

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ZEYTİN cDNA KÜTÜPHANELERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU ve ÖNEMLİ GENLERİN TESPİTİ**

DOKTORA TEZİ

ÖZNUR SUAKAR

BALIKESİR, EYLÜL - 2012

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ZEYTİN cDNA KÜTÜPHANELERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU ve ÖNEMLİ GENLERİN TESPİTİ**

DOKTORA TEZİ

ÖZNUR SUAKAR

BALIKESİR, EYLÜL - 2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Öznur SUAKAR tarafından hazırlanan “ZEYTİN cDNA KÜTÜPHANELERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU ve ÖNEMLİ GENLERİN TESPİTİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28.08.2012 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç Dr. Ekrem DÜNDAR

.....

Uye

Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

.....

Üye

Doç. Dr. Selma SİNAN

.....

Üye

Doç. Dr. Turgay ÜNVER

.....

Üye

Yard. Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA

.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 106O616 ve 110O108 numaralı projeler ile ve Balıkesir Üniversitesi tarafından 2012 / 41 numaralı proje ile desteklenmiştir

ÖZET

**ZEYTİN CDNA KÜTÜPHANELERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE ÖNEMLİ GENLERİN TESPİTİ
DOKTORA TEZİ
ÖZNUR SUAKAR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. EKREM DÜNDAR)

BALIKESİR, EYLÜL - 2012

Bu çalışmada zeytin (*Olea europaea* L.) periyodisitesinin moleküler düzeyde aydınlatılmasına yardımcı olacak aday genlerin tespit edilmesine altyapı oluşturacak cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur. Bu amaçla Temmuz “var yılı”, Temmuz “yok yılı”, Kasım “var yılı”, ve Kasım “yok yılı” yaprakları ve Ekim meyve örnekleri kullanıldı. Herbir kütüphaneden rastgele 100 koloni seçilerek insert nükleotit dizileri ve homoloji analizleri yapıldı. Genomik DNA kütüphanesi verileri ile zeytin genomu hakkında bazı ipuçları elde edildi. cDNA kütüphaneleri verileri ile her gelişme dönemine özgü ve meyveye özgü cDNA molekülleri tespit edildi ve iki farklı döneme ait birçok aday gen bulundu. Kütüphanelerden elde edilen önemli genlerden dehidrin seçilerek moleküler, biyokimyasal ve biyoinformatik karakterizasyonu yapıldı. Dehidrin geninin 118 nükleotitlik intron bölgesi ve 699 nükleotitlik aday promotör bölgesi tespit edildi. 28 kDa’luk proteininin laktat dehidrogenaz (LDH) ile donmayı geciktirme aktivitesi, ve mRNA’sının Temmuz ve Kasım ayı “var - yok” yılları yapraklarında ve sürgün, tomurcuk, pedisel gibi zeytinin diğer organlarında ekspresyon profili belirlendi. Anlık gösterimli (real-time) PCR ile dehidrin geninin tek kopyalı olma ihtimalinin yüksek olduğu tespit edildi. 27 zeytin çeşidinde polimorfizm analizi yapıldı ancak çeşit ayrımında kullanılacak kadar polimorfik olmadığı belirlendi. Biyoinformatik analizler sonucunda zeytin dehidrin geninin Y₂SK₂ segmetine sahip olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELER: zeytin, *Olea europaea* L., cDNA kütüphaneleri, dehidrin, D11

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERISATION OF OLIVE cDNA LIBRARIES AND DETERMINATION OF IMPORTANT GENES

PH.D THESIS

OZNUR SUAKAR

**BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. EKREM DUNDAR)

BALIKESİR, SEPTEMBER 2012

In this study, one genomic DNA (gDNA) library and 5 cDNA libraries from Ayvalik (leaves and fruits) were constructed for isolating candidate genes that can help enlightening the molecular mechanism of alternate bearing in olive (*Olea europaea* L.). For this purpose, cDNA libraries from olive leaves in July (“on” and “off year”) and in November (“on” and “off year”) and one fruit library (in October “on year”) were constructed and randomly selected 100 positive clones from each library were analysed with respect to homology and insert size / sequence information. Additionally, a genomic DNA library was also constructed and analysed the same way, to obtain some insights about the general structure and gene density of the olive genome. The analysis of the results revealed a 118 nucleotides long intron, and 699 nucleotides long of the putative promoter region of olive dehydrin. Cryoprotective activity of 28 kDa dehydrin through lactate dehydrogenase (LDH) activity, and expression profile of its mRNA were determined. Real-time PCR analysis predicted dehydrin is probably represented with one copy in the genome. Polymorphism analysis including 27 olive cultivars revealed multiple SNPs although the SNPs were not abundant enough to utilize dehydrin as a genetic marker for cultivar identification. Bioinformatic analysis showed that dehydrin has Y₂SK₂ segment.

KEYWORDS: olive, *Olea europaea* L., cDNA libraries, dehydrin, D11

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
ÖNSÖZ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	17
1.1 Zeytin Ağacının Gelişimi	20
1.2 Periyodisite	21
1.2.1 Periyodisiteye Çeşitli Uygulamaların Etkileri.....	23
1.2.1.1 Ürün Miktarı ve Ağaç Gelişiminin Etkileri	23
1.2.1.2 Hormonların Etkileri	24
1.2.1.3 Vejetatif Büyüme Ve Meyve Oluşumunun Etkileri.....	27
1.2.1.4 İklimin Etkisi	29
1.2.1.5 Karbohidratın Etkisi	30
1.2.1.6 Fizyolojik Gelişimin Etkileri	32
1.2.1.7 Meyve Gelişme Hızının Etkisi	33
1.2.2 Periyodisitenin Zeytin Gelişimine Çeşitli Etkileri	34
1.2.2.1 Periyodisitenin Ürün Yüküne ve Kaliteye Etkileri	34
1.2.3 Periyodisiteyi Dengelemek İçin Geliştirilen Yöntemler.....	36
1.3 LEA Proteinleri	37
1.3.1 LEA Proteinlerinin Görevleri	37
1.3.2 LEA Proteinlerinin Sınıflandırılması	38
1.3.2.1 LEA Proteinlerinin POPP Programına Göre Sınıflandırması	41
1.4 Dehidrinler.....	44
1.4.1 Dehidrinlerin Lokalizasyonu	46
1.4.2 Dehidrinlerin Birikme Koşulları	46
1.4.3 Dehidrinin Korunmuş Dizi Motifleri	47
1.4.4 Dehidrinlerin Sınıflandırılması.....	49
1.4.5 Dehidrin Geni Çalışılan Bitkiler	51
1.4.6 Dehidrinlerin Biyokimyasal Özellikleri.....	52
1.4.7 Post-Translasyonel Modifikasyonlar	54
1.4.8 Dehidrin Gen Sentezi	55
1.4.9 Abiotik Stres Durumlarındaki Fonksiyonları	58
1.4.9.1 Düşük Sıcaklıkta Dehidrinin Rolü	58
1.4.9.2 Su Eksikliğinde Dehidrinin Rolü	59
1.4.9.3 Tuzluluk Durumunda Dehidrinin Rolü	60
1.5 DNA Kütüphaneleri	60
1.5.1 DNA Kütüphanelerinin Oluşturulması	61
1.5.2 Genomik DNA Kütüphanesi	61
1.5.3 cDNA Kütüphanesi	61
1.6 Çalışmanın Amacı.....	62
2. MATERYAL VE METOT	65
2.1 MATERYAL	65
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	65

2.1.2	Çalışmada Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	65
2.1.3	DEPC'li Suyun Hazırlanması	65
2.1.4	Örneklerin Toplanması	66
2.1.5	Kullanılan Bakteri Suşlarının İsimleri ve Genotipleri	68
2.1.6	Çalışmada Kullanılan Tüm Vektörlerin İsimleri ve Şekilleri	69
2.2	METOD	72
2.2.1	Bakteriyel ve Maya ile İlgili Çalışmalar	72
2.2.1.1	Bakteriyel Teknikleri	72
2.2.1.1.1	Antibiyotikler	72
2.2.1.1.2	Bakteriyel Kültür Ortamlarının Hazırlanması	72
2.2.1.1.3	Bakteri Kompetan Hücresinin Hazırlanması	72
2.2.1.1.4	Bakteriyel Transformasyon	73
2.2.1.1.5	Plazmit DNA izolasyonu (Küçük ölçekte- Miniprep)	73
2.2.1.1.6	Plazmit Stoklarının Hazırlanması	74
2.2.1.2	Maya İle İlgili Teknikler	74
2.2.1.2.1	Tamponların Hazırlanması	74
2.2.1.2.2	Maya Kompetan Hücresinin Hazırlanması	74
2.2.1.2.3	Mayaya Transformasyon	75
2.2.1.2.4	Plazmit DNA izolasyonu (Büyük ölçekte – Maksiprep)	75
2.2.2	DNA İle İlgili Teknikler	76
2.2.2.1	gDNA İzolasyonu ile İlgili Teknikleri	76
2.2.2.1.1	Zeytin gDNA İzolasyonu	76
2.2.2.1.2	Maya gDNA İzolasyonu	77
2.2.2.2	DNA Agaroz Jel Elektroforezi	77
2.2.2.3	gDNA'nın Temizleme Basamakları	78
2.2.2.3.1	Kit ile gDNA Temizleme Aşaması	78
2.2.2.3.2	gDNA'nın İzopropanol İle Saflaştırılması	78
2.2.2.3.3	gDNA'nın Etanol ile Saflaştırılması	78
2.2.2.3.4	Genome Walker İçin gDNA Saflaştırılması	79
2.2.2.3.5	Küt Uçlu Yapma Basamağı	79
2.2.2.4	Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Protokolü	80
2.2.2.4.1	Genome Walker için Kesim Protokolü	80
2.2.2.5	Primer Tasarımı	81
2.2.2.6	Ligasyon	81
2.2.2.7	PCR Basamağı	82
2.2.2.7.1	Koloni PCR	82
2.2.2.7.2	Genome Walker İçin PCR Basamağı	82
2.2.2.7.3	TAIL-PCR Protokolü	83
2.2.2.7.4	TAIL PCR1 Basamağı	83
2.2.2.7.5	TAIL PCR2 Basamağı	83
2.2.2.7.6	TAIL PCR3 Basamağı	84
2.2.2.8	Southern Blot Deneyleri	84
2.2.2.8.1	Radyoaktif Prob ile Yapılan Southern Blot Deneyleri	84
2.2.2.8.2	Radyoaktif prob ile Southern Blot için gDNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	84
2.2.2.8.3	Southern Blot için Gerekli Olan Tamponların Hazırlanması	84
2.2.2.8.4	Southern Blot Düzeneginin Hazırlanması	85
2.2.2.8.5	Probun Jelden Kazanılması ve Miktar Tayini	86

2.2.2.8.6	Proben Hazırlanması	86
2.2.2.8.7	Hibridizasyon	86
2.2.2.8.8	Blotun Yıkama	87
2.2.2.8.9	Filmin Hazırlanması	87
2.2.2.8.10	Non-Radyoaktif Prob ile Southern Blot Deneyleri.....	87
2.2.2.8.11	Radyoaktif olmayan prob ile Southern Blot için gDNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi.....	87
2.2.2.8.12	Proben Hazırlanması	87
2.2.2.8.13	Hibridizasyon Basamağı	88
2.2.2.8.14	Yıkama Basamağı	89
2.2.2.8.15	Tamponların Hazırlanması	89
2.2.2.9	Anlık Gösterimli PCR ile Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi	90
2.2.2.9.1	Anlık Gösterimli PCR Basamağı.....	90
2.2.3	RNA İle İlgili Teknikler	90
2.2.3.1	Total RNA İzolasyonu	90
2.2.3.2	RNA Örneklerinin DNase I İle Muamele Edilmesi	91
2.2.3.3	cDNA Eldesi.....	91
2.2.3.4	cDNA Moleküllerinin İkinci Zincirlerinin Eldesi.....	92
2.2.3.5	Saf Çift Zincirli cDNA	92
	(Double stranded cDNA = dscDNA) Eldesi	92
2.2.3.6	Anlık Gösterimli PCR Protokolü	92
2.2.3.6.1	Anlık Gösterimli PCR için Standart Çalışması.....	92
2.2.4	Fonksiyonel Analiz İle İlgili Teknikler.....	93
2.2.4.1	Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi	93
2.2.4.2	Hücrelerin Yıkama	93
2.2.4.3	Hücrelerin Liziz Edilmesi (Parçalanması).....	93
2.2.4.4	Proteininin Karakterizasyonu	94
2.2.4.4.1	Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	94
2.2.4.4.2	SDS PAGE Jelinde Örneklerin Yürütülmesi	95
2.2.4.4.3	Western Blot Basamağı.....	96
2.2.4.4.4	Antikoru Hazırlanması ve Proteinlerin Belirlenmesi	97
2.2.4.4.5	Protein Saflaştırma Basamağı	97
2.2.4.4.6	Ni-NTA Kolonundan Geçirmek İçin Liziz Basamağı.....	98
2.2.4.4.7	Ni-NTA Klonundan Geçirme Basamağı	98
2.2.4.4.8	Kryoprotektif Aktivitenin Belirlenmesi	98
2.2.4.5	Dizileme.....	99
3.	BULGULAR.....	100
3.1	gDNA Kütüphanesine Ait Bulgular	102
3.1.1	SSR Dizilerinin Analizi	113
3.2	cDNA Kütüphanelerine Ait Bulgular	116
3.2.1	İnsert kontrolleri	116
3.2.2	Biyoinformatik Analiz	118
3.2.3	Anlık Gösterimli PCR'a Ait Bulgular.....	138
3.2.1	cDNA Gen Kütüphaneleri Klonlarının BLASTGO Analizine Göre Fonksiyonel Olarak Gruplandırılması	144
3.2.1.1	Temmuz "Var" Yılına Ait Klonların Anlık Gösterimli PCR Sonuçları.....	154
3.2.1.2	Temmuz "Yok" Yılına Ait Klonların Anlık Gösterimli PCR Sonuçları.....	156

3.2.1.3	Kasım ‘‘var yılı’’ Klonlarının Anlık Gösterimli PCR Sonuçları.....	158
3.2.2	Kasım ‘‘yok yılı’’ Klonlarının Anlık Gösterimli PCR Sonuçları	160
3.2.2.1	Meyve Kütüphanesine Ait Klonların Anlık Gösterimli PCR Sonuçları	162
3.3	Zeytin Dehidrin Geni İle İlgili Bulgular	167
3.3.1	Genin Yapısına Ait Bulgular	170
3.3.1	Dehidrin Geninin İntron Analizine Ait Bulgular	173
3.3.2	Dehidrin Promotör Analizine Ait Bulgular	176
3.3.3	Dehidrin Geninin Kopya Sayısının Belirlenmesine Ait Bulgular	182
3.3.3.1	Radyoaktif Prob ile Yapılan Southern Blot ile İlgili Bulgular	182
3.3.3.2	Radyoaktif Olmayan Probla Yapılan Southern Blot ile İlgili Bulgular	183
3.3.3.3	Anlık Gösterimli PCR ile Dehidrin Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesine Ait Bulgular	185
3.3.4	Dehidrin Geninin Çeşitler Arasındaki Polimorfizminin Belirlenmesi	187
3.3.5	Dehidrin Geninin Ekspresyonuna Ait Bulgular	190
3.3.6	Dehidrin Geninin Protein Karakterizasyonuna Ait Ekspresyon Analizi Bulguları	193
3.3.6.1	<i>Pichia pastoris</i> ‘ e Vektörü İle Yapılan Çalışmalara ait Bulgular	193
3.3.6.1	<i>E. coli</i> sistemi pLATE51 Vektörü İle Yapılan Çalışmalara ait Bulgular	197
3.3.7	Dehidrin Geninin Fonksiyonel Analizine Ait Bulgular	199
3.3.8	Dehidrin Geninin Kryoprotektif Aktivitesinin Belirlenmesine Ait Bulgular	202
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	204
5.	KAYNAKLAR	233
6.	EKLER.....	287
6.1	EK A Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar	287

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Zeytinin anavatanı ve yayılış yolları [9].....	18
Şekil 1.2: Ilık ve serin iklimlerde zeytin sürgünlerinin yıllık gelişme eğrisi (Zeytin ansiklopedisinden esinlenerek çizilmiştir) [7]	21
Şekil 1.3: Arpa bitkisinde çeşitli dehidrin segmentlerinin gösterilmesi [162, 492]	50
Şekil 1.4: gDNA ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulması	62
Şekil 2.5: pUC19 klonlama vektörü	69
Şekil 2.6: pJET1.2 klonlama vektörü	70
Şekil 2.7 : pBluescript SK klonlama vektörü	70
Şekil 2.8 : pPICZαB klonlama vektörü	71
Şekil 2.9: pLATE51 klonlama vektörü.....	71
Şekil 3.10: Zeytin gen kütüphanelerinin oluşturulması	100
Şekil 3.11: Zeytin gDNA örneğinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	103
Şekil 3.12: Zeytin gDNA kütüphanesine ait klonların <i>Sma</i> I restriksiyon enzimi kesimi ile elde edilen insert kontrolünün agaroz jel görüntüsü	103
Şekil 3.13: Zeytin gDNA kütüphanesi klonlarının GenBankası BLASTn analizi ile elde edilen homoloji sonuçlarına göre insert dizilerinin dağılımı A. Dizilerin fonksiyonel kategoriye göre genel dağılımı B. Dizilerin çekirdek, kloroplast ve mitokondri benzerliklerine göre genel dağılımı.....	113
Şekil 3.14: Oe121 - 136 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü	114
Şekil 3.15: Oe149 - 162 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü	114
Şekil 3.16: Oe138 - 142 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü	115
Şekil 3.17: Oe130 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü	115
Şekil 3.18: Oe131 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü	115
Şekil 3.19: Oe3 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü	115
Şekil 3.20: Temmuz “var yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	116
Şekil 3.21: Temmuz “yok yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	116
Şekil 3.22: Kasım “var yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	117
Şekil 3.23: Kasım “yok yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	117
Şekil 3.24: Meyve kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğüne ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	117
Şekil 3.25: Kütüphanelerden elde edilen kolonilerin insert büyüklükleri	118

Şekil 3.26: Kütüphanelerde ki klonların databanklardan elde edilen EST analizi	131
Şekil 3.27: Temmuz “var yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.....	136
Şekil 3.28: Temmuz “yok yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.....	136
Şekil 3.29: Kasım “var yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.....	137
Şekil 3.30: Meyve kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.....	137
Şekil 3.31: Kasım “yok yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.....	138
Şekil 3.32: Kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların benzerlik gösterdiği bitkilerin dağılımı	144
Şekil 3.33: Kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların biyolojik proses kategorisindeki dağılımı	145
Şekil 3.34: Kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların fonksiyonel proses kategorisindeki dağılımı	146
Şekil 3.35: Kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların moleküler proses kategorisindeki dağılımı	147
Şekil 3.36: Zeytinden total RNA örneğinin agaroz jel görüntüsü.	151
Şekil 3.37: Anlık gösterimli PCR için standart çalışması	153
Şekil 3.38: Temmuz “var yılı” 45 ve 46 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	154
Şekil 3.39: Temmuz “var yılı” 111 - 148 ve 124 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	154
Şekil 3.40: Temmuz “var yılı” 126 ve 153 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	155
Şekil 3.41: Temmuz “var yılı” 154 - 160 ve 178 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	155
Şekil 3.42: Temmuz “yok yılı” 1 ve 2 - 62 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	156
Şekil 3.43: Temmuz “yok yılı” 4 ve 32 - 87 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	156
Şekil 3.44: Temmuz “yok yılı” 42 – 82 ve 56 - 65 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri.....	157
Şekil 3.45: Temmuz “yok yılı” 79 ve 92 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	157
Şekil 3.46: Temmuz “yok yılı” 96 numaralı klona ait anlık gösterimli PCR grafiği	157
Şekil 3.47: Kasım “var yılı” 5 – 11 ve 3 – 96 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	158
Şekil 3.48: Kasım “var yılı” 8 ve 17 – 90 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	158
Şekil 3.49: Kasım “var yılı” 69 – 99 ve 9 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	159
Şekil 3.50: Kasım “var yılı” 22 ve 41 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	159
Şekil 3.51: Kasım “var yılı” 58 ve 60 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	159

Şekil 3.52: Kasım “var yılı” 95 numaralı klona ait anlık gösterimli PCR grafiği.....	160
Şekil 3.53: Kasım “yok yılı” 14 - 36 ve 91 – 97 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	160
Şekil 3.54: Kasım “yok yılı” 23 ve 24 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	161
Şekil 3.55: Kasım “yok yılı” 29 ve 31 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	161
Şekil 3.56: Kasım “yok yılı” 59 numaralı klonuna ait anlık gösterimli PCR grafiği	161
Şekil 3.57: Meyve kütüphanesi 4 – 22 ve 13 – 17 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri.....	162
Şekil 3.58: Meyve kütüphanesi 10 ve 12 - 20 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri	162
Şekil 3.59: Meyve kütüphanesi 51 numaralı klonuna ait anlık gösterimli PCR grafiği	163
Şekil 3.60: Bütün kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların Temmuz “var yılı” ve Temmuz “yok yılı” yapraklarındaki miktarlarının anlık gösterimli PCR grafiği	164
Şekil 3.61: Bütün kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların Kasım “var yılı” ve Kasım “yok yılı” yapraklarındaki miktarlarının anlık gösterimli PCR grafiği	165
Şekil 3.62: Bütün kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların meyvedeki miktarlarının anlık gösterimli PCR grafiği	166
Şekil 3.63: Zeytin dehidrin genine ait amino asit dizisi [421]	171
Şekil 3.64: Dehidrin proteininin amino asit kompozisyonu.....	171
Şekil 3.65: Dehidrin geninin NCBI korunmuş domain analizi [421].....	171
Şekil 3.66: Dehidrin KYTE – Doolittle hidrofobosity analizi [421]	172
Şekil 3.67: Dehidrin izoelektrik nokta analizi [421]	172
Şekil 3.68: Dehidrin Y, S ve K segmentlerinin gösterilmesi	172
Şekil 3.69: Bazı bitkilerde ve zeytinde korunmuş S, Φ ve K segmentlerin gösterilmesi	173
Şekil 3.70: Farklı metot ile izole edilmiş DNA örnekleri ile Dehidrin primerlerine ait PCR görüntüsü	174
Şekil 3.71: Ayvalık çeşidine ait gDNA ve cDNA kalıpları ile yapılan PCR sonucu.....	174
Şekil 3.72: Dehidrin genomik dizisinde intron bölgesinin yeri.	175
Şekil 3.73: Dehidrin geninin intron bölgesi, promotör bölgesi ve (Y, S, K) segmentlerinin gösterilmesi	176
Şekil 3.74: Farklı methodlarla pürifiye edilen DNA örnekleri	177
Şekil 3.75: Farklı methodlarla pürifiye edilen gDNA örneğinin <i>DraI</i> restriksiyon enzimi ile kesim sonucu	178
Şekil 3.76: Farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş örneklerin jel de yürütülmesi.....	178
Şekil 3.77: Genome walker jel görüntüsü	179
Şekil 3.78: Genome walker PCR1 kalıbı kullanılarak yapılan TAIL PCR sonucu.....	179
Şekil 3.79: Dehidrin 2. Set primerler ile TAIL PCR1 sonucu	180
Şekil 3.80: Dehidrin 2. Set primerler ile TAIL PCR2 ve 3 sonucu	180

Şekil 3.81: Dehidrin promotör bölgesinin ve önemli korunmuş dizilerin gösterilmesi	181
Şekil 3.82: A:Dehidrin geninin <i>EcoRI</i> (1) ve <i>EcoRV</i> (2) enzimleri ile kesilmiş jel görüntüsü. B: Southern blot için hazırlanan transfer düzeneği.	182
Şekil 3.83: Dehidrin prob primerleri ile yapılan PCR sonucu	183
Şekil 3.84: DIG ile işaretlenmiş dehidrin probu ile yapılan PCR sonucu	183
Şekil 3.85: Plazmit kalıp olarak kullanılarak yapıldan Southern blot denemesi.....	184
Şekil 3.86: gDNA örneğinin <i>EcoRI</i> (1) ve <i>HindIII</i> (2) restriksiyon enzimleri ile kesim ve dehidrin Southern blot sonucu	184
Şekil 3.87: Dehidrin geninin anlık gösterimli PCR ile kopya sayısını gösteren grafik.....	186
Şekil 3.88: Dehidrin geninin anlık gösterimli PCR ile genomik kopya sayısını gösteren cihaz grafiği	186
Şekil 3.89: Zeytin çeşitleri arasındaki delesyon bölgesinin aminoasit dizilerinde gösterilmesi	187
Şekil 3.90: Zeytin çeşitleri arasındaki delesyon bölgesinin nükleotid dizilerinde gösterilmesi	188
Şekil 3.91: İzmir sofralık zeytin çeşidinde delesyon bölgesinin gösterilmesi	188
Şekil 3.92: 27 zeytin çeşidine ait polimorfizm analizini gösteren dendrogram	189
Şekil 3.93: Dehidrin geninin original anlık gösterimli PCR grafiği	190
Şekil 3.3.94: Dehidrin genine ait melting curve grafiği	191
Şekil 3.95: : Zeytin dehidrin geninin 5 farklı dokudan yapılan anlık gösterimli PCR grafiği.....	191
Şekil 3.96: Zeytin dehidrin geninin 8 farklı dokudan yapılan anlık gösterimli PCR grafiği.....	192
Şekil 3.97: Zeytin dehidrin geninin “var” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PCR grafiği.....	192
Şekil 3.98: Zeytin dehidrin mRNA’sının “yok” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PCR ile tespit edilen sentez miktarları	193
Şekil 3.99: PCR sonucu ve ligasyon için miktar tayinine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	194
Şekil 3.100: Koloni PCR sonucunun ve 1 numaralı plazmitin %0.8’lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	194
Şekil 3.101: <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pPICZαB vektörü ve 1 numaralı koloninin jel görüntüsü.	195
Şekil 3.102: pPICZαB vektörü ve dehidrinin <i>EcoRI</i> ve <i>XbaI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen ürünlerin jelden geri kazanılmış agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	195
Şekil 3.103: Plazmitlerin AOX primerleri ile Koloni PCR görüntüsü	196
Şekil 3.104: Maksiprep yapılmış dehidrin, linerize olan ve olmayan dehidrin, maya transformasyon sonucu elde edilen petri görüntüsü.....	196
Şekil 3.105: pLATE51 vektörü klonlama bölgesi içeren primerler ile yapılan PCR sonucu.....	197
Şekil 3.106: pLATE51 kontrol primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu	198

