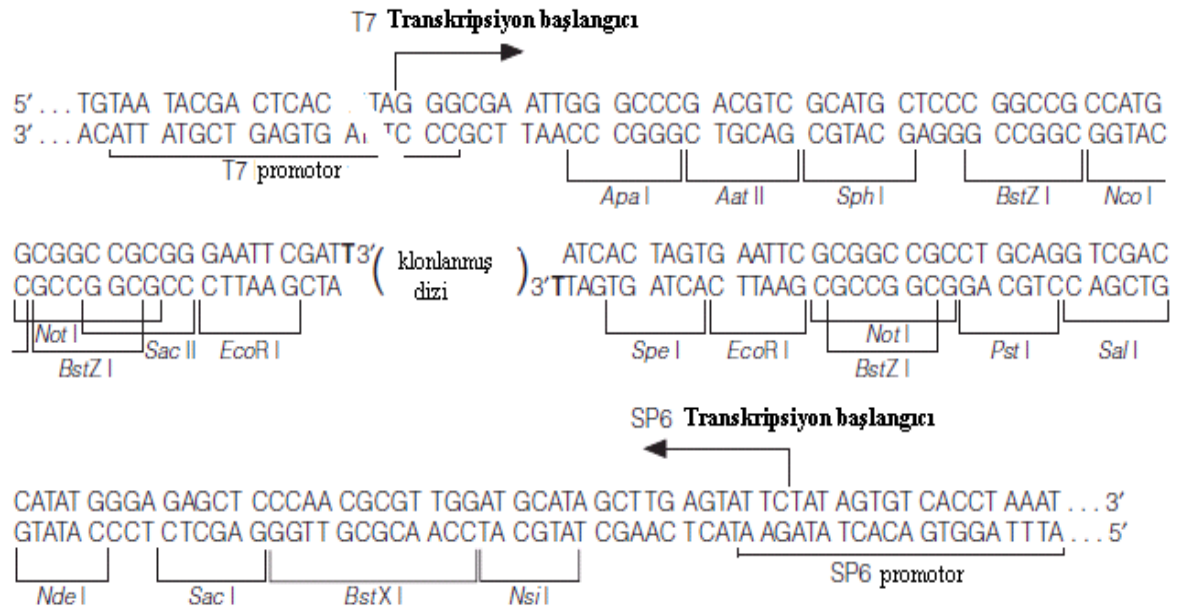
%1 lik jel hazırlamak için 1 Agaroz (Aplichem) , 100 ml 1X TBE (5X için ; 54 g Tris , 27,5 g Borik Asit , 20 ml 0,5M EDTA , 1 Lt saf su) eklenerip ısıtılarak çözüldü. 60⁰ C ' ye soğutulup içersine 50 µl (mg/ml) etidyum bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

2.8 cDNAların Vektöre Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. pGEM-T Easy vektörünün Şematik gösterimi Şekil 2.1 de ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 2.2 de verilmiştir (Promega Vektör Kullanım Kılavuzu).



Şekil 2.1 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi

2.9 Ligasyon Reaksiyonu

Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği şekilde hazırlanmıştır. Ligasyon için, standart, pozitif kontrol ve background kontrol olmak üzere tablo da gösterilen üç reaksiyon hazırlanarak 4 °C de 24 saat inkübe edildi.

	Standart	Pozitif Kontrol	Background Kontrol
2X Ligasyon Buffer	10 µl	6 µl	6 µl
pGEM T Easy Vektör	1 µl	1 µl	1 µl
DNA Ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
PCR Ürünü	8 µl	-	-
Kontrol DNA	-	2 µl	-
H2O	-	10 µl	12 µl
TOPLAM	20 µl	20 µl	20 µl

Çizelge 2.2 Ligasyon reaksiyonu kurulmasında kullanılanlar ve miktarları

2.10 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Ultra kompetan hücreler Inoue ve arkadaşlarının (1990) optimize ettiği protokoldeki gibi hazırlandı. 250ml SOB içersine 5–10 koloni ekilerek 22 °C de 20–24 saat kadar OD₆₀₀, 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 içersinde çözülüp % 7 si kadar DMSO ilave edildi. 10 dakika buzda bekletilerek, sıvı azot ile dondurularak -80 °C de saklandı.

2.11 Transformasyon

2.11.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması

2.10’da 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.

Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 ° C ‘de 16 saat büyütüldü.

2.11.2 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıkları kontrol etmek amacı ile koloniler kürdanla alınarak 100 µl su içersinde çözülür. 100 ° C ‘de 10 dakika tutulduktan sonra , 1 µl si kalıp olarak kullanılarak , 10 µl KCl Buffer (5X), 2 µl MgCl₂ , 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl forward primer (20 mM) ve 1 µl reverse primer (20 mM) primer, 0,5 µl Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı.

İstenilen DNA yı taşıdığı belirlenen her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek, ekilerek, 37 ° C ‘de 16 saat büyütülürler.

2.12 Plazmit İzolasyonu

2.11.2 de anlatıldığı biçimde belirlenen kolonilerde büyüme görülürse, 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampicilin (100 µg/ml) içersinde, 37 ° C de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı.

2 ml kültür 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. DNAYı filtreden ayırmak için filtre temiz tüpe alınıp, üzerine 100 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 ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

2.13 Genomik DNA İzolasyonu

Gemlik ve Memecik kültürlerinden DNA izolasyonu, DNeasy Plant Mini Kit kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde yapıldı.

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örneği, sıvı azot yardımı ile, daha önceden soğutulmuş havan içersinde toz haline getirilerek, 2 ml lik mikro santrifüj tüpüne alındı. 100 mg örnek için 400 µl Buffer AP1 ve 4 µl RNase A edilerek vortekslenir. 10 dakika 65 ° C de inkübe edildi. 130 µl Buffer AP2 eklenip 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 5 dakika 20 000 xg hızda santrifüjlendi. Süpernatant QIA shredder kolonlara pipetlendi ve 2 dakika 20 000 xg hızda santrifüjlendi. Pipetlenen süpernatantın 1,5 katı kadar Buffer 3/E eklenip pipetlenerek karıştırıldı. Karışım DNeasy Mini Kolonlara pipetlendi ve 1 dakika 6000 xg hızda santrifüjlendi. DNeasy Mini Kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi ve 500 µl Buffer AW eklenip, 1 dakika 6000 xg hızda santrifüjlendi. Tüplerdeki sıvı atıldı ve kolonlara tekrar 500 µl Buffer AW eklenip, 2 dakika 20 000 xg hızda santrifüjlendi. Kolonlar, yeni eppendorflara alındı, üzerlerine 100 µl su eklenip, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip, 6000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek DNAların eppendorflara geçmesi sağlandı. Tüpe geçen DNA -20 ° C de saklandı.

2.14 DNA 'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

%1 lik jel hazırlamak için 1 Agaroz (Aplichem) , 100 ml 1X TBE (5X için ; 54 g Tris , 27,5 g Borik Asit , 20 ml 0,5M EDTA , 1 Lt saf su) eklenerip ısıtılarak çözüldü. 60° C ' ye soğutulup içersine 50 µl (mg/ml) etidyum bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

2.15 Genomik DNA'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.15.1 Kullanılan Primerler

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Çizelge 2.3 de verilmiştir. Primerlerin tasarımında Ek 4 'te verilen CBF Dizinleri kullanıldı.

Primerin Adı	Primer Dizini
CBF1F	5'- CCG AAG AAG CGC GCT GGA AGG AAG -3'
CBF1R	5' - CTC AAC TTC GAC TCC GCA TGG CGG – 3'
F	5' - AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TT -3
R	5' - CCA AGC CGA GTC AGC GAA GTT – 3'

Çizelge 2.3 Genomik DNA'dan PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

2.15.2 PCR Koşulları

500 µl lik PCR tüpü içersine, 1 µl kalıp cDNA, 5 µl Qiagen PCR Buffer (10 X), 10 µl Q Solution (5X), 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl forward primer (20 mM) ve 1 µl reverse primer (20 mM) primer, 0,5 µl Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı.

PCR döngüsü ise şöyledir. 94⁰ C de 4 dakika denatüre edildikten sonra, 94⁰ C 30 saniye denatürasyon, 56⁰ C 30 saniye primer bağlanması ve 72⁰ C 30 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72⁰ C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp , -20⁰ C de saklandı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

2.15.3 PCR Ürünlerinin Jel Üzerinde Analiz

% 1 lik agaroz jel 2.14 'te anlatıldığı biçimde hazırlanır.

2.16 DNAların Vektöre Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu 2.9 da anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.17 Transformasyon

2.17.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması

Transformasyon Reaksiyonu 2.11.1 de anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.17.2 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıkları kontrol etmek amacı ile koloniler kürdanla alınarak 100 µl su içersinde çözülür. 100 ° C 'de 10 dakika tutuludukran sonra, 1 µl si kalıp olarak kullanılarak, 10 µl KCl Buffer (5X), 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl froward primer (20 mM) ve 1 µl reverse primer (20 mM) primer, 0,5 µl Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı.

PCR döngüsü ise şöyledir. 94 ° C de 4 dakika denatüre edildikten sonra, 94 ° C 30 saniye denatürasyon, 56 ° C 30 saniye primer bağlanası ve 72 ° C 30 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 ° C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alındı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

İstenilen DNA yı taşıdığı belirlenen her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek, ekilerek, 37 ° C 'de 16 saat büyütülürler. Bu kolonilerde büyüme görülürse, 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampisilin (100 µg/ml) içersinde, 37 ° C de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü.

2.18 Plazmit İzolasyonu

2.11.2 de anlatıldığı biçimde belirlenen kolonilerde büyüme görülürse, 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampisilin (100 µg/ml) içersinde, 37 ° C de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi, 2.12 de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

2.19 RACE

2.19.1 3'RACE

2.19.1.1 cDNA Sentezi

1 günlük ve 1 haftalık soğuk stresi verilmiş RNAlardan Roche RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı cDNA sentezi yapıldı. 8 µl total RNA'ya 1 µl oligo d(T) primer, 2 µl dNTPs (10mM) ve 4 µl su eklenip, 65 °C de 10 dakika ve 4 °C de 1 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun üzerine, 4 µl First Strand Buffer(5X) ve 1 µl Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 55 °C 90 dakika ve 70 °C de 15 dakika inkübe edildi.

2.19.1.2 PCR Reaksiyonu

500 µl lik PCR tüpü içersine, 1 µl kalıp cDNA, 10 µl High Expand PCR Buffer (5 X), 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl MgCl₂, 1 µl forward primer (20 mM) ve 1 µl reverse primer (20 mM) primer (Çizelge 2.3), 0,5 µl High Expand Enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı.

Primerin Adı	Primer Dizini
CBF1F	5'- CCG AAG AAG CGC GCT GGA AGG AAG -3'
F	5'- AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TT -3
Oligo d(T)-anchor	5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTTTTTTTTTTTTTTTTV - 3'

Çizelge 2.4 3'RACE yöntemi PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

PCR döngüsü ise, 94 °C de 2 dakika denatüre edildikten sonra , 94 °C 15 saniye denatürasyon ,56 °C 30 saniye primer bağlanası ve 72 °C 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı.72 °C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp , -20 °C de saklandı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

2.19.1.3 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

%1 lik jel hazırlamak için 1 Agaroz (Aplichem) , 100 ml 1X TBE (5X için ; 54 g Tris , 27,5 g Borik Asit , 20 ml 0,5M EDTA , 1 Lt saf su) eklenerip ısıtılarak çözüldü. 60⁰ C ‘ ye soğutulup içersine 50 µl (mg/ml) etidyum bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

2.19.1.4 Vektör Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu 2.9 da anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.19.1.5 Transformasyon

Transformasyon 2.11.1 de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek , 37⁰ C ‘de 16 saat büyütüldü.

2.19.1.6 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıkları kontrol etmek amacı ile, koloniler kürdanla alınarak 100 µl su içersinde çözülür. 100⁰ C ‘de 10 dakika tutuludukran sonra , 1 µl si kalıp olarak kullanılarak , 10 µl KCl Buffer (5X), 2 µl MgCl₂ , 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl froward primer (20 mM) ve 1 µl reverse primer (20 mM) primer, 0,5 µl Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı.

İstenilen DNA yı taşıdığı belirlenen her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek ekilerek , 37⁰ C ‘de 16 saat büyütülürler. Bu kolonilerde büyüme görülürse , 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampisilin (100 µg/ml) içersinde , 37⁰ C de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü.

2.19.1.7 Plazmit İzolasyonu

2.11.2 de anlatıldığı biçimde belirlenen kolonilerde büyüme görülürse, 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampisilin (100 µg/ml) içersinde, 37⁰ C de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi , 2.12 de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

2.19.2 5'RACE

2.19.2.1 cDNA Sentezi

Soğuk stresi verilmiş RNAlardan Roche RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı cDNA sentezi yapıldı. 7 µl total RNA'ya 1 µl R primer, 2 µl dNTPs (10mM), 4 µl First Strand Buffer(5X) , 1 µl RNase inhibitör ve 0,5 µl Ters Transkriptaz enzimi katılarak, 4,5 µl su ile reaksiyon 20 µl ye tamamlandı. 55 ° C de 90 dakika ve 85 ° C de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun Pure Link PCR Purifikasyon Kiti ile saflaştırıldı.

2.19.2.2 Poli A Kuyruğu Takılması

Saflaştırılmış cDNA dan 19 µl alınarak, 2,5 µl Reaksiyon Buffer (10X) ve 2,5 µl dATP (2mM) eklendi. 94 ° C de 3 dakika inkübe edildikten sonra, 1 µl Terminal Transferaz katıldı. 37 ° C de 30 dakika ve 70 ° C de 10 dakika inkübe edildi.

2.19.2.3 Birinci PCR Reaksiyonu

Çoklu A kuyruğu takılan cDNAdan 5 µl alınarak, 10 µl High Expand PCR Buffer (5 X), 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl MgCl₂, 1 µl R Primeri, 1 µl Oligo dT Anchor Primeri ve 0,5 µl High Expand Enzimi (5U/ µl) konulup, 50 µl ye tamamlandı. Kullanılan primerlerin dizinleri Çizelge 2.5 de verilmiştir.

PCR döngüsü ise, 94 ° C de 2 dakika denatüre edildikten sonra, 94 ° C 15 saniye denatürasyon, 56 ° C 30 saniye primer bağlanası ve 72 ° C 40 saniye uzatma aşamaları 10 kez tekrarlandı. 11inci basamaktan itibaren 72 ° C ' lik uzatma aşaması her basamakta 20 saniye uzatılarak 25 tekrar da yapıldı. Son olarak 72 ° C 'de 10 dk son uzatma yapılarak tamamlandı.

2.19.2.4 İkinci PCR Reaksiyonu

Birinci PCR reaksiyonu kalıp olarak kullanılmak üzere 1 µl alındı. Üzerine 10 µl High Expand PCR Buffer (5 X), 1 µl dNTPs (10mM) , 1 µl MgCl₂ , 1 µl SP1R Primeri , 1 µl PCR Anchor Primeri ve 0,5 µl High Expand Enzimi (5U/ µl) konulup , 50 µl ye tamamlandı. Kullanılan primerlerin dizinleri Çizelge 2.5 de verilmiştir.

Primerin Adı	Primer Dizini
R	5' -CCA AGC CGA GTC AGC GAA GTT – 3'
Oligo d(T)-anchor	5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTTTTTTTTTTTTTTTTTTV – 3'
SP1	5' -CCA CGT TGT GAG CTC TCG CAG 3'
PCR Anchor	5' –GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C -3'

Çizelge 2.5 5'RACE birinci ve ikinci PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizinleri

PCR döngüsü ise, 94 ° C de 2 dakika denatüre edildikten sonra, 94 ° C 15 saniye denatürasyon ,56 ° C 30 saniye primer bağlanası ve 72 ° C 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı.72 ° C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp , -20 ° C de saklandı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

2.19.2.5 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

%1 lik jel hazırlamak için 1 Agaroz (Aplichem) , 100 ml 1X TBE (5X için; 54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5M EDTA, 1 lt saf su) eklenerip ısıtılarak çözüldü. 60° C ' ye soğutulup içersine 50 µl (mg/ml) etidyum bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

2.19.2.6 Vektör Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanılarak 2.9 da anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.19.2.7 Transformasyon

Transformasyon 2.11.1 de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 ° C 'de 16 saat büyütüldü.

2.19.2.8 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıkları kontrol edildikten sonra, her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek, ekilerek, 37 ° C 'de 16 saat büyütülürler. Bu kolonilerde büyüme görülürse, 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampisilin (100 µg/ml) içersinde, 37 ° C de 250 rpm hızda 16 saat büyütüldü.

2.19.2.9 Plazmit İzolasyonu

2.11.2 de anlatıldığı biçimde belirlenen kolonilerde büyüme görülürse, 3ml Luria-Bertani ve 30 µl ampisilin (100 µg/ml) içersinde, 37 ° C de 250 rpm hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi, 2.12 de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

3. SONUÇLAR

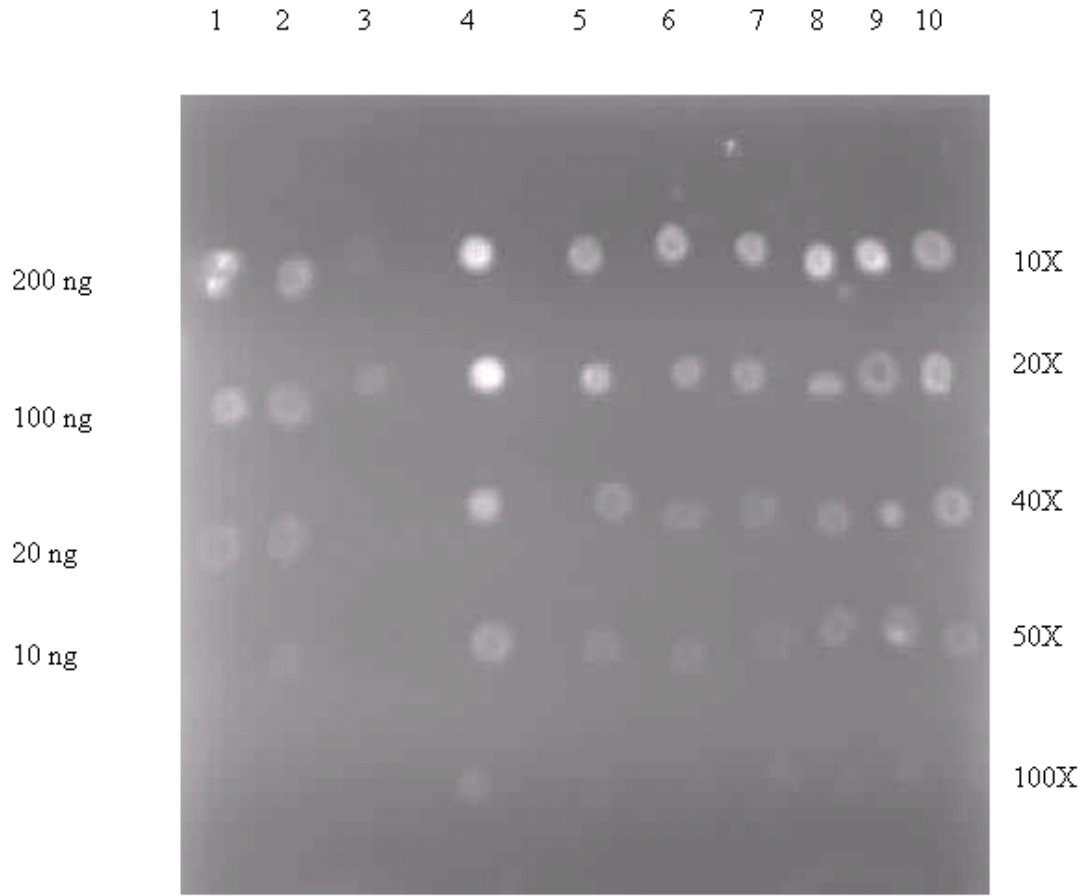
3.1 RT-PCR İle İlgili Sonuçlar

3.1.1 Bitki Örneklerinin Alınması

Bitkiye stres verilmesinden önce yaprak örnekleri alınarak sıvı azot içersinde donduruldu ve -80°C 'de saklandı. Örnek alınmasından sonra bitki 2.2 de belirtilen stres koşulları uygulandı. 5 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 12 saat, bir gün örnekleri alınarak sıvı azot içersinde donduruldu ve -80°C 'de saklandı. Bir haftalık stres uygulaması sonucunda, yaprak uçlarında kahverengi renk oluşumu gözlemlendi. Bir hafta örneği alınarak sıvı azot içersinde dondurulup -80°C 'de saklandı.

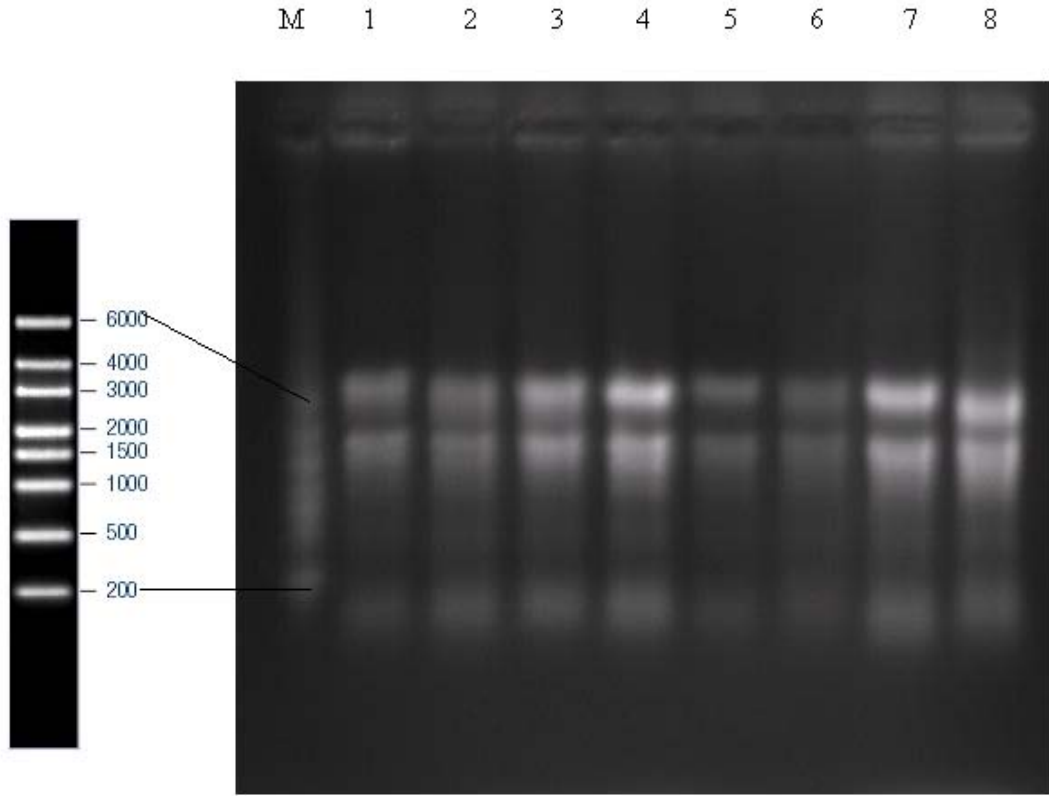
3.1.2 RNA İzolasyonu

Yapraklardan RNA izolasyonu 2.4.2 'de anlatıldığı biçimde yapıldı. %1 lik Fosfat jeline yüklenerek miktarı (Şekil 3.1) ve %1'lik RNA jeline yüklenerek (Şekil 3.2) kalitesi belirlendi.



Şekil 3.1 0 dakika ,30 dakika,1,2,4,12 saat ,1 gün ve 1 haftalık RNAların miktarlarının belirlenmesin için Spot test.(Maniatis vd., 1982)

1. Standart RNA, 2. Stres verilmemiş RNA örneği, 3. 15 dakika soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 4. 30 dakika soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 5. 1 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 6. 2 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 7. 4 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 8. 12 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 9. 1 gün soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 10. 1 hafta soğuk stresi verilmiş RNA örneği.



Şekil 3.2 0 dakika, 30 dakika, 1, 2, 4, 12 saat, 1 gün ve 1 haftalık RNA'ların %1 lik denatüre edici jel üzerinde görüntülenmesi

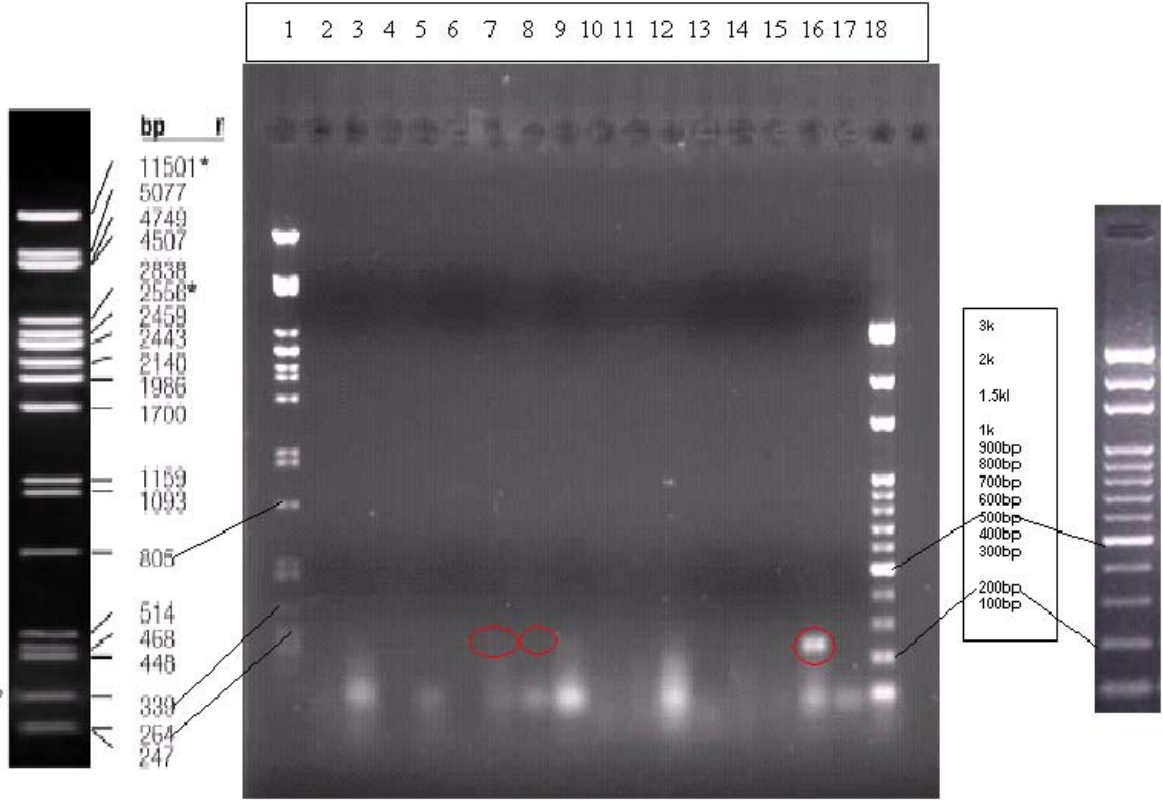
M: High Range RNA Ladder, 1. Stres verilmemiş RNA örneği, 2. 30 dakika soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 3. 1 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 4. 2 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 5. 4 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 6. 12 saat soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 7. 1 gün soğuk stresi verilmiş RNA örneği, 8. 1 hafta soğuk stresi verilmiş RNA örneği.

3.1.3 cDNA Sentezi

ROCHE High Fidelity cDNA Sentez kiti kullanılarak 0 dakika (kontrol) ,1 gün ve 1 haftalık RNAlardan cDNA sentezi yapıldı.

3.1.4 PCR

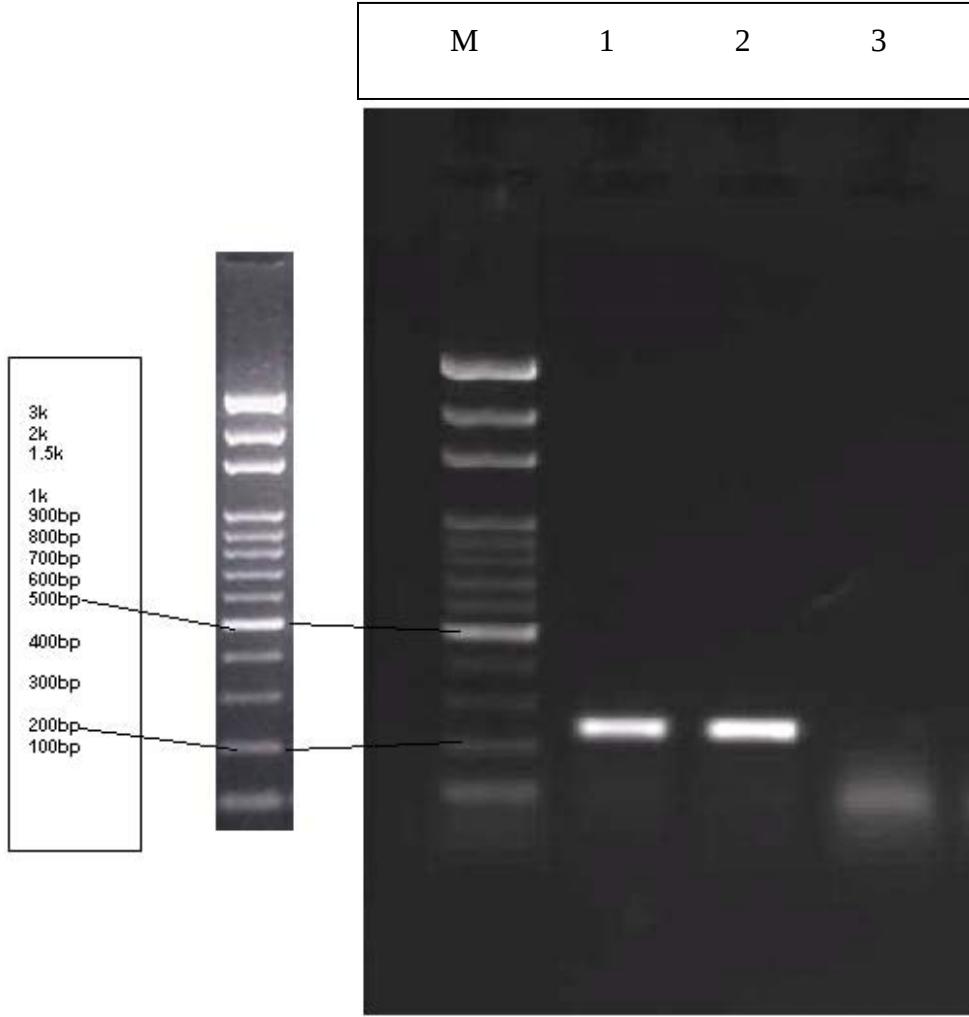
2.7 de belirtilen koşullarda sentezlenen 0 dakika (kontrol) ,1 gün ve 1 hafta cDNAları kullanılarak yapılan PCRın ürünleri %1lik Agaroz jele yüklenerek, kalite ve büyüklüğü kontrol edildi. Bunlardan F ve R primerleriyle yapılan ve 1 haftalık RNA kullanılarak kurulan reaksiyon belirtilen koşullarda en iyi sonucu vermiştir ve yaklaşık 250bp boyunda bir DNA bandı elde edilmiştir.(Şekil 3.3)



Şekil 3.3 PCR ürünlerinin %1lik agaroz jel üzerinde görüntüsü .

1.PstI enzimiyle kesilmiş Lambda DNA, 2.CBF1F+CBF1R (stres verilmemiş RNA örneğinden), 3.CBF1F+CBF1R (1 günlük stres verilmiş RNA örneğinden), 4.CBF1F+CBF1R (1 haftalık stres verilmiş RNA örneğinden), 5.CBF1F+CBF1R negatif kontrol, 6.CBF1F+ R (stres verilmemiş RNA örneğinden), 7. CBF1F+R (1 günlük stres verilmiş RNA örneğinden), 8.CBF1F+R (1 haftalık stres verilmiş RNA örneğinden),9. CBF1F+ R negatif kontrol, 10. F+CBF1R (stres verilmemiş RNA örneğinden), 11. F+ CBF1R (1 günlük stres verilmiş RNA örneğinden), 12.F+CBF1R (1 haftalık stres verilmiş RNA örneğinden), 13. F+ CBF1R (negatif kontrol), 14.F+R (stres verilmemiş RNA örneğinden), 15. F+R (1 günlük stres verilmiş RNA örneğinden), 16. F+R (1 haftalık stres verilmiş RNA örneğinden) ,17. F+R (negatif kontrol),18. DNA Ladder

Ayrıca CBF1 ve R primerleriyle 1 günlük (Şekil 3.3’de 7 numara) ve 1 haftalık (Şekil 3.3’de 8 numara) RNAlar kullanılarak kurulan reaksiyonlarda da aynı boyda, silik bantlar görüldü. Jelden kesilerek saflaştırıldı. Aynı primerler ve aynı reaksiyon koşulları ile PCR reaksiyonu tekrarlandı. PCRın ürünleri %1lik Agaroz jele yüklendi ve daha keskin bantlar elde edildiği görüldü.(Şekil 3.4)



Şekil 3.4 CBF1F ve R primerleriyle kurulan PCR ürünlerinin %1lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.

M .DNA ladder,1.CBF1F+ R (1 günlük stres verilmiş RNA örneğinden yapılmış PCR ürünü saflaştırılmış ve kalıp olarak kullanılmıştır), 2.CBF1F+ R (1 günlük stres verilmiş RNA örneğinden yapılmış PCR ürünü saflaştırılmış ve kalıp olarak kullanılmıştır), 3.CBF1F+R (negatif kontrol)

3.1.5 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren 1 günlük (CBF1F+R) , 1 haftalık (CBF1F+R) ve 1 haftalık (F+R) örnekleri , 2.9 da anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

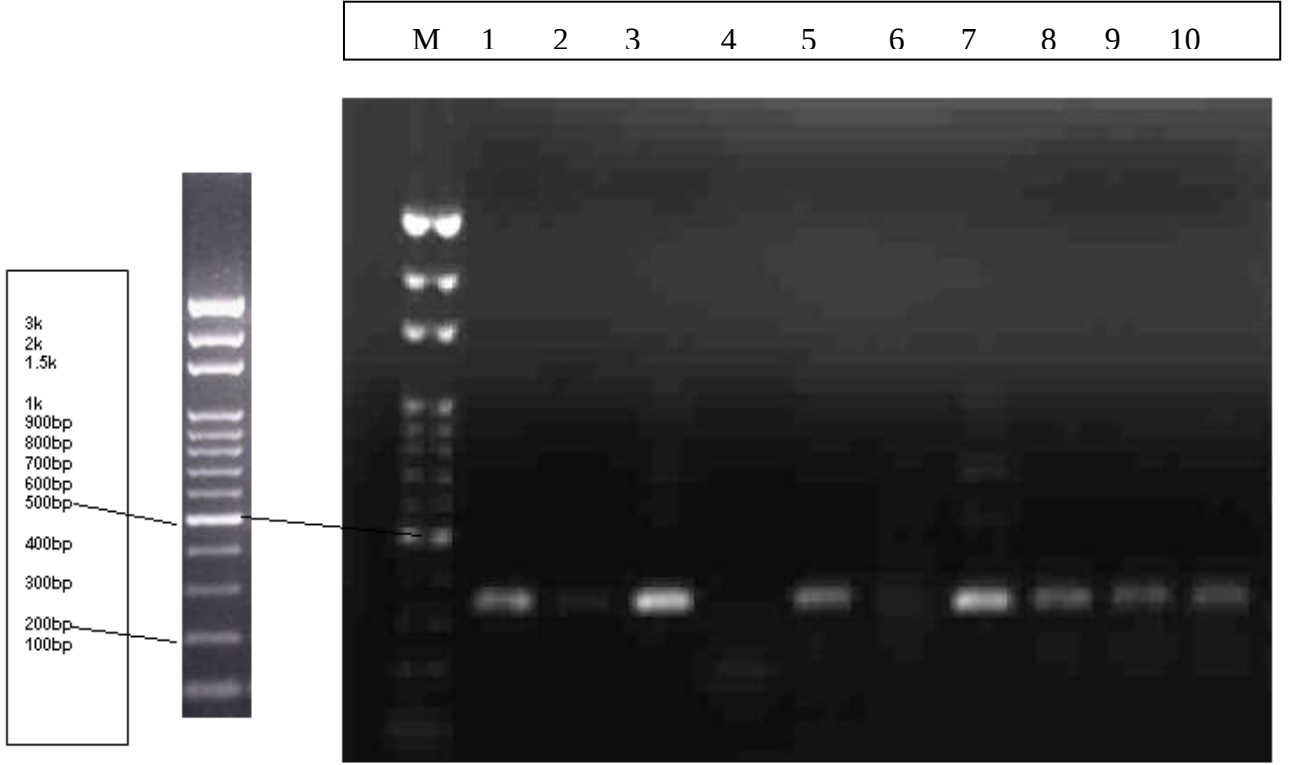
3.1.6 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 µl'si 2.10 da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 µl kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 ° C 'de 16 saat büyütüldü.

16 saat sonunda, 1 günlük (CBF1F+R) transformasyonundan 48, 1 haftalık (CBF1F+R) transformasyonundan 48 ve 1 haftalık (F+R) transformasyonundan 16 koloni elde edildi.

3.1.7 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için, 2.7.2 de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri %1 lik Jel üzerinde kontrol edildi.



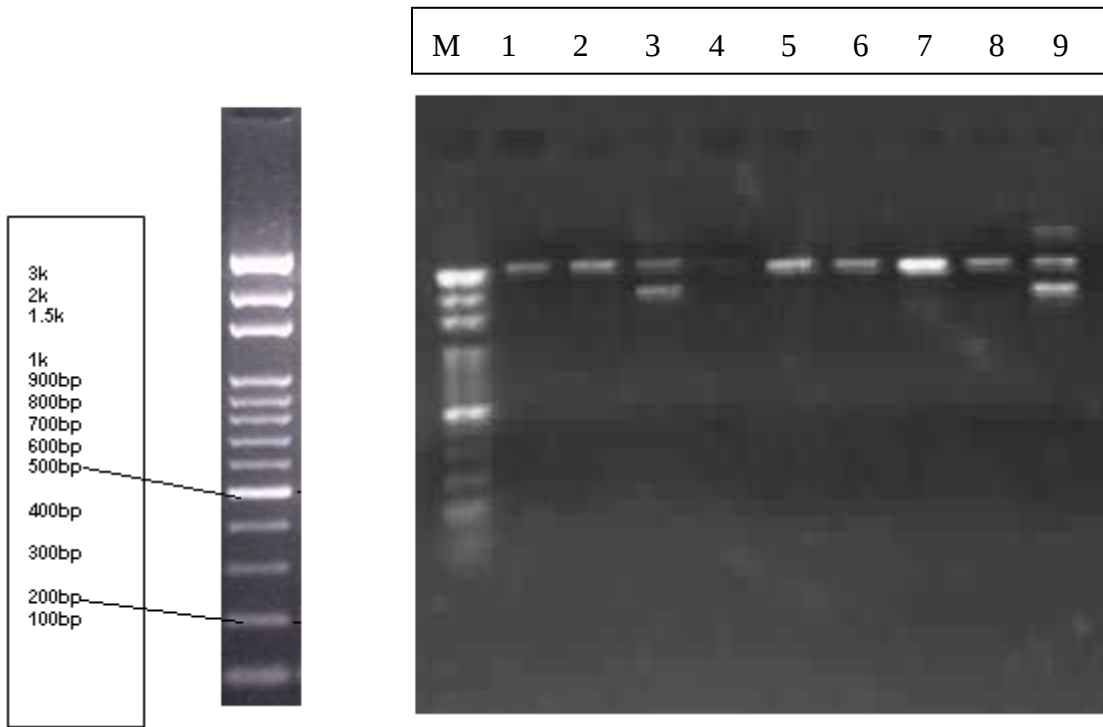
Şekil 3.5 Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCRın %1lik Agaroz Jel üzerinde görüntüsü.

M: DNA Ladder, 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10 1 Haftalık (F+R) Koloni Kontrol PCR

3.1.8 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.12 de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

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



Şekil 3.6 Pst I enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1lik Agaroz Jel üzerinde görüntüsü.

M: DNA Ladder , 1,2,3,4,5,6,7,8,9 Pst I ile kesilen plazmitler

3.1.9 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Lineer hale getirilen plazmitlerden miktar ve yoğunlukları dizin analizi için elverişli olanlar seçilerek adlandırıldı ve Iontek firmasına dizin analizi yapılması için yollandı. Seçilen plazmitlerin adlandırılması Çizelge 3.1 de verilmiştir.

Transformasyon	Plazmitlere Verilen İsim
1 haftalık F+R	PGEMOEAP2,PGEMOEAP3, PGEMOEAP4, PGEMOEAP5
1 haftalık F+R	1HFR2,1HFR7,1HFR9,1HFR20,1HFR25,1HFR29, 1HFR41,1HFR42, 1HFR66
1 günlük CBF1F+R	1GCFR1, 1GCFR5, 1GCFR16, 1GCFR41, 1GCFR 46
1 haftalık CBF1F+R	1HCFR7, 1HCFR10, 1HCFR19, 1HCFR30, 1HCFR41

Çizelge 3.1 Dizin analizine gönderilen örneklerin adlandırılması

Gelen sonuçların vektör dizinleri çıkartıldı ve BLASTn ,BLASTx ve tBLASTx programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar Ek 5 ‘de verilmiştir.

İsim	Primerler	RNA	BlastN	Skor	BlastX	Skor (Bits)	tBlastX	Skor (Bits)
PGEMOEAP2	F-R	Gemlik 1 Haftalık Soğuk	Capsicum annuum CBF1	120	Arabidopsis thaliana DREB1D	97.8	Eucalyptus gunnii CBF1	117
PGEMOEAP3	F-R	Gemlik 1 Haftalık Soğuk	Capsicum annuum CBF1	170	Arabidopsis thaliana DREB1D	93.2	Capsicum annuum CBF1	111
PGEMOEAP4	F-R	Gemlik 1 Haftalık Soğuk	Capsicum annuum CBF1	181	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CBF1	111
PGEMOEAP5	F-R	Gemlik 1 Haftalık Soğuk	Brassica napus CBF16	86	Arabidopsis thaliana DREB1D	50.4	Chorispota bungeana CBF1	60.7
1HFR2	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Fragaria x ananassa CBF1	172	Arabidopsis thaliana DREB1D	90.1	Capsicum annuum CBF1	108
1HFR7	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Fragaria x ananassa CBF1	174	Arabidopsis thaliana DREB1D	95.1	Solanum tuberosum CBF1	99.6
1HFR9	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Fragaria x ananassa CBF1	178	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CBF1	111
1HFR20	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Fragaria x ananassa CBF1	174	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CBF1	111
1HFR25	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Capsicum annuum CBF1	176	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CBF1	111
1HFR42	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Capsicum annuum CBF1	179	Arabidopsis thaliana DREB1D	90.1	Capsicum annuum CBF1	108

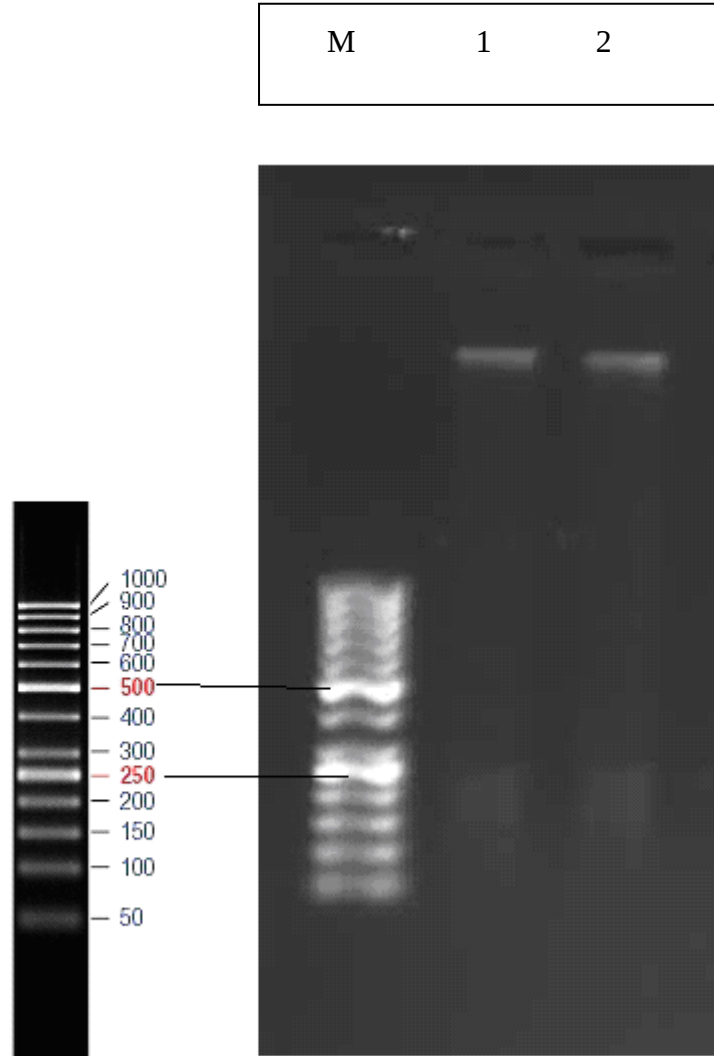
1HFR50	F-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Capsicum annuum CBF1	174	Arabidopsis thaliana DREB1D	90.1	Capsicum annuum CBF1	108
1GCFR1	CBF1-R	Gemlik 1günlük soğuk	Capsicum annuum CBF1	190	Arabidopsis thaliana DREB1D	97.4	Populus trichocarpa CBF1	113
1GCFR5	CBF1-R	Gemlik 1günlük soğuk	Capsicum annuum CBF1	196	Arabidopsis thaliana DREB1D	97.4	Populus trichocarpa CBF1	113
1GCFR16	CBF1-R	Gemlik 1günlük soğuk	Capsicum annuum CBF1	190	Arabidopsis thaliana DREB1D	95.1	Populus trichocarpa CBF1	113
1GCFR41	CBF1-R	Gemlik 1günlük soğuk	Camelia sinensis CBF1	129	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Populus trichocarpa DREB71	107
1GCFR46	CBF1-R	Gemlik 1günlük soğuk	Brassica napus DREB I-5	141	Arabidopsis thaliana DREB1D	63.2	Chenopodium album CBF1	74.4
1HCFR7	CBF1-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Capsicum annuum CBF1	196	Arabidopsis thaliana DREB1D	95.1	Populus trichocarpa CBF1	113
1HCFR10	CBF1-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Betula pendula CBF2	178	Arabidopsis thaliana DREB1D	95.1	Populus trichocarpa CBF1	113
1HCFR19	CBF1-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Fragaria x ananassa CBF1	188	Arabidopsis thaliana DREB1D	71,6	Populus trichocarpa CBF1	83,1
1HCFR30	CBF1-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Betula pendula CBF2	188	Arabidopsis thaliana DREB1D	97.4	Populus trichocarpa CBF1	113
1HCFR41	CBF1-R	Gemlik 1haftalık soğuk	Capsicum annuum CBF1	183	Arabidopsis thaliana DREB1D	97.4	Populus trichocarpa CBF1	113

Çizelge 3.2 RT-PCR ile İlgili Dizin analizi ve Blast sonuçları

3.2 Genomik DNA'dan PCR İle İlgili Sonuçlar

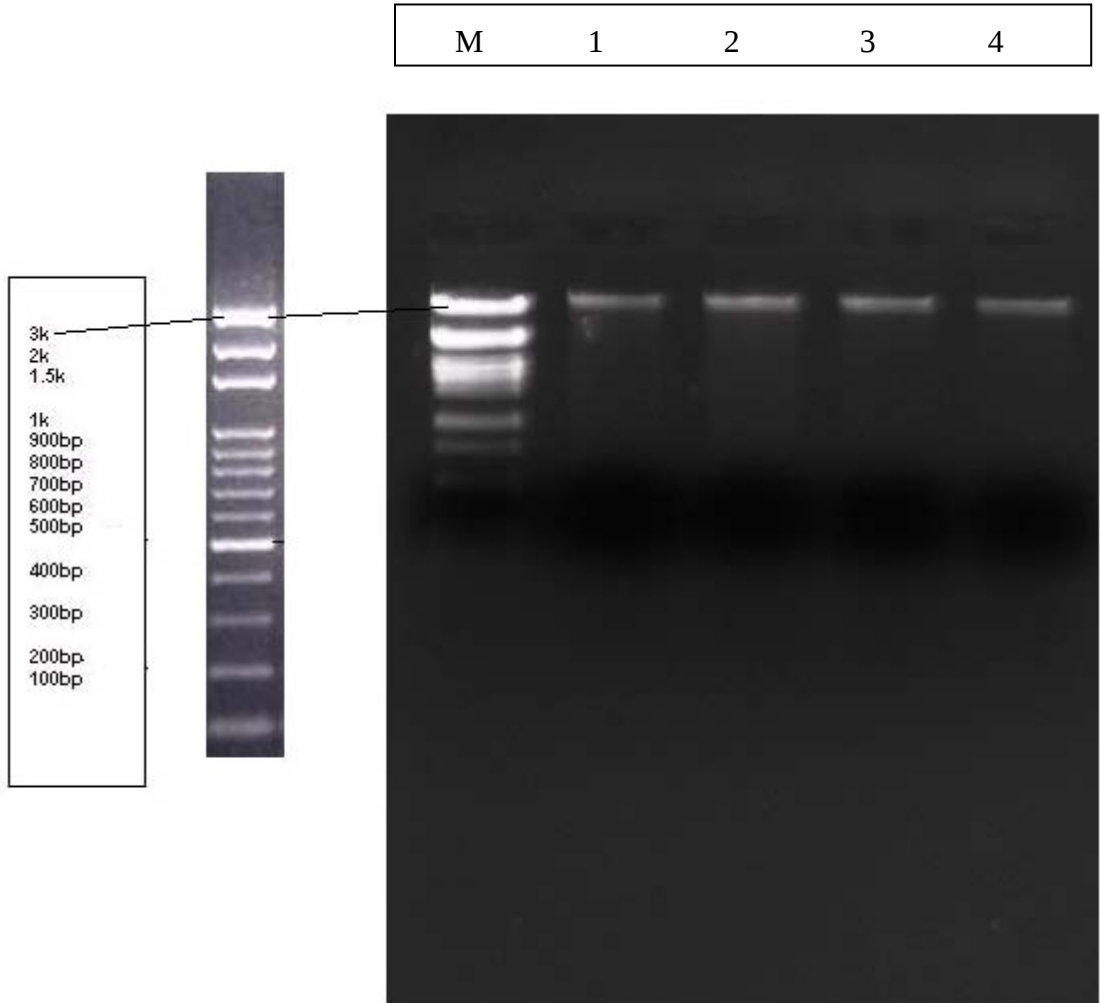
3.2.1 Genomik DNA İzolasyonu

Gemlik ve Memecik Kùltivarlarının yapraklarından, 2.13 te anlatıldığı biçimde genomik DNA izolasyonu yapıldı. %1 lik Agaroz jeli üzerinde, miktar ve kalitesi belirlendi.