Şekil 3.107: Koloni PCR sonucunda pozitif çıkan plazmitlere ait jel görüntüsü	198
Şekil 3.108: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafiği.....	199
Şekil 3.109: İndüklenmemiş (dehidrin içeren ve içermeyen) hücrelerden elde edilen proteinlere ait SDS PAGE görüntüsü.....	201
Şekil 3.110: İndüklenmiş (dehidrin içeren ve içermeyen) hücrelere ait SDS PAGE görüntüsü	201
Şekil 3.111: Dehidrin içeren hücrelerin SDS-PAGE jeliyle yapılan Western blot görüntüsü	202
Şekil 3.112: Dehidrin kryoprotektif aktivitesini gösteren grafik	203

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: 1998 - 1999, 1999 - 2000 yıllarında “var” ve “yok” yıllarında ki ürün verimi.....	35
Tablo 1.2: Farklı LEA proteinlerinin farklı isimlendirilmesi [139, 224].	43
Tablo 2.3: Farklı metotlarla pürifiye edilmiş gDNA örneklerinin DraI enzimi ile kesim protokolü	80
Tablo 2.4: Proben PCR DIG probe synthesis kit ile işaretleme protokolü	88
Tablo 2.5: Kriyoprotektif için örneklemelerin gösterilmesi	99
Tablo 3.6: Genomik DNA kütüphanesine ait klonların homoloji analizleri ve NCBI BLASTn ve BLASTx kayıtları	105
Tablo 3.7: BLASTn ve BLASTx programlarının tekrarsız (nr) veritabanlarına göre hiçbir dizi kaydına benzerlik göstermeyen genomik DNA dizileri. BLASTn ve BLASTx programlarının nr dışındaki veritabanlarına ilaveten farklı biyoinformatik araçlarla yapılan analiz sonuçları	108
Tablo 3.8: SSR deneyleri için kullanılan primerler.....	113
Tablo 3.9: Temmuz “var yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi	119
Tablo 3.10: Temmuz “yok yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi	121
Tablo 3.11: Kasım “var yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi	123
Tablo 3.12: Kasım “yok yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi	127
Tablo 3.13: Meyve kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi	129
Tablo 3.14: Temmuz “var yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi	132
Tablo 3.15: Temmuz “yok yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi	133
Tablo 3.16: Kasım “var yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi	134
Tablo 3.17: Kasım “yok yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi	135
Tablo 3.18: Meyve kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi.....	135
Tablo 3.19: Anlık gösterimli PCR da kullanılan TV kütüphanesine ait primerler	139
Tablo 3.20: Anlık gösterimli PCR da kullanılan TY kütüphanesine ait primerler	140

Tablo 3.21: Anlık gösterimli PCR da kullanılan KV kütüphanesine ait primerler	141
Tablo 3.22: Anlık gösterimli PCR da kullanılan KY kütüphanesine ait primerler	142
Tablo 3.23: Anlık gösterimli PCR da kullanılan MK kütüphanesine ait primerler	143
Tablo 3.24: Anlık gösterimli PCR da kullanılan kontrol primerleri	143
Tablo 3.25: Bütün kütüphanelerin istatistiki değerleri ve karşılaştırılması	148
Tablo 3.26: Kütüphanelerdeki klonların homoloji gösterdiği bitkilerin isimleri ve istatistikleri	149
Tablo 3.27: Kütüphane klonlarının NCBI BLASTn analizinde zeytin kayıtlarına olan benzerlikleri	150
Tablo 3.28: Anlık gösterimli PCR için kullanılan standartların seyreltme oranları.....	152
Tablo 3.29: Dehidrin için kullanılan tüm primerler	168
Tablo 3.30: Zeytin dehidrin geninin genel bilgileri	170
Tablo 3.31: Genome walker için AP primerleri	177
Tablo 3.32: TAIL PCR’da kullanılan AD primerleri	177
Tablo 3.33: Anlık gösterimli PCR’da kullanılan kontrol primerleri ve dizileri.....	185
Tablo 3.34: Lowry yöntemi ile dehidrin taşıyan ve taşımayan (kontrol) hücrelerden elde edilen proteininin miktarları	200

KISALTMALAR LİSTESİ

ABA	:	Absisik asit
AP	:	Arbitrary primer
AD	:	Arbitrary degenerate
bp	:	base pair (baz çifti)
BLAST	:	Basic local alignment search tool
BSA	:	Bovin serum albumin
Ct	:	Cycle treshold
cDNA	:	Complementary DNA (Komplementer DNA)
CHA	:	Klorojenik asit
dNTP	:	Dinükleotit trifosfat
DHN	:	Dehidrin
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DEPC	:	Diethylpyrocarbonate
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	:	Ethylene glycol tetraacetic acid
EST	:	Expressed sequence tags
GPDH	:	Gliserol-3fosfat dehidrogenaz
gDNA	:	Genomik DNA
kDa	:	Kilo dalton
KV	:	Kasım var
KY	:	Kasım yok
IAA	:	Indol asetik asit
IPTG	:	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	:	Luria broth
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
LEA	:	Late embryogenesis abundant

MGY	:	Mannitol-glutamate-yeast
MK	:	Meyve kütüphanesi
NAA	:	Naftalen asetik asit
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCBI	:	National center of biotechnology information
ORF	:	Open reading frame (Açık okuma çerçevesi)
PCR	:	Polymerase chain reaction
RNA	:	Ribonükleik asit
SSC	:	Sodyum sitrat
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi
SSR	:	Simple sequence repeat
TV	:	Temmuz var
TY	:	Temmuz yok
TE	:	Tris-EDTA
UV	:	Ultra-viyole
TAIL	:	Thermal Asymmetric Interlaced
TAE	:	Tris asetik asit
TBE	:	Tris borik asit
YPDS	:	Yeast Extract Peptone Dextrose Medium
YNB	:	Yeast Nitrogen Base

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel bölümünün bir kısmı Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji laboratuvarında, ikinci kısmı ise Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır. Tez çalışmalarım Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR danışmanlığında yürütülmüş ve sonuçlanmıştır.

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her zaman destekleyen, sabırla dinleyerek yardımcı olan çok değerli hocam Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan ve her zaman desteğini, şefkatini ve yardımlarını hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Feray KÖÇKAR'a ve değerli fikirlerini paylaşan Yard. Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA'ya çok teşekkür ederim.

Laboratuvarımızı paylaştığımız sayın hocam Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a ve komşu laboratuvarımızda bizi yalnız bırakmayan Doç. Dr. Selma Sinan'a çok teşekkür ederim. Ayrıca İngiltere'deki laboratuvarına beni davet eden ve destekleyen Dr. Hilary J. Rogers ve çalışma grubunda bulunan değerli arkadaşlarıma ve Osman Öztürk'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar da tüm günümüzü birlikte geçirdiğimiz, her türlü sıkıntıyı ve neşeyi paylaştığımız kader arkadaşım Araş. Gör. Görkem DENİZ SÖNMEZ'e ve laboratuvarı paylaştığım değerli arkadaşlarım Şakir AKGÜN, Gülçin ÇETİN, Tuğba ÇAKMAK ve komşu laboratuvarımızda çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

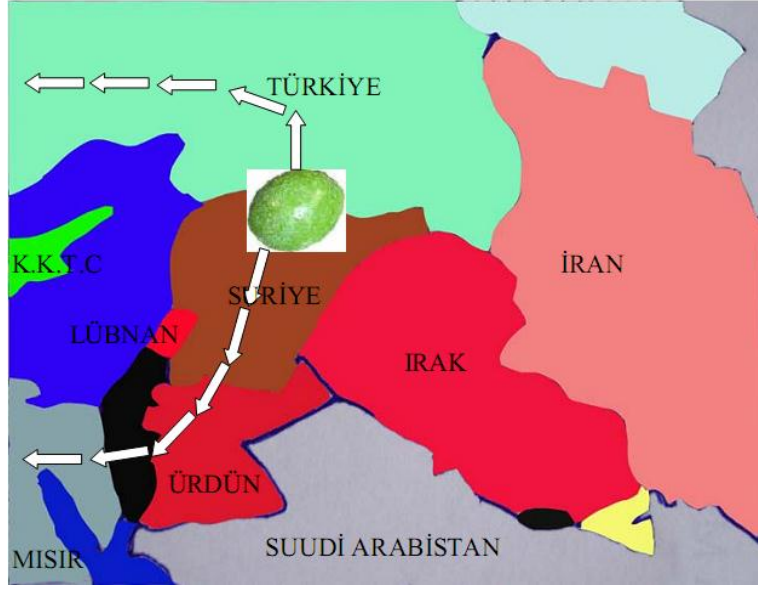
Hayatımın her aşamasında bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen ve her zaman sabır gösteren canım annem Dilber SUAKAR'a, babam Adnan SUAKAR'a ve neşe kaynağım canım kardeşim Özden SUAKAR'a çok teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Ekonomik değerinden, besin değeri yüksek yağ kaynağı olmasından ve ağaç olarak dayanıklı olup, uzun yıllar meyve vermesinden dolayı zeytin (*Olea europaea* L.) önemli bir ağaçtır [1]. Zeytin, kuru iklime uyumlu, su eksikliğine [2, 3] ve tuzlu topraklara toleranslı bir bitkidir [4, 5]. Yağ üretimi için önemli olan zeytinin varoluşu antik uygarlıklara dayanırken; Yunanca ‘elaia’ dan gelen zeytinin Latincesi olea’nın etimolojik kökeni yağdır ve birçok Avrupa dilinde aynı anlamda kullanılmaktadır [6].

Zeytin ağacının yaprakları birçok dönemde, zafer, akıl ve barış simgesi olarak kullanılmıştır ve Nuh’un gemisine ağzında bir zeytin dalı ile geri dönen güvercin büyük sel felaketinin sona erdiğine dair bir işaret sayılmıştır. Ayrıca tarihte kralların asası, din adamlarının kutsal yağı, barışın ve onurun simgesi olmuştur. İlk Yunan ve Roma yazıtlarında dahi zeytinin barış ve birlikteliğin simgesi olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır [7].

Zeytin ağacına ilişkin mevcut en eski veri Ege Denizindeki Santorini Adası’nda yapılan arkeolojik çalışmalarda ortaya çıkarılan 39 yıllık zeytin fosilleridir. Kuzey Afrika’daki Sahra Bölgesinde gerçekleştirilen arkeolojik araştırmalarda ise M.Ö.12 bin yıllarına ait zeytin ağacı fosillerine rastlanılmıştır. Tarihte zeytinyağına ilişkin en belirgin izler ise M.Ö.4500 yıllarında ve Akdeniz’deki Girit Medeniyeti’nde görülmektedir [8]. Bu izler bir anlamda zeytinciliğin M.Ö.4000’li yıllarda Mezopotamya olarak adlandırılan ve Gaziantep, Mardin, Kahramanmaraş üçgeninin yer aldığı bölgelerde kültüre alındığını da doğrulamaktadır. Zeytine ait fosiller aynı zamanda İtalya’da Mongardino’da Pliyosen devrine ait kalıntılarda, Kuzey Afrika’da Relilay’da salyangozların beslendiği yerlerde üst Paleolitik döneme ait katmanlarda ve İspanya’da Eneolitik ve Bronz devrine ait kalıntılarda tespit edilmiştir [7].



Şekil 1.1: Zeytinin anavatanı ve yayılış yolları [9]

Zeytinin anavatanı Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'dır. Zeytinin yayılışı Şekil 1.1'de görüldüğü gibi iki koldan olmuştur. Birincisi Mısır üzerinden Tunus ve Fas'a, diğeri ise Anadolu boyunca Ege Adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya doğrudur. [9]. Zeytin, dünyada Akdeniz havzasında yer alan ve Akdeniz iklim özelliklerini gösteren 25 ülkede ekonomik anlamda tarımı yapılan bir meyvedir [10, 11]. Türkiye'de ise 800.000 hektar alanın üzerinde zeytin alanı ve 90 milyonu aşan zeytin ağacı mevcuttur; bu ağaçların %67'si batı Anadolu'da yer almaktadır [12] ve Türkiye'de yetişen toplam 100 kadar zeytin çeşidi bulunmaktadır [13].

Zeytin ülkemiz için ekonomik olarak önemli bir gelir kaynağı olmasıyla birlikte, Türkiye zeytinyağı üretim ve ihracatı ile dünya zeytinyağı piyasasında beşinci sırada yer almakta ve 70 farklı ülkeye zeytin ihraç etmektedir [14]. Türkiye'nin toplam zeytinyağı üretiminin yaklaşık %75 - 80'i Ege bölgesinde olup, bu üretimin yaklaşık %76'sı yağlık olarak değerlendirilmektedir [15]. Türkiye, dünya zeytin alanının %9'una, ağaç varlığının %17'sine, dane zeytin üretiminin %8'ine, zeytinyağı üretiminin %5'ine ve sofralık zeytin üretiminin %14'üne sahiptir [16]. Aynı zamanda üretilen dane zeytin değeri, zeytin ve diğer sert kabuklu meyveler

üretiminin %32'sini, zeytin üretimi yapılan alanlar ise işlenen toplam tarım alanlarının %4'ünü oluşturmaktadır [17].

Zeytin meyvesi çeşitli şekillerde işlenmek suretiyle tüketilmektedir. Bu işlemler, salamuraya yatırmak, acılığın fermentasyon yoluyla giderilmesi veya kimyasal bileşiklerle tatlandırma olarak sıralanabilir. İnsanlar bu bitkinin odunu ve meyvelerinin yanı sıra, yağından kozmetik sanayisinde ve tıp alanında yüzyıllardır faydalanmışlardır [7].

Sınıflandırma sistemine göre zeytin, 20 - 29 cinse sahip olan *Oleaceae* familyası üyesidir [18, 19]. *Olea* cinsi, çoğunlukla güç yetiştirme şartlarına sahip sahalardan çıkan çeşitli tür ve alt türleri içermektedir [20]. Bunların çoğu çalılar veya ağaçlar olmakla birlikte yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytinin de dahil olduğu *Olea europaea* L.'dir. Zeytinin sınıflandırması aşağıdaki şekildedir [20];

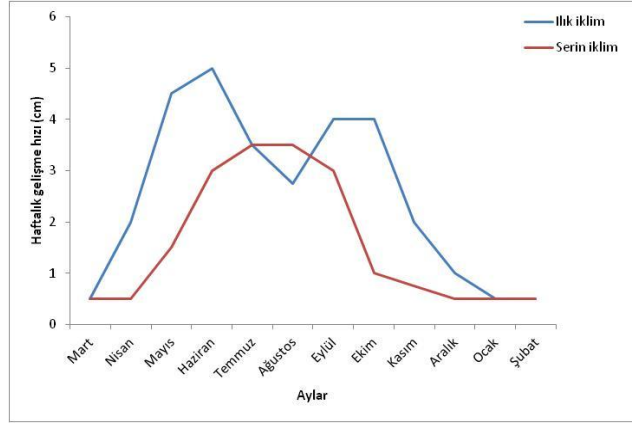
Alem	:	Yeşil bitkiler
Alt alem	:	Tracheobionata
Superdivision	:	Spermatophyta
Division	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Altsınıf	:	Asteridae
Ordo	:	Lamiales
Aile	:	Oleacea
Cins	:	<i>Olea</i>
Tür	:	<i>Olea europaea</i>

1.1 Zeytin Ağacının Gelişimi

Akdeniz havzasının doğu kısmından çıkan kültür zeytini [21] bu bölgedeki subtropik iklimin uzun ve sıcak yaz mevsimine uyum sağlamıştır [22]. Zeytinin yüksek yaşama gücü özel yaprak anatomisi, sektöriyel sürgün - kök sistemlerinin çevreye uyumu ve yüksek morfogenetik yenilenme potansiyeli gibi morfolojik özelliklerden kaynaklanmaktadır. Zeytin çeşitlerinin kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklık derecelerine direnç gibi zor çevresel şartlara karşı gösterdiği yüksek uyum ile alakalı olan metabolik yolları kesin olarak belirlemek üzere araştırmalar devam etmektedir [23]. Akdeniz ekosistemlerinde, yaz ayları oldukça sıcak, fazla ışık seviyesinde, yağışsız ve buhar basıncı oldukça düşük olarak karakterize edilmektedir. Su eksikliği, stomaların kapanmasını ve fotosentez oranının düşmesini indükler ve bu koşullar altında zeytin ağaçları, fazla ışıklı ve yüksek sıcaklıklara maruz kalmakla birlikte kurumaya da maruz kalmaktadır [24]. Ancak, birçok bitki gibi çeşitli adaptif özelliklerinden dolayı kuruma durumunda reaksiyonlar geliştirebilir [25]. Zeytin ağacının büyüklüğü ve verim gücü çevresel şartlardan etkilenmektedir. Kış şartlarının çok ağır olmadığı bölgelerdeki ağaçlar, çok fazla su eksikliği olmadığı sürece genellikle daha ılımlı alanlara göre daha küçüktür. Zeytinde yüksek veya düşük sıcaklık gibi zor çevre koşulları, fotosentezde önemli ölçüde azalmaya ve strese neden olmaktadır [26].

Kuzey yarımkürede zeytin vejetatif tomurcukları Mart ayının sonunda patlar, bunu aksiler floraların patlaması izler ve ilkbaharın sonlarına doğru Nisan - Mayıs aylarında ise çiçek açmaya başlar. Bir önceki mevsimde oluşan apikal ve az sayıdaki lateral gözler gelişmeye başlar. Sıcaklığın 12 °C üzerine çıkması bu durumu teşvik edici bir etkidir. Ağaç, somak başına 10 - 35 çiçek içerir ve meyve tutumu %1 - 3 arasında ve o yılki verime göre değişir. Vejetatif gelişme hızı, yaz ortasındaki 30 °C üzerindeki sıcaklıklarda düşmektedir. Meyve yaz mevsimi boyunca gelişmeyi sürdürürken, Temmuz ortalarına kadar bahar ısınmasıyla bu süreç devam eder ve meyve yüküne bağlı olarak Eylül - Ekim aylarında yeşil zeytin oluşur. İkinci fişkırmaya Eylül ve Ekim ortalarında olur ve meyveler sulanır. Ürün vermeyen ağaçlar fişkırmaya tüm Mart - Ekim dönemi boyunca devam eder [27]. Ekim ayından sonra renklenme başlar ve çoğu çeşitte kış aylarında tam olgunluğa ulaşılır. Topraktaki

nemin uygun veya suyun bol olduğu durumlarda sonbahardaki günlük sıcaklıklardaki azalma ağağ gelişiminin hızlanmasına neden olmaktadır. Şekil 1.2’de görüldüğu gibi zeytin ağacının gelişiminde ılık iklimlerde yaz aylarında bir azalma görülürken, serin iklimlerde ise sürgün gelişiminin en fazla olduğu dönemlere denk gelmektedir. [7].



Şekil 1.2: Ilık ve serin iklimlerde zeytin sürgünlerinin yıllık gelişme eğrisi (Zeytin ansiklopedisinden esinlenerek çizilmiştir) [7]

1.2 Periyodisite

Periyodisite, yapraklarını döken ve dökmeyen bitkilerde geniş yayılım gösteren, verimli bir yılı, daha az verimli bir yılın takip etmesiyle oluşan bir durumdur [28-31]. Bu fenomen, genel olarak çiçeklenme yüküyle belirlenirken [32] tüm kültürü yapılan zeytin çeşitlerinde farklı derecelerde görülür [33]. Zeytin bütün yetiştirme şartlarında periyodisite gösteren bir bitkidir ve bu durumu azaltmak ve önlemek için tarımsal müdahaleye ihtiyaç duyulmaktadır [7]. Periyodisite özelliği hem gelişme miktarı hem de hormonal faktörlerle ilgili olmakla birlikte meyve büyüklüğü, kuvvet ve yıllık vejetatif gelişme miktarı da etkilidir. Bu nedenle, verimli bir yılda genç sürgün gelişimi sınırlı olmaktadır [34]. Yapılan pek çok çalışmada, besinsel rekabetten dolayı periyodisitenin meyve ağırlığına güçlü etkisi tespit edilmiştir [35-38]. ‘‘Var’’ ve ‘‘yok’’ yılları yapraklarındaki karbonhidrat bileşenlerindeki değişiklikleri tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada şekerlerin

“var” yılının başında “yok” yılının başına göre daha fazla miktarda bulunduğu tespit edilmiştir [39]. Vejetatif ve üretici organlarının “var” yılındaki rekabeti, yeni dalların oluşumunu ve çiçek sayısının azalmasına neden olur. “yok” yılındaki güçlü büyüme ise gelecek yıldaki çiçek miktarının artmasına neden olur [30].

Verimli bir yıldan sonra, kısa ve gelişmesi engellenmiş sürgünler üzerindeki gözlerin büyüme potansiyeli genellikle düşük olmaktadır. Böylece aynı uzunluktaki sürgünler, verimli bir yıldan sonra daha fazla somak geliştirmektedirler. Somaklar üzerindeki çiçeklerin bulunması aynı zamanda ağacın daha önceki ürün verimine göre de farklılık göstermektedirler. Meyve tutum yüzdesi çiçek, somak sayısına bağlı olsa bile bazı yıllarda verimdeki dalgalanma meyve sayısındaki değişikliğe göre daha azdır. Bu durum meyvelerin sayıları ile büyüklükleri arasındaki yakın ilişkiye dayanmaktadır [40, 41]. Meyve sayısı daha az olduğunda daha büyük meyve oluşumuna neden olur ve böylece dalgalanmanın derecesi daha düşük olmaktadır. Meyve sayısı ve büyüklüğü arasındaki ilişki sadece meyvelerin miktarına değil aynı zamanda onların dağılımına da bağlıdır.

Zeytinlerde çiçeklenme indüksiyonu kışın geç aylarında başlar ve yaprakların varlığı ve kış donması gibi durumlarda görülebilir [30]. Zeytinde görülen periyodisite nedenlerine bakıldığında; fazla ürünün filiz büyümesini ve tüm besin maddelerinin tükenmesinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler [42]. Periyodisite, zeytin [27, 43-47], elma [48], pekan cevizi [49], mango [50], mandalin [51], fıstık [52], meşe [53], palmiye [54], avakado [55] gibi pek çok ağacı etkilemektedir [30, 56]. Ancak yapılan çalışmalar genel olarak “var” ve “yok” yıllarındaki element eksikliği, karbohidratların periyodisitedeki rolü [57, 58] ve çeşitli hormonların değişimine dayanmaktadır [59]. Genetik olarak bir etkinin söz konusu olduğu periyodisite için henüz moleküler anlamda sebep olan aday genler olarak bir çalışma bulunmamaktadır.

1.2.1 Periyodisiteye Çeşitli Uygulamaların Etkileri

1.2.1.1 Ürün Miktarı ve Ağaç Gelişiminin Etkileri

Mevcut ürün miktarı, bir sonraki yıldaki farklılaşmayı ve meyve tutumunun derecesini belirleyen en önemli faktördür. Mevcut yıldaki ürünün seviyesi ertesi yılın meyve verme gücü üzerinde iki yönlü bir etkiye sahiptir. İlk olarak gelişen meyvenin indüksiyon düzeyinde mekanizmalarını ve tomurcukların farklılaşma gücünü kontrol etmektedir, ikinci olarak ise ertesi yıl meyve taşıyan sürgünlerin vejetatif gelişme yoğunluğunu dolaylı yoldan kontrol eder [7].

Geç hasat zamanı, ertesi yıldaki ağacın verim gücü üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Hasat zamanı Aralık - Ocak ayına kadar ertelenirse bir sonraki verim üzerine azda olsa olumsuz bir etki yaratmaktadır. Ürünü fazla olan ağaçlar, önemli bir vejetatif gelişme gösterebilir bile, bir sonraki yılın ürün miktarının az olmasına sebep olacaktırlar. Bu durumda somaklar oluşmaz ve kış koşulları uygun olsa bile oluşan çiçekler meyve bağlamayacak ya da sadece birkaç tane meyve bağlayacaktır [7].

Periyodisite eğilimi gösteren zeytinlerde meyve seyreltmesi, sadece meyve tutumunun başlangıcında uygulandığında ürün seviyesini etkilemektedir. Farklılaşma zamanındaki yapılan yaprak seyreltmesi ise çiçek gözü gelişimini azaltarak periyodisiteyi önlemede etkilidir. Böylece periyodisite için ilk sinyalin, meyvelerde gelişmekte olan embriyolardan kaynaklanan bir sinyal ile metabolik bir değişme geçiren yapraklar aracılığıyla alınabileceği ve yaprakların bir sonraki çiçek özü indüksiyon ve farklılaşma periyodlarını kontrol eden bilgi için bir depo organı olarak görev yaptıkları anlaşılmaktadır.[36].

1.2.1.2 Hormonların Etkileri

Hartmann ve arkadaşları [11] tarafından ilk olarak 1967 yılında zeytin meyvelerinde gelişim sürecinde meydana gelen hormonal değişimler tanımlanmıştır. Altı haftalık zeytin meyvelerindeki embriyoların yok olmasına ve meyvelerin ağaç üzerinde gelişmelerini sürdürmelerine rağmen, ürünlerdeki dalgalanmanın yok olmadığı sadece en aza indiği kanıtlanmıştır [16]. Verimli yıllardaki meyve seyreltmesinin üretim seviyesi bakımından ertesi yıla etkisi; gelişen meyveler ve farklılaşan gözler arasındaki besin maddeleri rekabetinden kaynaklı olmadığı, indüksiyon ve farklılaşmanın kontrol edici etkisinin gelişen embriyolarda azalmasından kaynakladığı görülmüştür. Yapraklardaki fenolik asitlerin oluşumuyla ilgili bu durum uzun süreli metabolik bir değişmeye sebep olması nedeniyle ve yaz başlangıcında gelişen embriyoların, yazın indüklenen gözlerin kış sonunda farklılaşması üzerindeki etkisini açıklamada önemlidir.

Gelişen embriyonun, hem çiçek başlangıcını hem de çiçek organ gelişimini etkileyen, düzenleyici faktörlerin etkisi zeytin somağında açıkça gözlenmiştir. Somakta meyve tutacak ilk çiçeğin somaktaki diğer meyvelerin normal tutumunu engellediği pek çok çeşitte kanıtlanmıştır. Ayrıca Stutte ve Martin tarafından yapılan tohum öldürme çalışmalarında ağaç üzerinde kalan tohumuz meyve miktarının azlığı ya da çokluğu, ertesi sezon için çiçek gözü indüksiyonu üzerinde sadece embriyolarda bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir [16].

Ağacın “var” yıllardaki besin maddesi tüketiminin, çiçek tomurcuğu indüksiyonu ve farklılaşması için uygun olmayan beslenme şartlarına sebep olduğu görülmüştür. Zeytin ağaçlarının “var” ve “yok” yıllarındaki beslenme durumları ile ilgili araştırmalar çeşitli yerlerde yürütülmüştür [60]. Fakat bulgular, mineral veya standart organik depo maddeleri ile ürünlerdeki dalgalanma arasında net bir ilişki göstermemiştir. Değişik durumlarda verimli ve verimsiz ağaçların yaprakları arasında pek çok besin maddesinin miktarında farklılıklar tespit edilebilmiştir [61]. Ancak birçok fizyolojik işleyişin sonucunda periyodisitede içsel hormonların etkili olduğu görülmüştür [62].

Sitokinin gibi büyüme düzenleyicisinin dıştan uygulanması birçok meyve türünde çiçek tomurcuğu indüksiyonunu ve farklılaşmasını indüklerken [63, 64], bu durum zeytinlerde mümkün olmamaktadır [65]. Zeytinde en kuvvetli inhibisyonun kış uygulamasından sonra olduğu, yaz ve sonbahar uygulamalarından sonrada inhibe ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [66, 67]. Marcelle, içsel gibberellik asit ve sitokininlerin seviyeleri arasındaki denge ile çiçeklenme arasında bir korelasyon olduğunu [68], Chaari-Rkhis, ise gibberellinin, çiçek oluşumu ve kök büyümesinin dahil olduğu pek çok fizyolojik prosesin düzenlenmesi için gerekli olduğunu göstermiştir [69]. Gibberellin karşıtı paklobutrazol'un ise büyümeyi azaltmada ve meyve üretimini arttırmada etkili olduğu görülmüştür [67, 70]. Gibberellik asit zeytin ağaçlarına enjekte edildiğinde çiçeklenmeyi inhibe ettiği görülürken [71], Qrunfleh, Nabali zeytin çeşidindeki çiçeklenmede ABA'nın bu durumda daha uygun olduğunu göstermiştir [72]. Ancak Proietti ve Tombesi, zeytin ağaçlarına gibberellik asit ve paklobutrazol uygulamasının çiçeklenme ve meyve üretimini takip eden yıllarda etkilemediğini göstermiştir [73].

Eylül ayından Ekim'e kadar olan dönemde "var" yılındaki ağaçlarda lateral tomurcularda serbest ABA konsantrasyonunun azaldığı ve sonrasında Aralık'a kadar büyük oranda arttığı ve Nisan ayına kadar sabitlendiği, "yok" yılında ise, ABA konsantrasyonunun, Eylül ayında başladığı ve Kasım'a kadar önemli ölçüde artarken, Aralık ayına kadar azaldığı ve Nisan ayına doğru sabitlendiği belirlenmiştir. Bunu takip eden yıl olan "yok" yılında ise ABA konsantrasyonu keskin bir şekilde Eylül ayından Ekim'e kadar arttığı ve sonrasında Aralık'a kadar azaldığı görülmüştür ve sonrasında Nisan'a kadar sabit seviyede kalmaktadır. "Var" yılında ise ABA konsantrasyonu zeytin lateral tomurcularında Eylül ayından Kasım'a kadar az miktarda arttığı ve Mart ayına kadar bu şekilde devam ettiği ve Nisan ayına doğru büyük oranda azaldığı görülmüştür [74].

Zeevaart, birçok bitki çeşidinde çiçek oluşumunda ABA'nın önemli olduğunu göstermiş [75] ve Temmuz - Kasım ayları arasında zeytindeki çiçek oluşumunun başlangıcını ve indüklenmesiyle ilgili bilgileri göstermiştir [47, 71, 76-78]. Pinney ve Polito ise Kasım ayı ortalarına ve Ocak ayının sonlarına doğru ya da Mart ayları

arasında zeytin floral tomurcuklarının görülür şekilde büyüme olmadığını yayımlamıştır [78]. Bu durumun endodormansi ve ekodormansiden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [79].

Kasım ve Aralık aylarında “var yılı” zeytin lateral tomurcuklarında IAA (İndol Asetik Asit) konsantrasyonu “yok” yılındaki ağaçlar ile karşılaştırıldığında önemli miktarda fazladır. Bunu takip eden yılda, IAA konsantrasyonu Eylül ve Mart ayları boyunca her iki ağaçta da hemen hemen aynı seviyededir. Bu sonuçlardan yola çıkarak IAA'nın zeytinde çiçek tomurcuklarının indüklenmesinde ve başlamasında gerekli olduğu tahmin edilmektedir [74].

Eylül ayından Ekim ayına kadar lateral tomurcuklarda gibberellik asit konsantrasyonu “yok” ve “var” yılındaki ağaçlarda benzerlik göstererek önemli ölçüde artmaktadır. “Yok” yılındaki serbest gibberellik asit oranı Kasım ayına doğru ani bir şekilde azalırken, Kasım ayından Aralık ayına kadar olan süreçte her iki yıldaki ağaçlarda önemli ölçüde artmaktadır. “Var” yılındaki serbest gibberellik asit miktarı Nisan ayına kadar sürekli bir azalış gösterirken, “yok” yılında serbest gibberellik asit miktarı aynı periyotta değişiklikler göstermektedir. İlerleyen dönemlerde “yok” ve “var” yılındaki serbest gibberellik asit konsantrasyonu Eylül ayından Nisan ayına kadar olan periyod boyunca çok değişmemektedir [74].

Gibberellik asit sonuçları Stutte ve Martin ve Ferara ve arkadaşlarının araştırmaları ile örtüşmemektedir [77, 80]. Şöyle ki; zeytinin de dahil olduğu meyveli ağaçlarda çiçeklenme oluşumunun indüklenmesi ile “var” yılındaki tohumlar tarafından üretilen gibberellik asit seviyesi artmaktadır. Ancak, Stutte ve Martin lateral tomurcuklarda gibberellik asit miktarını [77] ve tomurcuklardaki gibberellik asitin tohumun yok olması ve meyvenin düşmesine etkisini araştırırken gibberellik asitin enjeksiyon zamanı ölçülmemiştir [81]. Bu nedenle, zeytinde çiçek oluşumunun başlaması ve indüklenmesinde gibberellik asitin kabul edilmesi zor görünmektedir.

“Var” yılında zeytin ağaçlarının lateral tomurcuklarında sitokininlerin konsantrasyonu Eylül ayından Nisan ayına kadar olan periyotta “yok” yılına göre önemli miktarda fazladır. Bir sonraki yılda ise “yok” yılındaki sitokininlerin konsantrasyonu Eylül - Ocak ayları boyunca “var” yılındaki ağaçlar ile aynı seviyededir. Eylül ve Kasım aylarında indüklenme ve başlama periyodu sırasında zeytin lateral tomurcuklarındaki sitokininlerin konsantrasyonu “var” yılında “yok” yılına göre daha yüksektir. Ancak, bunu takip eden yılda “var yılı” ağaçlarındaki Sitokinin konsantrasyonu “yok” yılındaki ağaçlarınkı ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, çiçeklenmenin indüklenmesi ve başlaması ile sitokininin konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi belirlemek oldukça zordur.

Yaprak metabolizmasındaki değişikliklerin yeni bir sinyal alınıncaya kadar devam ettiği Lavee ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir [82]. Mamafih, yaprakların gelişen meyvelerden gelen sinyale karşı tepkilerinin çevresel koşullara bağlı olduğunu göstermiştir. Yapraklarda meydana gelen metabolik değişiklikler fenolik ve flavonolik bileşikler kapsamaktadır ki bu bileşiklerin çoğu çiçek özü farklılaşması üzerinde engelleyici etkilere sahiptirler ve *in vitro* hücre gelişimini teşvik edebilmektedirler [83, 84]. Buradan periyodisitenin çiçek gözü farklılaşmasının engellenme derecesi ile de yönlendirildiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

1.2.1.3 Vejetatif Büyüme Ve Meyve Oluşumunun Etkileri

Zeytin meyvesi, önceki yıllardaki filizlerde oluşmuş tomurcuklardan gelişmektedir. Meyveler, sadece çiçek durumu iyi odunlaşmış ağaçlarda gelişebilecektir. Bu nedenle önceki yıllarda gelişen güçlü ve uzun vejetatif filizler gelecek yılların potansiyel çiçeklenme gelişimini sağlarlar [38, 85].

“Yok” yılında görülen güçlü vejetatif büyüme uzun ve güçlü filizler, iyi gelişmiş tomurcuklardır ve üretken farklılaşmaya doğru bir ilerlemedir. Fazla miktardaki tomurcuklar genel olarak üretken olanların arasından farklılaşarak bir

sonraki yıl olan “var” yılında gelişecek olan fazla miktarda çiçek durumunu oluşturabilirler [7]. Buradan zeytinde meyve üretiminin önceki büyüme sezonundaki vejetatif büyümeye bağlı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. “Var” veya “yok” yılındaki vejetatif büyüme derecesi aynı zamanda ağaçtaki meyve varlığının fonksiyonel miktarını da göstermektedir. Böylece, gelişmekte olan meyve ve vejetatif büyüme arasındaki denge büyüme dönemini takip eden yıldaki potansiyel meyve üretiminide etkileyecektir [7].

Vejetatif büyüme seviyesinin meyve verimine etkisinin yanı sıra gelişmekte olan meyveleri takip eden yıldaki çiçek tomurcuklarının gelişimi de etkilemektedir. [86]. Bazı çalışmalarda “var” ve “yok” yıllarındaki verim ile karbonhidrat [87] ve polyamin [88] gibi primer metabolitler arasında bir orantı bulunmuştur. Kış aylarında üretici tomurcukların lateral merkez akislerinde nişasta içeriğinin azaldığı rapor edilirken [89], gelişen meyvelerde ve vejetatif büyüme ve temel organik metabolitler arasında rekabet görülmemiştir [90, 91]. Stutte and Martin’in yaptıkları çalışmada ise meyve veren ağaç ve vermeyen ağaçların yapraklarında karbonhidrat seviyesinin eşit olduğunu bulmuştur [60].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda “var” ve “yok” yıllarına ait yaprakların mineral içeriğinde spesifik değişikliklerin çoğunlukla büyümeyi düzenleyici sistemlerin potansiyel aktivitesi ile ilgili olarak değiştiği rapor edilmiştir [90, 91]. Troncoso, “var” yılının sonunda yapraklardaki sodyum ve potasyum içeriğinin önemli ölçüde azaldığını ancak “yok” yılında bu değerlerin yüksek olduğunu göstermiştir [92]. Buradan mineral içeriğinin çiçek tomurcuklarının farklılaşarak tekrar oluşmasında gerekli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Yaz sezonundaki major büyüme sırasında ya da meyve düşme zamanında hormon uygulamalarının diğer çeşitlerde olduğu gibi zeytinde çiçek tomurcuklarının indüklenmesini azalttığını göstermişlerdir [67, 82, 93].

“Var” ve “yok” yıllarındaki yaprak ve tomurcukların sahip olduğu çeşitli büyüme düzenleyicilerin içeriğinin farklı olduğu pek çok çalışma bulunmaktadır [17,

94, 95]. Çeşitli büyüme düzenleyicilerinde görülen konsantrasyon değişikliğinin yaz ortası, erken-geç kış ve erken baharda tomurcuklar açmadan önceki gibi spesifik dönemlere denk gelmesi bu değişikliğin tomurcuk farklılaşması ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir [95]. “Var” ve “yok” yıllarındaki zeytin ağacı yapraklarında klorogenik asit gibi fenolik metabolitlerin birikimi ve sinyal indüklenmesi meyvelerde meyve gelişimini başlatmada ve sekonder metabolit içeriklerinde de önemli değişiklik kaydedilmemiştir. [96-98].

Genel olarak, hasat edilen yıl ve onu takip eden diğer yıldaki ürün miktarı arasındaki negatif korelasyon periyodisitenin temeli olarak belirlensede kışın ikinci yarısında yapılan geç hasatında da etkisi büyüktür. Meyveler geç hasat edildiğinde, tomurcuk büyüme inhibisyonuna bağımsız etkisine ilaveten tomurcuk farklılaşması sonucunda oluşan ürünleri indükleyerek erken aktive edebilir ve bahar aylarında bazı meyve oluşmasını ve çiçeklenmenin azalmasına yol açabilirler [38, 99].

1.2.1.4 İklimin Etkisi

Sıcaklık, çevresel koşulların en önemlisi olup, çiçek farklılaşmasında önemli bir etkiye sahiptir. Çiçek tomurcuklarının farklılaşmasında kış donmasının (9°C'nin altında) eşit miktarda olması, çok uzun yıllardır bilinmektedir [99, 100]. Stabil derecelerin gözlendiği kış aylarında, potansiyel çiçek tomurcuklarının farklılaşma oranı yüksek iken olumsuz sıcaklık değişimleri, periyodisitenin indüklenmesine teşvik eder ve dondurucu kışlarda tüm ağaçlarda tomurcukların miktarı azalmaktadır. Bu tamamen, meyve üretiminin yüksek oranda eşitlenmesine neden olur ve sonuçta takip eden yıldaki ürün için düşük oranda çiçek tomurcuklarının farklılaşmasına yol açar ve bunlar eş zamanlı periyodisitenin başlamasına neden olacaktır [101].

İklimsel koşullar, zeytin ağacının meyvelenmesinde ve tek yıllık gelişimsel döngüde farklı gelişim aşamalarında çok önemli bir etkidir. Yağmur miktarı ve yağmurun dağılımı sulanmayan ağaçlarda, ağaç gelişim seviyesini ve potansiyel meyve üretimini yönlendirir. Ekstrem koşullar, ağacın büyüme döngüsündeki bir

aşamada su ve sıcaklık stresine yol açarak meyve ve vejetatif gelişim arasında dengeyi indükleyerek, periyodisitenin başlamasını neden olur. Bu şekilde oluşan stresin tekrarı kritik gelişim aşamalarında meydana geldiğinden iki yılda bir meyve verme sendromu başlar [7].

1.2.1.5 Karbohidratın Etkisi

Yaprak ve meyve dokusundaki çözülebilir karbonhidrat kompozisyonu değişikliği ile ilgili yapılan çalışmalar karbonhidratların “var” ve “yok” yıllarında farklılık gösterdiğini kanıtlamıştır [39, 102]. Glukoz, fruktoz ve mannitol, hem “var” hem “yok” yıllarındaki olgunlaşma sürecinde meyvelerin alkolde çözülebilen şekerlerin ana içeriğini oluştururlar [103] ve bu durum diğer araştırmalarla da örtüşmektedir [28, 39, 104, 105]. Glukoz ve fruktoz “var” yılındaki her bir meyvelerde olgunlaşma sırasında çeşitlilik gösterdiği, glukoz ve fruktoz miktarının azalırken, mannitol miktarının arttığı [106] ve glukoz içeriğinin fruktoz ve mannitole kıyasla daha fazla olduğu kanıtlanmıştır [102, 107, 108]. Yapraklarda fruktoz miktarı, monosakkaritlerin ana bileşenleri olan diğer iki şeker göre - glukoz ve mannitol - daha azdır. Oysa ki manntiol miktarı ile “var” ve “yok” yılları arasında negatif bir korelasyon olduğu özellikle “var” yılında mannitol miktarı diğerlerine göre daha fazla olduğu görülmüştür [39].

Karbohidratın periyodisiteye olan rolü ile ilgili 2 hipotez vardır: Mannitolün transport hızı “yok” yılında meyveden yaprağa doğru azalmaktadır ve yapraklarda mannitol birikiminin azalmasına neden olmaktadır, diğeri ise yok yılında glukoz, fruktoz ve mannitol dönüşümü düzensiz olmaktadır [106]. Meyve gelişiminde çözülebilir şeker içeriği meyve oluştuktan 90 gün sonra artar ve sonrasında azalmaktadır. “Var” yılında fark edilir şeker artışı meyvelerin renk değişiminin başladığı zamana denk gelirken, “yok” yılındaki toplam şeker içeriği ise “var” yılından daha yüksektir [106]. Bunun nedeni ise, “yok” yılında meyve üretiminin olmamasından kaynaklanmaktadır.

Meyve gelişimi sırasında (meyve oluşumundan 75 - 135 gün arası), şeker miktarı “var” ve “yok” yıllarındaki meyve örnekleri arasında benzerlik göstermektedir fakat yapraklardaki glukoz ve fruktoz miktarı daha düşüktür ve mannitol “var” yılında daha yüksektir. Mannitol miktarının fazla olması, mannitolün transport özelliği ile örtüşmektedir. Bunun nedeni “var” yılında meyve büyümesi için gerekli olan şeker, yapraklardan meyveye doğru taşınmalıdır ve daha önce açıklandığı gibi mannitolün bu özelliğinden kaynaklanabilir. Meyve gelişiminin ileriki aşamalarında yapılan çalışmalarda (135 - 165 günleri arasında) meyvedeki mannitol miktarının arttığı ve bunu yapraklardaki bu şeker artışının da takip ettiği görülmüştür [106]. “Yok” yılındaki bazı elementlerin seviyesinin “var” yılına göre daha az olmasından dolayı [109] mannitol transportunun, bu elementlerin seviyelerinin az olmasına bağlı olarak azalmaktadır. *Apium graveolens* (Umbeliferae) isimli bitkide mannitolün bu biyosentetik metabolik yolu daha önceden yayınlanmıştır [110].

Genel olarak, meyveler yapraklardaki metabolik üretimin translokasyonu sonucunda beslenirler. Meyvelerde birikmiş şekerlerin (glukoz ve fruktoz) azalması durumunda yüksek bitkilerin floemindeki karbonhidratlarda bir yer değiştirme durumu görülmez. Bu durum; bazı bitkilerde polyollere ek olarak sukroz ve diğer indirgenmeyen oligosakkaritlerin, karbonhidratların yer değiştiricisi olarak görev aldığını göstermektedir [111]. Bu nedenle zeytin meyvesindeki mannitol diğer birçok bitki gruplarında olduğu gibi zeytin meyvesinde de diğer polyoller gibi spesifik materyalin sentezi ve metabolik transformasyonunda önemli bir görev üstlenir [106].

Yapraklardaki karbon salınımı ve karbon asimilasyonu arasındaki denge 2 farklı mekanizma ile düzenlenir [39, 112]. “Yok” yılındaki karbonhidrat transport oranının daha düşük olmasından dolayı, bu bileşenlerin konsantrasyonu “yok” yılında daha fazladır. Meyvenin karbonhidrat içeriği ise “var” ve “yok” yıllarında benzerdir [106]. Bu sonuç daha önce elmada rapor edilmiştir [30].

1.2.1.6 Fizyolojik Gelişimin Etkileri

Zeytin ağaçlarının “var” ve “yok” yıllarındaki beslenme durumları ile ilgili araştırmalar yapılmıştır ve fakat [60] bulgular, mineral veya standart organik depo maddeleri ile ürünlerdeki dalgalanma arasında açık bir ilişki olmadığını göstermiştir. Değişik durumlarda, “var” ve “yok” yılları ağaçlarının yaprakları arasında pek çok besin maddesinin miktarında farklılıklar belirlenmiştir. Ancak belirlenen bu farklılıklar, değişen meyve üretimini anlamakda çok spesifik olmadığı için zeytinde görülen periyodisite durumunun sadece besin maddesi tüketimi nedeniyle olduğu konusu net değildir. [61]

Yaprakların çiçek tomurcuğu indüksiyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir. Zeytin sürgünlerinin kritik periyodlarda yapraklarını dökmesi farklılaşmanın olmamasına veya büyük ölçüde azalmasına yol açar [113]. Yaprakların dökülmesi sadece fotosentezde etkilidir ve böylece karbonhidratların seviyesinde bir azalmaya değil, aynı zamanda örneğin şeftalilerde naringenin [114], elmalarda phlorizin ve zeytinde oleuropein [115] gibi düzenleyici özelliklere sahip olan özel maddeler için kaynağın yok edilmesine neden olmaktadır. Son 10 yıl içerisinde gerçekleştirilen uzun süreli araştırmalar, yapraklardaki bazı özel fenolik asitlerin ve özellikle klorojenik asit (CHA) seviyesinin ağaçlardaki meyve yükü seviyesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [96]. HPLC ile yapılan çalışmalarda CHA'nın kantitatif olarak tespiti [116] ile yapraklardaki CHA seviyesinin “var” yıllarda yüksek, “yok” yıllarda ise düşük olduğunu göstermiştir. IAA'de olduğu gibi, klorojenik asidin de *in vitro* çalışmalarda zeytin doku gelişmesini indüklemeye etkili olduğu bulunmuştur [84].

Meyve tutumundan sonra küçük meyvelerin uzaklaştırılması, yapraklarda CHA'nın birikmesine engel olacağından ertesi sezon için ağaç farklılaşmasını ve çiçeklenmeyi kolaylaştırır [17, 97].

Verimli ve verimsiz ağaçların metabolik durumları halen araştırılmaktadır. Meyve veren ve vermeyen ağaçların yapraklarındaki özel proteinlerin ortaya çıkışı ve kayboluşu; çiçek gözü farklılaşmasını başlatan metabolik yolda görev alan genlerin ekspresyonunu tespit etmek açısından önemlidir [117].

1.2.1.7 Meyve Gelişme Hızının Etkisi

Meyve tutumunun derecesini belirleyen en önemli etkenler, ağacın mevcut ürün miktarı ve bir sonraki yıldaki farklılaşmasıdır. Mevcut yıldaki ürünün miktarı ertesi yılın meyve verme gücü üzerinde iki yönlü bir etkiye sahiptir; gelişen meyvenin indüksiyon düzeyinde mekanizmalarını ve tomurcukların farklılaşma gücünü kontrol eder ve ertesi yıl meyve taşıyan sürgünlerin vejetatif gelişme yoğunluğundan dolayı kontrol eder [7].

Ürün, ağaç gelişiminin ilk yıllarında yıldan yıla artmaktadır. Fakat ağaç tam taç büyüklüğüne ulaştıktan sonra bireysel uç gelişim hızı azalır ve gelişen meyvelerin rekabeti artar. Çok kuvvetli ağaçlar veya sürgünlerdeki- özellikle sert bir budamadan sonra ana dallar üzerindeki gelişme-, bir yıl daha vejetatif olur ancak bundan sonrasında vejetatif gelişme kuvveti ve verim verme arasındaki denge tekrar kurulur [7].

Hasat zamanının Aralık veya Ocak aylarına sarkması ertesi yıldaki verim gücü üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Çok fazla ürüne sahip olan ağaçlar, yüksek ürüne paralel olarak önemli bir vejetatif gelişme olmasına rağmen, ertesi yıl daha az ürüne sahip olacaklardır. Ayrıca somaklar oluşmayacak uygun kış koşulları nedeniyle oluşurlarsa bu şekilde oluşan çiçekler meyve bağlamayacak ya da sadece birkaç tane meyve oluşturacaklardır [7].

1.2.2 Periyodisitenin Zeytin Gelişimine Çeşitli Etkileri

1.2.2.1 Periyodisitenin Ürün Yüküne ve Kaliteye Etkileri

Meyveler arasındaki rekabet, meyve gelişimini, olgunlaşmasını ve kalitesini etkileyen faktörlerdendir. Meyvelerin her biri birbiri ile sink uzunluğu ve asimilasyon pozisyonlarına bağlı olarak rekabet içindedirler [45, 118].

Ürün miktarı ve meyve kalitesi arasındaki ilişki yaprağını döken ve dökmeyen meyveli ağaçlarda geniş ölçüde çalışılmaktadır [30, 119-121]. Zeytin gibi periyodisite gösteren çeşitler sadece düzensiz üretim göstermezler aynı zamanda “var” yılında ki meyve verimi ve kalitesi değersiz sayılabilecek kadar kötü olabilir [30, 122]. Zeytinde gelişim aşamalarının en başlarında görülen şiddetli bir rekabet ürün yükünün düzenlenmesi ile ilgilidir [45, 123].

Fazla miktarda ürün yükü bulunan ağaçlarda meyvelerin olgunlaşması tam olmayabilir. Bunun nedeni meyveli ağaçlarda genelde görülen bir durum olan fotosentazlardaki güçlü rekabettir [124]. Meyve olgunlaşmasındaki değişiklikler ve ürün yükünden dolayı azalma durumu limon, şeftali, ve üzüm gibi pek çok bitkide gözlenmiştir [30, 125, 126].

Zeytin meyvelerinin 1998-1999 ve 1999-2000 yılları arasındaki “var” ve “yok” yıllarındaki ağaçlara ait ürün miktarı Tablo 1.1’ de verilmiştir. 1999 - 2000 yıllarında yok yılına göre “var” yılında filiz uzunluğunun yüzdesinde önemli ölçüde artma gözlenmiştir. Bu artış “yok” yılında %95, “var” yılında ise %39 dur. 1999 - 2000 yıllarında her filizdeki ortalama yaprak sayısı, “yok” ve “var” yıllarında hemen hemen aynıdır (28.1, 27.8). Her iki sezonda da 1998 - 1999, 1999 - 2000 her filizdeki meyve sayısı ise “var” yılında elde edilen “yok” yılından fazladır ve sırasıyla ortalama rakamları filiz başına 5.4 ve 2.8’dir [74].

Tablo 1.1: 1998 - 1999, 1999 - 2000 yıllarında “var” ve “yok” yıllarında ki ürün verimi

Yıl	Var yılı ağacı	Yok yılı ağacı
1998 - 1999	96.7 kg / ağaç	41.7 kg / ağaç
1999 - 2000	28.3 kg / ağaç	16.7 kg / ağaç

“Var” yılındaki ağaçlardaki (96.7 kg / ağaç, 28.3 kg / ağaç) her iki sezondaki ürün miktarı “yok” yılındaki ağaçlara göre yaklaşık olarak iki kattır (41.7 kg / ağaç, 16.7 kg / ağaç). 1998 - 1999 sezonunda “var” yılındaki zeytin ağaçlarının ürün miktarı, “yok” yılındakinden yüksektir. 1998 - 1999 yıllarında “yok” yılında olan ve 1999 - 2000 yıllarında “var” yılında olan ağaçlarda 1999 - 2000 yıllarında “yok” yılında olan, 1998 - 1999 yıllarında “var” yılında olan ağaçlardan yüksektir. Bunun nedeni; 1999 yılında sıcaklığın yüksek olmasından dolayı (optimum sıcaklık 23.3 °C, max. 32.6 °C min. 13.4 °C) meyve oluşumu ve çiçeklenme etkilenmiştir.