Şekil 3.7 Gemlik DNA'sının %1 lik Agaroz Jeldeki görünümü

M: DNA Ladder, 1. Gemlik DNA 1, 2.Gemlik DNA 2

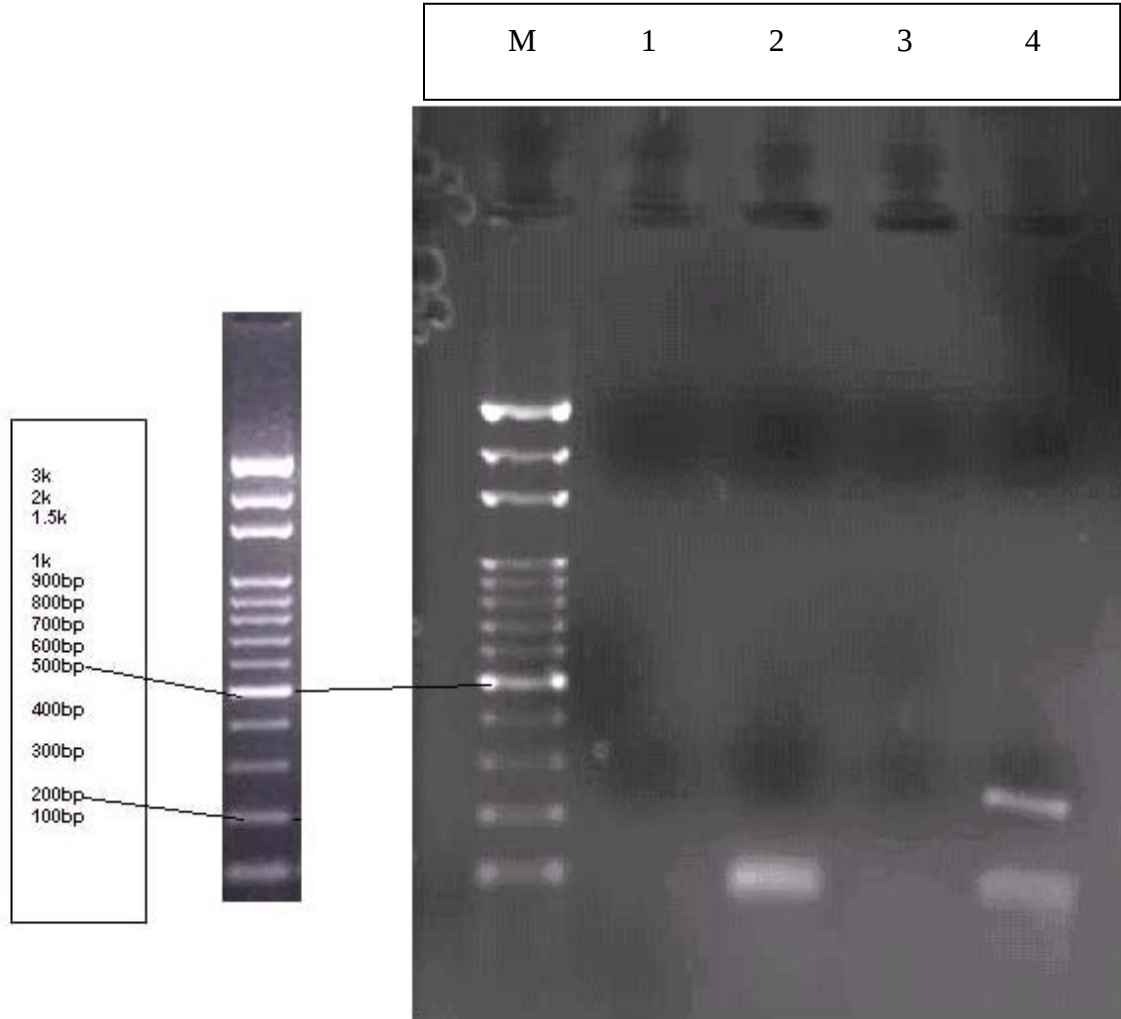


Şekil 3.8 Memecik DNA'sının %1 lik Agaroz Jeldeki görünümü

M : DNA Ladder , 1. Memecik DNA 1 , 2. Memecik DNA 2 ,3. Memecik DNA 3,
4. Memecik DNA 4

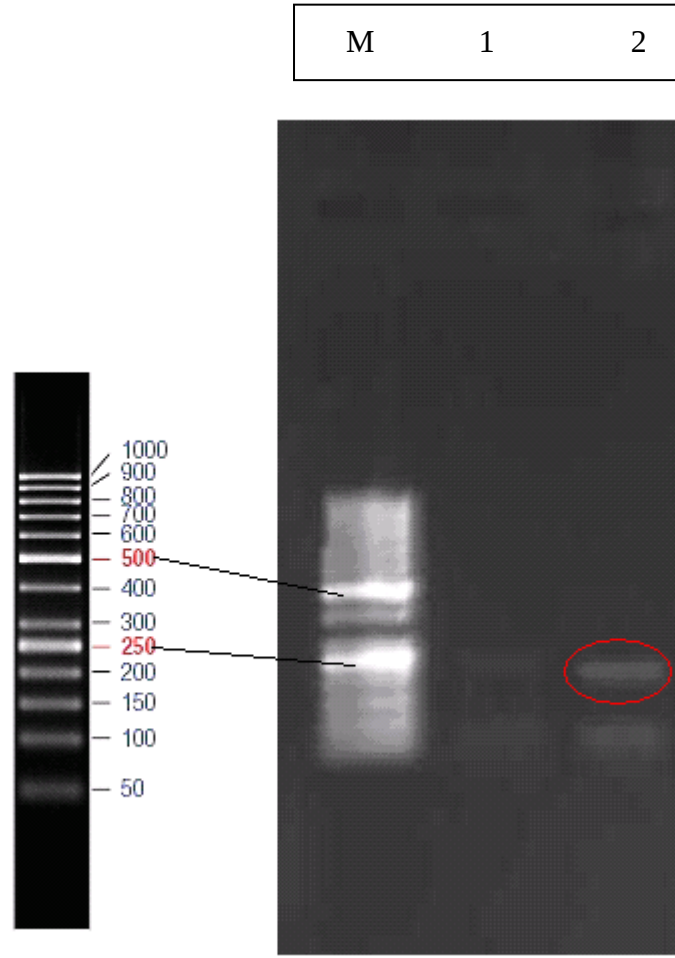
3.2.2 PCR

2.15.2 de anlatıldığı koşullarda yapılan PCR dan elde edilen sonuçlar %1lik Agaroz Jele yüklenerek , kalite ve büyüklüğü kontrol edildi. Her iki genomik DNA ile Fve R primerleri kullanılarak yapılan PCRLar sonucu yaklaşık 250 baz çiftlik bantlar elde edildi.



Şekil 3.9 Memecik Genomik DNA' sı ile yapılan PCR'ın %1 lik Agaroz Jel Üzerindeki Görüntüsü

M: DNA Ladder , 1.Memecik DNA CBF1F+CBF1R, 2. Memecik DNA CBF1F+R 3. Memecik DNA F+CBF1R 4. Memecik DNA F+R



Şekil 3.10 Gemlik DNA Genomik DNA' sı ile yapılan PCR'ın %1 lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

M: DNA Ladder , 1. Gemlik DNA 1 F+R , 2. Gemlik DNA 2 F+R

3.2.3 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren Memecik (F+R) ve Gemlik (F+R) , 2.9 da anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

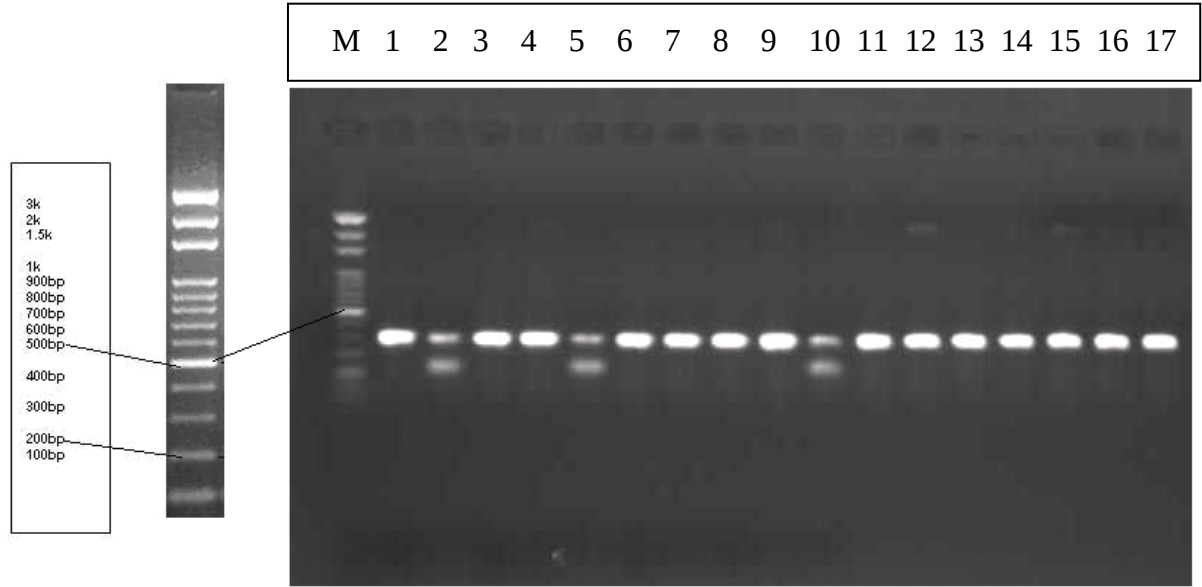
3.2.4 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 µl'si 2.10 da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 µl kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 °C 'de 16 saat büyütüldü.

16 saat sonunda, Memecik (F+R) transformasyonundan 51, Gemlik (F+R) transformasyonundan 37 koloni elde edildi.

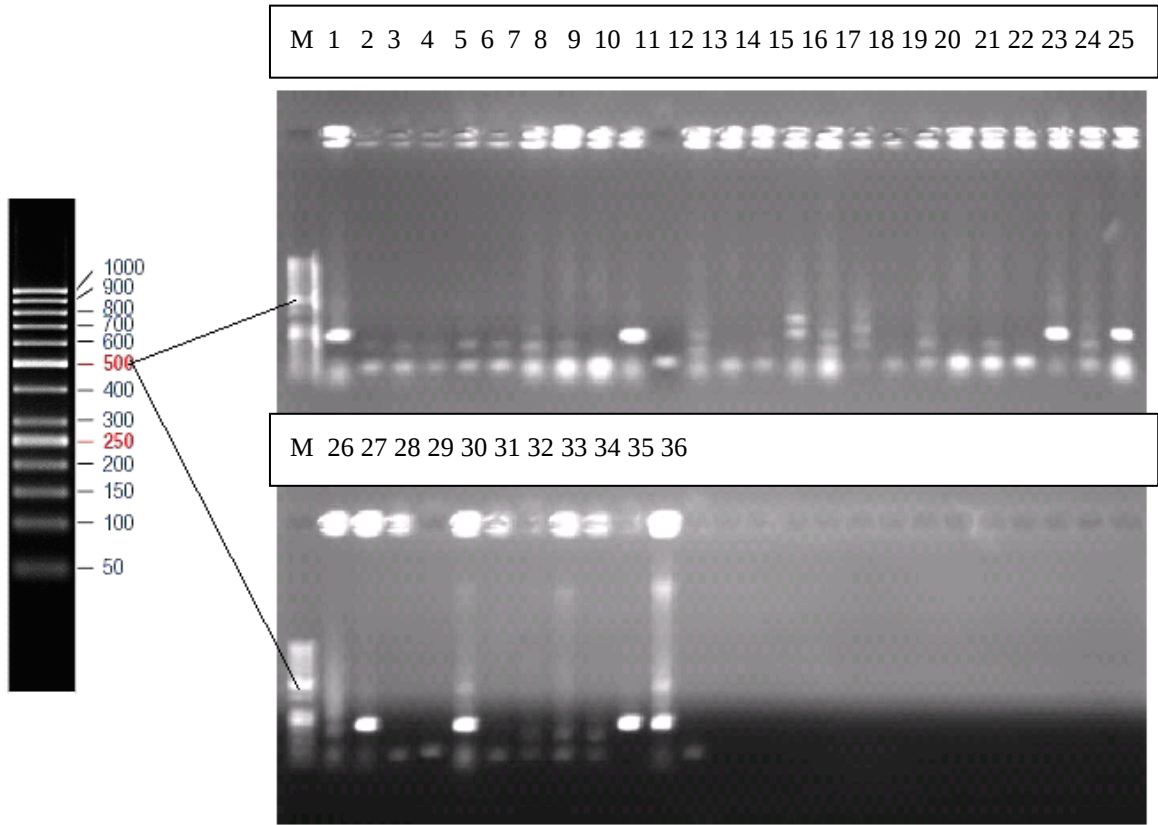
3.2.5 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA'yı taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için , 2.7.2 de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri %1 lik Jel üzerinde kontrol edildi.



Şekil 3.11 Memecik PCR'ından(F+R) yapılan transformasyondan elde edilen pozitif koloniler

M: DNA Ladder, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 Memecik transformasyon koloni kontrol PCR



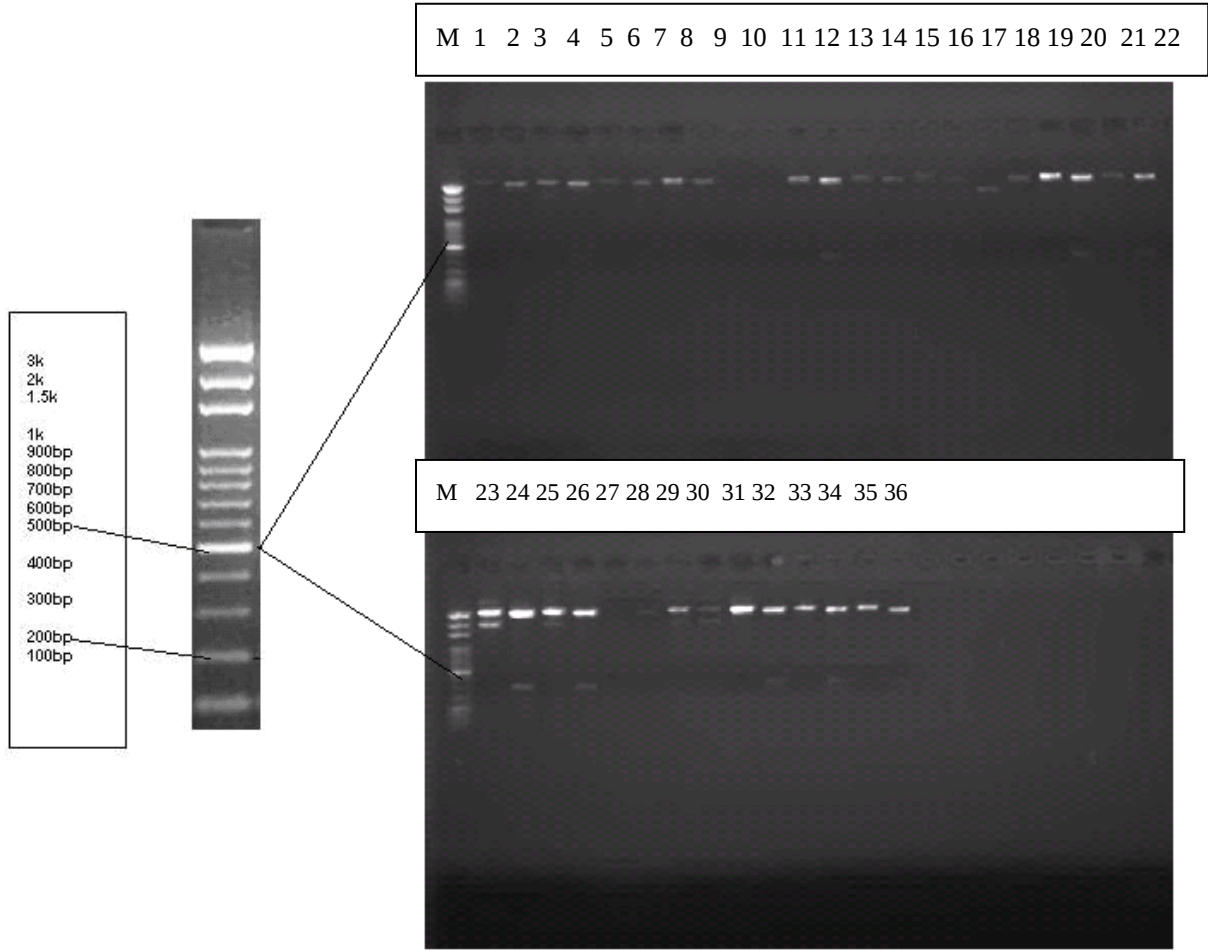
Şekil 3.12 Gemlik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen pozitif koloniler

M: DNA Ladder, 1–36 Gemlik transformasyon koloni kontrol PCR

3.2.6 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.12 de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

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



Şekil 3.13 Memecik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen , Not I ve NdeI ile kesilmiş plazmitler

M: DNA Ladder 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31,33,35 Not I ile kesilmiş plazmitler , 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,28,30,32,34,36 Nde I ve Not I ile kesilmiş plazmitler

3.2.7 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Lineer hale getirilen plazmitlerden miktar ve yoğunlukları dizin analizi için elverişli olan, Gemlik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen plazmitlerden 27,30 ve 36 nolu plazmitler (Şekil 3.12) ile Memecik PCR'ından yapılan transformasyondan elde edilen plazmitlerden 3, 29,38 ve 41 nolu koloniler seçilerek, Iontek firmasına dizin analizi yapılması için yollandı.

Gelen sonuçların vektör dizinleri çıkartıldı ve BLASTn, BLASTx ve tBLASTx programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar ve benzerlik analizi sonuçları Ek 6 'da verilmiştir.