Yüksek sıcaklık, polen tanelerinin yaşayabilirliğini etkilerken, fertilizasyona da zarar verebilir. Ayrıca yüksek sıcaklık pistil düşmesini ve meyve oluşum yüzdesini etkilediğinden dolayı ağaç başına düşük ürün elde edilir [127-129]. 1999 - 2000 yıllarında “var” ve “yok” yıllarındaki zeytin ağaçlarında yüksek sıcaklık etkisi ürün miktarına yansımıştır; “var” ve “yok” yıllarında ürün miktarı sırasıyla %83 ve %32 oranında azalmıştır. Ferrara et al.’ın elde ettiği sonuçlarda, çiçeklenme ve floral tomurcuk farklılaşmasında fertilizasyonun değişimi ve pistil düşmesi, ışık, sıcaklık, iklimsel faktörler gibi birçok etkenler ile ilgili olduğunu görülmüştür [80]. Bireysel tozlaşma çiçeklenme periyodunda yüksek sıcaklık tarafından sınırlanabilir [130]. Singh et al.’ın sonuçlarına göre ise, kritik periyotlarda (Kasım ve Mayıs) zeytin verimi maksimum sıcaklık, bağıl nem ve minimum sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir [127].

İkinci sezondaki 1999 - 2000 yıllarında “yok” yılındaki filiz uzunluğu yüzdesi (1998 - 1999 yıllarında “var” yılındadır) %95 olup “var” yılındakine göre %39 oranında fazladır. Bunun anlamı şudur; “yok” yılındaki ağaçlar, “var” yılındaki ağaçlara göre filiz gelişimi için daha çok fotosentaza sahiptirler. Çünkü verim düşüktür ve meyve, filiz büyümesi arasındaki rekabet minimumdur. Tüm bu sonuçlardan elde edilen bilgiler ile Proietti ve Tombesi'nin elde ettikleri ile uyum göstermektedir. Filizlerde meyve varlığı büyük ölçüde azalmaktadır ve yüksek fertilizasyon koşullarında büyük ölçüde ağacın diğer bölümlerindeki yapraklardan geçen fotosentaz sınırlandırmaktadır [131].

Tüm zeytin çeşitlerinde “var” yılındaki meyvelerin büyüklüğü, “yok” yılındaki meyvelere göre daha küçüktür [132, 133] ve “yok” yılındaki yağ içeriği “var” yılındaki meyvelerden elde edilen yağa göre daha fazladır [134].

1.2.3 Periyodisiteyi Dengelemek İçin Geliştirilen Yöntemler

Verimsiz yılda az olan meyvenin gelişmesini önlemek amacıyla çiçeklenme sırasında, pülverize halde yüksek konsantrasyonlu NAA (Naftalen Asetik Asit) (120-150 mg / L) uygulaması ve verimsiz yılın öncesinde gibberellik asit ile (500 mg / L) verimli yıl öncesindeki kış uygulamasında somak sayısını etkiler ve böylece “var” yılındaki meyve yükünü azaltmada yardımcı olabilir [67]. Bunun dışında budama yöntemi de “var yılı” öncesinde uygulanabilir. Ayrıca meyve sayısını azaltmak ve daha fazla vejetatif gelişmeye ve “yok yılı” için daha iyi bir çiçek gözü farklılaşması sağlamak için “var” yılında küçük meyve seyreltmesi de yapılabilir [36, 41, 135]. Çok miktardaki küçük meyvelerden oluşan bir ürün, az sayıdaki büyük meyveli ürüne oranla periyodisiteyi daha fazla teşvik etmektedir. Ana dalda bilezik almanın periyodisiteyi azaltan başka bir yöntem olup, kış farklılaşmasını sınırlayan şartlar altında fayda sağladığı görülmüştür. [136, 137].

1.3 LEA Proteinleri

Bu proteinler, tohumların olgunlaşma aşamasında ve vejetatif organlarda özellikle soğuk, kuruma, yüksek tuzluluk, su eksikliği gibi stres koşullarında biriken [138], sıcaklık değişimlerinde hücrelerin fizyolojisini korumak için gen ekspresyonunu düzenleyen [139-143], embriyo gelişimi ve ABA gibi faktörler ile indüklenen protein grubudur [138, 144-147]. Embriyonun geç dönemlerinde bol buldukları için geç embriyogenezis döneminde bol olan proteinler anlamına gelen LEA (=Late Embryogenezis Abundant) olarak isimlendirilirler [148, 149].

LEA proteinleri, primer olarak bitkilerde özellikle tohumlarda ve diğer dokularda bulunmasına rağmen [150-152] bitkilere has değildirler bakterilerden *Deinococcus radiodurans* [153] ve *Bacillus subtilis* [154] kironomid *Polypedilum vanderplanki* [155] artemia [156], farklı nematod çeşitlerinde [157-159], rotiferlerde [160, 161] ve Cyanobakterilerde [162] gibi birçok farklı organizmada bulunabilirler.

Pek çok bitkide protein, gen ve cDNA ları çalışılan [151] LEA proteinleri ilk olarak gelişmekte olan pamuk (*Gossypium hirsutum*) embriyolarında çalışılmıştır [141, 146, 149, 163-168], ancak ilk yayımlanan dehidrin dizisi pirinç RAB21 dehidrinine aittir [169]. LEA proteininin yapısal karakterizasyonu ilk olarak 1985 yılında McCubbin tarafından çeşitli biyokimyasal teknikler kullanılarak grup 1 proteinini (Em) buğdayda (*Triticum aestivum*) kullanarak çalışmıştır [170].

1.3.1 LEA Proteinlerinin Görevleri

LEA proteinlerinin genel olarak görevlerine bakıldığında: veziküllerin ve endomembran yapılarının korunmasında, kalsiyum gibi iyonların ayrılmasında, moleküler şaperonlar gibi davranarak iyonların suya bağlanmasında ya da yer değiştirmesinde [138, 171, 172], bitki hücrelerinin dehidrasyonun zararlı etkilerine karşı korunmasında [141, 173], kurumaya dirençte, su kaybından kaynaklanan

hücrel yapının korunmasında, katlanmamış proteinlerin renaturasyonunda gerekli oldukları sonucuna ulaşılmıştır [148, 174-176].

LEA proteinleri birçok hücre tipinde, farklı konsantrasyonlarda bulunabilirler [177-180] ve hücre içinde predominant sitosolikler ve hücre içindeki konsantrasyonları dikkate alınacak kadar çoktur. Örneğin; ham pamuk embriyo hücrelerinde D7 LEA proteinleri organel olmayan sitosolik proteininin (yaklaşık 0.34 mM) %4'ü kadardır [181].

LEA proteinlerinin aminoasit kompozisyonuna bakıldığında, total aminoasit miktarının %20 - 30 oranında hidrofilik polipeptidlerden oluşurlar. Örneğin; D19 pamuk proteini %13 glisin, %11 glutamik asit içerir [150]. LEA proteinleri ile direkt çalışmalarda, yüksek oranda hidrofilik oldukları ve aminoasit kompozisyonlarından enzim fonksiyonuna sahip olmadıkları anlaşılmıştır [150]. Kyle-Doolittle hidropati algoritmeleri [182] ile de LEA proteinlerinin hidrofilik olduğunu göstermiştir [149, 163].

1.3.2 LEA Proteinlerinin Sınıflandırılması

LEA proteinleri kendi içinde, farklı sekans motiflerin bulunması ve yine farklı aminoasit kompozisyonlarına bağlı olarak Tablo 1.2' de görüldüğü gibi farklı gruplara ayrılmıştır [149, 173, 183, 184]. Bu ayırım, aynı zamanda grupların her birinin su kaybı durumunda farklı fonksiyona sahip olduklarını da göstermektedir [149, 173, 183].

Transkript yoğunluğuna ve embriyogenezisteki ekspresyon seviyelerine göre LEA genleri 2 ayrı sınıfa ayrılmaktadır: LEA ve LEA-A altgrupları. LEA-A genleri tohum gelişiminin erken aşamalarında LEA genlerinden daha az ekspre olurlar [166, 185, 186]. Daha genel bir sınıflandırma ise LEA genlerinin kimyasal özelliklerine ve proteinlerin yapısal domainlerine bakılarak elde edilmiştir. 2 farklı yaklaşım

bulunmaktadır. İlk olarak Dure [149] tarafından tanımlanan sistemde; aminoasit dizilerindeki korunmuş motiflere bakılarak yapılmıştır. Buna göre LEA proteinlerini 5-9 alt gruba ayrılmaktadır [149, 187-189]. İkinci yaklaşım ise bilgisayar analizi ile yapılandır. Protein ya da oligonükleotit tahmini profili (=Protein or Oligonucleotide Probability Profile = POPP) olarak isimlendirilen program ile protein dizisindeki kısmen aminoasitlerin alt ve üst yerleşimlerini gösterir ve buna göre isimlendirilir [184, 190]. POPP analizinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, LEA proteinleri tekrar 4 gruba ayrılmıştır [184, 191].

LEA I proteinleri: Buğday Em proteinini [192-194] ve ona homolog olan pamuk D-19 proteini [163] içerir. Her iki proteinde birbirine homologdur ve benzer protein özellikleri gösterirler [149, 163]. Çeşitli bitkilerden ve bakterilerden izole edilen LEA I proteininin glisine (%20) ve yüklü aminoasitlerce (%40) zengin olduğu görülmüştür [195, 196]. LEA I proteinlerinin moleküler ağırlığı; 11.5 kDa (maksimum 20.3 minimum 6.8), elektrik yükü; %58 oranında 6 dan küçük, %26 oranında 6 ile 9 arasında ve %16 oranında 9 dan büyüktür ve bu proteinler küçük ve asidikten nötrale yakındır [197].

LEA II proteinleri: D-11 [163], RAB (ABA'dan sorumlu, responsive to ABA) [169] ve dehidrin proteinleri [198] olarakda isimlendirilen proteinler ilk olarak gelişen pamuk embriyolarında çalışılmıştır. Soğukta regüle olan proteinler (COR= Cold regulated) LEA II proteinlerine benzerlik göstermektedir [199]. Bugüne kadar 100 den fazla LEA II proteinleri Angiospermler, Gymnospermler, Pteridofita, Bryofita, mantarlar, algler ve Cyanobakteriler gibi çeşitli bitki taksonlarını içeren pek çok canlıda çalışılmıştır [144, 145, 149, 200-204]. LEA II proteinlerinin moleküler ağırlığı; 5.3-66.3 kDa arasında değişmektedir (ortalaması 18.3 kDa), elektrik yükü; %7 oranında sırasıyla 6 dan küçük, %58 oranında 6 ile 9 arasında ve %35 oranında 9 dan büyüktür ve bu proteinler küçük ve nötralden bazike yakındır [197].

LEA III proteinleri: D-7 proteinleri olarak da bilinen bu grup, bitkilerde, mantarlarda, bakterilerde ve hayvanlarda bulunmaktadır [149, 188, 205]. LEA III

proteinlerinin moleküler ağırlığı 25.5 kDa (maksimum 67.2 minimum 7.2) elektrik yükü; %20 oranında 6 dan küçük, %37 oranında 6 ile 9 arasında ve %43 oranında 9 dan büyüktür ve bu proteinler küçük olup ve nötralden bazike yakındır [197].

LEA IV proteinleri: D-113 proteinleri olarakda isimlendirilen bu grup proteinleri, pamuk D113 [163], domates ve yabani türü Le25 de [206, 207], ayçiçeği (*Helianthus annuus*) Hads11 [208], soyafasulyesi GmPM1 ve GmPM16 [209, 210], *Arabidopsis* AtLEA4-1 (PAP260) ve AtLEA4-5 (PAP51) [211] ve *Phaseolus vulgaris* PvLEA-18 [212] de çalışılmıştır. LEA IV proteinlerinin moleküler ağırlığı 12.6 kDa (maksimum 67.2 minimum 7.2) elektrik yükü; %22 oranında 6 dan küçük, %22 oranında 6 ile 9 arasında ve %56 oranında 9 dan büyüktür ve bu proteinler küçük olup ve baziktirler [197]. Bu proteinler diğerlerinin aksine korunmuş motif ve dizi içermezler.

LEA V proteinleri: Pamuk D-34 ve D-95 proteinleri bu gruptandır [163, 213]. LEA V proteinlerinin moleküler ağırlığı 18.1 kDa (maksimum 38.5 minimum 5.3) elektrik yükü; %87 oranında 6 dan küçük, %6 oranında 6 ile 9 arasında ve %7 oranında 9 dan büyüktür ve bu proteinler asidiktirler [197].

LEA I, II, III ve IV proteinlerinin hidrofilik ve LEA V proteinin ise hidrofobik olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [197].

Atipik LEA proteinleri: Bu grup diğer LEA gruplarında olduğu gibi embriyogenezisin geç aşamalarında birikir. Ancak tek farkı bunların korunmuş motif içermemeleridir [197].

1.3.2.1 LEA Proteinlerinin POPP Programına Göre Sınıflandırması

Peptid kompozisyonları esas alınarak bilinmeyen proteinlerin kompozisyonlarındaki farklılıkları belirlemek için kullanılan yazılım programıdır [190]. POPP ile LEA proteinleri 4 gruba ayrılmıştır [184, 191].

Group1: LEA I grubu ve 2 alt grubunu içerir. Grup1a proteinleri (SF4), histon H4 ve diğer kromozomal ve nükleer proteinleri POPP vektörleri içermektedir. Grup1a proteinleri DNA'ya bağlanan nükleer proteinlerdir. Grup1b proteinleri (SF6), bunun aksine RNA ve ATP'ye bağlayabilirler, giraz ve şaperon gibi daha kapsamlı fonksiyonlara sahip proteinlerdir [197]. Korunmuş 20 aminoasit içerirler ki bunun yaklaşık olarak %20'sini glisin oluşturmaktadır. Polipeptidlerin %70'den fazlası rastgele büküm formundadır. 20 aminoasitlik motifte rastgele tekrarlar molekülün ortasında 1 - 4 oranında bulunmaktadır. Hidrofilik ve rastgele büküm yapısı, LEA proteinleri grup1'in kurumakta olan hücrelerin su kaybını önleme fonksiyonunu belirlemektedir.

Grup2: Dehidrin (D-11) olarak bilinirler ve LEA II proteinleri ile bazı LEA IV proteinlerini içerirler. Korunmuş 15 aminoasitlik lizin dizisi EKKGIMDKIKEKLPG olan K segmenti ile karakterize edilirler. K segmentinin putatif amfipatik α helikal yapısı makromoleküllerin yüzeyi ile hidrofobik etkileşim gösterirler [145]. Serin kümelerinin birçok dehidrinde fosforillendiği bulunmuştur [214], ancak fosforilasyonun fizyolojik önemi henüz bilinmemektedir. Grup2 LEA proteininin, dehidrasyon durumunda protein ve membran yapısının korunmasında görev aldığı tahmin edilmektedir [183, 215]. Spesifik dehidrinlerin, plazma membranı [216] ve endomembrandaki [183] lokalizasyonu fonksiyonları ile uyumludur. Soğuk şartlarda bitkilerin direnç kazanmasındaki rollerinden dolayı, dehidrinlerin protektan aktivitesinin olduğu bilinmektedir [217]. Grup2 2 alt gruba ayrılmaktadır.

Grup2a: Soğuğa toleranslı olmayan, geç embriyogeneziste biriken tüm Grup2 proteinlerini içerir. 2 alt ailesi bulunmaktadır. Bunlar; SF1 proteinleri onarımla ilgili olup DNA'nın nükleozom yapısının açılmasıyla ilgili proteinlerdir. SF10 proteinleri ise, DNA'ya bağlanan proteinler ve sitoskeleton proteinlerini içerir. Y motiflerine benzer motif içerirler [191].

Grup2b: Soğuğa toleranslı ve geç embriyoneziste sentezlenmeyen proteinleri içerir. SF3 proteinleri SF1'de olduğu gibi DNA'nın nükleozom yapısının açılmasıyla ilgili proteinler olmakla birlikte ayrıca sitoskeleton ve Ca^{+2} bağlama ve şaperon proteinlerini içerirler [197]. Y motiflerine benzer motif içermezler [184]. Grup2b LEA proteinlerinin aminoasit yüzdelerine bakıldığında Lisin ve Glutamin aminoasitleri bakımından Grup2a'dan daha fazla içerirler. Grup2b'de ise glutamin rezidüleri bol bulunmaktadır [218].

Bazı yazarlar asidik Grup2b LEA proteinlerinin fosforilasyon - bağımlı metal iyon bağlama özelliğinin olduğunu da bulmuşlardır [219] ancak Grup2a Grup2b'nin aksine fosforilasyonsuz metal iyon bağlayıcı özelliği göstermektedirler [220]. Bu durum farklı bir grup özelliği olup bunu üçüncü grup olan Grup2c olarak adlandırılmıştır [184, 221], ve orijinal olarak Grup2 proteinlerini 3 alt gruba ayırmıştır. Fakat daha sonra yapılan analizler orijinal Grup2c'nin Grup2b'yi de içerdiğini göstermiştir. Grup2a dizileri periyodik 3 glisin tekrarı içerirler, Grup2 dizileri ise (özellikle soğuğa tolerans ile ilgili olanlar) birkaç tane periyodik glisin tekrarına sahiptir fakat lisin ve glutamininin periyodik tekrarları daha fazladır.

Grup3: LEAIII proteinlerini ve bazı LEA IV proteinlerini içerir. Korunmuş aminoasit dizisi olan TAQAAKEKAGE ile 11-mer aminoasit tekrarları içerirler [222]. Bu motifi uygun amfilik α -helikal yapısı ile polipeptidlerin dimerizasyonuna izin verebilir. Motif içindeki yüklü aminoasitlerin düzeninin fonksiyonu dehidrasyon koşullarında iyonların birikimine olanak sağlamaktadır [183]. İki alt gruba ayrılır: Grup3a; SF2 proteinleri şaperonlar, tropomiyozin, fosforilasyon ve stres aktin

bağlayıcı proteinleri içerir, Grup3b; SF5 proteinleri nükleer ve DNA'ya bağlanan proteinleri, histonları özellikle H1 histonunu içerir [197].

Grup4: LEA V proteinlerini içerir ve SF7 olarak bilinir. Şaperonları ve kromatinle bağlanmış nükleer proteinleri içerir [197]. Tekrar motifi içermezler fakat iyi korunmuş N terminal domaini içerirler. Bu domain iyon ve membranlar ile etkileşimde olan amfilik α -helikal yapıda olduğu tahmin edilmektedir [173, 223]. Su bağlayan proteinin alternatif fonksiyonu grup 4 pamuk LEA proteini D113'ün C terminalinin rastgele bükümlenmesi temel alınarak tespit edilmiştir [146].

Tablo 1.2: Farklı LEA proteinlerinin farklı isimlendirilmesi [139, 224].

pFam	Bray	Dure
Dehidrin	Grup2	D11
LEA 1	Grup4	D-113
LEA 2		LEA14;D-95
LEA 3		LEA 5;D-73
LEA 4	Grup3; Grup5	D-7; D-29
LEA 5	Grup1	D-19
SMP	Grup6	D-34

Kuruma stresi, tuz stresi, soğuk stresleri gibi biyotik streslerin LEA proteini ekspresyonu ve bitkinin gösterdiği tolerans arasındaki korelasyon pek çok defa tekrar edilmiştir [176, 225]. Ancak sadece Grup2'nin donma zararına karşı LDH gibi davranarak proteinleri koruyabildikleri görülmüştür [226-233]. Sonraki yıllarda kurumaya karşı direnç çalışmaları devam etmiş ve tüm LEA protein gruplarının

LDH, malat dehidrogenaz, fumaraz ve sitrat sentaz gibi hassas enzimlere karşı koruyucu olduğu bulunmuştur [234, 235].

1.4 Dehidrinler

1980'lerde pamuk ve pirinçten izole edilen dehidrin geni [163, 169] son yıllarda birçok farklı bitki çeşidinde klonlanmıştır [236] Hidrofilinler olarak bilinselerde [237] genel olarak yaygın isimleri *dehidrin* olup dehidrasyon koşullarında indüklenen proteinler anlamını karşılamaktadır [198]. Bu kullanım ekspresyon özelliğinden daha ziyade spesifik dizi homolojisi gösteren tüm proteinlerdendir.

Dehidrin geni, konstitütif olarak sentezlenen[238, 239] ancak özellikle tuz, kuruma ve soğuk stresinde, ekzogenous absisik asit uygulamasında, hücrel dehidrasyon durumlarında [240-242], stomaların kapanma modifikasyonlarında [243], osmotik dengede [244] gen ekspresyonunun düzenlenmesinde [141] görev alan LEA grubu protein ailesi üyesidir [138, 145, 245-247]. Bunların yanı sıra yaralanma durumlarında da indüklendiği bazı örneklerde tespit edilmiştir [241, 248-250] ancak ABA ile muamele edilen dehidrin genlerinin bitkilerde sentezlenmediği görülmüştür [251-253]. ABA tarafından kontrol edilmeyen dehidrinler, *Pisum sativum* [254], *Arabidopsis thaliana* [255] ve *Hordeum vulgare* [256-258] bitkilerinde çalışılmıştır.

Fonksiyonu bilinen hiçbir protein ya da enzim ile benzerlik göstermeyen dehidrinlerin büyüklüğü 82 - 648 aminoasit arasında değişir ve çözülmüş proteinlerin %1 - 5'i oranında birikebilirler [138]. Proteininin büyüklüğü 9 - 200 kDa arasında değiştiği ilk olarak pirinç Wsi724 [259], Wcs200 proteinlerinde SDS ile tespit edilmiştir [138, 260, 261]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda 5.3 - 66.3 kDa (ortalama 18.3 kDa) arasında değiştiği tespit edilmiştir [197]. Moleküler ağırlığındaki bu farklılığın nedeninin tekrarlı K segmentlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nötrden baziğe yakın olduğu tahmin edilen dehidrin proteinlerinin

elektrik yükü; %7, 58, 35, izoelektrik noktası sırasıyla 6 dan küçük, 6 ile 9 arasında ve 9 dan büyüktür [197]. Dehidrin aminoasit kompozisyonuna bakıldığında spesifik savunma fonksiyonu için özellikle hücrel dehidrasyon koşullarında görev alan yüksek oranda yüklü ve polar rezidülerden oluştuğu görülmüştür [200, 262]. Sistein ve triptofan aminoasitlerinden yoksundurlar ve yüksek oranda yüklü ve apolar aminoasitler içerirler ve bu durum dehidrin polipeptitlerinin hidropatik alanlarda son derece hidrofilik davranmasını sağlar. Bu polar yüklü aminoasit düzenine ilişkin çalışmalar, yüksek sıcaklıklarda çözünebilen dehidrinlerin özelliklerini açıklar. Bu karakteristik özelliklerinden dolayı, LEA proteinlerinin dehidrasyon koşullarında bitki hücrelerini korumada etkili olduğu tahmin edilmektedir [146, 163, 173]. Birçok dehidrin polipeptidi putatif iki parçalı nükleer hedef sinyal sekansı içerirler [263, 264].

Dehidrasyon sürecinde suyun uzaklaşması sonucunda, vakuol, total hücre hacmi ve hücre içi konsantrasyonu artarken turgor kaybolur ve plazmoliz oluşabilir [265]. Benzer şekilde hücrel seviyede oluşan kuruma ve donmayı içeren pek çok çevresel strese [266] bitkiler strese toleranslı olabilmek ve protoplastın kurumasını önlemek amacıyla hücre içindeki tüm seviyelerde görülen bir mekanizmaya sahip oldukları bilinmektedir [267].

Bitkilerdeki savunma mekanizması ve kuruma, donma ve tuzluluğa tolerans arasındaki ilişki çok uzun yıllardır çalışılmaktadır [268] ve birçok çalışma, Grup2 LEA transkriptleri / proteinlerin birikiminin, soğuk iklim, soğuğa uyum, [269, 270] donma / buzlanma, kuruma ve tuzluluğa tolerans ile [140, 271, 272] korelasyon içinde olduğunu kanıtlamıştır [216, 251, 271-278]. Buradan, dehidrinlerin farklı sıcaklık derecelerinde ve çeşitli spesifik stres koşullarında ekspre oldukları sonucuna ulaşılmaktadır [239]. Odunsu bitkilerde ise dehidrin birikimi ve ekspresyonunun, kış aylarında soğuk iklim aşamalarında ve dönemsel geçişlerde ki uyku durumu ile bağlantısı tespit edilmiştir [279-282].

1.4.1 Dehidrinlerin Lokalizasyonu

Dehidrinlerin, nükleusta, sitoplâzma, plazma membranında, mitokondri ve vakuollerde buldukları tespit edilmiştir [171, 216, 261, 277, 283]. Dehidrinlerin enzimatik fonksiyonları bilinmemesine rağmen, birçok yüksek bitkilerde bulunduğu bilinmektedir [198, 284]. Genellikle buz oluşumuna son derece hassas olan ve yaşayabilirliğini kaybetmeksizin (alevron) diğer hücrelerde olduğu gibi düşük sıcaklıklarda zarar görebilen vasküler ve çevresindeki dokularda buldukları gözlenmiştir. Buna ek olarak pek çok durumda hücre içi organellerin endomembranlarının içinde ve etrafında buldukları da görülmüştür [214].

1.4.2 Dehidrinlerin Birikme Koşulları

Dehidrinler bitki dokularında, tohum olgunlaşması ya da çeşitli çevresel stimülatörler tarafından indüklenen osmotik streslerin neden olduğu hücrel dehidrasyonlarda biriktikleri tespit edilmiştir [138].

Dehidrinlerin genel olarak özelliklerine bakıldığında şu şekilde sıralanabilir; stabilizatör olarak hücrel makromoleküllerin denaturasyonunu azaltmada ya da önlemede (şaperon benzeri) [138, 144, 285] ve stres koşulları altında dehidratif bileşenler ile ekspresyonlarının indüklenmesi ile bitkinin yaşam mücadelesinde adaptatif rolünü sağlamada görev alırlar [138] ve hücrelerin dehidrasyona toleranslı olmasına yardımcı olurlar [286]. Bazı dehidrinler düşük sıcaklıkta indüklenirken [238, 269, 273, 287, 288], soğukta indüklenen dehidrinler kurumada indüklenen dehidrinlerden daha fazla sayıda korunmuş tekrarlar içerir [144] soğukta spesifik indüklenen dehidrinlerin fonksiyonu henüz net olarak bilinmemektedir. Ancak deneysel kanıtlar dehidrinin, sitoplazmanın soğuğa maruz kalma sırasında hücre yapısının kararlılığını korumada yardımcı olduğu yönündedir [144]. Ayrıca dehidrasyon ve veya donmaya toleranslı proteinleri ve membranları deterjan ya da ters şaperon aktivitesi ile stabilize ettiklerini göstermişlerdir [138, 144, 289]. Glisince zengin olan dehidrinler hiperosmotik durumlarda hidrofilik proteinlerin birikimi ile adaptasyon özelliklerini korumuşlardır [290].

1.4.3 Dehidrinin Korunmuş Dizi Motifleri

Dehirin, K - S - Y - Φ segmentleri olarak isimlendirilen korunmuş 4 segment içerirler [138]. Dehidrinin yapısal özelliklerini belirlemede görev alan yüksek oranda korunmuş lizince zengin domain olan zorunlu K segmenti (EKKGIMDKIKEKLP), Serin rezidülerince zengin S segmenti (SSSSSSS) ve daha az oranda bulunan Y segmenti (V/T]DEYGNP) ve K segmentinin arasında bulunan polar aminoasitlerce, (glisince, alanin ve proline) zengin olan Φ segmentidir [138, 166, 245]. Dehidrinde, bulunan korunmuş motiflerin miktarı büyük çeşitlilik (82-575 aa) gösterir ve buna göre bir sınıflandırma yapılmaktadır [145, 245].

K segmenti: Tipik olarak 1 - 11 kez tekrarlanır [138, 144, 291] ve tüm dehidrinlerde bu motif korunmuş olarak bulunur. Ancak bazı tek aminoasitlerin değişimi ve yapısal modifikasyonları segment içinde oluşabilir. Örneğin; *Pseudotsuga menziesii* dehidrinlerinde K segmenti aminoasit sekansı ve cDNA fragmentlerinin aminoasit dizisi (Q / E)K(P / A)G(M / L)LDKIK(A / Q)(K / M)(I / L)PG şeklindedir [144, 292]. K segmentlerinin aminoasit dizisinin bilgisayar analizi yardımıyla amfipatik α helix formasyonunun bulunduğu [163] ve ikincil α helikal yapısı halkasal dichroism (CD) spektrumunda %15'in üstünde aminoasit varlığı ile ikincil α helikal yapı formasyonundaki önemini göstermiştir [289]. İlginç olarak, hidrofobik alansız bu protein, hidrofobik etkileşimler gerçekleştirebilmektedir. Bu durum tahminen, hidrofobik etkileşimi için hidrofilik ve hidrofobik özelliklerin kombinasyonu olan amfipatik α heliks gibi, K segmentinin ikincil yapısından kaynaklanmaktadır [138, 144, 291]. Ayrıca bu diziyi içeren sentetik peptid, büyük çeşitlilik gösteren bitkilerde savunma ile ilgili proteinlerin tanınmasında antikor olarak da kullanılmıştır [284].

Swiss Protein veritabanında 92 dehidrin ile yapılan analize göre; her bir pozisyon için temel olarak hidrofobik ya da yüklü pek çok alternatif aminoasit içeren 247 tane K segmenti görülmüştür. Korunmuş 15 aminoasit dizisinden 10 tanesi (IMDKIKEKLP) ya da 12 tanesi (GIMDKIKEKLP) olarak da görülebilir ve K segmenti sınıf A amfipatik α helix olarak görev almaktadır [138]. Sınıf A amfipatik

heliksler, negatif yüklü rezidülerin karşılarında hidrofobik yüz ile ve pozitif yüklü rezidüler ile polar / non-polar ara yüzü polar ve non polar yüzlerinde bulundurmalarıyla ayrılırlar [293].

S segmenti: Bu segment serin rezidüleri içermektedir ve bu alan fosforillenmiş olabilir. Bu durum, mısır RAB17 ve domates TAS14 dehidrinlerinde görülmüştür [264, 294, 295]. S segmentinin fosforilasyonu tahminen, nükleus içinde olur ve translokasyonunu takiben spesifik sinyal iletiminde rol alır [138, 144, 285]. S segmentide korunmuştur ve LHRSGS (4-10) (E / D)₃ şeklinde ilk K segmentinden önce bulunmaktadır. Birçok dehidrin, proteinin merkezinde serin rezidülerinin bulunduğu S segmenti yer alır ve bu segment CK2 ve Ser / Thr protein kinazlar tarafından fosforillendiği [296, 297], nükleus lokalizasyonu ile ilgili sinyaller de [264, 297] nükleer lokalizasyonda fosforilasyon ile sinyal peptidlerine bağlanarak nükleer taşınım da görev aldığı bilinmektedir [138, 145, 245]. Dahası, bu motiflerin Gly / Ser -, Gly / Thr -, Glu / Lys- bakımından zengin rezidülerin amorf alanlarının içine Φ domaini gibi gömülü olarak da bulunduğu görülmüştür [144, 146, 214].

Y segmenti: N terminal ucunda DEYGNP segmentini içeren Y segmenti, 1 - 3 kopya şeklinde bulunur. Swiss Protein veritabanında yapılan 92 dehidrin analizine göre; 76 korunmuş Y segmenti bulunmuştur. Bitki ve bakteriyel şaperonların nükleotit bağlanma alanları ile önemli bir homolojiye sahiptir. [138, 144].

Bu 3 korunmuş dehidrin segmentinin yanı sıra, daha az bulunan, genellikle glisince (%30'dan fazla), threonin ve yüklü aminoasitlerce zengin olan, dehidrinler arasında çeşitlilik gösteren ve rastgele tekrarlar şeklinde bulunan segmente Φ -segmenti denir [144, 298].

1.4.4 Dehidrinlerin Sınıflandırılması

T. J. Close' un dehidrinlerin sınıflandırılmasıyla ilgili yaptığı çalışmada [138], yüksek derecede korunmuş segmentler içerdiğini göstermiştir. Choi [299], segmentlerin önemli ölçüde bir kısıtlamaya neden olduğu ve bu nedenle dehidrin segmentlerinin doğal spesifik yapıya sahip olduğunu belirtmiştir.

Y S K ve Φ segmentlerinin kombinasyonlarına bağlı olarak dehidrinler 5 alt sınıfa ayrılmıştır. Bunlar: Y_nSK_n (35), SK_n (21), K_n (17), Y_nK_n (10), K_nS (7). Şekil 1.3'te segmentlere ait şekiller görülmektedir.

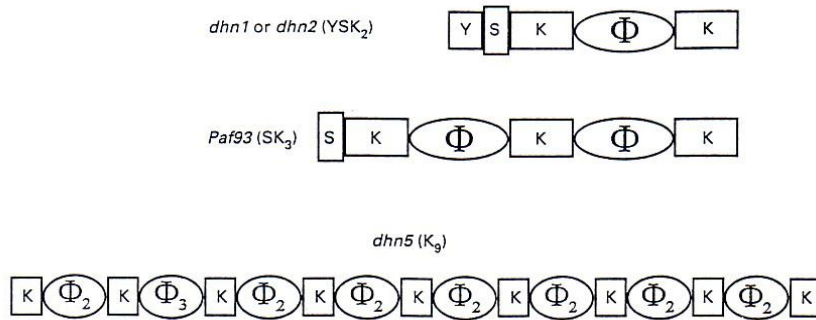
Y_nSK_2 dehidrinleri: Dehidrinler içinde en bol bulunan sınıftır. Y segment miktarı 1 - 3 arasında değişir. 1 tane S, 2 tane K segmenti bulunur. Bunlar kuruma ve ABA (sadece soğuk derecelerde değil) ile indüklenir. Örneğin; buğday dehidrinleri, DHN1, DHN2, DHN3, DHN4, DHN6, DHN9, YSK_2 yapısını içerirler. Bu grup filizlerde, ABA uygulamasında dehidrasyon durumunda sentezleri artarken, hipotermia sırasında içerikleri değişmeden kalır [300]. Hiçbir stres koşulunda vejetatif dokularda sentezlenmezken, gelişme aşamasındaki embriyolarda sentezlenen buğday DHN12 dehidrinide bu sınıfa aittir [301].

K_n dehidrinleri: Bu sınıftaki dehidrinler 2 - 9 adet K segmenti içerirler. Bu asidik ve nötral proteinler soğuk derecelerde, dehidrasyon ve ABA tarafından indüklenirler [138]. Örneğin; böğürtlen K_5 dehidrininin moleküler ağırlığı 60 - 65 kDa olup çiçek tohumlarında düşük sıcaklık koşullarında birikirler [302]. Arpa DHN5B gen ekspresyonunda K_9 dehidrini düşük sıcak uygulamayla indüklenirken, kuruma ve ABA uygulaması ile daha az etkilenirler [294, 303]. Yumuşak buğday proteinlerinden, WCS120 ailesi arpa DHN5 dehidrini ile homologdur. Proteinlerin sentezi özellikle düşük sıcaklıklarda indüklenir ve birikme seviyesi buğdayın donmaya toleransı ile ve diğer tahıllar ile pozitif korelasyon gösterir. WCS120 proteinleri diğer dehidrinlerden sadece glisince zengin TGGTYQQGHTHTT motifin varlığıyla ayrılırlar [261].

SK_n dehidrinleri: Bu sınıf proteinleri, 1 adet S segmenti ve 1 - 3 adet K segmenti içerirler [138]. Bunlar asidik dehidrinler olup, düşük sıcaklıklarda indüklenirler. Örneğin buğdayda 4 °C'de WCOR410 proteinin (SK_n dehidrin) birikme seviyesi sonbahardaki miktarı kışa göre daha düşüktür [216]. Arpa asidik dehidrin DHN8'i kodlayan gen (buğday WCOR410'a homolog) Y_nSK_2 proteinlerine kıyasla düşük sıcaklıklarda çok sentezlenirken, kuruma ve ABA uygulamasında daha az sentezlenirler [300]. Kanada fir dehidrininin kodladığı APgDHN1 geninin sentezi (SK_n dehidrin), vejetatif dokularda, düşük sıcaklıklarda, kuruma, tuzluluk, yaralanma stresi, jasmonate - metil jasmonate uygulamalarında artmaktadır [241].

K_nS dehidrinler: Bu proteinlerin karakteristik özelliği ve diğer dehidrin sınıflarına zıt olarak, K_nS dehidrinlerindeki K segmenti (H/Q)KEG motifi ile başlar (diğerleri EKKG ile başlar). Pirinç Wsi724 ve kabayonca CAS15a, Cas15b dehidrinleri bu sınıfa dâhil olup, dehidratasyon durumlarında ve soğukta indüklendikleri görülmüştür [138, 144].

Y_2Kn dehidrinleri: Bu sınıftaki asidik dehidrinler genellikle 2 adet Y segmenti ve 1 - 2 K segmenti içerirler [138, 144]. Bu grupta vigna DHN1 dehidrini, germinasyon sırasında ve tohum donmasında tolerans gösterirler [278].



Şekil 1.3: Arpa bitkisinde çeşitli dehidrin segmentlerinin gösterilmesi[162, 492]

Bazı proteinler, dehidrinlerin belli bir grubuna katılmazlar. Örneğin kuş otu yaprakları H26 proteini SK_n ve K_nS proteinleri arasında ara protein formudur [138]. Ispanak dehidrini YK₁₁ segment yapısına sahiptir ve K_n-, Y₂K_n-, ve K_nS- sınıflarının bazı özelliklerini gösterir [138, 285].

1.4.5 Dehidrin Geni Çalışılan Bitkiler

Dehidrinler ilk olarak çiçekli bitkilerde bulunmuştur [169, 198] ancak daha sonra yapılan immünolojik çalışmalar, cDNA'nın taranması ve genom kütüphaneleri gibi teknikler ile diğer bitki taksonlarında proteinlerin alglerde, mayalarda ve Cyanobakteriler de bulunduğunu göstermiştir [138, 144, 145, 162, 304]. Örneğin; Gymnospermlerden *Picea glauca*'dan PgDHN [241], *Pinus sylvestris*'den PsDHN [305], *Pinus taeda*'dan PtDHN [306] ve *Pseudotsuga menziesii*'de 3 tane DF65 cDNA'sı [292] çalışılmıştır. Bazı bitki türlerinde ise dehidrinlerin zorunlu segmenti olan K segmentine homolog sentetik polipeptide karşı antikolar kullanılarak çalışmalar yapılmıştır [138, 145, 162, 245, 284, 307]. *Arabidopsis thaliana* dehidrinleri; RAB18, LTI29, LTI30, ve COR47 [291] ve buğday dehidrini WCOR410 [216] rekombinant *E.coli* hücrelerinden izole edilmiştir. *Ricinus communis*'den elde edilen dehidrin benzeri proteinlerin son yıllarda mikoronütrientlerin floem iyon taşıyıcı protein fonksiyonunda olduğu bulunmuştur [308].

Odunsu bitkilerdeki dehidrin birikimine bakıldığında, dönemsel değişiklikler kuruma / uyku dönemi ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Örneğin Yabanmersini bitkisinde dehidrin protein sentezinin, kış aylarında maksimum seviyeye ulaştığı, bahar aylarında ise azaldığı görülmüştür [144, 270, 309-311]. Kısa gün fotoperiyodundaki *Betula pubescens* ve şeftali ağacının yaprak döken ağaçlarında dehidrinin yapraklarını dökmeyen ağaçlardaki transkript seviyesi daha geride kalırken, yapraklarını döken ağaçlar da sentez seviyesinde bir azalma belirlenmiştir [312]. Bazı yaprak döken ağaçlarda dehidrinin kış metabolizmasında da görev aldığı tespit edilmiştir. Şeftali dehidrin (PpDHN1, Y₂K₉) geninden yapılan çalışmalarda soğukta ve ABA ile indüklendiği ve PC60 proteininin kroyoprotektif ve antifriz aktivitesi tespit edilmiştir [279, 313, 314]. Yabanmersininde (*Vaccinium* spp.)

soğuktan sorumlu 3 dehidrin geni karakterize edilmiştir ve bazı farklı genotiplerde soğuk stresi ile orantılı transkript birikimleri de görülmüştür [315-318].

Odunsu bitkilerdeki dehidrinin dehidrasyonun neden olduğu koşullarda [319] şeftali (*Prunus persica*) ve yabanmersininde (*Vaccinium spp.*) dehidrin birikiminin kuruma ile indüklendiğini [312, 319] ve *Citrus unshiu* [320], *Vaccinium spp.* [302, 319, 321, 322], *B. pubescens* [270, 323], *Picea glauca* [241], *Populus euramericana* [324], ve kurumaya ilaveten *Prunus persica* [288, 309] soğuk stresinde de biriktiğini göstermişlerdir. Şeftali'ye sadece ABA [312], *C. unshiu*'ya ise ABA ve NaCl uygulaması [320], *Populus euramericana*'ya NaCl ve PEG 6000 [324] ve beyaz çama ABA ve etefon uygulamasının dehidrin birikimini indüklediği görülmüştür. Beyaz çamda yaralanmadan sonra, jasmonik asit ve metil jasmonat uygulamalarında da dehidrinin indüklendiği görülmüştür [241].

1.4.6 Dehidrinlerin Biyokimyasal Özellikleri

Dehidrinlerin en önemli özelliği, kaynama noktasında bile çözülebilir kalmalarıdır. Daha öncede anlatıldığı gibi yüksek derecelerde çözünebilir kalmalarında önemli olan yüksek oranda glisin içermeleri, hidrofilik olmaları, dönüşümlü aminoasit kompozisyonuna ve polar rezidülerine sahip olmalarıdır. İlk dehidrin dizisi elde edildiğinde, dehidrinlerin, sistein ve triptofan içermediği görülmüştür [138, 198, 245] ancak yapılan pek çok çalışmada polipeptid dizilerinde %25 oranında sistein rezidüsü ve yaklaşık %8.5 oranında 1 - 2 triptofan rezidüsü içerdiği görülmüştür [138, 198, 245]. Bokor Grup2 LEA proteininin globular proteinlerden daha kolay suya bağlanabildiğini göstermiştir [325].

Dehidrinleri, *Escherichia coli* rekombinant ekspresyon teknolojisi ile *Arabidopsis thaliana* dehidrini pürifiye edilerek immunobilize metal afinite kromatografisi çalışmasında dehidrinin kurşun yüklü kolonlara güçlü şekilde bağlandığı görülmüştür [326]. Dehidrinin metal bağlama motifi içermemesine rağmen bu aktiviteyi göstermesinin nedeni; dehidrin proteini içindeki çeşitli yüzey

girişleri pozisyonunda çoklu histidin rezidülerinde koordine olmuş komplekstir [291].

Mısır DHN1’de doğal G50 (a.k.a RAB17, Y₅K₂), börülce DHN1 (Y₂K) ve *Citrus unshiu* DHN CuCor19 (K₃S) gibi çeşitli bitkilerde Circular dichroism (CD) analizi ile dehidrinlerin yapısal olmayan aquaz solusyonlarında ve doğal ancak yapısal olmayan proteinler olduğu tespit edilmiştir [289, 320, 327].

4 adet *Arabidopsis* dehidrini, [LTI29, (SK₃); COR47, (SK₃); RAB18, (Y₂SK₂); LTI30, (K₆)], jel filtrasyonu ve moleküler ağırlığına bağlı ayırma metoduyla moleküler ağırlıkları analiz edilmiştir. Buna göre elde edilen moleküler ağırlıklarının, aminoasit dizilerinden biyoinformatik veritabanları ile hesaplanan monomerik moleküler ağırlıklarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Jel filtrasyonu; şekil ve kütleden etkilendiği için jel filtrasyonu proteinin oligomerizasyonunun kanıtı için çok güvenilir özellikler taşımamaktadır. Gerçekte, *Arabidopsis* dehidrinleri, doğal formları ile karşılaştırıldığında denaturasyon koşulları altındaki moleküler ağırlığı daha düşüktür, buradan elde edilen sonuçlar ışığında dehidrinlerin oligomerik olmadığı da açıktır [291].

Dehidrinler ve hücre dehidrasyonu arasındaki bağlantı çok iyi bilinmesine rağmen spesifik moleküler mekanizmaları henüz net değildir. Sekans özelliklerine dayanarak, dehidrinlerin membran yapısını stabilize etme fonksiyonlarının olduğu ve proteinler üzerinde deterjan ve şaperon benzeri etkilere sahip olduğu düşünülmektedir [138]. Yazarlar, dehidrinlerin lokal su havuzu oluşturarak dehidrate hücrelerde nişasta ve protein degradasyonu için gerekli olan enzimlerin aktivitelerini yönetebildiklerini ve bunların büyük oranda kış döneminde tükettiklerini göstermişlerdir. Bu hipotezi doğrulamak için dehidrasyon koşullarında çalışmalar yapmışlar ve pürifiye edilen dehidrinin α -amilaz kısmından kaynaklandığını kanıtlamışlardır [214]. Koag [172], dehidrinlerin, stres koşullarında K segmentindeki konformasyonel değişiklikler ile hücresel membranları stabilize edebileceği öne sürmüştür. Rinne [270], huş ağacında dehidrinlerin α -amilaz aktivitesi için gerekli

olan suyu tutarak, nişasta yıkım ürünlerini sağladığını ve böylece dehidrasyon zararından hücreleri koruyarak kış zorluklarını iyileştirdiğini öne sürmüştür.

Dehidrinin LDH kryoprotektif mekanizması henüz çok iyi bilinmemektedir ancak Close [144] tarafından önerilen mekanizmada dehidrinin K segmentinin lipid bağlayıcı sınıf A amfipatik α -helikse benzemesinden kaynaklanmaktadır. Bu element lipidler ile ya da kısmen denatüre olmuş LDH'nin hidrofobik parçalarını önleyerek inaktivasyonu ile etkileştirler. Bu sonuçtan, polipeptid içindeki K segmentinin tekrar sayısı ile kryoprotektif özelliği arasında bir korelasyon olduğu beklenmektedir [144]. Dahası, kryoprotektif çalışmalar, donma / erime inaktivasyonuna karşı dehidrinlerin 3 ya da daha az K segmentinin gerekliliğininde göstermektedir. Dehidrinlerin in vitro kryoprotektif aktivitesinin fizyolojik önemi net değildir ancak COR15a geninin *Arabidopsis thaliana*'daki konstitüf sentezinde iklim uymayan (non-acclimated) bitkilerin yapraklarından kloroplast ve protoplastlarının donmaya karşı toleransını etkilemektedir [328]. Wisniewski [288] şeftali dehidrininde antifriz aktivitesini laktat dehidrogenaz kullanarak donma / erime analizi yapmıştır ve bunu takiben şeftali dehidrasyona maruz kaldığı sırada dehidrinlerin protein denaturasyonunu önlediğine dair bilgiler edinmiştir. Ispanak COR85 [329], buğday WSC120 protein ailesi ve mısır DHN1, buğday WSC120, çavdar-ve diğer tahıllarda [330, 331], yaban yasemini [332], şeftali PCA60, limon CuCor19 ve havuçta [333] antifriz proteinleri içerdiği rapor edilmiştir [138, 215, 273, 288, 320].

1.4.7 Post-Translasyonel Modifikasyonlar

Donmayla indüklenen, reaktif oksijen türleri membran zararı ile bağlantılıdır [334] ve hücreler arası buz hücre duvarları ve membran arasındaki adhezyona ve hücrelerin kristalleşmesine (kırılmasına) neden olmaktadır [335]. Buna ek olarak, protein denaturasyonu bitkilerde düşük sıcaklıklarda oluşur [336] ve bu hücre zarının potansiyel bir sonucudur. Bu durumdaki antioksidatif mekanizmaların artması [334], apoplastik alandaki şekerlerin seviyesinin artması [337], moleküler şaperon kodlayan genin indüklenmesi [338], gibi mekanizmaları gerektirir.

Dehidrinlerin, fosforilasyonu ilk kez mısırdaki RAB17 de (YSK₂) rapor edilmiştir [339]. Plana [296] daha sonra in vitro ve in vivo çalışmalarda RAB17'nin S segmentinide içeren fosforillenmiş polipeptidin protein fragmentasyonunu göstermiştir. Serin rezidülerini takip eden 3 asidik aminoasit putatif kazein kinaz 2 alt birimi olarak tanımlanmıştır ve bu sonuçlardan bu dizide mutasyon olduğunda düşük oranda fosfor birleşmesi gözlenmemiştir [340]. Buradan bu S segmentinin önemi iki domates dehidrini TAS14 (YSK₂) [295] ve *C. plantagineum* DSP16 (YSK₂) [341] fosforillenmesiyle daha iyi anlaşılmıştır.

Yabanmersini ve fıstıktan elde edilen dehidrin benzeri proteinlerin post translasyonel modifikasyonu çalışmalarında glikozillendiği bulunmuştur [302, 311].

1.4.8 Dehidrin Gen Sentezi

1985 yılında Guy ve arkadaşları [342] soğuk iklim koşullarında gen ekspresyonunun değiştiğini kanıtlamış ve soğukta indüklenen genlerin yapısı ve donmaya toleranstaki rollerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalarla birlikte soğuk iklimlerde indüklenen pek çok gen karakterize edilmiştir. Bu genlerin çoğunluğunun protein kodladığı ve enzim aktivitelerinin olduğu bilinmemektedir. Örneğin: *Arabidopsis thaliana* FAD8 geni [343] yağ asit desaturazını kodlar ve lipit kompozisyonunun değişmesi ile donma toleransı ile bağlantılıdır. Soğuktan sorumlu genlerin kodladığı moleküler şaperonlardan ısıpanak hsp70 geni [344] ve *Brassica napus* hsp90 genlerinde [345] donmayla indüklenen denaturasyona karşı proteinlerin stabilizasyonu ve donma toleransı arasında bir bağlantı belirlemiştir. Soğuktan sorumlu genler çeşitli sinyal iletilicileri ve düzenleyici proteinleri de kodlamaktadırlar. Bu proteinler; MAP kinaz [346], MAP kinaz kinaz kinaz [347], kalmodulin ile ilgili protein [348] ve 14-3-3 proteinleridir [349]. Bu proteinler, donma toleransı için gerekli olan proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek donma ile ilgili genlerin ekspresyonlarını da kontrol edebilirler.

Abiotik stresten sorumlu olan genlerin aktive olma konusuna açıklık getirmek için Nordin [350], düşük sıcaklıkta sorumlu promotör elementlerinin (LTRE= Low Temperature Responsive Element) karakterize edilmesini önermiştir. Bu elementlerin varlığının akabinde delesyon analizi ile TACCGACAT dizisi ile 9 nükleotitlik element oldukları ve düşük sıcaklıklarda, kuruma ve yüksek tuzluluktan sorumlu oldukları görülmüştür [255]. Bu düşük sıcaklık ve dehidrasyondan sorumlu element (LTRE / DRE= dehydration responsive element) diğer soğuk ve kurumadan sorumlu genlerin promotörlerinde olduğu gibi birçok dehidrin promotörlerinde de bulunmaktadır [351]. *Arabidopsis* proteinlerinden küçük bir aile olan CBF1, CBF2 ve CBF3 (CRT binding protein) ya da DREB1B, DREB1C, ve DREB1A (DRE binding protein), DRE / CRT / LTRE elementi taşıyan gen, ekspresyonlarında düşük sıcaklıkla indüklenerek aktive olurlar [142]. DRE / CRT / LTRE elementleri aynı zamanda kurumaya spesifik transkripsiyon faktörleri (DREB2A ve DREB2B) ile ilgili bir aile olarak da tanımlanmaktadır [352].

Pek çok düşük sıcaklık ve kurumadan sorumlu olan dehidrinler, dışarıdan ABA uygulamasıyla indüklenirler. Bu nedenle, dehidrin promotörlerinin cis elementlerini içermeleri beklenmektedir. Aslında, bu dizi tamamen ABA sorumlu elementlere benzerler (ABREs) ve bu promotörler korunmuş C / TACGTGGC dizisi ile birlikte bulundurlar. ABRE'ler pek çok genlerin ekspresyonunda ABA düzenleyici olarak görev aldıkları gibi [353, 354], pek çok transkripsiyon faktöründe ve bazik lösin fermuarı domain motifi içeren ABRE'ye de bağlanırlar [353]. İki bZIP proteininin, ABRE elementlerine spesifik olarak bağlandığı son yıllarda bulunmuştur [355]. Bu genler, AREB1 ve AREB2'yi kodlarlar ve kuruma, tuzluluk ve ABA'dan sorumludurlar. Diğer bir çalışmada, küçük bir aile olan ABRE bağlayan faktörler (ABFs) *Arabidopsis*'de karakterize edilmiştir [301]. ABF'ler, düşük sıcaklığı da içeren pek çok farklı çevresel stresten sorumludurlar, bu nedenle farklı stres sorumlu metabolik yollarda buldukları da tahmin edilmektedir.

ABA, dehidrin gen ekspresyonunun indüklenmesinde önemli bir indükleyici olup, tohum gelişimi sırasında, embriyo olgunlaşmasında, kurumaya karşı tolerans ve dormansinin korunması ve indüklenmesinde önemli bir role sahiptir. ABRE

elementleride tohumda dehidrin genlerinin ekspresyonunun gelişimsel kontrolü için gereklidir [356].