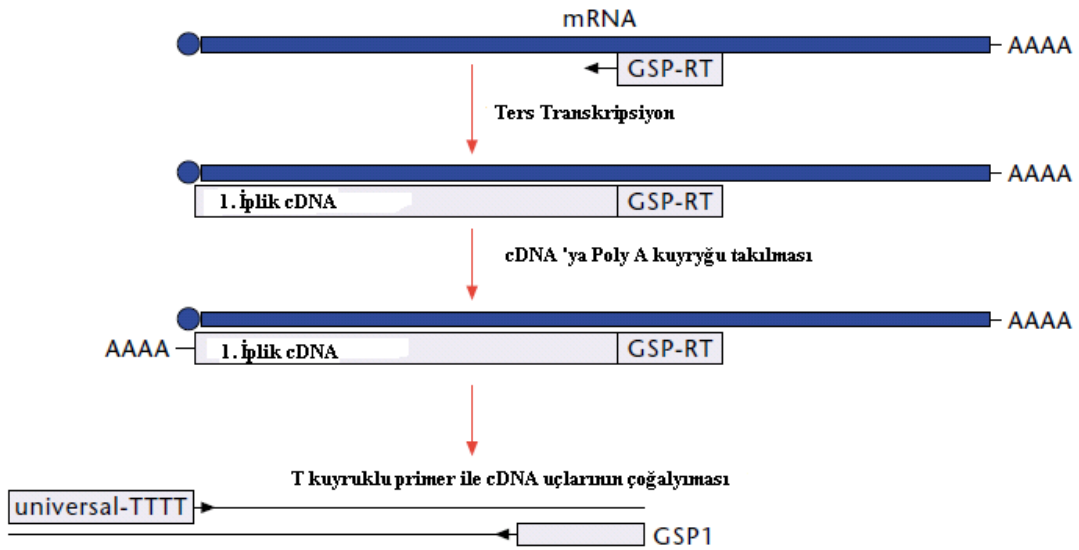
İsim	Primerler	DNA	BlastN	Skor	BlastX	Skor (Bits)	tBlastX	Skor (Bits)
GFR27	F+R	Gemlik	Capsicum annuum CaCBF1	185	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CaCBF1	111
GFR30	F+R	Gemlik	Capsicum annuum CaCBF1	176	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CaCBF1	111
GFR36	F+R	Gemlik	Arabidopsis thaliana CBF3	176	Arabidopsis thaliana DREB1D	91.7	Capsicum annuum CaCBF1	111
MFR3	F+R	Memecik	Capsicum annuum CaCBF1	185	Arabidopsis thaliana DREB1D	91.7	Capsicum annuum CaCBF1	111
MFR29	F+R	Memecik	Capsicum annuum CaCBF1	179	Arabidopsis thaliana DREB1D	92.0	Capsicum annuum CaCBF1	111
MFR38	F+R	Memecik	Capsicum annuum CaCBF1	172	Arabidopsis thaliana DREB1D	103	Capsicum annuum CaCBF1	104
MFR41	F+R	Memecik	Capsicum annuum CaCBF1	185	Arabidopsis thaliana DREB1D	91.7	Capsicum annuum CaCBF1	111

Çizelge 3.3 Memecik ve Gemlik genomik DNA ile ilgili dizin analizi ve blast sonuçları

3.3 RACE İle İlgili Sonuçlar

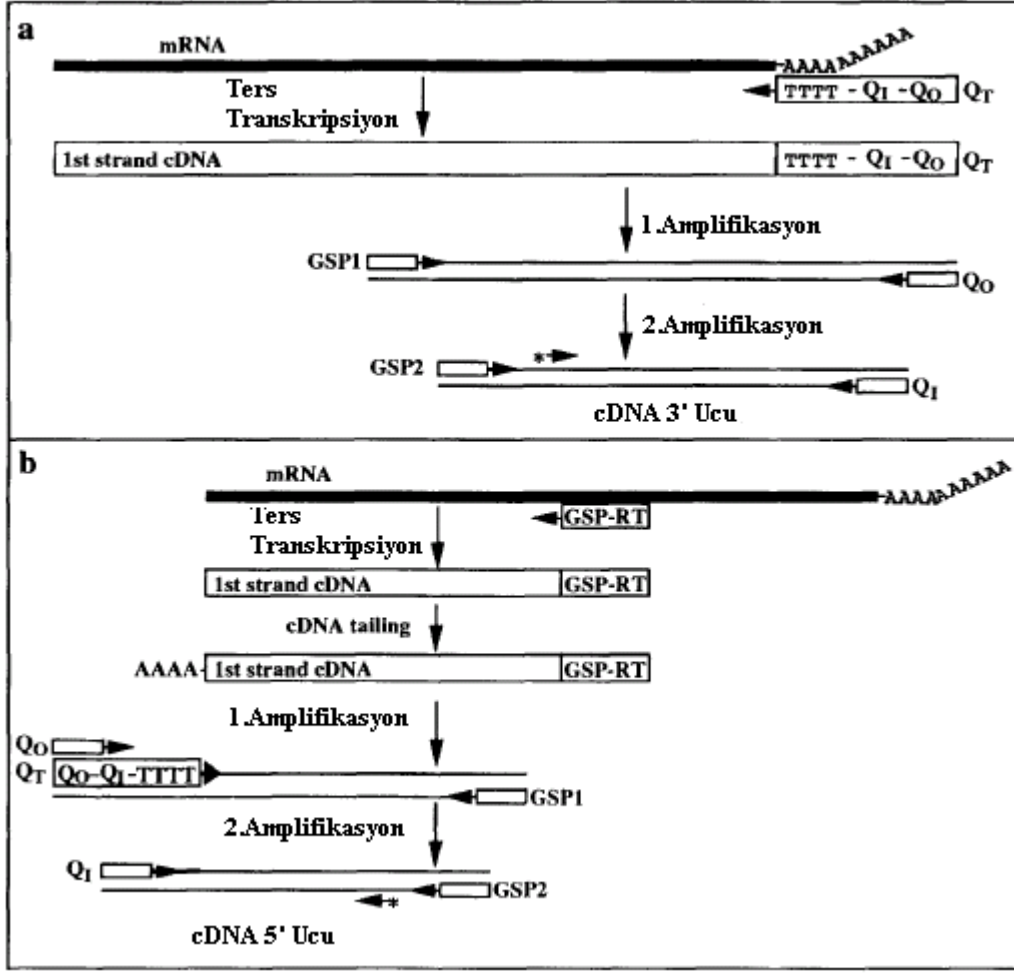
3.3.1 RACE (RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS)

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 (Frohman vd., 1988).Dizini bilinen kısım kullanılarak gene özgü bir primer tasarlanır. Bu primer aracılığı ile RNAdan cDNA sentezlenir. cDNA'nın ucuna Poly A kuyruğu takıldıktan sonra, T kuyruklu primer ve gene özgü primer ile çoğaltım yapılır(Thriska ve Frohman, 2001). RACE yöntemi Şekil 3.7 de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 3.14 RACE metodunun şematik gösterimi (GSP: Gene özgü primer) (Thriska ve Frohman, 2001)

Kullanılan primerler ve reaksiyonun işleyişi açısından 3' RACE ve 5' RACE olarak 2 ye ayırmak mümkündür. 3'RACE ve 5' RACE şekil 3.8'de şematik olarak özetlenmiştir



Şekil 3.15 RACE metodunun şematik gösterimi (Frohman, 1994) a – 3'RACE , b- 5'RACE

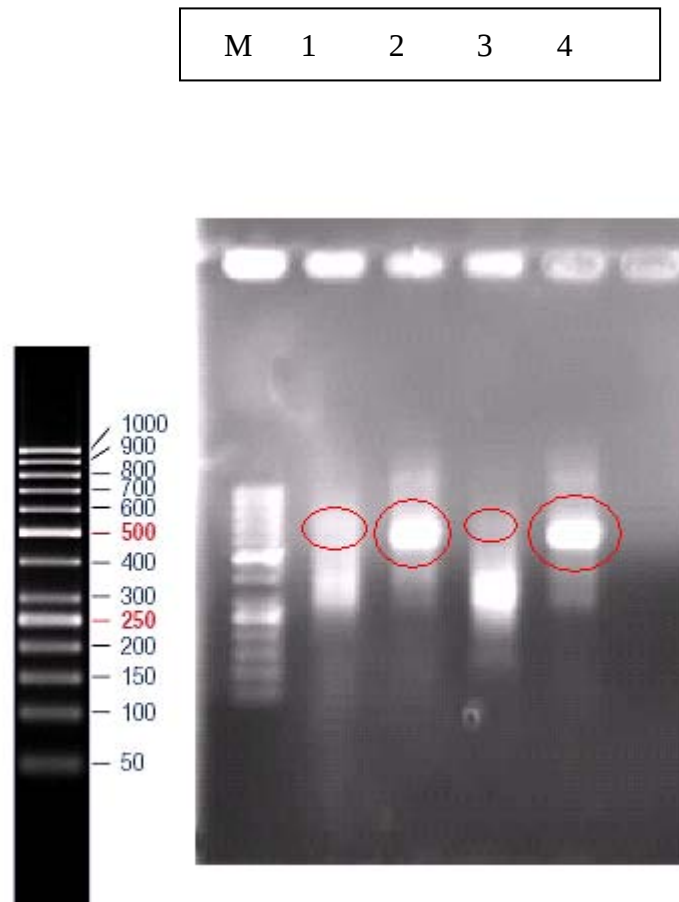
3.3.2 3'RACE

3.3.2.1 cDNA Sentezi

1 günlük ve 1 haftalık soğuk stresi verilmiş RNAlardan Roche RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde cDNA sentezi yapıldı.

3.3.2.2 PCR

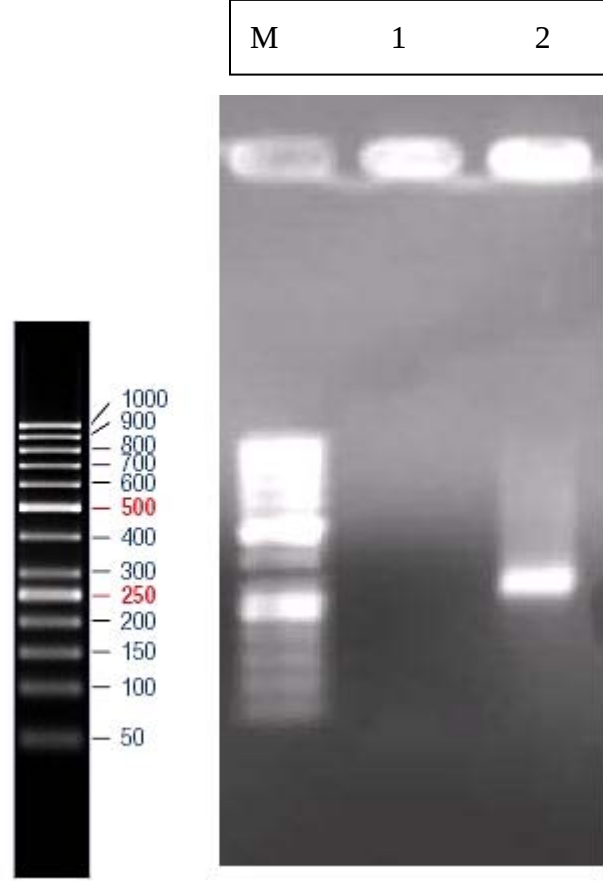
2.13.1.2 de belirtilen koşullarda yapılan PCRın ürünleri %1lik Agaroz Jele yüklenerek, kalite ve büyüklüğü kontrol edildi.



Şekil 3.16 3'RACE in PCR reaksiyonunun %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.

M: DNA ladder, 1. CBF1F+Oligo dT (1 günlük stres verilmiş RNA'dan), 2. F+Oligo dT (1 günlük stres verilmiş RNA'dan), 3. CBF1F+Oligo dT (1 hafta stres verilmiş RNA'dan), 4. F+Oligo dT (1 hafta stres verilmiş RNA'dan)

Ayrıca, tekrar kurulan reaksiyonlarda da aynı boyda, silik bantlar görüldü. Jelden kesilerek saflaştırıldı. Aynı primerler ve aynı reaksiyon koşulları ile PCR reaksiyonu tekrarlandı. PCRın ürünleri %1lik Agaroz Jele yüklendi ve daha keskin bantlar elde edildiği görüldü.



Şekil 3.17 Jelde saflaştırılarak yeniden kurulan 3'RACE PCr reaksiyonunu %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü.

M : DNA Ladder , 1. 1hafta stres verilmiş RNA dan CBF1F+Oligo dT ile PCR yapılmış , PCR ürünü saflaştırılmış ve kalıp olarak kullanılarak aynı koşullarda ikinci PCR yapılmış , 2. 1 hafta stres verilmiş RNA dan F+Oligo dT ile PCR yapılmış , PCR ürünü saflaştırılmış ve kalıp olarak kullanılarak aynı koşullarda ikinci PCR yapılmış

3.3.2.3 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren 1 günlük (F+oligo dT) , 1 haftalık (F+oligo dT) ve jelden saflaştırılarak tekrarlanan PCRdan elde edilen 1 haftalık (F+oligo dT) örnekleri, 2.9 da anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

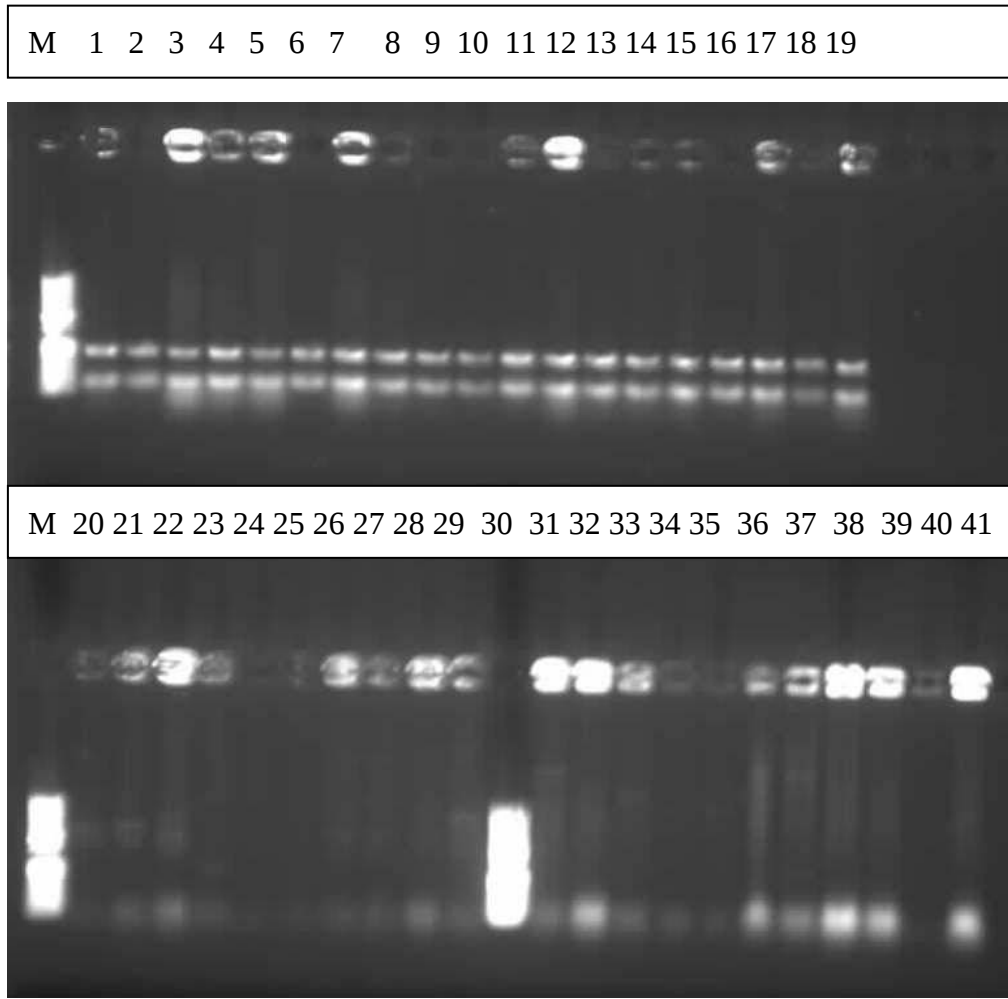
3.3.2.4 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 µl'si 2.10 da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 µl kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 ° C 'de 16 saat büyütüldü.

16 saat sonunda, 1 günlük (F+oligo dT) transformasyonundan 78, 1 haftalık (F+oligo dT) transformasyonundan 42, tekrarlanan PCRdan elde edilen 1 haftalık (F+oligo dT) transformasyonundan 24 adet koloni elde edildi.

3.3.2.5 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için , 2.7.2 de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri %1 lik Jel üzerinde kontrol edildi.



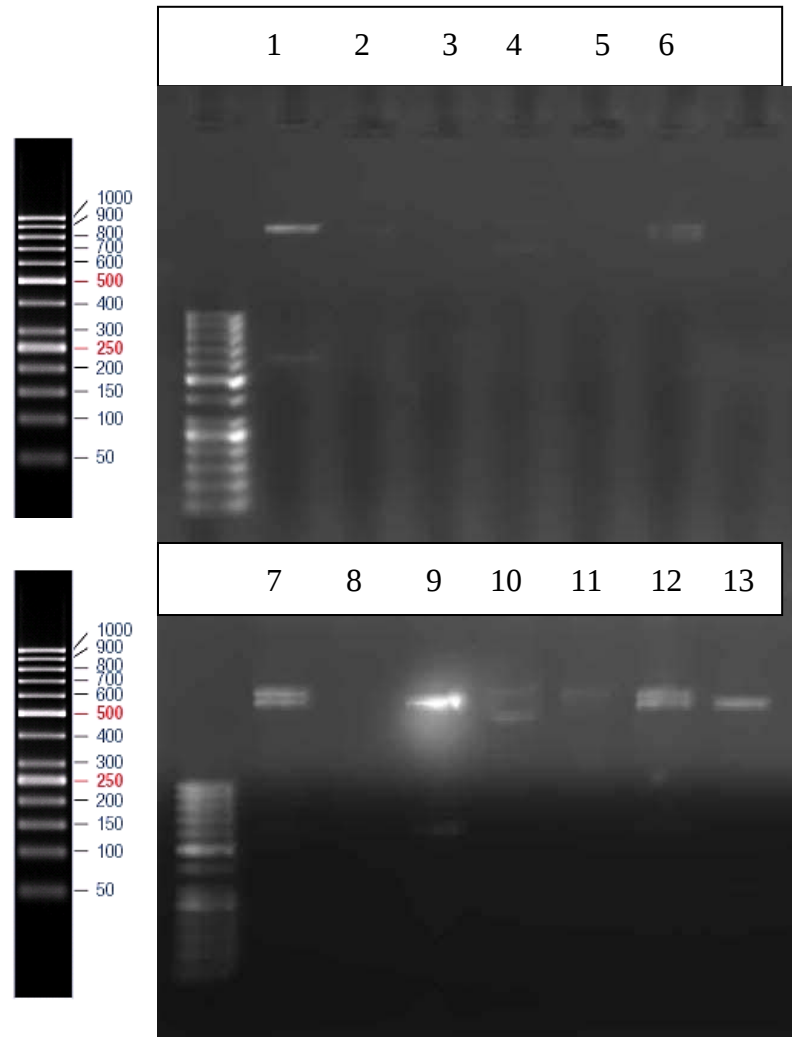
Şekil 3.18 Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCRın %1’lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.

M: DNA Ladder, 1–40 koloni kontrol PCR

3.3.2.6 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.12 de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

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



Şekil 3.19 EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.

1. 1G3R5 ,2. 1G3R13, 3. 1G3R26, 4. 1G3R31, 5. 1G3R34, 6. 1G3R40, 7.1H3R1, 8. 1H3R15, 9. 1H3R16, 10. 1H3R25, 11. 1H3R40, 12. 1H23R1, 13. 1H23R22

3.3.2.7 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Lineer hale getirilen plazmitlerden miktar ve yoğunlukları dizin analizi için elverişli olanlar seçilerek , Iontek firmasına dizin analizi yapılması için yollandı.

Gelen sonuçların vektör dizinleri çıkartıldı ve BLASTn, BLASTx ve tBLASTx programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.2 de verilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar ve benzerlik analizi sonuçları Ek 7’de verilmiştir.

İsim	Primerler	RNA	BlastN	Skor	BlastX	Skor (Bits)	tBlastX	Skor (Bits)
1G3R5	F +oligo dT	Gemlik 1günlük soğuk	Vitis vinifera misc_RNA	197	İnsan Repetin Proteini	42.0	Vitis vinifera misc_RNA	154
1G3R31	F +oligo dT	Gemlik 1günlük soğuk	Arabidopsis lyrata SINE9 transpozon	199	Katalaz	41.2	İnsan Poliglutamin Bağlanma Proteini	182
1G3R40	F +oligo dT	Gemlik 1günlük soğuk	Arabidopsis lyrata SINE9 transpozon	194	Katalaz	41.2	Arabidopsis lyrata SINE9 transpozon	177
1H3R1	F +oligo dT	Gemlik 1haftalık soğuk	Arabidopsis lyrata SINE9 transpozon	206	Katalaz	41.2	Arabidopsis lyrata SINE9 transpozon	186
1H3R16	F +oligo dT	Gemlik 1haftalık soğuk	Arabidopsis lyrata CACTA2 transpozon	215	Katalaz	42.0	Arabidopsis lyrata MITE6 transpozon	190
1H3R25	F +oligo dT	Gemlik 1haftalık soğuk	Arabidopsis lyrata SINE9 transpozon	93.3	Katalaz	48.1	Populus trichocarpa predicted protein	83.1
1H23R1	F +oligo dT	Gemlik 1haftalık soğuk	Cloning vector psiLentGene Basic	527	Katalaz	33.9	Cloning vector psiLentGene Basic	111

Çizelge 3.4 3’RACE dizin analizi ve benzerlik analizleri

3.3.3 5'RACE

3.3.3.1 cDNA Sentezi

Soğuk stresi verilmiş RNAlardan Roche RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde cDNA sentezi yapıldı.

3.3.3.2 Çoklu A Kuyruğu Takılması

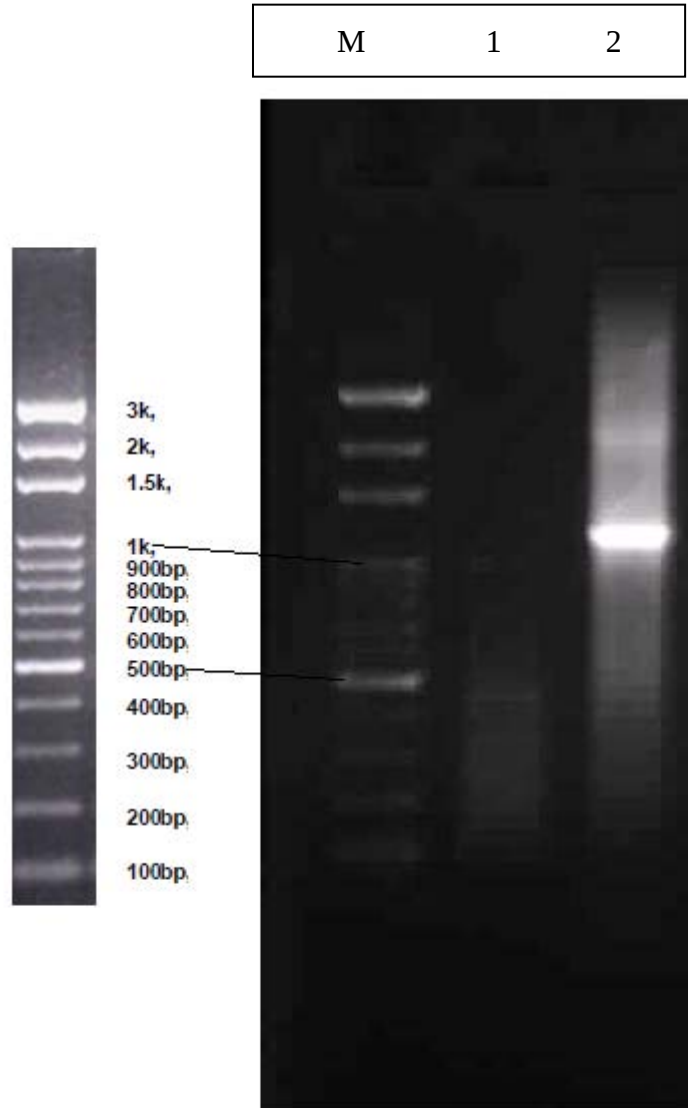
2.13.2.2 de anlatıldığı biçimde çoklu A kuyruğu takıldı.

3.3.3.3 Birinci PCR Reaksiyonu

2.13.2.3 de anlatıldığı biçimde yapılan PCRın ürünleri %1lik Agaroz Jele yüklenerek , kalite ve büyüklüğü kontrol edildi.

3.3.3.4 İkinci PCR Reaksiyonu

2.13.2.4 te anlatıldığı biçimde yapılan PCRın ürünleri %1lik Agaroz Jele yüklenerek , kalite ve büyüklüğü kontrol edildi.



Şekil 3.20 5'RACE İkinci PCR reaksiyonunun %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

M: DNA Ladder , 1. Soğuk stresi verilmiş RNAlardan R ve oligo dT ile 1.PCR yapılmış , bu PCR kalıp olarak kullanılarak R ve PCR Anchor pirmerleri ile yapılan 2.PCR , 2. Soğuk stresi verilmiş RNAlardan R ve oligo dT ile 1.PCR yapılmış , bu PCR kalıp olarak kullanılarak SP1 ve PCR Anchor pirmerleri ile yapılan 2.PCR

3.3.3.5 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren bant jelden kesilerek saflaştırıldı ve 2.9 da anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

3.3.3.6 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 µl'si 2.10 da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 µl kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 °C 'de 16 saat büyütüldü.

16 saat sonunda 38 koloni elde edildi.

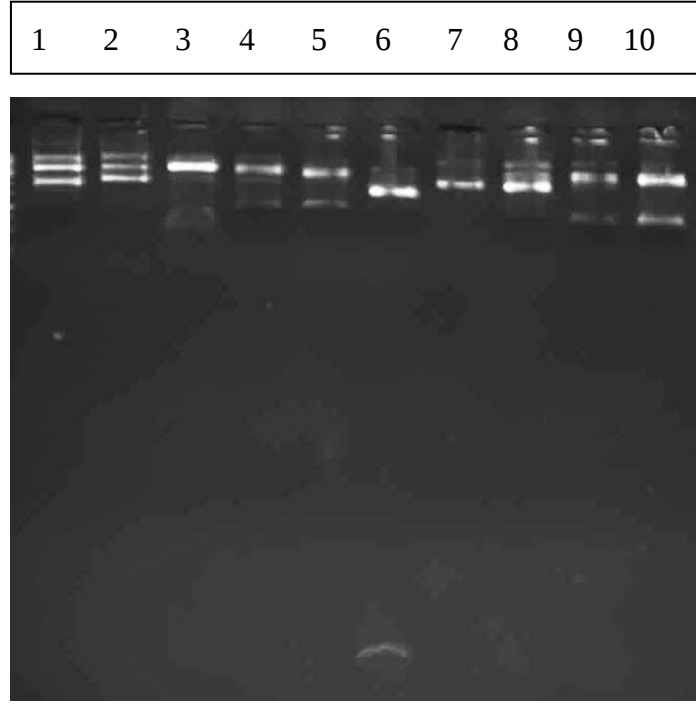
3.3.3.7 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA yı taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için, 2.7.2 de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri %1 lik Jel üzerinde kontrol edildi.

3.3.3.8 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.12 de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

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



Şekil 3.21 Pst I enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiş plazmitlerin %1lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

1.C51, 2.C52, 3.C53, 4.C54, 5.C55, 6.C56, 7.C57, 8.C58, 9.C59, 10.C510

3.3.3.9 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Lineer hale getirilen plazmitlerden miktar ve yoğunlukları dizin analizi için elverişli olan C51, C55, C59, C510 seçilerek , Iontek firmasına dizin analizi yapılması için yollandı.

Gelen sonuçların vektör dizinleri çıkartıldı ve BLASTn, BLASTx ve tBLASTx programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.3 te verilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar ve benzerlik analizi sonuçları Ek 8’de verilmiştir.

İsim	Primerler	RNA	BlastN	Skor	BlastX	Skor (Bits)	tBlastX	Skor (Bits)
C51	R+SP1+PCR Anchor	Gemlik 1haftalık soğuk	Solanum lycopersicum Kloroplast genomu	661	İnsan Keratin Proteini	31.2	Jasminum nudiflorum kloroplast genomu	305
C55	R+SP1+PCR Anchor	Gemlik 1haftalık soğuk	Olea europaea cultivar Bianchera tRNA-His (trnH) geni	1411	Fotosistem (Q)B Proteini	503	Vitis vinifera PSII	595
C59	R+SP1+PCR Anchor	Gemlik 1haftalık soğuk	Olea europaea cultivar Bianchera tRNA-His (trnH) geni	1415	Fotosistem (Q)B Proteini	441	Olea europaea cultivar Bianchera tRNA-His (trnH) geni	593
C510	R+SP1+PCR Anchor	Gemlik 1haftalık soğuk	Mus musculus BAC RP23-122N6 Klonu	44.6	Mus musculus Coiled-coil domain	33.1	Mus musculus BAC clone RP24-304A20	42.3

Çizelge 3.5 5’RACE dizin analizi ve benzerlik analizleri

4. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada bir hafta süreyle soğuk stresi verilen Zeytin bitkisinden mRNA izolasyonu yapılmış ve daha önce çeşitli bitkilerde varlığı belirlenen CBF1 gen homologları göz önüne alınarak primer tasarlanmıştır. Daha önceki çalışmalardan bilindiği üzere CBF1 geni, bir AP2 domain bölgesi taşımaktadır. CBF geni homologları izole edilmiş bitkilerin gen dizinleri CLUSTAL W programı ile hizalanmış ve bu hizalamada görülen AP2 domain bölgesine özgü primerler sentezlettirilmiştir. Sentezlenen primerler çeşitli kombinasyonlarda kullanılarak ters transkriptaz PCR ile cDNA'lar elde edilmiştir.

Stres verilmiş olan RNA'lerden cDNA'lar sentezlenmiş ve bu cDNA'lar PCR ile çoğaltılarak pGEM T easy vektörüne klonlanmıştır. CBF familyasının bitki türüne göre değişen sayılarda üyesi vardır. Bu sayı *Arabidopsis thaliana* da 6 iken, *Hordeum vulgare* de 14 tür. CBF genleri, soğukla uyarılırlar ve boyları yaklaşık olarak eşittir. Bu duruma ilaveten, çalışmada kullanılan primerler AP2 domain bölgesi için tasarlanmış olup, PCR sonucu farklı CBF genlerini çoğaltmış olmamız muhtemeldir. pGEM T easy vektörüne klonlayarak dizin analizine göndermenin amacı, farklı CBF genlerini saptayabilmektir.

Transformasyon sonucu elde edilen pozitif koloniler, dizin analizine yollanmış, gelen sonuçlar BlastX ile yorumlanarak, mevcut homologlara benzerliklerine bakılmıştır. Blast N ve Blast X sonuçları elde edilen dizinlerin yüksek oranda DREB1D , tBlastX sonuçları ise Çeşitli türlerin CBF1 homologlarına benzediğini göstermiştir.

Genin tam uzunluğunu elde etmek için 5' ve 3' RACE yöntemleri uygulandı. Her iki RACE sonucu elde edilen bantlar pGEM T easy vektörüne klonlanmıştır. Transformasyon sonucu elde edilen pozitif koloniler, dizin analizine yollanmış, gelen sonuçlar Blast analizleri ile yorumlanmıştır. Blast analizleri CBF genlerine benzerlik vermemiştir. RACE çalışmalarına devam edilecektir. Yeni 3' ve 5' primerler tasarlanarak bunlar kullanılacaktır.

McKhann ve arkadaşlarının 2008 tarihli yayınında çeşitli bölgelerde yetişen *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin CBF genlerinin kodlayıcı bölgelerinde dizin farklılıkları olduğu belirtilmiştir. Bu yayındanki bilgiden yola çıkarak Memecik ve Gemlik kültürlerinin dizinlerinde bir farklılık olup olmadığına bakılmış, ancak AP2 domainleri arasında bir farklılık bulunamamıştır. CBF dizinleri intronsuz oldukları için, RACE çalışmalarında Genomik DNA da kalıp olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M., Suzuki, M., (1998), "A novel mode of DNA recognition by a b-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA", *The EMBO Journal*, 17:5484-5496
- Artus N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., Thomashow, M.F. (1996), "Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance", *Proc Natl Acad Sci USA* , 93 ;13404-13409
- Badawi M., Danyluk J., Boucho B., Houde M., Sahran F. (2006), "The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*", *Mol Genet Genomics*
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., Thomashow, M.F. (1994), "The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression", *Plant Molecular Biology* , 24;701-713
- Baldoni, L., Tosti, N., Ricciolini, C., Belaj, A., Arcioni, S., Panelli, G., Germana, M.A., Mulas, M., Porceddu, A. (2006) "Genetic Structure of Wild and Cultivated Olives in the Central Mediterranean Basin", *Annals of Botany* , 98; 935-942
- Barranco, D., Ruiz, N., Gomez-del Compo, M. (2005), "Frost Tolerance of Eight Olive Cultivar", *HortScience* , 40(3) ;558-560
- Bartolozzi, F., Mencuccini, M., Fontanazza, G., (2001), "Enhancement of frost tolerance in olive shoots in vitro by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 299-302
- Beck, E.H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K., Bhattarait., (2007), "Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress" *Journal of Biosciences*, 32(3):501-510
- Bedestenci, H.Ç., Vuruş, H. (2000) "Türkiyede Zeytin Üretiminin Geleceği", *Fen ve Mühendislik Dergisi* (3), 2:136-144
- Bernardi, R., Adamo, S., Fontana, F., Manzo, M., Salvini, M., Durante, M., Petruccelli, R., Bartolini, G. (2008), "Differential Gene Expression Induced by Cold Stress in *Olea europaea* L.", V. International Symposium on Olive Growing
- Besnard, G., Baradat, P., Bervillé, A., (2001), "Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars", *Theor Appl Genet*, 102:251-258
- Besnard, G., Baradat, P., Chevalier, D., Tagmount, A., Bervillé, A., (2001), "Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 165-182
- Besnard, G., Green, P.S., Bervillé, A., (2002) "The Genus *Olea* : Molecular approaches of its structure and relationships to other Oleaceae", *Acta Botanica Gallica* 149 : 49-66
- Bosabalidis, A.M., Kofidis, G., (2002), "Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars", *Plant Science*, 163:375-379
- Büttner, M., 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.*, 94:5961-5966

- Cansev ,A., Gülen , H., Eriş , A. (2009) , “Cold-hardiness of olive (*Olea europaea*L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages : seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins” , *Journal of Agricultural Science* ,147 ; 51-61
- Cattivelli,L.,BartelsD.,(1990), “Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley”,*Plant Physiology*,93:1504-1510
- Champ K.I., Febres V.J., Moore G.A., (2007) , “The role of CBF transcriptional activators in two Citrus species (*Poncirus* and *Citrus*) with contrasting levels of freezing tolerance” , *Physiology Plantarum* 129 : 529-541
- Chartzoulakis , K.S. (2005) , “Salinity and Olive : Growth, salt tolerance, photosynthesis and yield” , *Agricultural Water Management* ,78 ; 108-121
- Cheng,H., An,Z. and Huang,H. “Cloning and expressing of the HbCBF1 gene in *Hevea brasiliensis*”
- Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J-K., (2006) , “Gene Regulation During Cold Acclimation in Plants” , *Physiology Plantarum* 126 : 52-61
- Chinnusamy V., Zhu J.,(2002) , “Molecular Genetic Analysis of Cold Regulated Gene Transcription” , *Phil.Trans.R.Soc.* 357 : 877-886
- Choi D-W., Rodriguez E.M., Close T. J.(2002) “Barley *Cbf3* Gene Identification, Expression Pattern, and Map Location”, *Plant Physiology* 129; 1781–1787
- Contento,A., Ceccarelli,M., Gelati,M.T., Maggini,F., Baldoni,L., Cionini,P.G., (2002) , “Diversity of *Olea* Genotypes and the Origin of Cultivated Olives” , *Theor Appl.Genet.*, 104:1229-1238
- Cushman J.C., Bohnert H.J., (2000) , “Genomic Approaches to Plant Stress Tolerance” , *Current Opinion in Plant Biology* 3 :117-124
- D’Angeli,S. Altamura,M.M., (2007), “Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization”, *Planta*,225:1147–1163
- Dichio , B., Xiloyannis , C., Sofo , A., Montanara , G. (2005) , “Osmotic Regulation in Leaves and Roots of Olive Trees During a water Deficit and Rewatering” , *Tree Physiology* , 26 ; 179-185
- Durrant,W.E., Rowland,O., Piedras,P., Hammond-Kosack,K.E., Jones,J.D.(2000) ,cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles , *Plant Cell* 12 (6), 963-977
- El Kayal W ., Navarro M ., Marque G., Keller G., Marque C., Teulieres C., (2006) , “Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold”, *Journal of Experimental Botany* 57: 2455–2469
- Elbaum,R.,Melamed-Bessud,C., Boaretto,E., Galili,E.,Lev-Yadun,S.,Levy ,A.A., Weiner,S., (2006), “Ancient olive DNA in pits: preservation, amplification and sequence analysis” , *Journal of Archaeological Science*,33:77-88
- Finkelstein,R.R.,Wang,M.L.,Lynch,T.J.,Rao,S.,Goodman,H.M.,(1998),“The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an *APETALA2* domain protein”, *Plant Cell*,10:1043–1054.

- Fowler S.G., Cook D., Thomashow M.F. (2005) , “Low Temperature Induction of Arabidopsis CBF1,2 and 3 Is Gated by the Circadian Clock” , *Plant physiology*
- Frohman ,M.A., (1994) , On Beyond Classic RACE, PCR Methods And Application , Cold Spring Harbour Laboratory , 40-58
- Frohman, M.A.,Dush, M.K., Martin, G.R., (1988), “Rapid production of full-length cDNA’s from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer”
- Gamboa M.C., Rasmusen-Poblete S.,Valenzuela P.D.T., Krauskopf E., (2007) , “Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from E. Globulus” , *Plant Physiology and Biochemistry* 45 : 1-5
- Gao M-J., Allard G., Byass L., Flanagan A.F., Singh J. (2002) “Regulation and Characterization of Four CBF Transcription Factors From *Brassica napus*” , *Plant Molecular Biology* 49 ; 459-471
- Giannoulia,K., Banilas,G.,Hatzopoulos,P.,(2007), “Oleosin gene expression in olive” , *Journal of Plant Physiology*, 164:104-107
- Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M., 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(4) ; 433-442
- Gilmour S.J., Thomashow M.F. (2004) , “Arabidopsis Transcriptional Activators CBF1, CBF2 and CBF3 Have Matching Functional Activities” , *Plant Molecular Biology* 54 ; 767-781
- Gómez-del-Campo,M., Barranco,D., (2005), “Field evaluation of frost tolerance in 10 olive cultivars”, *Plant Genetic Resources*, 3(3); 385–390
- Gu,Y.-J., Wan,F.-H. and Cheng,H.-M. , “Clone and identification of C-repeat binding factor (CBF) encoding gene from *Eupatorium adenophorum*”
- Gutterson,N., Reuber,T.L.,(2004)“Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors”, *Current Opinion in Plant Biology*,7:465–471
- Guy,C.L.,Niemi,K.J.,Brambl,R., (1985), “Altered Gene Expression During Cold Acclimation in Spanish” ,*Proc.natl.Acad.Sci.*82:3673-3677
- Haake,V.,Cook,D.,Riechmann,J.L.,Pineda , O.,Thomashow,M.F., Zhang,J.Z. (2002), “Transcription Factor CBF4 is a regulator of Drought adaptation in Arabidopsis” , *Plant Physiology* ,130;1-10
- Hajela,R.K.,HorvathD.P.,Gilmour,S.J.,Thomashow,M.F.,(1990) , “Molecular Cloning and expression of cor (cold-Regulated) genes in Arabidopsis thaliana”,*Plant Physiology* ,93;1246-1252
- Hatzopoulos,P.,Banilas,G.,Giannoulia,K.,Gazis,F.,Nikoloudakis,N.,Miloni,D.,Haralampidis ,K.,(2002), “Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree”, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*,104:574-586
- Hernández,M.L., l Mancha,M., Martínez-Rivas,J.M., (2005), “Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive” *Phytochemistry*, 66 1417–1426

- Huang B.(2006) , “A cotton dehydration responsive element binding protein functions as a transcriptional repressor of DRE-mediated gene expression” , *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 ; 1023–1031
- Huang B., Jin H., Liu J-Y. (2006) “Identification and characterization of the novel gene GhDBP2 encoding a DRE-binding protein from cotton (*Gossypium hirsutum*)” , *Journal of Plant Physiology*
- Huang B., Liu J-Y., (2006) , “Cloning and functional analysis of the novel gene GhDBP3 encoding a DRE-binding transcription factor from *Gossypium hirsutum*” , *Biochimica et Biophysica Acta* 1759 ; 263–269
- Hughes M.A., Dunn M.A., (1990) , “The Molecular Biology Of Plant Acclimation To Low Temperature” , *Journal of Experimental Botany* 47 : 291-305
- Huner , N.P.A., Öquist , G., Sarhan ,F. (1998) , “ Energy balance and acclimation to light and cold” , *Trends in Plant Science*, 3(6) ;224-230
- Inoue,H., Najima,H., Okayama,H., (1990), High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene*,96(1): 23-28
- Jaglo – Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O., Thomashow M.F. (1998), “Arabidopsis CBF1 Overexpression induces COR Genes and Enhances Freezing Tolerance”
- Jaglo – Ottosen K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Hake V., Zhang J.Z., Deist T., Thomashow M.F. (2001) , “Components of the Arabidopsis C-Repeat/Dehydration-Responsive Element Binding Factor Cold-Responsive Pathway Are Conserved in *Brassica napus* and Other Plant Species” , *Plant Physiology* 127 ; 910-917
- Jofuku,K.D.,den Boer,B.G.W.,Montagu,M.V.,Okamuro,J.K.,(1994), “Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2”, *The Plant Cell*,6:1211-1225
- Kalefetoğlu,T., Ekmekçi,Y.,(2005),”The Effect of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms” , *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*,18(4):723-740
- Kasuga M., Liu Q., Mirua S., Yamaguchi-Shinozaki K , 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
- Kessler, B., (1961). “ Nucleic acids as factors in drought resistance of higher plants”, *Recent Advan. Bot.* , 1153-1159
- Kim,S., An,S., Hong,Y.-N. and Lee,K.-W., (Yayınlanmamış) “Cold-inducible Transcription Factor CaCBF Associates with HD-Zip, Homeodomain Leucine Zipper Protein in Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.)”
- Kim,S., Soltis,P.S.,Wall,K.,Soltis,D.E.,(2005), “Phylogeny and Domain Evolution in the APETALA2-like Gene Family”,*Mol.Biol.Evol.*,23(1):107-120
- Kitashiba,H., Ishizaka,T., Isuzugawa,K., Nishimura,K. and Suzuki,T. (2004) , Expression of a sweet cherry DREB1/CBF ortholog in Arabidopsis confers salt and freezing tolerance . *J. Plant Physiol.* 161 (10) ;1171-1176
- Kitashiba,H., Matsuda,N., Ishizaka,T., Nakano,H. and Suzuki,T. (2002) , “Isolation of genes similar to DREB1/CBF from sweet cherry (*Prunus avium* L.)”, *J. Japan. Soc. Hort. Sci*

- Kizis,D.,Lumbreras,V.,Pagés,M.,(2001), “Role of the AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stres”,FEBS Letter,498:187-189
- Knight , H., Zarka,D.G., Okamoto, H., Thomashow , M.F. Knight M.R. (2004)“Abscisic Acid Induces CBF Gene Transcription and Subsequent Induction of Cold-Regulated Genes via the CRT Promoter Element”, Plant Physiology, 135; 1710-1717
- Kurkela,S.,Franck,M.,(1990), “Cloning and characterization of cold and ABA-inducible *Arabidopsis* gene”,Plant Molecular Biology,15:137-144
- Larcher W., (1998) Physiological Plant Ecology , Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups , Springer-Verlag , Berlin
- Lee S-C., Huh K-W., An K., An G., Kim S-R., (2004) “Ectopic Expression of a Cold-inducible Transcription Factor,CBF1/DREB1b, in Transgenic Rice (*Oryza sativa* L.)” , *Mol. Cells* 18 (1); 107-114
- Levitt,J., (1980), Responses of plants to environmental stresses , Academic Pres, New York
- Li C., Puhakainen T., Welling A., Vihera-Aarnio A., Ernstsén A., Junttila O., Heino P., Palva E.T., (2002) , “Cold Acclimation in Silver Birch (*Betula pendula*).Development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes” , *Physiology Plantarum* 116 : 478-488
- Li,H.-Y. and Liu,X.-D. , (Yayınlanmamış),Isolation and characterization of CBF1 transcription factor from *Malus baccata* (L.) Barkh
- Li,H.-Y. and Wang,F.-W. , (Yayınlanmamış), Isolation and characterization of the putative CBF transcription factor from *Rosa chinensis*
- Lichtenthaler,H.K., (1996), “Vegetation Stres:An intoruction to the stres concept in plants”, Journal of Plant Physiology,148:4-14
- Lichtenthaler,H.K., (1998), Stres Concept in Plants, Annals of the New York Academy of Sciences, New York.
- Lin,Y-h.,hwang,S-Y.,Hsu,P-Y.,Chiang, Y-C., Huang C-L.,Wang C-N., Lin, T-P.,(2008) , “Molecular population genetics and gene expression analysis of duplicated CBF genes of *Arabidopsis thaliana*” , BMC Plant Biology, 8(111) ;1-16
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998) , Two Transcription Factors , DREB1 And DREB2 With An EREBP/AP DNA Binding Domain Seperate Two Cellular Signal Transduction Pathways İn Drought-And Low-Temperature-Responsive Gene Expression , Respectiveley, İn *Arabidopsis* , The Plant Cell, 10 ; 1391-1406
- Lu,L., Wilson,K.G. and Francko,D.A., (Yayınlanmamış),Identification of CBF/DREB homologs from both cold-hardy and cold-sensitive palms
- Magnani,E., Sjölander,K., Hake,S. (2004), “From Endonucleases to Transcription Factors : Evolution of the AP2 DNA Binding Domain in Plants” , The Plant Cell, 16 ; 2265-2277
- Maniatis, T., Fritsh, E.F., Sambrook, J., (1989), Molecular Cloning : a laboratory manual , Cold Spring Harbour, New York
- Mckersie,B.D.,Lehsem,Y.,(1994) Stress and stres coping in cultivated plants , Kluwer Academic Publishers, Netherlands

- McKhann, H., Gery, C., Berard, A., Leveque, S., Zuther, E., Hinch, D.K., Mita S.D., Brunel D., Teoule E. (2008), "Natural variation in CBF gene sequence, gene expression and freezing tolerance in the Versailles core collection of *Arabidopsis thaliana*", *BMC Plant Biology*, 8 (105) ;1-18
- Medina J., Bargues M., Terol J., Perez-Alonso M., Salinas J. (1999), The *Arabidopsis* CBF Gene Family is Composed of Three Genes encoding AP2 Domain-Containing Proteins Whose Expression is Regulated by Low Temperature but Not by Abscissic Acid or Dehydration, *Plant Physiology* 119 ; 463-469
- Mohapatra, S.S., Poole, R.J., Dhindsa, R.S., (1988), "Abscissic acid-induced gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa", *Plant Physiology*, 87:468-473
- Mohapatra, S.S., Wolfrum, L., Poole, R.J., Dhindsa, R.S., (1989), "Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation specific genes of alfalfa"
- Moose, S.P., Sisco, P.H., (1996), "Glossy15, an APETALA2-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity", *Genes Dev.* 10:3018-3027
- Ohmetakagi, M., Shinshi, H., (1995), "Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element", *Plant Cell*, 7:173-182.
- Ohto, M., Fischer R.L., Goldberg R.B., Nakamura, K., Harada, J. (2005), "Control of seed mass by APETALA2", *PNAS*, 102 (8) ;3123-3128
- Okamoto J.K., Caster B., Villarroel R., Montagu M., Jofuku K.D. (1997) The AP2 Domain of APETALA2 Defines a Large New Family of DNA Binding Proteins in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci* 94 ; 7076-7081
- Oñate-Sánchez, L., Singh, K.B., (2002) "Identification of *Arabidopsis* Ethylene-Responsive Element Binding Factors with Distinct Induction Kinetics after Pathogen Infection" *Plant Physiology*, 128: 1313-1322
- Puhakainen T., Li C., Boije-Malm M., Kangasjarvi J., Heino P., Palva E.T., (2004) Short-Day Potentiation of Low Temperature-Induced Gene Expression of a C-Repeat-Binding Factor-Controlled Gene during Cold Acclimation in Silver Birch, *Plant Physiology* 136 : 4299-4307 *Science* 280 ; 104-106
- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M., (1998), "The AP2/EREBP Family of Plant Transcription Factors", *Biol. Chem.*, 379:633-646
- Rodríguez-Ariza, M.O., Moya, E.M., (2005), "On the origin and domestication of *Olea europaea* L. (olive) in Andalucía, Spain, based on the biogeographical distribution of its finds", *Veget Hist Archaeobot* 14: 551-561
- Rugini, E., Pesce, P.G., (2006) "Genetic Improvement of Olive", *Pomologia Croatica*, 12:43-74
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., (2002), "DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 Domain of *Arabidopsis* DREBs, Transcription Factors Involved in Dehydration- and Cold-Inducible Gene Expression", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290:998-1009
- Salisbury, F.B., Ross C.W. (1992) *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Co., California