Bazı dehidrinler, farklı doku ve hücre tipi dışında, bitkilerde stressiz durumlarda da ekspre oldukları görülmüştür [239, 357]. Birçok Grup2 LEA proteinlerinin, vasküler dokularda daha çok biriktiği gözlenmiştir [239, 273, 295]. Diğer spesifik hücre tiplerinde hücrenel lokalizasyon modeli dışında (örneğin; polen keseleri, savunma hücreleri ve kök meristemleri) bu proteinlerin, osmotik regülatör olarak davranabildikleri tahmin edilmektedir ve böylece hücrelerde su attraktantları gibi işlev görerek yüksek osmolarite durumlarında birikmektedirler [239]. Yüksek sıcaklıklarda dehidrin seviyesinin azalması, kış uykusundaki güçsüzlük kaybı ile orantılıdır [282, 315, 317, 358]. Dokuya spesifik olabilen dehidrin genleri birbirini etkileyen ve farklı sayıda birbiriyle ilişkili sinyal metabolik yolları tarafından kontrol edilirler [236].

Transkripsiyonel kontrol aşamasında rol alan transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır ki bunlar genel olarak dehidrasyon sinyal iletim kaskadında pek çok transkripsiyon faktörleri etkilidir. Bunlar: ABA sorumlu elementler: ABRE [359], dehidrasyondan sorumlu elementler (DRE) [360, 361], SAP domaini: (SAF-A/B, Acinus, PIAS) [362, 363], Myb ve heliks loop heliks domainleri [364-366], homedomain proteinleri [367-370], RNA sinyal molekülü olarak ekstrem stres koşullarında, kodlanmayan RNA'lar (çeşitli küçük RNA çeşitleri) retroelement ve transpozonlara benzer fonksiyonlara sahip olarak stres tetikleyici değişikliklerdeki gen ekspresyonunu düzenlerler [371]. Dehidrasyonda aktive olan genler ve uygun çözücülerin birikimi birçok çeşitte dehidrasyon savunmasından sorumlu genlerin birikimine yol açar. Bunlar uygun çözücüler olup genelde çözünebilir düşük moleküler ağırlıklıdır, non-toksiktirler ve hücrenel metabolizmaya karışmazlar. Bitkiler arasında uygun çözücülerin kimyasal yapısı farklıdır ve genel olarak betainleri içerirler (betainlerde glisin betain, aminoasit - özellikle prolin - polyoller ve mannitol, sorbitol, sukroz ve trenolas gibi şekerleri içerirler). Bu bileşenler, solusyon içinde tanecik sayısını arttırarak dehidrasyon sırasında turgorun sürmesine yardımcı olurlar. Ayrıca membranların akışkanlığını yönlendirebilirler ve proteinleri

hidratta tutarak yapılarının kararlı olmasını sağlarlar [372]. Dehidrasyona tolerans mekanizmalarında rol alan gen ailesi LEA'dır ve dehidrasyon koşulları ile ekspresyonları orantılıdır [373]. Reaktif oksijen (ROI) aracılara bakıldığında dehidrasyon gibi bazı streslerde reaktif oksijen aracılarının konsantrasyonu artmaktadır [374]. ROI; membranların, proteinlerin, DNA ve RNA'nın telafisiz zarar görmesine neden olur. Ancak bitki hücrelerinin canlılığı için ROI düşük konsantrasyonlardadır ve bazı ROI molekülleri kendi stres savunmasında temel sinyal bileşenlerindedir [375, 376]. ROI konsantrasyonu arttığında dehidrasyon koşullarında, meydana gelen zararı önler ve yaşam mücadelelerini sürdürmede önemli rol oynar. ROI birikimi ise intrinsik antioksidant sistemler - superoksidaz dismutaz, peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri içerir - tarafından kontrol edilirler [377].

1.4.9 Abiotik Stres Durumlarındaki Fonksiyonları

1.4.9.1 Düşük Sıcaklıkta Dehidrinin Rolü

Bitkilerin soğuk kış aylarında sıcaklıkla mücadelesi, düşük / dondurucu olmayan sıcaklıklardaki yeteneklerine bağlıdır. Bitkilerin, - 5 ve - 30°C gibi düşük sıcaklıklara dayanabilmesi için bir hazırlığı ya da mücadelesi olmalıdır [378]. Çok sayıdaki fizyolojik değişiklik, şeker seviyesinin, çözünmüş proteinlerin, prolin, organik asit ve dehidrininde dahil olduğu çeşitli proteinlerin artmasını, membran lipid kompozisyonunun artmasını ve membran lipid kompozisyonunun değişmesini indükler [379] ve böylece bitkilerin zor kış şartlarına uyumu sağlar.

Dehidrinlerden, arpa dehidrini ayrıntılı olarak çalışılmıştır [272, 300, 301] ve pek çoğunun ekspresyonu dehidrasyon ve ABA ile düzenlenirken, diğerleri soğukta indüklendiği ve embriyoya spesifik olduğu bulunmuştur. Arpa DHN5 ve DHN8 örnekte ve kontrollerde soğuk derecelerde indüklenmektedirler ve bu genlerin ekspresyon seviyeleri o alandaki soğukluk derecesine büyük oranda bağlıdır. Sıcaklık orijinine bağlı olarak dehidrin birikimi sezona bağlı olarak değişmektedir, kışın yüksek olmakla birlikte, gelişme periyodunda düşüktür [202, 380]. 34 - 36 kDa

moleküler ağırlığına sahip 2 fotoperiyotta indüklenen dehidrin benzeri proteinler, huş ağacında (*Betula pubescens*) tanımlanmıştır ve kısa günlerde hücrel dehidrasyon ile dehidrin benzeri proteinleri arasında bir korelasyon bulunmuştur [323].

1.4.9.2 Su Eksikliğinde Dehidrinin Rolü

Kurumayla indüklenen dehidrinler pek çok bitkide tanımlanmıştır ve dehidrinlerin birikimi su eksikliğinde ve ABA seviyesinin azalması gibi durumlarda yüksektir.

Arabidopsis'te ABA ile muamelesinde indüklenen RAB18 geninin birikimi su eksikliğinde yüksek seviyededir [381] ve *Sorghum*'da 21 kDa'luk dehidrin geni kurumaya toleranslı olan ve olmayan bitkilerde su eksikliği durumunda tespit edilmiştir. [239]. Stresle indüklenmiş 2 dehidrin geninde HaDHN1 (Y₃SK₂) ve HaDHN2 (SK₂) gece ve gündüz döngüsünün ekspresyona etkisi su eksikliği temel alınarak ayçiçeği bitkisinin yapraklarında da çalışılmıştır [382].

Titrek kavak (*Populus tremula*) bitkisinde 43 kDa'luk dehidrin temel olarak kökte bulunmuştur fakat gövdede sadece su eksikliğinde indüklenmektedir. 31 ve 33 kDa'luk 2 dehidrinin ekspresyonunun nem ve ABA uygulamasından sorumlu oldukları ilk olduğu zamanda önce filizlerde ve sonrasında hem kökte hem filizlerde ekspre oldukları görülmüştür [383]. Yabanimersininde kurumadan sorumlu olan dehidrinler, kök ve yaprağa göre gövde de daha fazla birikirler. Ancak, dehidrinlerin birikimi, su içeriğine bağlı olarak öncelikle etkili indükleyiciler olduğunda birikirler [384].

Turgor kaybolması ve hücre hacmindeki değişiklikler, hücrel seviyede su kaybından ve farklı çevresel streslerden dolayı oluşur. Oluşan bir ya da birkaç değişiklik, kritik proteinlerden birbirine yakın olanlarda konformasyon değişikliğine neden olur ve bu durum hücre - duvar plazma membranında değişikliklere neden

olarak kanalları aktive edebilirler [385] ve sinyal iletim mekanizmasını tetikleyerek gen ekspresyonunu indükler [174]. Bu nedenle birkaç farklı stres, aynı ya da farklı iletim mekanizmasıyla da tetiklenebilir.

Dehidrasyondaki bitkilerde ABA seviyesi artışı, su eksikliğinden etkilenmeye karşı savunma için gerekli çoklu genlerin ekspresyonunu indükler. ABA, stomaların kapanmasını tetikler ve solunum aracılığıyla su kaybı azalır. ABA biyosentetik metabolik yolu karatenoid metabolik yolunun yan dalıdır ve ABA biyosentetik metabolik yolundaki çeşitli enzimlerin dehidrasyonu ile düzenlenir [386].

1.4.9.3 Tuzluluk Durumunda Dehidrinin Rolü

Besinsel dengesizlikten ve ortam şartlarından kaynaklanabilen tuzluluk, bitkilerde hücrel dehidrasyon boyunca ozmoisten, toksik iyonların birikiminden dolayı zarar verebilir. Hücrel dehidrasyon, dıştan etkilenen düşük potansiyelden dolayıda yükselebilir, topraktaki ozmotik potansiyel azaldığında eksik iyon dengesi artar ya da yaprakların hücreler arası boşluklarındaki yüksek tuzlar, symplastların dehidrasyonuna neden olur. Tuzluluktan sorumlu LEA genleri, yüksek ozmotik stresten kaynaklanan hücrel dehidrasyon koşullarından dolayı etkilenerek indüklenirler ki bu durum tuzluluktan sorumlu olmalarını anlamak açısından dehidrinler ile ilgili pek çok çalışmaya açıklık getirmiştir [295, 387].

1.5 DNA Kütüphaneleri

Hücrenin genetik materyali iki formda bulunan nükleik asitlerden oluşur: birincisi kromozomlarda bulunan deoksiribonükleik asit (DNA) ve diğeri hücrelerde protein sentezinde görev alan ve DNA tarafından yönlendirilen genetik bilgi ile görev alan ribonükleik asittir (RNA). RNA'dan geri (reverse) transkriptaz enzimi ile elde edilen DNA, orijinal genleri içeren bilgi ve protein kodlama bilgisini içerir. Elde edilen DNA, RNA'nın bir kopyasıdır ve buna cDNA denir. cDNA'lar, ökaryotik gen dizilerinde genellikle çok sayıda bulunan intron ve kodlanmayan dizi

(UTR=Untranslated Region) içermezler. Bu nedenle genleri karakterize etmek ve tanımlamak daha kolaydır.

İki kütüphane arasındaki farklara bakıldığında Şekil 1.4'te görüldüğü gibi; cDNA kütüphaneleri, mRNA molekülünden yapıldığı için sadece transkribe olan genleri içerirken, genomik DNA kütüphanesi ise gen dizileri dışında gen olmayan DNA dizilerini de içerirler. Çünkü total genomik DNA'nın sadece %1 - 5 lik kısmını genler oluşturmaktadır. Ancak gDNA kütüphanesi cDNA kütüphanesinde olmayan enhancer ve promotör gibi düzenleyici dizileri de içermektedir. Bu nedenle çalışmanın amacına göre kütüphane çeşidini belirlemek önemlidir.

1.5.1 DNA Kütüphanelerinin Oluşturulması

Hücre içinde bulunan genomik DNA'dan tüm genlerin tanımlanması hızlı bir proses olup, genom hücre içine klonlandığında bağımsız olarak replike olabilecek küçük dizilerin oluşturduğu kütüphaneye bölünür. Kütüphane içinde elde edilen klonların analizi, o geni bağımsız olarak elde edip tüm genomdan klonlama prosesine göre daha hızlıdır.

1.5.2 Genomik DNA Kütüphanesi

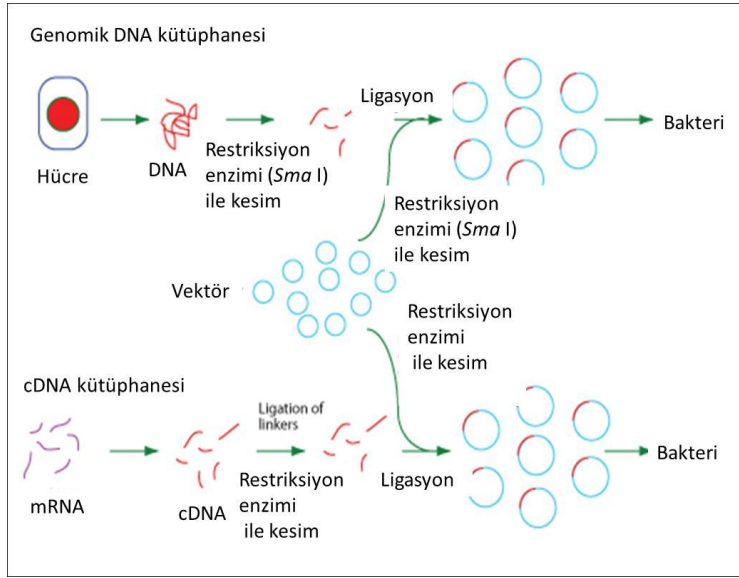
Genomik DNA (gDNA) molekülleri oldukça büyüktür bu nedenle küçük fragmentler şeklinde ancak klonlanabilmektedir. İzole edilen total gDNA klonlanacak vektörün klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzimleri ile rastgele kesilerek vektöre klonlaması suretiyle elde edilen rastgele DNA fragmentlerinin elde edilmesiyle oluşan kütüphanedir.

1.5.3 cDNA Kütüphanesi

Hedef dokudan izole edilen mRNA ya da total RNA'nın cDNA'ya dönüştürülerek, elde edilen tek iplikli cDNA'nın DNA polimerazın Klenow aktivitesi

ile ikinci ipliğin sentezlenerek vektör klonlanmasıyla elde edilen rastgele cDNA fragmentlerinden oluşan kütüphanedir. Tek bir gen dizisinin gerekli olduğu durumlarda cDNA kütüphanesi, daha kompleks olan genomik kütüphaneden daha kolay ve işlevseldir. Ancak hedef dokudan oluşturulan cDNA kütüphanesinin taranmasında genin sentezlendiği yer önemlidir.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması gDNA kütüphanesine oranla daha kolaydır. Çünkü cDNA dizisi tek iplikli mRNA dizisidir ve kısadır. Bu nedenle vektör ile ligasyon aşaması ve transformasyonu kolaydır. Diğer bir avantajı ise intron içermediğinden dolayı genin açık okuma çerçevesinin tespit edilmesi mümkündür. Ayrıca gDNA içinde bulunabilecek bir iki kopyaya karşılık cDNA kütüphanesi, hedef gen açısından daha fazla kopya içerir [388, 389].



Şekil 1.4: gDNA ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

1.6 Çalışmanın Amacı

Periyodisite zeytin bitkisinin verimi ve kalitesi açısından son derece sınırlayıcı bir durumdur. Verimli bir yılı verimsiz bir yılın takip etmesiyle meydana gelen bu fizyolojik olayın, genetik temelli olduğu, ancak hasat zamanının

geciktirilmesi ve ürün toplama şartları gibi dış etkenlerden de etkilendiği tespit edilmiştir. Zeytin meyvesi Nisan ayında çiçeklenmeye başlar ve meyve oluşumu Haziran ayının sonlarına doğru görülür. Meyve olgunlaşması Kasım ayında maksimum olurken bazı bölgelerde ağacın durumuna göre Aralık ayına kadar ertelenmektedir. Zeytin meyvesi, drupa tipi meyvedir ve her dönem yeşil olan, farklı derecelerde ve çeşitlere göre farklılık gösteren periyodisiteye sahiptir. Zeytin meyvesi, genel olarak yağlık ve sofralık olarak değerlendirilirken, yağ eldesinden sonra kalan meyve posasından da pirina olarak yararlanılmaktadır. İnsanoğlu zeytinin meyvesinin yanı sıra zeytinyağından kozmetik sanayide ve tıp alanında da yüzyıllardır faydalanmaktadır. Zeytinyağı, zeytin meyvesinden doğal yollarla, hiçbir kimyasal ile müdahale edilmeden elde edilen zeytin meyvesinin öz suyudur.

Zeytinin genç fazının uzun zaman almasından dolayı zeytin doku kültürü çalışmaları oldukça sınırlıdır. Aynı zamanda birçok açıdan önemli bir bitki olmasından dolayı transgenik çalışmalarda etik izin açısından sınırlamalar bulunmaktadır. Ancak son yıllarda zeytin ile ilgili çalışmalar hız kazanmış olup, zeytin genom projesinin başlamasına doğru önemli adımlar atılmaktadır. Pek çok bitkide gen kütüphaneleri yapılarak, spesifik genler çalışılmıştır. Ancak zeytinde henüz bir yaprak ve bir meyve kütüphanesi bulunmaktadır [390]. Bu çalışmada ise periyodisite takip edilerek, Temmuz ve Kasım aylarını takiben “var – yok” yıllarında 5 farklı dokudan örnekleme yapılarak kütüphaneler elde edildi. Özellikle periyodisiteyi takip eden yıllarda örnekleme yapılması bu çalışmanın özgün değerlerinden birisidir. DNA kütüphanelerinin yapılması, genom dizilenmesi ve spesifik genlerin analizinin yapılması açısından pek çok kolaylık sağlamaktadır. Bu çalışma kapsamında gDNA kütüphanelerinin yapılması zeytin genom projesine yönelik önemli bir adımdır. DNA kütüphaneleri, genomik ve cDNA kütüphaneleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Genomik DNA kütüphaneleri intronları da içeren total DNA örneğinden yapılırken, cDNA kütüphaneleri sadece sentezlenen ve ‘ekzon’ olarak adlandırılan anlamlı bölgeleri içeren RNA örneklerinden yapılmaktadır. Bu nedenle gen karakterizasyonu ve fonksiyonel gen analizleri için cDNA kütüphaneleri daha anlamlıdır.

Bu çalışmada, periyodisite gösteren Ayvalık zeytin çeşidinde meyvenin ilk oluşum aşaması olan Temmuz ve hasat zamanı olan Kasım aylarında “var – yok” yılları takip edilerek 4 adet yaprak cDNA kütüphanesi, zeytin genomunun anlaşılması ve referans olması açısından bir tane yaprak gDNA kütüphanesi ve bir tane Ekim “var yılı” meyve örneğine ait meyve kütüphanesinin oluşturulması amaçlanmaktadır.

Elde edilen her kütüphaneden 100 koloni rastgele seçilerek dizilenmiş ve bu dizilerin biyoinformatik analizi yapılmıştır. Bu dizilere uygun primerler dizayn edilerek anlık gösterimli PCR (Real-time PCR) ile ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

Kasım “var yılı” kütüphanesinden *Avicennia marina* ile homoloji gösteren dehidrin geni seçilerek aşağıdaki gibi çalışma planı yapılmıştır.

- Bu genin çeşitli programlar kullanılarak biyoinformatik analizinin yapılması
- Dehidrin proteininin ökaryotik ve prokaryotik sistemlerde sentezletilerek, protein özelliklerinin belirlenmesi
- LDH enzimine karşı kryoprotektif aktivitesinin belirlenmesi
- Anlık gösterimli PCR (Real-time PCR) ile Temmuz ayı “var yılı” ve “yok yılı” yapraklarda, Kasım ayı “var yılı” ve “yok yılı” yapraklarda, Ekim ayı meyvelerde ve ayrıca 8 farklı zeytin dokusunda (tomurcuk, sürgün, “var yılı” çiçek” “yok yılı” çiçek, ham meyve, olgun meyve, yaprak, meyve sapı), ekspresyon profiline bakılması
- İtron analizinin yapılması
- Promotör dizisinin belirlenmesi
- Genom içindeki kopya sayısının belirlenmesi
- 28 zeytin çeşiti arasında polimorfizminin belirlenmesi.

2. MATERİYAL VE METOT

2.1 MATERİYAL

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıkta olup Sigma, Fermentas, Qiagen, Roche, NEB, Clontech, Invitrogen, Stratagene, Applichem gibi firmalardan yerli aracı kuruluşlar yoluyla elde edildi.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, otoklava uygun çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer tüm malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C'de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edildi.

Otoklavlanarak steril edilmeye uygun olmayan solusyonlar için 0.22 µm'lik enjektör ucu filtre kullanıldı.

2.1.3 DEPC'li Suyun Hazırlanması

RNA örneklerini nükleazlardan korumak için izolasyonda kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında DEPC'li su kullanıldı. DEPC'li suyun hazırlanmasında 0.1 mL DEPC 100 mL saf suya eklendi ve alt üst edildi. 37 °C'de 12 saat bekletildikten sonra otoklav yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.1.4 Örneklerin Toplanması

Ayvalık zeytin çeşidine (*Olea europaea* cv. Ayvalık) ait yaprak ve meyve örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonuna ait Gömeç'teki zeytinlikten sıvı azot içinde toplandı ve çalışma yapılincaya kadar - 80 °C dolabında saklandı.

Tablo 2.1: Örneklerin toplandığı andaki hava sıcaklığı ve ortalama nem miktarı

Tarih	Örnek	Ortalama Sıcaklık	Ortalama Nem
15.04.2010	“Var yılı” yaprak	15 °C	%61
	“Yok yılı” yaprak		
14.05.2010	“Var yılı” yaprak	21 °C	%47
	“Yok yılı” yaprak		
17.06.2010	“Var yılı” yaprak	26 °C	%60
	“Yok yılı” yaprak		
15.07.2010	“Var yılı” yaprak	26 °C	%61
	“Yok yılı” yaprak		
19.08.2010	“Var yılı” yaprak	27 °C	%55
	“Yok yılı” yaprak		
19.10.2010	“Var yılı” yaprak	20 °C	%71
	“Yok yılı” yaprak		
22.11.2010	“Var yılı” yaprak	7 °C	%84
	“Yok yılı” yaprak		
20.12.2010	“Var yılı” yaprak	11 °C	%72
	“Yok yılı” yaprak		
19.01.2011	“Var yılı” yaprak	2 °C	%81
	“Yok yılı” yaprak		
21.02.2011	“Var yılı” yaprak	6 °C	%63
	“Yok yılı” yaprak		
16.03.2011	“Var yılı” yaprak	12 °C	%41
	“Yok yılı” yaprak		

Tablo 2.2: Polimorfizm ve SSR deneylerinde kullanılan zeytin çeşitlerinin özellikleri

Sıra	Zeytin kultivar ismi	Yetiştirildiği bölge	Değerlendirme şekli
1	Ayvalık	Ege Bölgesinde Ayvalık, Edremit, Burhaniye ve Havran	Yağlık
2	Memeli	İzmir'de Menemen ve Kemalpaşa ,Manisa'da Turgutlu	Yağlık
3	Kiraz	Akhisar'ın Zeytinli ova beldesindeki zeytinliklerde	Yağlık ve sofralık
4	Uslu	Manisa'nın Akhisar ilçesi ve civarındaki zeytinliklerde görülür.	Sofralık
5	Memecik	İzmir, Aydın, Manisa, Muğla ve Denizli illeri dışında Antalya, Sinop ve Kahramanmaraş illerinde de rastlanmaktadır.	Yağlık ve sofralık
6	Çakır	İzmir ve civarındaki eski zeytinliklerde görülür.	Yağlık
7	UB1	Ayvalık zeytin çeşidinden elde edilmiş Balıkesir yöresinde yetişen klonlar	Yağlık ve sofralık
8	UB3		
9	UB10		
10	0108		
11	0308		
12	Ub8		
13	Hojiblanca	İspanya	Yağlık ve sofralık
14	Verdial	İspanya	Yağlık ve sofralık
15	Karamürsel-su	Kocaeli'nin Karamürsel, Gebze, Gölcük ilçelerindeki ve Bursa ili civarındaki zeytinliklerde yetişen bir çeşittir.	Sofralık

Tablo 2.2 (Devam)

16	Erkence	İzmir ve civarındaki eski zeytinliklerdeki plantasyonların tamamını oluşturmaktadır.	Yağlık
17	Samanlı	Marmara bölgesi çeşitlerinden olan Samanlı Bursa'nın İznik, Kocaeli'nin Karamürsel ilçeleri ve civarındaki zeytinliklerde yetiştirilmektedir.	Yağlık ve sofralık
18	Negral	İspanya	Yağlık
19	Ascolona	İtalya	Sofralık
20	İzmir sofralık	İzmir ve civarındaki zeytinliklerde yaygın olan bir çeşittir.	Sofralık
21	Cormona	İspanya	Yağlık
22	Arbequine	İspanya	Yağlık
23	Leço (Leccino)	İtalya	Yağlık ve sofralık
24	Domat	Akhisar ve civarında yaygındır.	Sofralık
25	Hermandos	İspanya	Yağlık
26	Gemlik	Marmara bölgesinde Mudanya, Gemlik, Orhangazi ve İznik yöresinde yetiştir	Sofralık
27	Picual	İspanya	Yağlık
28	Koroneiki		
29	Tavşan yüreği	Muğla ve civarında yayılım göstermektedir.	Yağlık ve sofralık

2.1.5 Kullanılan Bakteri Suşlarının İsimleri ve Genotipleri

DH5 α : F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ -[391, 392].

DH10B: F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻[393].

E. coli GM2163 Genotipi: F- dam-13::Tn9 (Cam^r) dcm-6 hsdR2 (rk-mk+) leuB6 hisG4 thi-1 aracC14 lacy1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Strr) fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1(M0099, (Fermentas, Vilnius, Lithuania).

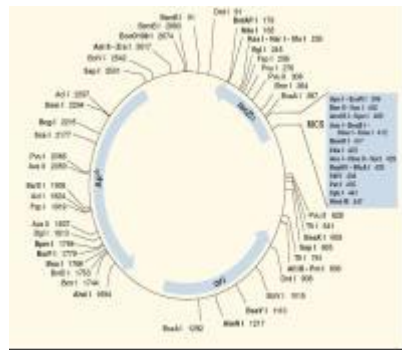
E. coli BL21 (DE3): F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) [394].

E. coli BL21 (DE3) pLysS: F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3) pLysS(cm^R) [394].

E. coli BL21-CodonPlus-RIL b *E. coli* B F-ompT hsdS(rB-mB-) dcm+ Tetrgal lendA Hte [argU ileY leuW Camr] [394].

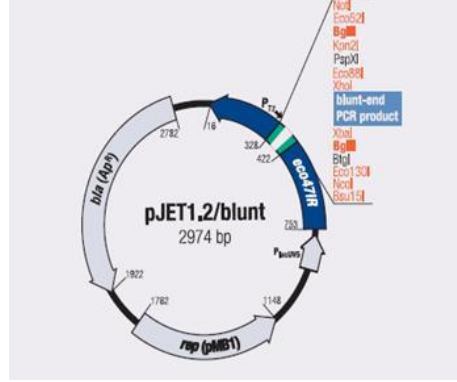
2.1.6 Çalışmada Kullanılan Tüm Vektörlerin İsimleri ve Şekilleri

gDNA kütüphanesinin yapımında kullanılan pUC19 (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Kat. No: SD0401) şekli aşağıda görülmektedir.



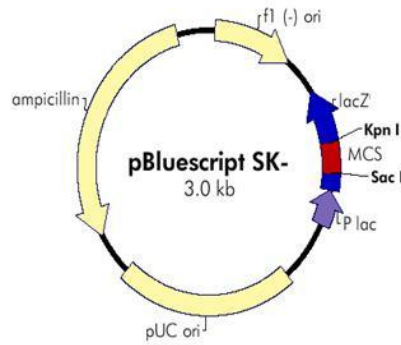
Şekil 2.5: pUC19 klonlama vektörü

cDNA kütüphanesinin yapımında kullanılan pJET1.2 küt uçlu klonlama vektörü (Fermentas Vilnius, Lithuania, Kat. No: K1231 Clone Jet TM PCR Cloning Kit) şekli aşağıda görülmektedir.