- Secchi , F., Lovisolo , C., Schubert , A. (2007) , “ Expression of OePIP2.1 aquaporin gene and water relations of *Olea europaea* twigs during drought stres and recovery”, *Annals of Applied Biology* , 150 ;163-167
- Seçmen Ö., Gemici Y., Gök G., Bekat L., Leblebici E. (2000) , *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları , İzmir
- Seki M., Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (2003) , Molecular Responses to Drought ,Salinity and Frost : Common and Different Paths for Plant Protection , *Current Opinion in Plant Biology* 14 : 194-199
- Sharma P., Sharma N., Deswal R., (2005) , The Molecular Biology of the Low-Temperature Response in Plants , *BioEssays* 27 : 1048-1059
- Shigyo,M.,Hasebe,M.,Ito,M. (2006), “Molecular evolution of the AP2 subfamily”, *Gene*,366;256-265
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., (2000) , Molecular Responses to Dehydration and Low Temperature : Differences and Cross-Talk Between Two Stress Signalin Pathways , *Current Opinion in Plant Biology* 3 :217-223
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.,Seki,M.,(2003), “Regulatory networkof gene expression in the drought and cold stres responses”, *Current Opinion in Plant Biology*,6:410-417
- Shinshi,H.,(2008), “Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid”, *Plant Science*,175:18–23
- Shinvari,Z.K.,Nakashima K., Miura,S., Kasuga,S.,Seki,M.,Yamaguchi-Shinozaki ,K., Shinozaki,K. (1998) , “An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in Low-Temperature-Responsive gene expression” , *Biochemical and Biophysical Research Communication*,250;161-170
- Siddiqua,M., Xiao,H. and Nassuth,A. (2005), In silico analysis of the promoters of three CBF genes from both *V.riparia* and *V. vinifera* *PROCEEDINGS INTERNATIONAL GRAPE GENOMICS SYMPOSIUM*: 105-112;
- Skinner J.S., Szucs P., Zitzewitz J., Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Stockinger E. J., Thomashow M.F.,Chen T. H.H., Hayes P. M. (2006) Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in Arabidopsis *Theor Appl Genet* 112 ; 832–842
- Skinner J.S., Zitzewitz J., Szücs P., Marquez-Cedillo L., Filichkin T., Amundsen A., Stockinger E.J., Thomashow M.F.,Chen T.H.H., Hayes P.M. (2005) , Structural , Functional and Phylogenetic Characterization of a Large CBF Gene Family in Barley , *Plant Molecular Biology* 59 ; 533-551
- Smallwood,M.,Bowles,D.J.,(2002), “Plants ina Cold Climate”,*Phil.Trans.*,357:831-847
- Smirnoff,N.,(1998), “Plant Resistance to Enviromental Stresses” , *Current opinion Biotechnology*,9:214-219
- Song,C-P.,Agarwal,M.,Ohta,M.,Guo,Y., Halfter,U.,Wang,P.,Zhua,J-K.,(2005) “Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-Type TranscriptionalRepressor in Absciscic Acid and Drought Stress Responses” *The Plant Cell*,17: 2384–2396

- Stockinger E.J., Gilmour S.J., 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 , *Prot.Natl.Acad.Sci* 94 ; 1035-1040
- Stockinger E.J., Mao Y., Reiger M.K., Triezenberg S.J., Thomashow M.F. (2001) Transcriptional Adaptation and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and Their Interactions with CBF1 , a Transcriptional activator involved in Cold-Regulated Gene Expression , *Nucleic Acid Research* 29(7) ; 1524-1533
- Thomashow M.F., (1998) , Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance , *Plant Physiology* 118 : 1-7
- Thomashow M.F., Gilmour S.J., Stockinger E.J., Jaglo – Ottosen K.R., Zarka D.G. (2001) , Role of the Arabidopsis CBF Transcriptional Activators in Cold Acclimation , *Physiologia Plantarum*, 112 ; 171-175
- Thomashow M.F., Stockinger E.J., Gilmour S.J. (1998) , Regulation of Plant Gene Expression in Response to Low Temperature , Plant Cold Hardiness, Premium Press ,
- Tsirka, S.E., Frohman , M.A., (2001) , “Polymerase Chain Reaction (PCR) : Specialized Reactions”, *Encyclopaedia of Life Science*
- Uemura, M., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. Steponkus, P.L., (1996) , “Effects of COR6.6 and Cor15a polypeptides encoded by COR genes of Arabidopsis thaliana on the freeze-induced fusion and leakage of liposomes” , *Plant Physiology* , 111; 313-327
- Van Bruskirk , H.A., Thomashow , M.F. (2006), Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation , *Physiology Plantarum* 126 : 72-80
- Wang X., Liu S., Liu X., Chena Z., Liu X., Panga Y., Sun X., Tang K. (2004) , Molecular Cloning and Characterization of a CBF Gene from Capsella bursa-pastoris *DNA Sequence* 15 (3) ; 180–187
- Wang, Z., Triezenberg, S.J., Thomashow, M.F., Stockinger E.J. (2005) , “Multiple Hydrophobic motifs in Arabidopsis CBF1 COOH-terminus provide functional redundancy in trans-activation” , *Plant Molecular Biology* , 58 ; 543-559
- Weiser, C.J., (1970), “Cold Resistance and Injury in Woody Plants” , *Science*, 169: 1269-1278
- Welling, A. and Palva, T. , Involvement of CBF Transcription Factors in Winter Hardiness in Birch
- Wessler, S., (2005), “Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain” , *Trends in Plant Science*, 10(2): 54-56
- Wilson, K., Long, D., Swinburne, J., 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.
- Wuitschick , J.D., Lindstrom , P.R., Meyer , A.E., Karrer K.M. (2004), “Homing Endonucleases Encoded by Germ Line-Limited Genes in *Tetrahymena thermophila* Have APETALA2 DNA Binding Domains” *Eukaryot Cell* , 3(3); 685-694
- Wuitschick, J.D., (2002), “ A novel family of mobile genetic elements is limited to the germline genome in *Tetrahymena thermophila*.” *Nucleic Acids Res.*, 30: 2524–2537

- Xiao,H., Siddiqua,M., Braybrook,S. and Nassuth,A. (2006), Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ.* 29 (7), 1410-1421
- Xin Z., Browse J., (2000) , Cold Comfort Farm : the Acclimation of Plants to Freezing Temperatures , *Plant , Cell and Environment* 23 : 893-902
- Xiong , L., Schumaker, K.S., Zhu J-K. (2002), “ Cell Signaling during Cold, Drought and Salt Stres” , *The Plant Cell* ,165-183
- Xiong L., Zhu J-K., (2001) , Abiotic Stress Signal Transduction in Plants : Molecular and Genetic Perspectives , *Physiology Plantarum* 112 : 152-166
- Yamaguchi-Shinozaki ,K., Shinozaki,K. (1994), A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene involved in Responsiveness to Drought, Lowqemperature, or High-Salt Stres ,*Plant Cell* ,6 ;251-264
- Yang,J.S., Li,X.G. and Bi,Y.P. , (Yayınlanmamış) The isolation of sweet pepper CBF1 gene CfCBF1
- Zarka,D.G., Vogel, J.T., Cook D., Thomashow , M.F. (2003), Cold Induction of Arabidopsis CBF Genes Involves Multiple ICE (Inducer of CBF Expression) Promoter Elements and a Cold-Regulatory Circuit That Is Desensitized by Low Temperature, *Plant Physiology*, 133 ; 910-918
- Zhang X., Fowler S.G., Cheng H., Lou Y.,Rhee S.Y., Stockinger E. J.,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
- Zhao T-J., Liu Y., Yan Y-B., Feng F., Liu W-Q ., Zhou H-M., (2007) , Identification of the amino acids crucial for the activities of drought responsive element binding factors (DREBs) of Brassica napus , *FEBS Letter*
- Zhu,J.,Dong,C-H.,Zhu,J-K.,(2007), Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation ,*Current Opinion in Plant Biology*,10 :290-295
- Zohary, D., Spiegel-Roy,P.,(1975), Beginnings of Fruit Growing in the Old World , *Science*, 187 : 319-327

İNTERNET KAYNAKLARI

<http://biow.tubitak.gov.tr>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

EKLER**Ek 1: *Arabidopsis* CBF/DREB Transkripsiyon Faktörlerinin cDNA Dizileri****CBF1/DREB1B (AB007788)**

CTT GAA AAA GAA TCT ACC TGA AAA GAA AAA AAA GAG AGA GAG ATA TAA
ATA GCT TTA CCA AGA CAG ATA TAC TAT CTT TTA TTA ATC CAA AAA GAC
TGA GAA CTC TAG TAA CTA CGT ACT ACT TAA ACC TTA TCC AGT TTC TTG
AAA CAG AGT ACT CTG ATC A **AT** GAA CTC ATT TTC AGC TTT TTC TGA AAT
GTT TGG CTC CGA TTA CGA GCC TCA AGG CGG AGA TTA TTG TCC GAC GTT
GGC CAC GAG TTG TCC GAA GAA ACC GGC GGG CCG TAA GAA GTT TCG TGA
GAC TCG TCA CCC AAT TTA CAG AGG AGT TCG TCA AAG AAA CTC CGG TAA
GTG GGT TTC TGA AGT GAG AGA GCC AAA CAA GAA AAC CAG GAT TTG GCT
CGG GAC TTT CCA AAC CGC TGA GAT GGC AGC TCG TGC TCA CGA CGT CGC
TGC ATT AGC CCT CCG TGG CCG ATC AGC ATG TCT CAA CTT CGC TGA CTC
GGC TTG GCG GCT ACG AAT CCC GGA GTC AAC ATG CGC CAA GGA TAT CCA
AAA AGC GGC TGC TGA AGC GGC GTT GGC TTT TCA AGA TGA GAC GTG TGA
TAC GAC GAC CAC GAA TCA TGG CCT GGA CAT GGA GGA GAC GAT GGT GGA
AGC TAT TTA TAC ACC GGA ACA GAG CGA AGG TGC GTT TTA TAT GGA TGA
GGA GAC AAT GTT TGG GAT GCC GAC TTT GTT GGA TAA TAT GGC TGA AGG
CAT GCT TTT ACC GCC GCC GTC TGT TCA ATG GAA TCA **TAA** TTA TGA CGG
CGA AGG AGA TGG TGA CGT GTC GCT TTG GAG TTA CTA ATA TTC GAT AGT
CGT TTC CAT TTT TGT ACT ATA GTT TGA AAA TAT TCT AGT TCC TTT TTT TAG
AAT GGT TCC TTC ATT TTA TTT TAT TTT ATT GTT GTA GAA ACG AGT GGA
AAA TAA TTC AAT AC

ATG : Başlangıç**TAA : Bitiş**

CBF2/DREB1C (AB007789)

CCT GAA TTA GAA AAG AAA GAT AGA TAG AGA AAT AAA TAT TTT ATC ATA
 CCA TAC AAA AAA AGA CAG AGA TCT TCT ACT TAC TCT ACT CTC ATA AAC
 CTT ATC CAG TTT CTT GAA ACA GAG TAC TCT TCT GAT CAA TGA ACT CAT
 TTT CTG CCT TTT CTG AAA TGT TTG GCT CCG ATT ACG AGT CTC CGG TTT CCT
 CAG GCG GTG ATT ACA GTC CGA AGC TTG CCA CGA GCT GCC CCA AGA AAC
 CAG CGG GAA GGA AGA AGT TTC GTG AGA CTC GTC ACC CAA TTT ACA GAG
 GAG TTC GTC AAA GAA ACT CCG GTA AGT GGG TGT GTG AGT TGA GAG AGC
 CAA ACA AGA AAA CGA GGA TTT GGC TCG GGA CTT TCC AAA CCG CTG AGA
 TGG CAG CTC GTG CTC ACG ACG TCG CCG CCA TAG CTC TCC GTG GCA GAT
 CTG CCT GTC TCA ATT TCG CTG ACT CGG CTT GGC GGC TAC GAA TCC CGG
 AAT CAA CCT GTG CCA AGG AAA TCC AAA AGG CGG CGG CTG AAG CCG CGT
 TGA ATT TTC AAG ATG AGA TGT GTC ATA TGA CGA CGG ATG CTC ATG GTC
 TTG ACA TGG AGG AGA CCT TGG TGG AGG CTA TTT ATA CGC CGG AAC AGA
 GCC AAG ATG CGT TTT ATA TGG ATG AAG AGG CGA TGT TGG GGA TGT CTA
 GTT TGT TGG ATA ACA TGG CCG AAG GGA TGC TTT TAC CGT CGC CGT CGG
 TTC AAT GGA ACT ATA ATT TTG ATG TCG AGG GAG ATG ATG ACG TGT CCT
 TAT GGA GCT ATT AAA ATT CGA TTT TTA TTT CCA TTT TTG GTA TTA TAG CTT
 TTT ATA CAT TTT CCT TTT TTA GAA TGG ATC TTC TTC TTT TTT TGG TTG TGA
 GAA ACG AAT GTA AAT GGT AAA AGT TGT TGT CAA ATG CAA ATG TTT TTG
 AGT GCA GAA TAT ATA ATC TTT

ATG : Başlangıç

TAA : Bitiş

CBF3/DREB1A (AB007787)

CCT GAA CTA GAA CAG AAA GAG AGA GAA ACT ATT ATT TCA GCA AAC CAT
 ACC AAC AAA AAA GAC AGA GAT CTT TTA GTT ACC TTA TCC AGT TTC TTG
 AAA CAG AGT ACT CTT CTG ATC **AAT** GAA CTC ATT TTC TGC TTT TTC TGA
 AAT GTT TGG CTC CGA TTA CGA GTC TTC GGT TTC CTC AGG CGG TGA TTA
 TAT TCC GAC GCT TGC GAG CAG CTG CCC CAA GAA ACC GGC GGG TCG
 TAAGAA GTT TCG TGA GAC TCG TCA CCC AAT ATA CAG AGG AGT TCG TCG
 GAG AAA CTC CGG TAA GTG GGT TTG TGA GGT TAG AGA ACC AAA CAA GAA
 AAC AAG GAT TTG GCT CGG AAC ATT TCA AAC CGC TGA GAT GGC AGC TCG
 AGC TCA CGA CGT TGC CGC TTT AGC CCT TCG TGG CCG ATC AGC CTG TCT
 CAA TTT CGC TGA CTC GGC TTG GAG ACT CCG AAT CCC GGA ATC AAC TTG
 CGC TAA GGA CAT CCA AAA GGC GGC GGC TGA AGC TGC GTT GGC GTT TCA
 GGA TGA GAT GTG TGA TGC GAC GAC GGA TCA TGG CTT CGA CAT GGA GGA
 GAC GTT GGT GGA GGC TAT TTA CAC GGC GGA ACA GAG CGA AAA TCG TTT
 TAT ATG CAC GAT GAG GCG ATG TTT GAG ATG CCG AGT TTG TTG GCT AAT
 ATG GCA GAA GGG ATG CTT TTG CCG CTT CCG TCC GTA CAG TGG AAT CAT
 AAT CAT GAA GTC GAC GGC GAT GAT GAC GAC GTA TCG TTA TGG AGT TAT
 TAA AAC TCA GAT TAT TAT TTC CAT TTT TAG TAC GAT ACT TTT TAT TTT ATT
 ATT ATT TTT AGA TCC TTT TTT AGA ATG GAA TCT NCA TTA TGT TTG TAA
 AAC TGA GAA ACG AGT **GTA** AAT TAA ATT GAT TCA GTT TCA GTA T

ATG : Başlangıç

TAA : Bitiş

CBF4 (NM124578)

ATG AAT CCA TTT TAC TCT ACA TTC CCA GAC TCG TTT CTC TCA ATC TCC
 GAT CAT AGA TCT CCG GTT TCA GAC AGT AGT GAG TGT TCA CCA AAG TTA
 GCT TCA AGT TGT CCA AAG AAA CGA GCT GGG AGG AAG AAG TTT CGT GAG
 ACA CGT CAT CCG ATT TAC AGA GGA GTT CGT CAG AGG AAT TCT GGT AAA
 TGG GTT TGT GAA GTT AGA GAG CCT AAT AAG AAA TCT AGG ATT TGG TTA
 GGT ACT TTT CCG ACG GTT GAA ATG GCT GCT CGT GCT CAT GAT GTT GCT
 GCT TTA GCT CTT CGT GGT CGC TCT GCT TGT CTC AAT TTC GCT GAT TCT GCT
 TGG CGG CTT CGT ATT CCT GAG ACT ACT TGT CCT AAG GAG ATT CAG AAA
 GCT GCG TCT GAA GCT GCA ATG GCG TTT CAG AAT GAG ACT ACG ACG GAG
 GGA TCT AAA ACT GCG GCG GAG GCA GAG GAG GCG GCA GGG GAG GGG GTG
 AGG GAG GGG GAG AGG AGG GCG GAG GAG CAG AAT GGT GGT GTG TTT TAT
 ATG GAT GAT GAG GCG CTT TTG GGG ATG CCC AAC TTT TTT GAG AAT ATG
 GCG GAG GGG ATG CTT TTG CCG CCG CCG GAA GTT GGC TGG AAT CAT AAC
 GAC TTT GAC GGA GTG GGT GAC GTG TCA CTC TGG AGT TTT GAC GAG **TAA**

ATG : Başlangıç

TAA : Bitiş

Ek 2: Otsu Bitkilerde Mevcut CBF Homologları

Bitki Türü	Gen	PubMed Kayıt No	Kaynak
<i>Brassica napus</i>	CBF	AF 370733	Jaglo vd.2001
	DREB1-4	EF625342	Zhao vd.2007
	DREB1-5	EF 625343	
	DREB2-1	AY437878	
	DREB2-2	AY444874	
	DREB2-3	AY444875	
	DREB2-19	AY444877	
	DREB2-23	AY444876	
	CBF5	AF499031	
	CBF7	AF499032	Gao vd.2002
	CBF16	AF 499033	
	CBF17	AF 499034	
<i>Brassica oleracea</i>	CBF1	AF370732	Thomashow ve Jaglo , 2001
<i>Brassica rapa</i>	CBF1 B	AY368483	Zhang vd. , 2006
<i>Capsicum annum</i>	CBF1	DQ 118521	Kim vd.*
	DREB1A	AY321150	Yang vd.*
<i>Gossypium hirsutum</i>	DREB1	DQ409060	Shan vd.*
	CBF1	AF298230	Huang ve Liu*

Bitki Türü	Gen	PubMed Kayıt No	Kaynak
<i>Hordeum vulgare vulgare</i>	CBF1	AF418204	Choi vd.2002
	CBF2	AF442489	Que , 2002
	CBF1	AY785837	
	CBF2A	AY785841	Skinner vd. 2005
	CBF2B	DQ097684	
	CBF3	AY785845	
	CBF4A	AY785849	
	CBF4B	AY785850	
	CBF4D	AY785852	
	CBF5	AY785855	
	CBF6	AY785860	
	CBF7	AY785864	
	CBF8A	AY785868	
	CBF8B	AY785871	
	CBF9	AY785875	
	CBF10A	AY785878	
	CBF10B	AY785882	
	CBF11	AY785885	
	CBF12	AY785890	
	CBF13	DQ095157	
	CBF14	DQ095158	
	DREB1	DQ095159	

Bitki Türü	Gen	PubMed Kayıt No	Kaynak
<i>Hordeum brevisubulatum</i>	EREBP Transkripsiyon Faktörü Benzeri	AF211530	Wang vd.
<i>Nicotiana tabacum</i>	DREB1	AF211531	Durrant vd.,2000
		AY064403	
<i>Oryza sativa</i>	DREB1B	AY785894	Skinner vd. 2005
	DREB1D	AY785895	
	DREB1E	AY785896	
	DREB1F	AY785897	
<i>Secale cereale</i>	DREB1	AF370730	Jaglo vd. 2001
<i>Solanum lycopersicum</i>	CBF	AB231689	Jaglo vd. 2001
<i>Sorghum bicolor</i>	CBF1	AF376136	Skinner vd. 2005
	CBF6	AY785899	
<i>Triticum aestivum</i>	CBF2	AY785900	Jaglo vd. 2001
	CBF5	AY785902	Skinner vd. 2005
	CBF6	AY785903	
	CBF7	AY785904	
	CBF 9	AY785905	
	CBF 11	AY785906	
<i>Triticum monococcum</i>	DREB1A	AF450481	Skinner vd. 2005

* yayınlanmamış

Ek 3 : Odunsu Bitkilerde Mevcut CBF Homologlar

Bitki Türü	Gen	PubMed Kayıt No	Kaynak
<i>Prunus avium</i>	DREB1 Like	AB080965	Kitashiba vd.,2002
		AB080966	
		AB080967	
	DREB1B	AB121674	Kitashiba vd.,2004
<i>Vitis amurensis</i>	CBF1	DQ517296	Li vd.
<i>Vitis riparia</i>	CFB1a	AY390370	Xiao vd.,2006
	CBF1b	AY390371	
	CBF2	AY390372	
	CBF3	AY390373	
<i>Vitis vinifera</i>	CBF1	AY390372	Xiao vd.,2006
	CBF2	AY390376	
	CBF3	AY390375	
<i>Hevea brasiliensis</i>	CBF1	AY960212	Cheng vd.
<i>Eucalyptus gunnii</i>	CBF1A	DQ241820	El Kayal vd.,2006
	CBF1B	DQ241821	
<i>Eucalyptus globulus</i>	CBF1	DQ523829	Gamboa vd.,2007
<i>Populus tomentosa</i>	CBF1	DQ354394	Zhou vd.*
<i>Populus suaveolens</i>	CBF1	DQ487103	Zhou vd.*
<i>Sabal palmetto</i>	CBF	DQ497730	Lu vd.*
<i>Sabal minor</i>	CBF	DQ497731	Lu vd.*

Bitki Türü	Gen	PubMed Kayıt No	Kaynak
<i>Trachycarpus fortunei</i>	CBF	DQ497732	Lu vd.*
<i>Ravenia rivularis</i>	CBF	DQ497733	Lu vd.*
<i>Elaeis oleifera</i>	CBF	DQ497734	Lu vd.*
<i>Elaeis guineensis</i>	CBF1	DQ497736	Lu vd.*
	CBF2	DQ497735	
<i>Attalea bassleriana</i>	CBF	DQ497737	Lu vd.*
<i>Dyopsis lutescens</i>	CBF	DQ497738	Lu vd.*
<i>Cocos nucifera</i>	CBF	DQ497739	Lu vd.*
<i>Rhapidophyllum hystrix</i>	CBF1	DQ497740	Lu vd.*
	CBF2	DQ497741	
<i>Ageratina adenophora</i>	CBF1	DQ923522	Gu Lu vd.*
<i>Betula pendula</i>	CBF1	EF530204	Welling ve Palva*
<i>Malus baccata</i>	CBF/DREB1	EF582842	Li ve Liu*
<i>Rosa chinensis</i>	CBF/DREB1	EF583559	Li ve Liu*

* yayınlanmamış

HvAF298230	----QKQQGHRTVSSEPPKRPAGRTKFETHRPLRYGVRRRGRVGQWVCEVRVPGIKGSR	68
TaAF376136	-----REGHRTVCSEPPKRPAGRTKFETHRPLRYGVRRRGRGLGQWVCEVRVGAQGYR	63
CnDQ497739	-----DEEAYATVSSAPPKRRAGRTKFETHRPVYKGVRRR-NADKWVCEVREPN-KKSR	72
TfDQ497732	-----DEEAYATVSSAPPKRRAGRTKFETHRPVYKGVRRR-NADKWVCEVREPN-KKSR	72
RhDQ497740	-----DEEAYATVSSAPPKRRAGRTKFETHRPVYKGVRRR-NADKWVCEVREPN-KKSR	72
SmDQ497731	-----DEEAYATVSSAPPKRRAGRTKFRE-RHPVYKGVRRR-NADKWVCEVREPN-KKSR	71
SpDQ497730	-----DEEVYATVSSAPPKRRAGRTKFETHRPVYKGVRRR-NADKWVCEVREPN-KKSR	72
RrDQ497733	-----DEEAYATVSSAPPKRRAGRTKFETHRPVYKGVRRR-NADKWVCEVREPN-KKSR	72
OsAY114110	-----DEDSYMTVSSAPPKRRAGRTKFETHRPVYKGVRRR-NPGRWVCEVREPH-GKQR	76
AtAB076155	---QGGDYCPTLATSCPKKPAGRKKFETHRPIYRGVRQR-NSGKWVSEVREPN-KKTR	71
BnEF625342	----EGGDY--ILAASCPKKPAGRKKFQETHRPIYRGVRLR-KSGKWVCEVREPN-KKSR	73
MbEF582842	SQLTSFSDEEIVILASSTPKKRAGRRVFNETHRPVYRGVRRR-NNDKWVCEMREPNKKKSR	84
PaAB080965	ARRASLSDEEIVILASSCPKKRAGRRVFKETHRPVYRGVRRR-NNNKWVCELAPNKKAR	87
PsDQ487103	QQDSPCSNEKVLLAASRPKKRAGRRIFKETHRPIFRGVRRR-NGDKWVCELREPN-KKSR	86
PtDQ354394	QQDSPSSNEKVLLAASRPKKRAGRRIFKETHRPIFRGVRRR-NGDKWVCELREPN-KKSR	86
BpEF530204	----LSDEEIRLASRNPKKRAGRKKFETHRPVYRGVRRR-NSGKWVCEVREPN-KQSR	70
HbAY960212	ALRANLSDEEIVLASSYPKKRAGRKKFETHRPIYRGVRRR-NSGKWVCEVREPN-KKSR	91
EglDQ523829	-APGNFSGEEVRLASDHPKKPAGRKKFETHRPVYRGVRLR-DSGKWVCEVREPR-KKSR	89
EguDQ241820	TALGNFSHKEVLLASHHPKKRAGRKKFETHRPVYRGVRLR-DSGKWVCEVREPI-KKSR	85
GhDQ409060	DRPVNFSGDYVMLASSYPKKRAGRKKFETHRPVYRGVRRR-NPGKWVSEVREPN-KKSR	79
VrAY390370	----NPSDSLPLQICIGHKRKAGRKKFETHRPIYRGVRRR-NGNKWVCEVREPL-KKSR	75
VrAY390371	----NPSDSLPLQICIGHKRKAGRKKFETHRPIYRGVRRR-NGNKWVCEVREPL-KKSR	75
VvAY390372	----NPSDSLPLQICIGHKRKAGRKKFETHRPIYRGVRRR-NGNKWVCEVREPL-KKSR	75
ZmAF448789	AGGEEEEEEEEEGCAGNKAAPAKKRPRGSEGKHPTRFGRVMR-AWGKWVSEIREPR-KKSR	118

HvAF298230	LWLGTFTNPEMAARAHDAAVLALSGRAACLNFADSAWRMRPVLATTGSFGFSSTREIKLA	128
TaAF376136	LWLGTFTTAEMAARAHDSAVLALLDRAACLNFADSAWRMLPVLAAGSSRFSSAREIKDA	122
CnDQ497739	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWLCVPV-RS-----SNSKDIQRA	125
TfDQ497732	IWLGTFTPTAEMAARAHDAAMALRGRSACLNFADSAWLCVPV-RS-----SNSKDIQRA	125
RhDQ497740	IWLGTFTPTAEMAARAHDAAMALRGRSACLNFADSAWLCVPV-GS-----SNPKDIQRA	125
SmDQ497731	IWLGTFTPTAEMAARAHDAAMALRGRSACLNFADSAWLCVPV-RS-----SSPKDIQRA	124
SpDQ497730	IWLGTFTPTAEMAARAHDAAMALRGRSACLNFADSAWLCVPV-RS-----SSPKDIQRA	125
RrDQ497733	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWLCVPV-RS-----SSPKDIQRA	125
OsAY114110	IWLGTFTETAEMAARAHDAAMALRGRAACLNFADSPRRLRVPPLG-----AGHEEIRRA	130
AtAB076155	IWLGTFTQTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWRLRIP-ES-----TCAKDIQKA	124
BnEF625342	IWLGTFTKTAEMAARAHDAALALRGRGACLNFADSAWRLRIP-ET-----TCAKDIQKA	126
MbEF582842	IWLGAFTPTAEMAARAHDAALAFRGRLACLNFADSAWRLPVP-AS-----TDSVDIRRA	137
PaAB080965	IWLGTFTPTAEMAARAHDAVLAFRGKLACLNFADSAWRLPVP-AS-----TDAEIRRA	140
PsDQ487103	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALAFRGKSACLNFADSAWRLPAP-IS-----NEAKDIRRA	139
PtDQ354394	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALAFRGKSACLNFADSAWRLPAP-IS-----NEAKDIRRA	139
BpEF530204	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWRLPVP-AS-----GTAKDIQRT	123
HbAY960212	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWRLPVP-AS-----REAKDIRKA	144
Eg1DQ523829	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWRLPVP-AS-----PNTKDIQKA	142
EguDQ241820	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWRLPVP-AS-----ADTKEIQKA	138
GhDQ409060	IWLGTFTPKADMAARAHDAALALRGRSACLNFADSAWKLVPV-AS-----SDPKDIQKT	132
VrAY390370	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRFASLNFPDPAWRLPRP-KS-----SSAEDIQVA	128
VrAY390371	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRFASLNFPDPAWRLPRP-KS-----SSAEDIQVA	128
VvAY390372	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALALRGRFASLNFPDPAWRLPRP-KS-----SSAEDIQVA	128
ZmAF448789	IWLGTFTPTAEMAARAHDAALAIKGRAHLNFPDLAALPRAAS-----AAPKDVQAA	171
	:***:: . .:***** *:!: . . * **.* .	::: :
HvAF298230	VAVAVVAFQQQIILPVA-----CPS---PEAPASPSAA-----	159
TaAF376136	VAVAVVAFQQQIILPVA-----EMHDGEKDAQGSPTPS-----	156
CnDQ497739	AVEAAEAFRPQTERV-----DAAESREDAAMAMIAG-----	156
TfDQ497732	AVEAAEAFRPQTERV-----DAAESREDAAMAMIAG-----	156
RhDQ497740	AVDAAEAFRPQTERV-----DAAESREDAAMAMIAR-----	156
SmDQ497731	AMEAAEAFRPQTES-----DAAESREDAAMAMIAG-----	154
SpDQ497730	AMEAAEAFRPQTES-----DAAESREDAAMAMIAG-----	155
RrDQ497733	AMEAAEGFRPQTEP-----DAAKSREDATMAMAAG-----	155
OsAY114110	AVEAAELFRPAPGQHN-----AAAEAAAATAA-----	162
AtAB076155	AAEAALAFQDETCDTTT-----TDHGLDMEETMVEAIYTPEQSEG-----	164
BnEF625342	AAEAALAFQDETCDTTT-----TDHGLDMEETMVEAIYTPEQSEG-----	186
MbEF582842	AAEAETFRPAEFGGVS-----ESGDDEKESKKMEGEKDCGCAEQSDC	180
PaAB080965	ATEAAEAFRQAEDGGV-----DEKESKAVVSE-----	167
PsDQ487103	AGEAAELFRTSDLGGQV-----MEDFTTEGRGEVCSS-----	171
PtDQ354394	ASEAAELFRTSDLGGQV-----MEDHTTENRGEVCSS-----	171
BpEF530204	AAEAEEFRP-----AESKAV-----	139
HbAY960212	AAEAAMAFQPEGTEGFS-----GELKQENKWT-----	171
Eg1DQ523829	AAKAAEAFQLESE-----DVMSGN-----	162
EguDQ241820	AARAAEAFQSVSE-----DVMSGD-----	158
GhDQ409060	VAEVAETFRTAEHSSGN-----S---RNDAKR-----	156
VrAY390370	ALEATKAFNPTAPSSSSSLASALDNMSG-----VADSKKVLETSPNVESPKLKSQRMVLEV	183
VrAY390371	ALEATKAFNPTAPSSSSSLASALDNMSG-----VADSKKVLETSPNVESPKLKSQRMVLEV	183
VvAY390372	ALEATKAFNPTAPSSSSSLASALDNMSG-----VADSKKVLETSPNVESPKLKSQRMVLEV	183
ZmAF448789	AALAAFTSPSSEPAGAHEEPAKDG-----AAPEEAAAQAQAPVPVALP-----	217

HvAF298230	-----LFYISSGDLLELDEEQWFGGMDAGSYASLAQGMLVAPPDERARP-ENR-EH	209
TaAF376136	-----ELSTSS----DLLDEHWFGGMDAGSYASLAQGMLMEPPSARTWS-EDGGEY	203
CnDQ497739	-----PSLAAADDPFYMEDGLNSG-MQG--YLD-MASGMLMEPPPIYAD-----E	197
TfDQ497732	-----PSLAAADDPFYMEDGLNFG-MQG--YLD-MASGMLMEPPPIYAD-----E	197
RhDQ497740	-----PSLAAADDPFYMEDGLNFG-MQG--YLD-MAAGMLMEPPPIYAD-----E	197
SmDQ497731	-----PSLAATDDPFMEDGLNFG-MQG--YLD-MAAGLLMEPPPIYAD-----E	195
SpDQ497730	-----PSLAATDDPFMEDGLNFG-MQG--YLD-MAAGLLMEPPPIYAD-----E	196
RrDQ497733	-----PSLAAADDPFYVEDGLNFG-MQG--YLD-MAAGLLMEPPPIYAD-----E	196
OsAY114110	-----SAELFADFPCYPMDGLEFE-MQG--YLD-MAQGMLIEPPPLAGQS---TWAE	207
AtAB076155	-----AFYMDEETMFG-MPT--LLDNMAEGMLLPPPSVQWN----HNYD	201
BnEF625342	EETTUVGVVPEEQMSKGFYMDDEWMFG-MPT--LLADMAAGMLLPLPSVQWG---HNDD	239
MbEF582842	GRAEQSDCGGAEQSGSSFYLDDEEMFA-MPR--LLDSMAEGLLLSPPRRSAGSNMNWDDM	237
PaAB080965	----EKGCVGMEGSSNLFYLDDEEIFE-MPR--LLDDMADGIMLCPPQLDG-YMDWNDV	219
PsDQ487103	----SNDDIRDLPSENVSYIDEEAEFN-MPW--LLANMAEGLLLSPP-HYTG---DWNDG	220
PtDQ354394	----TNDDIRDLPSENVSYIDEEAEFN-LPG--LLANMAEGLLLSPP-HYTG---DWNDG	220
BpEF530204	-----EDRQPSESLFFMDEEAVFG-MPG--LMINMAEGMLLPPPYCVGDDDGYGDDV	188
HbAY960212	-----TESAP-EDVFYMDDEEAVFA-MPG--LLASMAEGLMLPPPPQCVAGSGGEDGE-	218
Eg1DQ523829	-----EKKLHSEEGVLYDEEDIFG-MPG--LLANTAEGMLLSPPECSGDLIA-GLDD	210
EguDQ241820	-----EKKLRESEGVFYDEEDIFG-MPG--LLADMAEGLMLSPPKWGGDIYG-GEDE	206
GhDQ409060	-----SENTEMEKGFYLDDEEALFG-TQR--FWANMAAGMMMSPP--RSGHDG-GWEE	202
VrAY390370	SPVDTKRSEKVGDGSTPVFMDEEAMFN-MQG--LINSMAEGLLLTPPAMCKG--FSWDDA	238
VrAY390371	SPVDTKRSEKVGDGSTPVFMDEEAMFN-MQG--LINSMAEGLLLTPPAMCKG--FSWDDA	238
VvAY390372	SPVDTKRSEKVGDGSTTVSMDEEAMFN-MQG--LINSMAEGLLLTPPAMCKG--FSWDDA	238
ZmAF448789	-----PPAASRPGTPSSSGVEDERQLFD	200

:

HvAF298230	SGVETPIPLWSYLFDC	225
TaAF376136	SAVYT--PLWN-----	212
CnDQ497739	EVSDGDVSLWSYSI--	211
TfDQ497732	EVSDGDVSLWSYSI--	211
RhDQ497740	EVSDGDVSLWSYSI--	211
SmDQ497731	EVSDGDVSLWSYSI--	209
SpDQ497730	EVSDGDVSLWSYSI--	210
RrDQ497733	EVSGSDFSLWSYSM--	210
OsAY114110	EDYDCEVNLWSY----	219
AtAB076155	GEGDGDVSLWSY----	213
BnEF625342	FEGDADMNLWNY----	251
MbEF582842	GSNDDDVNLWSFSK--	251
PaAB080965	ETVDD-LKLWSFSI--	232
PsDQ487103	E-IDADWSLWSS----	231
PtDQ354394	E-IDADWSLWSS----	231
BpEF530204	MEAHAEVSLWSYSI--	202
HbAY960212	MDA-ADVSLWSFSI--	231
Eg1DQ523829	GNLDAYASLWSYSM--	224
EguDQ241820	GNLGAHTSLWSYSI--	220
GhDQ409060	HEVDDYVPLWSYSI--	216
VrAY390370	TDSHIDLSLWNDD---	251
VrAY390371	TDSHIDLSLWNDD---	251
VvAY390372	TDSHIDLSLWNDD---	251
ZmAF448789	AELRLEEPLWE----	281

*

Hv : Hordeum vulgare

Ta: Triticum aestivum

Cn: Cocos nucifera

Tf: Trachycarpus fortunei

Rh: Rhipidophyllum hystrix

Sm: Sabal minor

Sp: Sabal palmetto

Rr: Ravenea rivularis

Os: Oriza sativa

At:arabidopsis thaliana

Bn:brassica napus

Mb : Malus baccata

Pa:Prunus avium

Ps: Populus tomentosa

Pt: Populus tomentosa

Bp: Betula pendula

Hb:Hevea braziliensis

Egl:Eucalyptus globus

Egu: Eucalyptus gunni

Gh:Gossipium hirsutum

Vr:Vitis riparia

Vv:Vitis vinifera

Zm: Zea mays

*Gri ile işaretli bölge AP2 domain

Ek 5 : Dizin Analizi Sonuçları**PGEMOEAP2**

AAG AAA CCG CCA GGC CGG AGA AGT TTC ACG AGA CGA GGC TCC AGG TTT
 K K P P G R R S F T R R G S R F
 ATA GGG GAG TGA AGC TGA GGA ACT TTG GTA AGT GGG TGT GTG AAG CAA
 I G E * S * G T L V S G C V K Q
 GAG AAC CCA TCA AGA AGT CAA GAA TTT GGT TGG GAA CTT TCC CTC CGG
 E N P S R S Q E F G W E L S L R
 TGA GAT GGT TGA TGA GAG CTC ACA TCG TGT CGA CAA TAA TGC CTA GAG
 * D G * * E L T S C R Q * C L E
 GGC GCT CCA TAG GGT TGA ACT TCG CTG TCT CGG CTT GG
 G A P * G * T S L S R L G

PGEMOEAP3

AAG AAA CCG CCA GGC CGG AGA AGT TTC ACG AGA CGA GGC TCC AGG TTT
 K K P P G R R S F T R R G S R F
 ATA GGG GAG TGA AGC TGA GGA ACT TTG GTA AGT GGG TGT GTG AAG CAA
 I G E * S * G T L V S G C V K Q
 GAG AAC CCA TCA AGA AGT CAA GAA TTT GGT TGG GAA CTT TCC CTC CGG
 E N P S R S Q E F G W E L S L R
 TGA GAT GGT TGA TGA GAG CTC ACA TCG TGT CGA CAA TAA TGC CTA GAG
 * D G * * E L T S C R Q * C L E
 GGC GCT CCA TAG GGT TGA ACT TCG CTG TCT CGG CTT GG
 G A P * G * T S L S R L G

PGEMOEAP4

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GGA
 G G P L A * T S L T R L G

PGEMOEAP5

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CTC TCA GAC CAG GCT TCA GGT
 K K P A G R K K F L S D Q A S G
 TTA TAG GGG AGT GAA GCT GAG GAA CTC AAG TAA GTG GGT GTG TGA AGC
 L * G S E A E E L K * V G V * S
 AAG AGA ACC CAA CAA GAA
 K R T Q Q E

1HFR2

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E A R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

1HFR7

AAG AAA CCG GCA GGC GGA AGA AGT TTC ACG AGA CGA GGC ACC AGG TTT
 K K P A G G R S F T R R G T R F
 ATA GGG GAG TGA AGC TGA GGA ACT CTG GTA AGT GGG TGT GTG AAG CAA
 I G E * S * G T L V S G C V K Q
 GAG AAC CCA ACA AGA AGT CCA GAA TTT GGC TGG GAA CTT TCC CAC CGC
 E N P T R S P E F G W E L S H R
 TGA AAT GGC TGC GAG AGC TCA CAA CGT GGC GAC AAT AAC GCT TCG AGG
 * N G C E S S Q R G D N N A S R
 GCG GTC CGC TTG CTT GAA CTT CGC TGA CTC GGC TTG
 A V R L L E L R * L G L

1HFR9

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E A R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

1HFR20

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E A R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

1HFR25

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E A R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

1HFR29

AAC TTC GCT GAT GAC TCG GCT TGG
 N F A D D S A W

1HFR41

AAG AAA CCA GCC GGC CGG ATT AAG TTG TTG CCA ACC TTC TCT GAC TCT
 K K P A G R I K L L P T F S D S
 GCT TGC A
 A C

1HFR42

AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG GTT
 K P A G R K K F H E A R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

1HFR50

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E A R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

1HFR66

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTA TTT TGC ATT TGT TGT TGT CGA
 K K P A G R K K L F C I C C C R
 TGG TGT GAT TAA CTT CTC TGA CTC GAC TTG CTA ATC GCT ATT GAA TTC
 W C D * L L * L D L L I A I E F
 GCG GGC GCC TGC ACG TCA ACC ATA AGG TAC AGC TCC CAA CGA GGT GGA
 A G A C T S T I R Y S S Q R G G
 TGC TTA GCT TGA GTA TTC GAT ACT GTC ACC TAT TGA GCT TGG CGT AGT
 C L A * V F D T V T Y * A W R S
 CAT GGT CGT ATC TGG TTC CTG TGT GAA ATT GTT ATC CGC TCA CAC TTC
 H G R I W F L C E I V I R S H F
 CAC TCA ACA TAC GAG CCG GAA GCA TAA AGT GCA GAG CCG GCG GTG CCT
 H S T Y E P E A * S A E P A V P
 AGT GAT TGA TCT AAC TCA CTT TAA TTG CGT TGC TGT CAC TGC CCG CTT
 S D * S N S L * L R C C H C P L
 TCC AAT CCG TAA ACC GGT CGT GCC ATC TGC GTT ACT GAA TCG GCC AAC
 S N P * T G R A I C V T E S A N
 GCA CGG GGA GAG GGG GTT TGC GTA TTG CGC GCT CTT CCG CTT CCT CTC
 A R G E G V C V L R A L P L P L
 TCA CTG ACT CGC TGC GCT CGG TCG TGC GGC TGC GGC GAG CGG CAT CAT
 S L T R C A R S C G C G E R H H
 CTC ACT CAG AGG CGG TAA TAC CGT TAT CCT CAG AAT CTA GCG ATA GCG
 L T Q R R * Y R Y P Q N L A I A
 CAA GCA AGA GCA TGT GAG CAC AAC GCC AGC ACA AGG CCA GGA ACC GTG
 Q A R A C E H N A S T R P G T V
 AAA AGG TCG TGT TGC TGG CGC ATT TTC ACA GGC TCC GTG CCC ATG ACG
 K R S C C W R I F T G S V P M T
 AGC
 S

1GCFR1

CCG AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG
 P K K P A G R K K F H E A R H Q
 GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA
 V Y R G V K L R N S G K W V C E
 GCA AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA
 A R E P N K K S R I W L G T F P
 CCG CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC
 P L K W L R E L T T W R Q * R F
 GAG GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 E G G P L A * T S L T R L

1GCFR5

CCG AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG
 P K K P A G R K K F H E A R H Q
 GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA
 V Y R G V K L R N S G K W V C E
 GCA AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA
 A R E P N K K S R I W L G T F P
 CCG CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC
 P L K W L R E L T T W R Q * R F
 GAG GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 E G G P L A * T S L T R L

1GCFR16

CCG AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG
 P K K P A G R K K F H E A R H Q
 GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA
 V Y R G V K L R N S G K W V C E
 GCA AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA
 A R E P N K K S R I W L G T F P
 CCG CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC
 P L K W L R E L T T W R Q * R F
 GAG GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 E G G P L A * T S L T R L

1GCFR 41

CCG AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG
 P K K P A G R K K F H E A R H Q
 GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA
 V Y R G V K L R N S G K W V C E
 GCA AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT
 A R E P N K K S R I W L G T

1GCFR46

TTG GGT GTG TGA AGC AAG AGA ACC CAA CAA GAA GTC CAG AAT TTG GCT
 L G V * S K R T Q Q E V Q N L A
 GGG AAC TTT CCC ACC GCT GAA ATG GCT GCG AGA GCT CAC AAC GTG GCG
 G N F P T A E M A A R A H N V A
 ACA ATA ACG CTT CGA GGG CGG TCC GCT TGC TTG AAC TTC GCT GAC TCG
 T I T L R G R S A C L N F A D S
 GCT TGG
 A W

1HCFR7

CCG AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG
 P K K P A G R K K F H E A R H Q
 GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA
 V Y R G V K L R N S G K W V C E
 GCA AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA
 A R E P N K K S R I W L G T F P
 CCG CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC
 P L K W L R E L T T W R Q * R F
 GAG GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 E G G P L A * T S L T R L

1HCFR10

TCC GAA GAA GCG CGC TGG AAG GAA GAA GTT TCA CGA GAC GAG GCA CCA
 S E E A R W K E E V S R D E A P
 GGT TTA TAG GGG AGT GAA GCT GAG GAA CTC TGG TAA GTG GGT GTG TGA
 G L * G S E A E E L W * V G V *
 AGC AAG AGA ACC CAA CAA GAA GTC CAG AAT TTG GCT GGG AAC TTT CCC
 S K R T Q Q E V Q N L A G N F P
 ACC GCT GAA ATG GCT GCG AGA GCT CAC AAC GTG GCG ACA ATA ACG
 T A E M A A R A H N V A T I T
 CTT CGA GGG CGG TCC GCT TGC TTG AAC TTC GCT GAC TCG GCT TGG
 L R G R S A C L N F A D S A W

1HCFR19

CCG AAG AAG CGC GCT GAA AGG GGA AGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG
 P K K R A E R G R K K F H E T R
 CAC CAG GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG
 H Q V Y R G V K L R N S G K W V
 TGT GAA GCG AGA GAA CCA CAA AGA AGT CCA GAA TTT GGC TGG GAA CTT
 C E A R E P Q R S P E F G W E L
 TCC CAC CGC TGA AAT GGC TGC GAG AGC TCA CAA ACG TGG CGA CAA TAA
 S H R * N G C E S S Q T W R Q *
 CGC TTC GAG GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT
 R F E G G P L A * T S L T R L

1HCFR30

TCC GAA GAA GCG CGC TGG AAG GAA GAA GTT TCA CGA GAC GAG GCA CCA
 S E E A R W K E E V S R D E A P
 GGT TTA TAG GGG AGT GAA GCT GAG GAA CTC TGG TAA GTG GGT GTG TGA
 G L * G S E A E E L W * V G V *
 AGC AAG AGA ACC CAA CAA GAA GTC CAG AAT TTG GCT GGG AAC TTT CCC
 S K R T Q Q E V Q N L A G N F P
 ACC GCT GAA ATG GCT GCG AGA GCT CAC AAC GTG GCG ACA ATA ACG
 T A E M A A R A H N V A T I T
 CTT CGA GGG CGG TCC GCT TGC TTG AAC TTC GCT GAC TCG GCT TGG
 L R G R S A C L N F A D S A W

1HCFR41

CCG AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG GCG AGG CAC CAG
 P K K P A G R K K F H E A R H Q
 GTT TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCT GGT AAG TGG GTG TGT GAA
 V Y R G V K L R N S G K W V C E
 GCA AGA GAA CCC AAC AAG AAG TCC AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA
 A R E P N K K S R I W L G T F P
 CCG CTG AAA TGG CTG CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC
 P L K W L R E L T T W R Q * R F
 GAG GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 E G G P L A * T S L T R L

Ek 6: Gemlik Ve Memecik Genomik DNA'sı Dizin Analizi Sonuçları**GFR 27**

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GGA
 G G P L A * T S L T R L G

GFR30

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GGA
 G G P L A * T S L T R L G

GFR36

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GGA
 G G P L A * T S L T R L G

MFR3

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GGA
 G G P L A * T S L T R L G

MFR29

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GG
 G G P L A * T S L T R L

MFR38

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
 K K P A G R K K F H E T R H Q V
 TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
 Y R G V K L R N S G K W V C E A
 AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
 R E P N K K S R I W L G T F P P
 CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
 L K W L R E L T T W R Q * R F E
 GGC GGT CAA GCT TGC TTG AAC TTC GCT GAC TCG GCT TGG
 G G Q A C L N F A D S A W