Şekil 2.6: pJET1.2 klonlama vektörü

Dehidrin genin alt klonlanmasında kullanılan pBluescript klonlama vektörü (PCR Script cloning kit Stratagene Kat. No: #211188) şekli aşağıda görülmektedir.



Şekil 2.7 : pBluescript SK klonlama vektörü

Dehidrin geninin mayda ekspresyonunun da kullanılan pPICZ α B Easy Select TM *Pichia* ekspresyon kiti (Invitrogen, Vilnius, CA, Kat. No: K1740-01) şekli aşağıda görülmektedir.

2.2 METOD

2.2.1 Bakteriyel ve Maya ile İlgili Çalışmalar

2.2.1.1 Bakteriyel Teknikleri

2.2.1.1.1 Antibiyotikler

Ampisilin ve Zeozin 100 mg / mL stok çözelti şeklinde hazırlandı ve 0.22 µm steril filtre ile steril edilerek – 20 °C’de saklandı.

2.2.1.1.2 Bakteriyel Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Ampisilinli LB Agar’ın Hazırlanması: 5 g Tripton, 2.5 g yeast agar, 2.5 g NaCl 200 mL saf suda çözüldü. 3.75 g agar agar eklendi ve 500 mL’ye tamamlanıp otoklavlandı. 37 °C’ye geldiğinde ampisilin (50 mg / mL) eklenerek petrilere döküldü.

Ampisilinli LB’nin Hazırlanması: 5 g Tripton, 2.5 g yeast agar, 2.5 g NaCl 500 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı. 37 °C’ye geldiğinde ampisilin (50 mg / mL) eklenerek petrilere döküldü.

Ampisilinsiz LB’nin Hazırlanması: 5 g Tripton, 2.5 g yeast agar, 2.5 g NaCl 500 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.

2.2.1.1.3 Bakteri Kompetan Hücresinin Hazırlanması

E.coli GM 2163 (Fermentas, Vilnius, Litvanya) kompetan hücresi 1 mL’lik sıvı LB ile çözüldü. Ampisilinsiz LB ile hazırlanmış petriye tek koloni düşecek şekilde ekildi ve 1 gece 200 rpm’de 37 °C çalkalandı. 10 mL sıvı LB’ye (ampisilinsiz) tek koloniden alınıp inokülasyon yapılarak 37 °C’de 1 gece 2000

rpm'de çalkalayıcı etüvde bekletildi. 100 mL Ampisilinsiz LB içine ve ön kültürden 5 mL inoküle edildi. 37 °C'de çalkalayıcı etüvde inkübe edildi ve belirli aralıklarla spektrofotometre de absorbans değeri ölçülerek, (OD₆₀₀) dalga boyunda 0.4 absorbans değerine ulaşması beklendi. Daha sonraki işlemlere buzda devam edildi. 100 mL bakteri solusyonu 50 mL'lik 2 falkona alındı. 3000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. 25 mL soğuk 0.1 M CaCl₂ eklendi ve yavaşça çözüldü. 25 dakika buzda bekletildi. Tekrar 3000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant uzaklaştırıldı. 10 mL 0.1 M CaCl₂ ile tekrar çözüldü. 1 - 4 saat arası buzda bekletildi. Kompetan hücreler sonra kullanılmak üzere 10 mL steril %40'luk gliserol eklenerek karıştırıldı ve önceden buzda bekletilmiş ependorflara aktarılarak - 80 °C'de saklandı [395].

2.2.1.1.4 Bakteriyel Transformasyon

Kompetan hücreler - 80 °C dolabından çıkarıldı ve buza alındı. 5 µL ligasyon ürünü ile kompetan hücre (50 µL) aynı tüpe alındı. 20 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için 42 °C'de 90 saniye tutuldu. Hemen buza alınarak burada 2 dakika bekletildi. Falkona 950 µL ampisilinsiz LB eklenerek 37 °C'de 1.5 saat çalkalandı. Bulanıklaşma gözlemlendi. Tek koloni düşecek şekilde LB (+amp) içeren petriye 200 µL ekildi. Ampisilin / IPTG / X-Gal içeren petrilere elde edilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu için, 100 µg / mL ampisilin içeren sıvı LB kültürlerine inoküle edildi ve yaklaşık 12 saat çalkalamalı etüvde inkübe edildi.

2.2.1.1.5 Plazmit DNA izolasyonu (Küçük ölçekte- Miniprep)

Petrilere büyüyen koloniler numaralandırılarak sıvı ampisilinli LB 'ye inoküle edildi. 37 °C'de 1 gece 13 000 rpm'de büyümesi sağlandı. Gene Jet™ plazmid Miniprep (K0501, Fermentas, Vilnius, Lithuania) protokolüne uygun şekilde izole edildi. 4 adet ependorfa 1 µL olacak şekilde plazmitler aktarıldı. 5 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. 250 µL resuspanسیون solusyonu eklenerek 1 tüp olacak şekilde birleştirilerek çözüldü. 250 µL lizis solusyonu eklenerek alt üst edildi. 350 µL nötralizasyon solusyonu eklenerek hemen alt üst edildi (bu basamakta hızlı olmak önemlidir). 5 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant alınıp kolona

aktarıldı. 1 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. 500 µL yıkama solusyonu eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı. 50 µL saf su ile elusyon yapılarak plazmit izolasyonu tamamlandı.

2.2.1.1.6 Plazmit Stoklarının Hazırlanması

Büyüyen plazmitlerden 1.5 µL'lik ependorflara 150 µL gliserol ve 850 µL plazmitlerden alınarak stok hazırlandı. - 80 °C'de saklandı.

2.2.1.2 Maya İle İlgili Teknikler

2.2.1.2.1 Tamponların Hazırlanması

YPDS + Zeozin Agar Plate Hazırlanması (100 mL) için; 1 g yeast extract, 2 g pepton, 18.2 g sorbitol (0.1 M), 90 mL saf suda çözülüp, otoklavlandı. Soğuyunca üzerine; 10 mL 10X dekstroz 100 µL 100 mg / mL zeozin eklendi. Petrilere döküldü.

YPD Medyum Hazırlanması (100 mL) için; 1 g yeast extract, 2 g pepton, 90 mL saf suda çözüldü, otoklavlandı. Soğuyunca üzerine 10 mL 10X dekstroz ve 2 g agar eklendi.

MG Besiyerinin Hazırlanması için; 35 mL saf su, 5 mL YNB, 5 mL 10X methanol, 5 mL EDTA, 100 µL biotin eklendi, otoklavlandı.

2.2.1.2.2 Maya Kompetan Hücresinin Hazırlanması

10 mL YPD içine tek koloni *Pichia pastoris* ekildi ve 28 - 30 °C'de 1 gece 2500 -3000 x g'de çalkalandı. Kültür (OD₆₀₀) dalga boyunda 0.1 - 0.2 absorbans değerine ulaştığında 1 mL alındı ve 10 mL'lik YPD'ye aktarıldı. 28 - 30 °C'de 1 gece 200 - 300 rpm'de (OD₆₀₀) dalga boyunda 0.6 - 1.0 absorbans değerine ulaşınca kadar çalkalandı. 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. 10 mL solusyon I (Invitrogen, Vilnius, CA, EasySelect™ *Pichia* Expression Kit Kat. No: K1740-01) ile çözüldü. 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.

Supernatant uzaklaştırıldı. Pellet 1 mL solusyon I ile tekrar çözüldü ve 50 - 200 µL kompetanlar hücreleri 1.5 mL'lik ependorflara aktararak - 80 °C'de stoklandı.

2.2.1.2.3 Mayaya Transformasyon

50 µL X-33 kompetan *Pichia pastoris* hücresi oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 5 µL (~3 mg) linerize vektör ve dehidrin hücreleri eklendi. 1 mL solusyon II (PEG solusyonu (150 mL) eklendi. 2 saniye vortex yapıldı. 1.5 saat 33 °C'de su banyosunda inkübe edildi. 15 dakika aralıklarla 1 - 2 saniyelik vortex yapıldı. 42 °C'de 14 dakika ısı şoku yapıldı. 525 µL olacak şekilde 2 tüpe ayrıldı. Herbir tüpe 1'er mL YPD medyum eklendi. 30 °C'de 1 saat inkübe edildi (çalkalama yok). 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletleri 500 µL solusyon III'te çözümlenerek birleştirildi. 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 100 - 150 µL solusyon III'te çözüldü. YPDS agar platalere yayıldı ve 30 °C'de 48 - 72 saat bekletildi.

2.2.1.2.4 Plazmit DNA izolasyonu (Büyük ölçekte – Maksiprep)

200 mL'lik kültür 50 mL'lik 4 falkona paylaştırıldı ve 15 dakika 4000 x g'de 4 °C'de santrifüj edildi. Falkonun birine 10 mL solusyon A (50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA) eklenerek pellet çözüldü. Çözülen pellet diğer falkonlara aktararak tek tüpte birleştirildi ve 5 mL solusyon A tekrar boş falkonlardan geçirilerek en son 10 mL lik falkona aktarıldı ve 15 mL solusyon B (200 mM NaOH, %1 SDS) eklendi. 30 saniye yavaşça alt üst edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve 15 mL solusyon C (3 M potasyum asetat $KC_2H_3O_2$ (pH 5.5) eklenerek 30 saniye yavaşça alt üst edildi. 10 dakika buzda bekletildi ve otoklavlanmış tülbent ile yeni 50 mL lik bir falkona süzüldü. 10 dakika 4000 x g'de 4 °C'de santrifüj edildi. Supernatant 2 steril 50 mL lik falkona ayrıldı (~ 20 mL). Üzerlerine 22 mL solusyon F (izopropanol) eklendi ve 20 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı, tüpler peçeteye ters çevrilerek kurutuldu. Pelletlerin her birine 700'er µL %70'lik soğuk etanol eklenerek çözüldü. Toplam 1.4 mL stok elde edildi. Bu çözelti 1.5 mL'lik ependorflara alındı ve 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve tekrar 1 mL etanol ile yıkandı. 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve tüpler peçeteye ters çevrilerek kurutuldu.

Pelleti 700 µL solusyon D (10 mM tris - HCl (pH 7.5), 1mM EDTA) ile çözüldü. 5 dakika 14 000 g'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatantı steril 1.5 mL'lik ependorfa alıp üzerine 10 µL RNaz A (10 mg / mL 50 U) ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. 700 µL solusyon E (1.6 M NaCl, %13 PEG 8000) eklendi 1 - 2 saniye vortex yapıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 10 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. 3 defa 1 mL %70'lik etanol ile yıkandı. 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. 15 dakika alkolün uçması sağlandı. Etanol iyice uzaklaşınca 50 µL saf su ile çözüldü. pPICZαB vektörünün miktar tayini için; 0.5 µL vektör %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.2.2 DNA İle İlgili Teknikler

2.2.2.1 gDNA İzolasyonu ile İlgili Teknikleri

2.2.2.1.1 Zeytin gDNA İzolasyonu

gDNA izolasyonu için Dellaporta ve arkadaşları [396] tarafından geliştirilen metot modifiye edilerek kullanıldı. İzolasyon yapılıncaya kadar -80 °C dolabında saklanan yaprak örnekleri havanda sıvı azotla toz haline getirildikten sonra ependorf tüpünün yaklaşık 200 µL'lik seviyesine gelecek kadar dolduruldu. Sıvı azot uçar uçmaz 600 µL ekstraksiyon tamponu (33.6 g Üre, 5 mL NaCl, 4 mL Tris-HCl, 3.2 mL EDTA, 8 mL SDS) eklendi. Üzerine 500 µL fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklendi ve 5 dakika alt üst edildi. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril bir tüpe aktarıldı. Süpernatant hacmi kadar 3M sodyum asetat (pH 5.2) eklendi. 1 süpernatant hacmi kadar oda sıcaklığındaki izopropanol eklendi ve alt üst edildi. 1 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan çökelti 500 µL TE (10 mM, pH 8) ile çözüldü. 5 µL RNAaz A (10 mg / mL) eklendi. 30 dakika 37 °C'de inkübe edilerek ribosomal RNA'nın uzaklaştırılması sağlandı. Sonra tekrar 55 µL 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ve 1 mL etanol (%95'lik) eklendi. - 20 °C'de 30 dakika veya - 80 °C'de 10 dakika bekletildi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra kalan çökelti %70'lik etanol ile yıkandı. 12000 rpm'de 2 dakika tekrar santrifüj edildi. Oluşan çökeltiden

etanol dikkatlice uzaklaştırılıp çökeltideki alkolün tamamen uçması için 15 - 20 dakika kağıt havlu üzerinde bekletildi ve 50 µL'lik TE içerisinde çözülerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.2.2.1.2 Maya gDNA İzolasyonu

5 mL YPD içindeki koloniler 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. 1 mL saf suda pellet yıkandı. 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. 500 µL liziz tamponu (100 mM Tris - HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, %1 SDS, eklendi ve pellet çözüldü. 700 µL kadar cam boncuklar eklendi ve 2 dakika vortex yapıldı. 10 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı yeni ependorfa alındı ve 8 mg / mL'lik *RNaseA*'dan 20 µL eklendi. 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. 275 µL 7 M amonyum asetat (pH 7) eklendi. 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi, 5 dakika buzda bekletildi ve 500 µL kloroform eklendi. Vortex yapıldı ve ardından 2 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant steril bir tüpe alındı ve üzerine 1 mL izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve ardından 5 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Pellet %70'lik etanol ile yıkanıp, kurutuldu. 50 µL saf suda çözüldü

2.2.2.2 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Zeytin gDNA örneklerini gözlemek için %0.8'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 0.4 g agaroz tartıldı ve 50 mL 0.5X TBE (1 litre için; 54 g Tris-base, 27.5 g borik asit, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8) tamponu içinde mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 45 - 50 °C'ye soğuduktan sonra içerisine 2 µL (0.5 µg / mL) etidyum bromür ilave edilerek, önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra taraklar çekilerek örnek yükleme kuyucukları oluşturuldu. Elektroferez tankına yerleştirilen kasetin üzerini kaplayıncaya kadar 0.5X TBE tamponu eklendi. 5 µL gDNA ve 1 µL yükleme boyası ile örnekler yüklendi ve 120 voltaj verilerek 45 dakika yürütüldü. UV transillüminatörde gözlemlendi ve fotoğrafı çekildi [397].

2.2.2.3 gDNA'nın Temizleme Basamakları

2.2.2.3.1 Kit ile gDNA Temizleme Aşaması

Nucleon phytopure plant DNA ekstraksiyon (Kat. No: RPN8510, Manchester, UK) kiti kullanılarak gDNA pürifikasyonu işlemi şu şekilde yapıldı; 10 µL'lik gDNA örneği üzerine 600 µL tampon 1, 200 µL tampon 2 ve 500 µL soğuk kloroform, 100 µL silika süspansiyon (600 µL TE de 0.25 g çözülerek elde edildi). Oda sıcaklığında 10 dakika çalkalandı ve 1300 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice yeni steril tüpe aktarıldı.

StrataPrep PCR Pürifikasyon kiti (Stratagene, Kat. No: 211190, USA) ile aşağıdaki şekilde pürifiye edildi. PCR reaksiyonlarının hepsi bir ependorfta toplandı ve eşit hacimde DNA bağlama solusyonu eklendi (180 µL). Elde edilen karışım kolonlara aktarıldı. 1 dakika 14 000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı. 750 µL yıkama tamponundan eklendi. 1 dakika 14 000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım uzaklaştırıldı. 1 dakika 14 000 rpm'de santrifüj edildi. 2 - 3 dakika etanol'ün uçması için bekletildi. Kolon steril 1.5 µL'lik ependorflara alındı. 50 µL elusyon tamponu eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1 dakika 14 000 rpm'de santrifüj edildi.

2.2.2.3.2 gDNA'nın İzopropanol İle Saflaştırılması

İzole edilen gDNA örneklerinin üzerine 450 µL soğuk izopropanol eklendi ve hafifçe alt üst edildi. 4000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet %70'lik etanol ile yıkandı ve supernatant atıldı. 15 dakika kurutuldu ve 20 µL TE içinde çözüldü.

2.2.2.3.3 gDNA'nın Etanol ile Saflaştırılması

İzole edilen gDNA örneklerinin üzerine 3 M NaAc eklenip alt üst edildi ve %100 etanol eklendi ve - 80°C'de 10 dakika bekletildi. 10 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve 1 mL %70'lik etanol eklendi ve 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. Alkolün tamamen uçması

sağlandıktan sonra 50 µL TE ile çözüldü. Elde edilen gDNA örnekleri jelde yürütüldü ve nanodrop ile miktarları şu şekilde ölçüldü;

- Pürifiye edilmemiş DNA örneğinin miktarı: 157.7 ng / µL
- Nucleopuron ile saflaştırılmış DNA örneğinin miktarı: 152.1 ng / µL
- Etanol ile pürifiye edilen DNA örneğinin miktarı: 182.1 ng / µL

2.2.2.3.4 Genome Walker İçin gDNA Saflaştırılması

Her bir tüpe 95 µL fenol eklendi, 5 - 10 saniye vortex yapıldı. Oda sıcaklığında spin yapılarak fazların ayrılması sağlandı. Supernatant alınarak 1.5 mL'lik steril ependorflara transfer edildi. Her bir tüpe 95 µL kloroform eklendi. 5 - 10 saniye vortex yapıldı. Oda sıcaklığında spin yapılarak fazların ayrılması sağlandı. Supernatant alınarak 1.5 mL'lik steril ependorflara transfer edildi. Her bir tüpe 190 µL (2 hacim) soğuk %95'lik etanol, 9.5 µL (1 / 10 hacim) 3M NaOAc ve 20 µg glikojen eklendi. 5 - 10 saniye vortex yapıldı. 14 000 rpm'de 15 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve pellet 100 µL lik %80'lik etanol ile yıkandı. 14 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve pellet kurutuldu. 20 µL TE (10 / 0.1 pH 7.5) ile sulandırıldı. 5 - 10 saniye vortex yapıldı. 1 µL'si %0.6'lık jelde yürütüldü.

2.2.2.3.5 Küt Uçlu Yapma Basamağı

10 µL pürifiye PCR ürünü, 1 µL 10 mM dNTP karışımı, 3 µL 10X polishing (küt uçlu yapma) tamponu, 1 µL *Pfu* DNA polimeraz enzimi ile karıştırıldı. 20 µL mineral yağı karışımının üzerine eklendi. 30 dakika 72 °C'de bekletildi. Kullanana kadar +4'te saklandı. Ligasyon için gerekli olan örneğin miktarını belirlemek için 1 µL örnek %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü.

Linerize dehidrin ve pPICZαB vektörünün miktar tayini için; 75 µL (3 tüpte birleştirilmiş linerize dehidrin), 75 µL soğuk 3M NaAc (pH 5.5) oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 225 µL %100'lük soğuk etanol ile - 80 °C'de 20 dakika bekletildi. 14 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. 3 defa soğuk %70'lik etanol ile

yıkandı. Her yıkamada 14 000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. 21 µL saf su ile çözüldü.

2.2.2.4 Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Protokolü

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile önerilen tamponlar kullanılarak 50 µl toplam hacimde 37°C’de en az 2saat inkübe edilerek kesim yapıldı. İki farklı enzimle aynı anda kesim yapıldığı durumlarda da iki enzimle aynı anda kesim yapılmasını sağlayan tamponlar kullanıldı. Kesim sonuçları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenerek değerlendirildi.

2.2.2.4.1 Genome Walker için Kesim Protokolü

Farklı metotlarla pürifiye edilmiş gDNA örneklerinin 5 µL’lik miktarları (~ 750 ng / µL) Genome walker Clontech (638904) kit protokolüne uygun olarak *DraI* restriksiyon enzimi ile aşağıdaki şartlarda kesildi.

Tablo 2.3: Farklı metotlarla pürifiye edilmiş gDNA örneklerinin *DraI* enzimi ile kesim protokolü (1.Pürifiye edilmemiş gDNA, 2. Nucleopuron ile saflaştırılmış gDNA, 3. Etanol ile saflaştırılmış gDNA ve kontrol DNA)

gDNA		<i>DraI</i> enzimi	Tampon	Su
1	3.4 µL	1.6 µL	2 µL	13 µL
2	2.8 µL	1.6 µL	2 µL	13.6 µL
3	3.4 µL	1.6 µL	2 µL	13 µL
4	5 µL	1.6 µL	2 µL	11.4 µL

Tablo 2.2’de belirtilen miktarlarda hazırlanan kesimler 37 °C’de 1 gece bekletildi %0.8’lik agaroz jelde yürütüldü. Bundan sonraki denemelerde en iyi kesilen gDNA örneğinin etanol ile pürifiye edilen olduğuna karar verildi ve onunla devam edildi. İkinci basamak olan 5 farklı restriksiyon enzimleri ile (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *StuI*) aşağıdaki şekilde kesildi.

14 µL gDNA (0.1 µg / µL), 8 µL enzim (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *StuI*), 10 µL tampon ve 68 µL saf su ile 37 °C’de bir gece bekletildi ve 5 µL örnek %0.6’lık agaroz jelde yürütüldü.

2.2.2.5 Primer Tasarımı

gDNA’dan elde edilen klonların dizilenmesi ile elde edilen dizilerden genlere spesifik primer dizaynı PRIMER3 programı [398] kullanılarak yapıldı. Primer sıcaklığı normal şartlarda 59 - 61 °C aralığında ve 26 nükleotit uzunluğunda Tablo 3.8’te görüldüğü gibi dizayn edildi.

Genome walker kiti primerleri, 26 - 30 nükleotit uzunluğunda, %40 - 60 GC içeriği olmasına, primer sıcaklığının 67 °C olmasına dikkat edilerek Tablo 3.29’da görüldüğü gibi dizayn edildi.

Alicator pLATE51 primerleri ise, kit içeriğinde verilen vektör dizisine ilave olarak dehidrin geninin ORF’una göre ilk ATG ve sonlandırma kodonu TAA’ya göre primerler Tablo 3.29’da görüldüğü gibi PRIMER3 programı [398] ile dizayn edildi.

2.2.2.6 Ligasyon

PCR ürünleri, gDNA örnekleri, cDNA örnekleri kullanılacak olan vektörlere ait protokolda belirtildiği şekliyle genel olarak 20 µL toplam hacim olacak şekilde, 1 µl pGEM-T vektör (50 ng), 15 µL insert 2 µL 10 x T4 ligaz tamponu (Promega) ve 1 µl T4 DNA ligaz (Promega) +4 °C’de bir gece inkübe edildi.

Alicator pLATE51 vektörüne liagasyon basamağ şu şekilde yapıldı; 2 µL 5X LIC tamponu, 1 PCR ürünleri. T4 DNA polimeraz (1u / µL), 1 µL saf su, 6 µL PCR ürünü oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. 0.5 M EDTA’dan 0.6 µL eklendi. 1 µL pLATE51 vektörü eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendi.

2.2.2.7 PCR Basamağı

DNA ve cDNA örneğinden 3 µL kalıp kullanılarak Tablo 3.29'da görülen çoğaltma primerleri ile 1 döngü; 94 °C'de 5 dakika, 35 döngü; 94 °C'de 1 dakika, 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika, 1 döngü; 72'de 1 dakika koşullarında PCR yapıldı ve %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.2.2.7.1 Koloni PCR

DH10B kompetan hücrelerine aktarılan hücrelerden petride elde edilen koloniler kalıp olarak kullanılarak 2.5 µL tampon (10X), 1.5 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL DMSO, 2.5 µL dNTP (2.5 mM her biri için), 0.4 µL T3 primeri (10 µM), 0.4 µL T7 primeri (10 µM), 0.5 µL enzim (5U), 18.1 µL saf su ve 1 µL koloni (koloniye pipet ucunun değdirilmesi ile elde edilmiştir) ile PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

2.2.2.7.2 Genome Walker İçin PCR Basamağı

Restriksiyon enzimleri (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *StuI*) ile kesilen ve pürifiye edilen gDNA örneklerinden 1 µL kalıp kullanılarak aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

40 µL saf su, 5 µL 10X advantage 2 PCR tamponu, 1 µL dNTP, 1 µL AP1 primeri (10 µM), 1 µL advantage 2 polimeraz karışımı (50X), 1 µL kalıp, 1 µL gen spesifik primeri ile 94 °C'de 25 saniye bir döngü, 72 °C'de 3 dakika, 94 °C'de 25 saniye, 67 °C'de 3 dakika, 32 döngü, 67 °C'de 7 dakika bir döngü koşullarında PCR yapıldı.

1 µL PCR1 ürünü, 49 µL saf su ile sulandırılıp 1 µL olacak şekilde kullanıldı. PCR1 reaksiyon bileşenlerinin aynısı 94 °C'de 25 saniye bir döngü, 72 °C'de 3 dakika 5 döngü, 94 °C'de 25 saniye, 67 °C'de 3 dakika 20 döngü, 67 °C'de 7 dakika bir döngü koşullarında PCR2 basamağı yapıldı.

2.2.2.7.3 TAIL-PCR Protokolü

TAIL PCR, bilinen dizilere yakın olan DNA dizilerinin belirlenmesi için oldukça kullanışlı bir metottür. TAILPCR'da 3 ardışık reaksiyonda 3 tane gen spesifik primer ve düşük Tm sıcaklığına sahip AD (arbitrary degenerate) primerleri kullanıldı.

2.2.2.7.4 TAIL PCR1 Basamağı

2.5 µL NH₄SO₄ 10X PCR tamponu, 1.5 µL MgCl₂, 0.4 µL 10 mM dNTP 1 µL DMSO, 1 µL DHN1 primeri, 5 µL AD primeri, 2 µL gDNA (20 ng), 0.5 µL Taq DNA Polimeraz, 10.1 µL saf su ile 1 döngü; 92 °C'de 3 dakika, 95 °C'de 1 dakika, 5 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 25 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 15 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 44 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 72 °C'de 5 dakika koşullarında PCR yapıldı. (Tüm bileşenler Fermentas, Vilnius, Lithuania'dan temin edilmiştir)

TAIL PCR1 ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılmadan 1 µL TAIL PCR1 ürününe, 39 µL saf su ilave edilerek 1 / 40 oranında seyreltildi. Her AD primer için ayrı reaksiyon kuruldu.