MFR41

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CAC GAG ACG AGG CAC CAG GTT
K K P A G R K K F H E T R H Q V
TAT AGG GGA GTG AAG CTG AGG AAC TCA GGT AAG TGG GTG TGT GAA GCA
Y R G V K L R N S G K W V C E A
AGA GAA CCC AAC AAG AAA TCA AGA ATT TGG CTG GGA ACT TTC CCA CCG
R E P N K K S R I W L G T F P P
CTG AAA TGG CTA CGA GAG CTC ACA ACG TGG CGA CAA TAA CGC TTC GAG
L K W L R E L T T W R Q * R F E
GGC GGT CCG CTT GCT TGA ACT TCG CTG ACT CGG CTT GGA
G G P L A * T S L T R L G

Ek 7 : 3'RACE Dizin Analizi Sonuçları**1G3R5**

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TCA TGT AAC GCC CCC TTG ACA TTC
 K K P A G R K K S C N A P L T F
 TCA GAG TTA TAT GGA GCT GTC CTA TGA ACA CTA CCT TGT GCC TGA CGG
 S E L Y G A V L * T L P C A * R
 TCT TCT TGG CCC TCG TTT ATC TAA GAG GGT TGG TTT GGG ACT TCT CGT
 S S W P S F I * E G W F G T S R
 CTG AAG TTC TTG TCA TAT TGA TTG TGT GCA TTG TGA TGG GAA TCT TTG
 L K F L S Y * L C A L * W E S L
 CCA GCC TTT GCA CAA GTT TCC CTC TCT GGA CGT GTT TTA TAG CTT TCT
 P A F A Q V S L S G R V L * L S
 CGC TGT ATC CTT TCT CCC TGG CCC TCG TGT ATG TCC TTG ACT ACG TCT
 R C I L S P W P S C M S L T T S
 TTG GTT GGT CGT AGT TAT TTG GCG GCT CGA TGA TTA TCT ATC TGA CAT
 L V G R S Y L A A R * L S I * H
 TTT CTC TAC CTC CTC CTG ATA CAC ATT TCG AGC TAC ACA GTA TAA GGT
 F L Y L L L I H I S S Y T V * G
 AAT CCT CTA TAG TTT TCT TAA TGT TGC TTT AAC TTT GAA TGT GGA AGT
 N P L * F S * C C F N F E C G S
 CAT GTT TTT TTT TTG GTT CGC TGT ACT TTG AAA CAG CAA TAT ATC TGT TAC
 H V F F L V R C T L K Q Q Y I C Y
 AGA AGT AGC CTC CAT CTA CTT GTG TTG TAA TAA TCT GAT GAA CTG ATG
 R S S L H L L V L * * S D E L M
 TAG AAT TTT AAC TTA CTT GCA AAT TAT CAG AAT AAG TAT TGT TGC CAA
 * N F N L L A N Y Q N K Y C C Q
 TAA AAA AAA AAA AAA AA
 * K K K K

1G3R31

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TCA TTC TAA GCC CCC CTG ACT TTC
 K K P A G R K K S F * A P L T F
 TCA GAG TTA TAT GGA GCT GTA CCT ATA AAC AAT ACC TTG TGC CTG ACG
 S E L Y G A V P I N N T L C L T
 GTC TTC TTG GCC CTC GTT TAT CTA AGA GGG TTG GTT TGG GAC TTC TCG
 V F L A L V Y L R G L V W D F S
 TCT GAA GTT CTT GTC ATA TTG ATT GTG TGC ATT GTG ATG GGA ATC TTT
 S E V L V I L I V C I V M G I F
 GCC AGC CTT TGC ACA AGT TTC CCT CTC TGG ACG TGT TTT ATA GCT TTC
 A S L C T S F P L W T C F I A F
 TCG CTG TAT CCT TTC TCC CTG GCC CTC GTG TAT GTC CTT GAC TAC GTC
 S L Y P F S L A L V Y V L D Y V
 TTT GGT TGG TCG TAG TTA TTT GGC GGC TCG ATG ACT ATC TAT CTG ACA
 F G W S * L F G G S M T I Y L T
 TTT TCT CTA CCT CCT CCT GAT ACA CAT TTC GAG CTA CAC AGT ATA AGG
 F S L P P P D T H F E L H S I R
 TAA TCC TCT ATA GTT TTC TTA ATG TTG CTT TAA CTT TGA ATG TGG AAG
 * S S I V F L M L L * L * M W K
 TCA TGT TTT TTT TTT GGT TCG CTG TAC TTT GAA ACA GCA ATA TAT CTG
 S C F F F G S L Y F E T A I Y L
 TTA CAG AAG TAG CCT CCA TCT ACT TGT GTT GTA ATA ATC TGA TGA ACT
 L Q K * P P S T C V V I I * * T
 GAT GTA GAA TTT TAA CTT ACT TGC AAA TTA TCA GAA TAA AAA AAA AAA
 D V E F * L T C K L S E * K K K
 AAA
 K

1G3R40

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TTT CTT CAT AAG TCA TTG ACA TTC
 K K P A G R K K F L H K S L T F
 TCA GAG NTA TAT GGA GNC GTA TCC TTT AAC AAT ACC TTG TGC CTG ACG
 S E X Y G X V S F N N T L C L T
 GTC TTC TTG GCC CTC GTT TAT CTA AGA GGG TTG GTT TGG GAC TTC CCG
 V F L A L V Y L R G L V W D F P
 TCT GAA GTT CTT GTC ATA TTG ATT GTG TGC ATT GTG ATG GGA ATC TTT
 S E V L V I L I V C I V M G I F
 GCC AGC CTT TGC ACA AGT TTC CCT CTC TGG ACG TGT TTT ATA GCT TTC
 A S L C T S F P L W T C F I A F
 TCG CTG TAT CCT TTC TCC CTG GCC CTC GTG TAT GTC CTT GAC TAC GTC TTT
 S L Y P F S L A L V Y V L D Y V F
 GGT TGG TCG TAG TTA TTT GGC GGC TCG ATG ACT ATC TAT CTG ACA TTT
 G W S * L F G G S M T I Y L T F
 TCT CTA CCT CCT CCT GAT ACA CAT TTC GAG CTA CAC AGT ATA AGG TAA
 S L P P P D T H F E L H S I R *
 TCC TCT ATA GTT TTC TTA ATG TTG CTT TAA CTT TGA ATG TGG AAG TCA TGT
 S S I V F L M L L * L * M W K S C
 TTT TTT TTT GGT TCG CTG TAC TTT GAA ACA GCA ATA TAT CTG TTA CAG
 F F F G S L Y F E T A I Y L L Q
 AAG TAG CCT CCA TCT ACT TGT GTT GTA ATA ATC TGA TGA ACT GAT GTA
 K * P P S T C V V I I * * T D V
 GAA TTT TAA CTT ACT TGC AAA AAA AAA AAA AAA A
 E F * L T C K K K K K

1H3R1

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TCC ATT TAT GCC TCT TTG ACA TTC
 K K P A G R K K S I Y A S L T F
 TCA GAG TTA TAT GGA GCT GTC GTA CCT TTG AAC AAT ACC TTG TGC CTG
 S E L Y G A V P L N N T L C L T
 GTC TTC TTG GCC CTC GTT TAT CTA AGA GGG TTG GTT TGG GAC TTC TCG
 V F L A L V Y L R G L V W D F S
 TCT GAA GTT CTT GTC ATA TTG ATT GTG TGC ATT GTG ATG GGA ATC TTT
 S E V L V I L I V C I V M G I F
 GCC AGC CTT TGC ACA AGT TTC CCT CTC TGG ACG TGT TTT ATA GCT TTC
 A S L C T S F P L W T C F I A F
 TCG CTG TAT CCT TTC TCC CTG GCC CTC GTG TAT GTC CTT GAC TAC GTC TTT
 S L Y P F S L A L V Y V L D Y V F
 GGT TGG TCG TAG TTA TTT GGC GGC TCG ATG ACT ATC TAT CTG ACA TTT
 G W S * L F G G S M T I Y L T F
 TCT CTA CCT CCT CCT GAT ACA CAT TTC GAG CTA CAC AGT ATA AGG TAA
 S L P P P D T H F E L H S I R *
 TCC TCT ATA GTT TTC TTA ATG TTG CTT TAA CTT TGA ATG TGG AAG TCA TGT
 S S I V F L M L L * L * M W K S C
 TTT TTT TTT GGT TCG CTG TAC TTT GAA ACA GCA ATA TAT CTG TTA CAG
 F F F G S L Y F E T A I Y L L Q
 AAG TAG CCT CCA TCT ACT TGT GTT GTA ATA ATC TGA TGA ACT GAT GTA
 K * P P S T C V V I I * * T D V
 GAA TTT TAA CTT ACT TGC AAA AAA AAA AAA AAA A
 E F * L T C K K K K K

1H3R16

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TCC TTT TAT GCC TCT TTG ACA TTC
 K K P A G R K K S F Y A S L T F
 TCA GAG TTA TAT GGA GCT GTC ACT ATG AAC AAT ACC TTG TGC CTG ACG
 S E L Y G A V T M N N T L C L T
 GTC TTC TTG GCC CTC GTT TAT CTA AGA GGG TTG GTT TGG GAC TTC TCG
 V F L A L V Y L R G L V W D F S
 TCT GAA GTT CTT GTC ATA TTG ATT GTG TGC ATT GTG ATG GGA ATC TTT
 S E V L V I L I V C I V M G I F
 GCC AGC CTT TGC ACA AGT TTC CCT CTC TGG ACG TGT TTT ATA GCT TTC
 A S L C T S F P L W T C F I A F
 TCG CTG TAT CCT TTC TCC CTG GCC CTC GTG TAT GTC CTT GAC TAC GTC TTT
 S L Y P F S L A L V Y V L D Y V F
 GGT TGG TCG TAG TTA TTT GGC GGC TCG ATG ACT ATC TAT CTG ACA TTT
 G W S * L F G G S M T I Y L T F
 TCT CTA CCT CCT CCT GAT ACA CAT TTC GAG CTA CAC AGT ATA AGG TAA
 S L P P P D T H F E L H S I R *
 TCC TCT ATA GTT TTC TTA ATG TTG CTT TAA CTT TGA ATG TGG AAG TCA TGT
 S S I V F L M L L * L * M W K S C
 TTT TTT TTT GGT TCG CTG TAC TTT GAA ACA GCA ATA TAT CTG TTA CAG
 F F F G S L Y F E T A I Y L L Q
 AAG TAG CCT CCA TCT ACT TGT GTT GTA ATA ATC TGA TGA ACT GAT GTA
 K * P P S T C V V I I * * T D V
 GAA TTT TAA CTT ACT TGC AAA AAA AAA AAA AAA A
 E F * L T C K K K K K

1H3R25

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TCC TTT TAT GCC TCT TTG ACA TTC
 K K P A G R K K S F Y A S L T F
 TCA GAG TTA TAT GGA GCT GTC ACT ATG AAC AAT ACC TTG TGC CTG ACG
 S E L Y G A V T M N N T L C L T
 GTC TTC TTG GCC CTC GTT TAT CTA AGA GGG TTG GTT TGG GAC TTC TCG
 V F L A L V Y L R G L V W D F S
 TCT GAA GTT CTT GTC ATA TTG ATT GTG TGC ATT GTG ATG GGA ATC TTT
 S E V L V I L I V C I V M G I F
 GCC AGC CTT TGC ACA AGT TTC CCT CTC TGG ACG TGT TTT ATA GCT TTC
 A S L C T S F P L W T C F I A F
 TCG CTG TAT CCT TTC TCC CTG GCC CTC GTG TAT GTC CTT GAC TAC GTC
 S L Y P F S L A L V Y V L D Y V
 TTT GGT TGG TCG TAG TTA TTT GGC GGC TCG ATG ACT ATC TAT CTG ACA
 F G W S * L F G G S M T I Y L T
 TTT TCT CTA CCT CCT CCT GAT ACA CAT TTC GAG CTA CAC AGT ATA AGG
 F S L P P P D T H F E L H S I R
 TAA TCC TCT ATA GTT TTC TTA ATG TTG CTT TAA CTT TGA ATG TGG AAG
 * S S I V F L M L L * L * M W K
 TCA TGT TTT TTT TTT GGT TCG CTG TAC TTT GAA ACA GCA ATA TAT CTG
 S C F F F G S L Y F E T A I Y L
 TTA CAG AAG TAG CCT CCA TCT ACT TGT GTT GTA ATA ATC TGA TGA ACT
 L Q K * P P S T C V V I I * * T
 GAT GTA GAA TTT TAA CTT ACT TGC AAA AAA AAA AAA AAA A
 D V E F * L T C K K K K K

1H23R1

AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TCG GTA AGA CCG CCA TGA TGT CTT

K K P A G R K K S V R P P * C L

GTC GAG TAT CTT AAT ATT TCC GTT GGT AGA AGA CGA TGC AGC CTT ATC

V E Y L N I S V G R R R C S L I

GAA GCA ATT GAA AAT CCC GTC ACG TTT GTC CCT CTA GCT AGG CCT AAT

E A I E N P V T F V P L A R P N

TCG GCA TGT AAG ACG AGT ACA GGA ATT TGA GAC CTT TGG TGG AGA GTT

S A C K T S T G I * D L W W R V

TTA CTT TTT AGA GTG TAA CAG TTT GAA GTC ACT GTG GGG ATT TTA GAA

L L F R V * Q F E V T V G I L E

ATG AAA TTT AAA TAA TCA AAA AAA AAA AAA

M K F K * S K K K K

Ek 8 : 5'RACE Dizin Analizi Sonuçları**C51**

GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTC TTT CCG TAA GCT
 D H A Y R C R L F F F F F F P * A
 CCC AAG CAG TGG GAG GAG CCA GGT CTC TGA CCG CGT GCC TGT TGA AAA
 P K Q W E E P G L * P R A C * K
 ATG AGC CGG CGA CTC ATA GGC AGT GGC TTG GTT AAG GGA ACC CAC CGG
 M S R R L I G S G L V K G T H R
 AGC CGT AGC GAA AGC GAG TCT TCA TAG GGC AAT TGT CAC TGC TTA TGG
 S R S E S E S S * G N C H C L W
 ACC CGA ACC TGG GTG ATC TAT CCA TGA CCA GGA TGA AGC TTG GGT GAA
 T R T W V I Y P * P G * S L G E
 ACT AAG TGG AGG TCC GAA CCG ACT GAT GTT GAA GAA TCA GCG GAT GAG
 T K W R S E P T D V E E S A D E
 TTG TGG TTA GGG GTG AAA TGC CAC TCG AAC CCA GAG CTA GCT GGT TCT
 L W L G V K C H S N P E L A G S
 CCC CGA AAT GCG TTG AGG CGC AGC AGT TGA CTG GAC ATC TAG GGG TAA
 P R N A L R R S S * L D I * G *
 AGC ACT GTT TCG GTG CGG GCT GCG AGA GCT CAC AAC GTG GA
 S T V S V R A A R A H N V

C55

GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT CTT CTT CTG TAA CTG
 D H A Y R C R L F F F F L L L * L
 GAT AAC CAG CAC CGA AAA CCG CCT TTA CAT TGG ATG GTT TGG TGT TTT
 D N Q H R K P P L H W M V W C F
 GAT GAT CCC TAC CTT ATT GAC CGC AAC TTC TGT ATT TAT TAT TGC CTT CAT
 D D P Y L I D R N F C I Y Y C L H
 TGC TGC TCC TCC AGT AGA TAT TGA TGG TAT TCG TGA ACC TGT TTC TGG
 C C S S S R Y * W Y S * T C F W
 ATC TCT ACT TTA CGG AAA CAA TAT TAT CTC AGG TGC CAT TAT TCC TAC
 I S T L R K Q Y Y L R C H Y S Y
 TTC TGC AGC TAT AGG TTT GCA CTT TTA CCC AAT CTG GGA AGC GGC ATC
 F C S Y R F A L L P N L G S G I
 CGT TGA TGA ATG GTT ATA CAA CGG GGG TCC TTA TGA ACT AAT TGT TCT
 R * * M V I Q R G S L * T N C S
 ACA CTT CTT ACT TGG TGT AGC TTG TTA CAT GGG TCG TGA GTG GGA GCT
 T L L T W C S L L H G S * V G A
 TAG TTT CCG TCT GGG TAT GCG ACC TTG GAT TGC TGT TGC ATA TTC AGC
 * F P S G Y A T L D C C C I F S
 TCC TGT TGC AGC TGC TAC CGC TGT TTT CTT GAT CTA CCC AAT TGG TCA
 S C C S C Y R C F L D L P N W S
 AGG AAG TTT TTC TGA TGG TAT GCC TCT AGG AAT TTC TGG TAC TTT CAA
 R K F F * W Y A S R N F W Y F Q
 CTT CAT GAT TGT ATT CCA GGC TGA GCA CAA CGT CCT TAT GCA CCC ATT
 L H D C I P G * A Q R P Y A P I
 TCA CAT GTT AGG CGT AGC TGG TGT ATT CGG CGG CTC CCT ATT CAG CGC
 S H V R R S W C I R R L P I Q R
 TAT GCA TGG TTC CTT GGT AAC TTC TAG TTT GAT CAG GGA AAC CAC AGA
 Y A W F L G N F * F D Q G N H R
 AAA TGA ATC TGC TAA TGC AGG TTA CAG ATT CGG TCA AGA GGA AGA AAC

K * I C * C R L Q I R S R G R N
TTA TTA TAT CGT AGC CGC TCA TGG TTA TTT TTG GCC GAT TAT TCT TCA ATA
L L Y R S R S W L F L A D Y S S I
TGC TAG TTT CAA CAA CTC TCG GTC GGT ACA CTT CTT CCT AGC TGC CTT
C * F Q Q L S V G T L L P S C L
GCC TGT AGA AAG TAT CTG GTT CAC GGC TTA AGG ATC AAC A
A C R K Y L V H G L R I N

C59

GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTG ACA AGC
 D H A Y R C R L F F F F F L T S
 CTT CCA TTT TCT ATT TCG ATT TAT ATT ATA GAA AAT TAG TGT GCT TGG
 L P F S I S I Y I I E N * C A W
 GAG TCC CTG ATG ATT AAA TAA ACC AAG ATT TTA CCA TGA CTG CAA TTT
 E S L M I K * T K I L P * L Q F
 TAG AGA GAC GCG AAA GCG AAA GCC TAT GGG GTC GCT TCT GTA ACT GGA
 * R D A K A K A Y G V A S V T G
 TAA CCA GCA CCG AAA ACC GTC TTT ACA TTG GAT GGT TTG GTG TTT TGA
 * P A P K T V F T L D G L V F *
 TGA TCC CTA CCT TAT TGA CCG CAA CTT CTG TAT TTA TTA TTG CCT TCA TTG
 * S L P Y * P Q L L Y L L L L P S L
 CTG CTC CTC CAG TAG ATA TTG ATG GTA TTC GTG AAC CTG TTT CTG GAC
 L L L Q * I L M V F V N L F L D
 CTC TAC TTT ACG GAA ACA ATA TTA TCT CAG GTG CCA TTA TTC CTA CTT
 L Y F T E T I L S Q V P L F L L
 CTG CAG CTA TAG GTT TGC ACT TTT ACC CAA TCT GGG AAG CGG CAT CCG
 L Q L * V C T F T Q S G K R H P
 TTG ATG AAT GGT TAT ACA ACG GGG GTC CTT ATG AAC TAA TTG TTC TAC
 L M N G Y T T G V L M N * L F Y
 ACT TCT TAC TTG GTG TAG CTT GTT ACA TGG GTC GTG AGT GGG AGC TTA
 T S Y L V * L V T W V V S G S L
 GTT TCC GTC TGG GTA TGC GAC CTT GGA TTG CTG TTG CAT ATT CAG CTC
 V S V W V C D L G L L L H I Q L

CTG TTG CAG CTG CTA CCG CTG TTT TCT TGA TCT ACC CAA TTG GTC AAG
L L Q L L P L F S * S T Q L V K
GAA GTT TTT CTG ATG GTA TGC CTC TAG GAA TTT CTG GTA CTT TCA ACT
E V F L M V C L * E F L V L S T
TCA TGA TTG TAT TCC AGG CTG AGC ACA ACA TCC TTA TGC ACC CAT TTC
S * L Y S R L S T T S L C T H F
ACA TGT TAA GCG TAG CTG GGG TAT TCA GCG GCT CCC TAT TCA GCG CTA
T C * A * L G Y S A A P Y S A L
TGC CTG GTT CCT TGA TAA ACT CCA GTT TGA TCA GGG AAA ACC CAA AAA
C L V P * * T P V * S G K T Q K
ATG AAT CTG CTA ATG CAG GTT ACA GAT TCC GGT CAA AAG GAA AAA CTT
M N L L M Q V T D S G Q K E K L
TAT ATA AC
Y I T

C510

GAG AAA AAT AAG AAT AAA TGG TGT GAC TAG TAC GCC CGA CGT GTC TCT
 E K N K N K W C D * Y A R R V S
 TCT CTC GCG ACT TGT CCC CGT ACC ACA TCG TAG CTT GTG TAA CCC TCC
 S L A T C P R T T S * L V * P S
 CCC TTT CTT TTT ACC TCT TAG GTA TAG CTC TGA TTG TGG TCG CCG AAT CTA
 P F L F T S * V * L * L W S P N L
 TTC TCT TTC AAA TAA AAG TGG TAG CAT GTT GTT GTT ATC TGG CGG AGG
 F S F K * K W * H V V V I W R R
 TCA GAC TTG TCC CAC CAA ATT TCT CAT TCA CCT GTT TTT TCT TAT CAG CCT
 S D L S H Q I S H S P V F S Y Q P
 ACC ACA TAC ATC GAT AAA CCC ATC GTG GAT CTA CTT CTT ATT GCT TGT
 T T Y I D K P I V D L L L I A C
 GAG TAT GTC CCC GAA CCA CAT AAC TGT TCT CTG AAA CTT ATC GAT GGA
 E Y V P E P H N C S L K L I D G
 TAT GCG CGT AGT GTC GTA TGC ACA CAT ACC CTC TAT ATT ATC CGC GAA
 Y A R S V V C T H T L Y I I R E
 TCC TTC GCG ATT CGA CAT ATA CGC CAT CTG CTT CAG CTG ACT CGC GCT
 S F A I R H I R H L L Q L T R A
 TAT TGC ATA CAA TCT GTA GAG GAA CTC TAC CGA GCA ACC CTC TGC ATC
 Y C I Q S V E E L Y R A T L C I
 TCC GCT ATT CTT GCT CCA CCG CGC TTA ATC AAG TGT TAA TTA TAG AGA
 S A I L A P P R L I K C * L * R

GTG CTC AGA GCT ATC TAT TAA TCT TCA TCC TTG TCT GTT CAG CAG TAG
 V L R A I Y * S S S L S V Q Q *
 TGT ATC CTT AAT ACT AAA AAT CGC GCG CAA CAA CTA GCT AGG GTA AGA
 C I L N T K N R A Q Q L A R V R
 TCA CCA ACA GGC CAT TCT CGT TGC TGC AAG CTC ACC TCC TGC AAA TAA
 S P T G H S R C C K L T S C K *
 AGT TCG TTA TTA TCG CCC TTT GTA CAA AGC GAC GGA TTT TTG ACC ATC
 S S L L S P F V Q S D G F L T I
 CTT ATG CTT CCG AGA CCT TTC GAA ACC GAT TGT AAT CTC TTA AAA TAT
 L M L P R P F E T D C N L L K Y
 AAG CTT ACG CAC TGA GAT TTG GCC CTC CCC CCT TTA CAA AAA AAC AAG
 K L T H * D L A L P P L Q K N K
 ATC ACA CTA CTC CAA ACT CCT TTT TTT TTC TAT GAG ACC CCT CCA CAT
 I T L L Q T P F F F Y E T P P H
 CAG AAC CTC AGA AAA CCA ATC TTA AGA TTA AAT ATA GAA CTC CCC TCA
 Q N L R K P I L R L N I E L P S
 CCC TAA AGG TGG ATC CAA GAG ATA CTC CCA ATT GAT AAT AAC TCT CCA
 P * R W I Q E I L P I D N N S P

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 05.04.1981

Doğum yeri İstanbul

Lise 1994-1999 Kenan Evren Anadolu Lisesi

Lisans 1999-2004 Ege Üniversitesi Fen Fak.
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2005-2009 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Çalıştığı kurum(lar)

2007-2009 Yıldız Teknik Üniversitesi Asistan Öğrenci