2.2.2.7.5 TAIL PCR2 Basamağı

2.5 µL NH₄SO₄ 10X PCR tamponu, 1.5 µL MgCl₂, 0.4 µL 10 mM dNTP, 1 µL DMSO, 1 µL DHN2 primeri, 5 µL AD primeri, 1 µL 1 / 49 seyreltilen TAIL PCR1 ürünü, 0.5 µL Taq DNA Polimeraz, 11.1 µL saf su ile 12 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 45 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 72 °C'de 5 dakika koşullarında PCR yapıldı. (Tüm bileşenler Fermentas, Vilnius, Lithuania'dan temin edilmiştir).

2.2.2.7.6 TAIL PCR3 Basamağı

TAIL PCR2 ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılmadan 1 µL TAIL PCR2 ürününe, 9 µL saf su ilave edilerek 1 / 40 oranında seyreltildi. Her AD primer için ayrı reaksiyon kuruldu.

5 µL NH₄SO₄ 10X PCR tamponu, 3 µL MgCl₂, 0.8 µL 10 mM dNTP, 2 µL DMSO, 2 µL DHN3 primeri, 10 µL AD primeri, 1 µL 1/10 seyreltilen TAIL PCR2 ürünü, 1 µL Taq DNA Polimeraz, 25.2 µL saf su ile 20 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 45 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 72 °C'de 5 dakika koşullarında PCR yapıldı. (Tüm bileşenler Fermentas, Vilnius, Lithuania'dan temin edilmiştir)

2.2.2.8 Southern Blot Deneyleri

2.2.2.8.1 Radyoaktif Prob ile Yapılan Southern Blot Deneyleri

2.2.2.8.2 Radyoaktif prob ile Southern Blot için gDNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

gDNA kalıbından ~ 20.4 ng/ µL alındı, 5 µL *EcoRI* ve 8 µL *EcoRV*, 50 µl BSA, 50 µL tampon ile son hacim 200 µL olacak şekilde kesim reaksiyonu kuruldu ve 3 saat 37 °C'de inkübe edilen örneklere 5 µL enzim eklenerek bir gece bekletildi. Tüm kesim ürünü jelde yürütüldü.

2.2.2.8.3 Southern Blot için Gerekli Olan Tamponların Hazırlanması

50X Denhertz Tamponunun Hazırlanması; 1 g ficol 400, 1 g BSA, 1 g PVP, 100 mL olacak şekilde saf suyla tamamlanarak filtre edildi ve - 20 °C'de saklandı.

20X SSC Tamponunun Hazırlanması; 175.3 g NaCl, 88.2 g Na₃C₆H₅O₇ , 1 litre olacak şekilde saf suyla tamamlandı.

Denaturasyon Tamponunun Hazırlanması; 87.7 g NaCl, 20.0 g NaOH, 1 litre olacak şekilde saf suyla tamamlandı.

Nötralizasyon Tamponunun Hazırlanması; 87.7 g NaCl, 60.6 g tris, 2 mL 500 mM EDTA, 43.25 mL HCl, 1 litre olacak şekilde saf suyla tamamlandı.

Hibridizasyon Tamponunun Hazırlanması; 1.5 mL 20X SSC, 2 mL 50X denhertz, 200 µL %10 SDS, 16.3 mL saf suyla tamamlandı.

Yıkama Tamponunun Hazırlanması; 100 mL 20X SSC, 10 mL %10 SDS, 9890 mL saf suyla tamamlandı.

Salmon Sperm DNA'sının Hazırlanması; 10 mg / mL TE (pH 8.0) içerisinde çözüldü ve ~ 600 bp de sonikasyon yapılarak ve otoklavlandı.

Sıyırma Tamponunun Hazırlanması; 22.5 mL HCl (%36), 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

2.2.2.8.4 Southern Blot Düzeneginin Hazırlanması

Jelin yıkanma basamakları için örneklerin yürütüldüğü jel bir tepsiye alındı ve üzerine 200 mL HCl eklenip 15 dakika çalkalandı. Jel saf su ile yıkandı ve üzerine 200 mL denaturasyon tamponu eklenip 12 dakika çalkalandı. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. İkinci yıkamadan sonra saf su ile yıkandı ve 200 mL nötralizasyon tamponu eklenerek 12 dakika 2 kez çalkalandı.

Tepsinin hazırlanması için kromatografi kağıtları (Whatman 3 mm) 7 - 10cm olacak şekilde kesildi. Steril bir tepsiye agaroz jel kaseti ters çevrilerek kondu. Onun üzerine kaplayacak şekilde ve kağıtların ucunun tepsiye eklenecek tampona değmesi sağlanacak şekilde 4 kat, 26 cm uzunluğunda 10 cm eninde Whatman kağıtları ile kaplandı. 400 mL 20X SSC tamponu eklendi ve kromatografi kağıtlarının ıslanması sağlandı. Bu aşamada balon kalmamasına dikkat edildi ve üzeri plastik bir merdane ile düzlendi. Kağıtların üzerine önce jel (jelin kenarı kesildi) ve üzerine membran koyuldu ve en üstte 7 - 10cm ölçülerinde kesilen kromatografi kağıtları eklendi. SSC tampon eklendi ve balon oluşumunu engellemek için tekrar düzlendi. Üzerine ağırlık

yapması için kağıt ve ağırlık kondu. SSC tamponu tekrar eklendi. Ertesi gün üzerindeki ağırlıklar alınarak membranın kenarı kesildi ve kurutma kağıdının arasına konarak + 80 °C’de 2 saat bekletildi.

2.2.2.8.5 Probun Jelden Kazanılması ve Miktar Tayini

Prob PCR ürünleri %1’lik TAE içeren agaroz jele yüklendi. 90 voltajda 40 dakika yürütüldükten sonra jelden kesildi ve (Qiagen Hilden, Germany) jel ekstraksiyon kiti ile jelden pürifiye edildi. Nanodrop cihazı ile dehidrin prob miktarı 57.1 ng / µL olarak ölçüldü.

2.2.2.8.6 Probun Hazırlanması

Hibridizasyon tüpünün içine yürütülen DNA örnekleri iç yüzeye bakacak şekilde membran yerleştirildi. Hibridizasyon tamponu eklendi ve + 64 °C’de dönerek 1 saat inkübe edildi.

Prob için işaretlenecek DNA örneğinden 5 µL (100ng / µL), 2 µL primer karışımı, 1 µL P³² dCTP (0.37 MBq / 10 µC) eklendi. 10 dakika 37 °C’de inkübe edildi. 90 µL TE tampon eklenerek hacmi 100 µL tamamlandı. Sephadex50 kolonu eklendi. 3 dakika 2500 x g’de santrifüj edildi. Elue edilen prob yeni tüpe aktarıldı. 500 µL salmon sperm DNA’sı (2.5 mg / mL stok) eklendi. Prob karışımı 95 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerinde bekletildi.

2.2.2.8.7 Hibridizasyon

Prob karışımı hibridizasyon şişesine eklendi ve 12 - 16 saat dönerek inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.8.8 Blotun Yıkanması

Hibridizasyon solusyonu dikkatlice lavaboya döküldü. Blot 2 defa 5'er dakika 65 °C'de 2X SSC / %0.1 SDS ile yıkandı (150 - 200 mL her yıkama için) ve aynı tampon ile 20 dakika 60 °C'de çalkalandı. Membran plastik bir poşete sarıldı.

2.2.2.8.9 Filmin Hazırlanması

Paketlenen membran DNA kısmı kasetin içine gelecek şekilde kasete yerleştirildi ve üzerine Fujifilm Super RX X-Ray film yerleştirildi. - 80 °C'de 2 - 15 gün bekletildi. Film 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.

2.2.2.8.10 Non-Radyoaktif Prob ile Southern Blot Deneyleri

2.2.2.8.11 Radyoaktif Olmayan Prob ile Southern Blot için gDNA Örneklerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Ayvalık zeytin çeşidinden izole edilen genomik DNA örneği nanodrop ile ölçüldü (39.7 ng / µL). Buna göre restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu gDNA kalıbından ~ 10 µg / µL alındı, 4 µL *EcoRI* ve 4 µL *HindIII*, 50 µL BSA, 50 µL tampon ile son hacim 200 µL olacak şekilde kuruldu ve 3 saat 37 °C'de inkübe edilen örnekler 5 µL enzim eklenerek bir gece bekletildi. Kesim ürünlerinin üzerine 50 µL (1 hacim) NaAc ve 450 µL etanol eklenerek bir gece -80 °C'de bekletildi. Örnekler + 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek, 20 µL saf su ile sulandırıldı

2.2.2.8.12 Probun Hazırlanması

Tablo 2.4'te görüldüğü gibi PCR DIG prob sentez kiti ile (Roche, Basel, Switzerland, Kat No: 11 636 090 910 PCR DIG Probe Synthesis Kit, Switzerland) içinde dehidrin insertü içeren plazmit DNA örneği kullanılarak yapıldı.

Tablo 2.4: Proben PCR DIG probe synthesis kit ile işaretleme protokolü

Bileşenler	DIG işaretleme probu	İşaretsiz DNA probu	İşaretleme kontrol kit	Son konsantrasyon
Su	25.25	28.25	29.25	-
PCR tampon + MgCl ₂ 10X (vial3)	5 µL	5 µL	5 µL	1X
PCR DIG labelling 5 µL mix (vial2)	5 µL	-	5 µL	200 µM dNTP
dNTP stok tampon (vial4)	-	5 µL	-	200 µM dNTP
R ve F primeri	5 µL R 5 µL F	5 µL R 5 µL F	5 µL R 5 µL F	0.1 - 1 µM (her biri için)
Enzim	0.75 µL	0.75 µL	0.75 µL	2.6 U
Kalıp plazmit DNA	1 µL DHN	1 µL DHN	5 µL (vial5)	gDNA 1 - 50 ng cDNA 10 - 100 pg

PCR koşulları ise 1 döngü; 95 °C’de 2 dakika, 10 döngü; 95 °C’de 10 saniye, 60 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 2 dakika, 30 döngü; 95 °C’de 30 saniye, 60 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 2.20 dakika, 1 döngü; 72 °C’de 7 dakika şeklindedir. %0.8’lik agaroz jelde bir gece 40 voltajda 20 saat yürütüldü. Örneklerin yürütüldüğü jel bir tepsiye alındı ve üzerine HCl eklenip 15 dakika çalkalandı. Jel saf su ile yıkandı. 200 mL denaturasyon tamponu eklenip 12 dakika çalkalandı. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. İkinci yıkamadan sonra saf su ile yıkandı ve 200 mL nötralizasyon tampon eklenerek 12 dakikada 2 kez çalkalandı.

2.2.2.8.13 Hibridizasyon Basamağı

Membran ile işaretleme probun birleştirildiği basamaktır. DIG Easy Hyb Roche, Basel, Switzerland 11 603 558 001 kiti ile yapıldı. İşlem basamakları şöyledir:

Prehibridizasyon basamağı: DIG Easy Hyb tamponu daha önceden belirlenen hibridizasyon sıcaklığında (50 °C) 15 - 30 dakika bekletildi.

Hibridizasyon basamağı: Prehibridizasyon basamağında ısıtılan tamponun bulunduğu falkona membran eklendi ve aynı sıcaklıkta 30 dakika bekletildi. Nanodrop ile 9.5 ng / μ L olarak ölçülen DIG ile işaretlenen probdan 1 μ L alınarak 1 mL hibridizasyon tamponunda çözüldü. 5 dakika 100 °C'de ve 3 dakika buzda bekletildi. Membran içine prob aktarıldı ve 50 °C'de çalkalamalı etüvde 1 gece bekletildi.

2.2.2.8.14 Yıkama Basamağı

Bu basamakta membrana bağlanması istenmeyen ürünlerin uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Hibridizasyon tamponu hemen uzaklaştırıldı ve 200 mL düşük yoğunluklu tampon (%0.1 SDS ve 2X SSC) ile 2 defa 15'er dakika 50 °C'de yıkandı. Tampon uzaklaştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. 200 mL düşük yoğunluklu tampon eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. (Bundan sonraki tüm basamaklar oda sıcaklığında yapıldı.) Yıkama tamponu ile 5 dakika membran yıkandı. 100 mL sabitleme tamponu eklendi ve 30 dakika bekletildi. 20 mL antikor solusyonu ile 30 dakika bekletildi. 100 mL yıkama solusyonu ile 2 defa 15'er dakika yıkandı. 20 mL belirleme tamponunda 3 dakika bekletildi. 10 mL renk belirleme substratı içinde 16 saat karanlık bir ortamda bekletildi. Ertesi gün renk değişimi gözlemlendi ve 50 mL saf su ile reaksiyon durduruldu.

2.2.2.8.15 Tamponların Hazırlanması

Yıkama Tamponu (1X): 100 mL yıkama tamponuna 900 mL saf su eklenerek hazırlandı.

Maleik Asit Tamponu (1X): 100 mL maleik asit içine 900 mL saf su eklenerek hazırlandı.

Sabitleme Tamponu (1X): 100 mL bloklama solusyonuna 900 mL maleik asit eklendi.

Belirleme Tamponu (1X): 100 mL belirleme tamponuna 900 mL saf su eklenerek hazırlandı.

Antikor Solusyonu 1 / 5000 (150 Mu / mL): 4 µL antikor solusyonu 20 mL sabitleme solusyonunda çözüldü.

Renklendirici Substrat Solusyonu: 10 mL belirleme tamponu 200 µL NBT (Nitro blue tetrazolium chloride) içinde çözüldü.

2.2.2.9 Anlık Gösterimli PCR ile Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi

2.2.2.9.1 Anlık Gösterimli PCR Basamağı

Zeytin gDNA örneği 1 / 100 oranında seyreltilerek 2 µL ve 4 µL olacak şekilde 3 tekrarlı 2 set olarak kuruldu. Buna göre; 2 µL gDNA, 1 µL R primeri, 1 µL F primeri, 16 µL saf su ile birinci set, 4 µL gDNA, 1 µL R primeri, 1 µL F primeri, 14 µL saf su ile ikinci set Real Time PCR'ı 1 döngü; 95 °C'de 1 dakika, 35 döngü; 94 °C'de 15 saniye, 55 °C'de 15 saniye, 72 °C'de 15 saniye, 1 döngü; 72 °C'de 1 dakika koşullarında kuruldu.

2.2.3 RNA İle İlgili Teknikler

2.2.3.1 Total RNA İzolasyonu

Zeytin yapraklarından toplam RNA izolasyonu Qiagen, Hilden, Germany RNeasy Plant Mini Kit, Kat. No: 74904) tarifesi takip edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır: İzolasyon için - 80 °C dolabından çıkarılan yaprak örnekleri havanda sıvı azotla toz haline getirildikten sonra ependorf tüpünün yaklaşık 200 µL'lik seviyesine gelecek kadar dolduruldu. Sıvı azot uçar uçmaz, 450 µL RLT tamponu eklendi. Vortex ile homojen olarak karışması sağlandı. Lila kolonun içine aktarılan örnekler, 2 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Dipte kalan tabakaya değmeden sıvı kısım alınarak 1.5 µL'lik steril ependorflara aktarıldı. 225 µL etanol eklenerek alt üst yapıldı. 650 µL alınarak pembe kolonlara aktarıldıktan sonra 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan tabaka döküldü. 700 µL RW1 tamponu eklendi. 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı döküldü. 2 mL'lik

steril toplama tüplerine kolon yerleştirildi. 500 µL RPE tamponu eklendi. 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak 2 defa tekrarlandı. En son etanol'ün tamamen uçması için kolon 30 saniye boş santrifüj edildi. 30 µL RNaz içermeyen saf su ile 1 dakika 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı. 60 µL'lik elüsyon tamponu (veya saf su) içinde RNA örnekleri elde edildi.

2.2.3.2 RNA Örneklerinin DNase I İle Muamele Edilmesi

Total RNA örneklerinden gDNA'nın uzaklaştırılması için 60 µL RNA (~30 ng), 10 µL DNazI tamponu 10X, 30 µL DNazI enzimi (EN0515, Fermentas, Vilnius, Lithuania) ile toplam 100 µL olacak şekilde hazırlandı. 37 °C'de 30 dakika bekletildi. 350 µL RLT tamponu (Qiagen Hilden, Germany, plant RNAeasy izolasyon kitinden) eklendi. 250 µL %96'lık etanol ile karıştırıldı. 700 µL lik örnek Plant RNAeasy izolasyon kitindeki pembe kolonlara aktarıldı. 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Yeni 2 mL'lik toplama tüpüne kolon alındı. 500 µL RPE tamponu eklendi. 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Boş santrifüj edilerek altta kalan döküldü. 1.5 mL'lik ependorflara kolon alındı. 50 µL RNaz içermeyen saf su eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

2.2.3.3 cDNA Eldesi

İlk zincir cDNA eldesi RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Kat. No: K1631) tarifesi takip edilerek şu şekilde yapıldı: 5 µL total RNA, 1 µL oligonükleotit, 6 µL DEPC'li su ile birlikte 3 - 5 saniye santrifüj edildi. 5 dakika 70 °C'de inkübe edildi. Bir süre buzda bekletildi. Diğer işlemlere buzda devam edildi. 4 µL 5X tampon, 1 µL ribonükleaz inhibitörü ve 2 µL dNTP karıştırıldı. Santrifüj edildi. 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi. 1 µL Reverse Transkriptaz enzimi eklendi. 60 dakika 42 °C'de ve 10 dakika 70 °C'de inkübasyon yapıldı. Buzda bekletildi.

2.2.3.4 cDNA Moleküllerinin İkinci Zincirlerinin Eldesi

Elde edilen cDNA ürünleri *RNaz H* (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Kat. No: EN0201) ile muamele edilerek RNA - DNA hibrid sarmallarındaki RNA molekülleri uzaklaştırıldı. DNA Polimeraz I (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Kat. No: EP0041) ile de ikinci zincir sentezlendi. Elde edilen çift zincirli cDNA molekülleri 15 ünite T4 DNA Polimeraz (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Kat. No: EP0061) ile 15 °C'de 5 dakika bekletilerek küt uçlu hale getirildi.

2.2.3.5 Saf Çift Zincirli cDNA (Double stranded cDNA = dscDNA) Eldesi

Toplam dscDNA hacminin 3 katı hacminde QG tamponu (Jel pürifikasyon kiti Qiagen Hilden, Germany Kat. No: 28704) eklendi. Pipetaj yaparak karıştırıldı. Kolona aktarıldı. 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan döküldü. 750 µL PE tamponu eklendi. 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Alta kalan döküldü. Etanol tamamen uçması için kolon tekrar boş santrifüj edildi. 1.5 µL'lik steril ependorfa alınan kolona 50 µL saf su solusyonu eklendi ve saf çift zincirli cDNA elüsyon yoluyla elde edildi.

2.2.3.6 Anlık Gösterimli PCR Protokolü

Bunun için Exicycler™ 96 BIONEER cihazı kullanıldı ve şu şekilde reaksiyon hazırlandı; Liyofilize halde gelen platalere; 17 µL saf su, 1 µL cDNA kalıbı, 1 µL R primeri, 1 µL F primeri eklenerek; 1 döngü; 94 °C'de 5 dakika, 35 döngü; 94 °C'de 25 saniye, 55 °C'de 25 saniye, 72 °C'de 30 saniye, 1 döngü; 72 °C'de 1 dakika olacak şekilde Tablo 3.33'de görülen kontrol primerleri ile döngüler takip edilerek yapılmıştır.

2.2.3.6.1 Anlık Gösterimli PCR için Standart Çalışması

Dehidrin geninine ait primerler kullanılarak 10 adet örnek $1 - 1e^{-10}$ şeklinde seyrelterek standart çalışması yapıldı. Bu çalışmadan bir formül elde edildi.

2.2.4 Fonksiyonel Analiz İle İlgili Teknikler

2.2.4.1 Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi

Ekspresyon amacıyla *E.coli* BL21 codon (+), *E.coli* BL21 (DE3), *E.coli* BL21 phlyss hücrelerine transforme edildi. 100 µg / mL ampisilin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmak suretiyle ön kültür hazırlandı. Hazırlanan bu ön kültürün 10 mL'si son konsantrasyonda 12.5 µg / mL ampisilin içeren 100 mL LB besiyerine inokule edildi. 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürü (OD₅₅₀) 0.6 - 0.8'e ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ile indüklendi. İnkübatörün sıcaklığı 30 °C'ye indirilerek indüklemeye bırakıldı örnekleme 3 saat ve bir gece olacak şekilde alındı.

2.2.4.2 Hücrelerin Yıkanması

İndüklenme süresi sonunda bakteri kültürü 3000 rpm'de + 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti yıkama tamponunda (50 mM Tris - HCl, 1 litre saf su) çözüldükten sonra tekrar santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlanmak suretiyle hücreler yıkanarak kurutuldu ve - 20 °C'ye kaldırıldı.

2.2.4.3 Hücrelerin Liziz Edilmesi (Parçalanması)

Bakteriyal hücre pelleti buz üzerine alınıp çözünmesi beklendi. 10 mL soğuk liziz tamponunda (20 mM Trisbase, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 litre saf su) çözülerek vorteks yapıldı ve buzda bekletildi. Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde PMSF (fenilmetilsülfonilflorid) eklendi. Taze olarak hazırlanmış 10 mg / mL lizozim stok solusyonundan 250 µL eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika, 10 dakika buz üzerinde bekletildi. 30 mg / mL protamin sülfat stok solusyonundan 1 mL eklenerek santrifuj tüpü 2 dakika süreyle alt üst edildi. 3000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan kısım temiz bir tüpe alındı.

2.2.4.4 Proteininin Karakterizasyonu

2.2.4.4.1 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı ölçümleri Lowry metoduna göre hesaplanmıştır. Bu yöntem için aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı.

Solüsyon A: % 2'lik Na_2CO_3 0.1 M NaOH'da çözüldü.

Solüsyon B: %1 NaK tartarat saf suda çözüldü.

Solüsyon C: % 0.5'lik CuSO_4 saf suda çözüldü.

Solüsyon D: 48 mL solüsyon A, 1 mL solüsyon B, 1 mL solüsyon C alınarak hazırlandı.

Solüsyon E: Folin - fenol ve saf sudan bire bir oranında alınarak hazırlandı .

BSA: 5 mg BSA, 5 mL saf suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

Protein tayini için işlem basamakları 1 mg / mL protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μL alındı ve miktar her tüpte 100 μL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. Kör olarak kullanılmak üzere de bir tüpe 100 μL saf su koyuldu. Daha sonra her tüpe 2 mL solüsyon D eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10 dakika sonunda tüplere 0.2 mL solüsyon E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er μL koyularak (OD_{600}) absorbansları köre karşı okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı.

Saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 0.1'er mL tüplere alındı ve standart grafik için uygulanan yöntem aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numuneler içindeki protein miktarı standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı.

2.2.4.4.2 SDS PAGE Jelinde Örneklerin Yürütülmesi

SDS-PAGE jeli için kullanılan jeller ve solusyonları aşağıdaki tablolarda görülmektedir.

SDS PAGE jelinin %12'lik ayırma jeli; son konsantrasyonu %12 olacak şekilde %30 Akrilamid / Bis Akrilamid karışımı, son konsantrasyonu 357 mM olacak şekilde 1.5 M Tris (pH 8.8), son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %10 SDS ve %10 Amonyum per sülfat, son konsantrasyonu %0.4 olacak şekilde %99 TEMED 20 mL toplam hacimde saf su ile tamamlandı [399].

SDS PAGE jelinin %15'lik ayırma jeli; son konsantrasyonu %4.875 olacak şekilde %30 Akrilamid / Bis Akrilamid karışımı, son konsantrasyonu 125 mM olacak şekilde 1.5 M Tris (pH 6.8), son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %10 SDS ve %10 Amonyum per sülfat, son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %99 TEMED 20 mL toplam hacimde saf su ile tamamlandı [399].

SDS-PAGE yürütme tamponu; son konsantrasyonu 50 mM olan 1 M Tris ve son konsantrasyonu %0.1 olan %10'luk SDS ile hazırlandı [399].

SDS-PAGE yürütme tamponun; son konsantrasyonu 50 mM 1 M Tris, son konsantrasyonu %0.1 %10'luk SDS, son konsantrasyonu 2 mM 0.5 M EDTA (pH 8), son konsantrasyonu %1 %99 β -merkaptoethanol, son konsantrasyonu %10 %100 Gliserol ve son konsantrasyonu %20'lik %99 Bromfenol mavisi.[399].

SDS-PAGE boyama çözeltisi; 0.25 g. Coomassie Brilliant Blue 250, 100 mL %95 Etanol %10 Asetik asit ile karıştırıldı [399].

SDS-PAGE arıtma çözeltisinin hazırlanması: son konsantrasyonu %5'lik %99 Asetik asit ve son konsantrasyonu %50 olan %99 etanol [399].

Bakterilerden toplam protein izolasyonu sonucunda elde edilen ham ekstraktlar SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS - PAGE) yürütüldü.

Öncelikle, %12'lik ayırma jelini oluşturan çözeltiler APS hariç karıştırıldı. APS eklendikten sonra karışım, jel kasetine çizgi hizasına kadar döküldü. Jelin yüzeyini düzleştirilmek için izopropanol kaset kenarından enjekte edildi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yüzeydeki izopropanol döküldü ve saf su ile yıkandı. Diğer bir erlende %5'lik yığıma (yükleme) jeli hazırlandı. Yine APS hariç tüm malzeme manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. APS eklenerek polimerize haldeki ayırma jelinin üzerine döküldü ve jelde kuyular oluşturmak için tarak yerleştirildi. Jel polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirilerek tank tamponu ile dolduruldu. Örnek numune tamponu proteinle %50 oranında karıştırıldı ve 2 dakika 95 °C'de kaynatıldı. Protein örnekleri kuyulara yüklendi. Akım, proteinler %5'lik yığıma jelinde ilerlerken 80 voltajda, %12'lik ayırma jeline ulaştıktan sonra 150 voltaja ayarlandı. Yükleme tamponundaki bromfenol mavisi, jelin altına 1 cm kalana kadar işleme devam edildi. Bu işlem bitiminde, düzenek açıldı ve cam plakalar birbirinden ayrıldı. %5'lik yığıma jeli uzaklaştırıldı. Ayırma jeli, bir kesikle işaretlendi ve boyama çözeltisi içine alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar çalkalayarak boyandı. Daha sonra arıtma çözeltisine alınarak hafifçe karıştırıldı. Böylece boyanın fazlası alınmış oldu. Daha sonra UV ışığı altında protein bantları incelendi. Jel, saf suya alınarak saklandı.

2.2.4.4.3 Western Blot Basamağı

Western Blot analizi için 25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (v / v) Metanol'den oluşan bir transfer çözeltisi ve 10 mM Tris - HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4 içeren 10X TBS hazırlandı.

Proteinlerin elektroforetik transferi için Bio-Rad Trans Blot sistemi (BioRad, Almanya) kullanıldı. Proteinlerin transferi için PVDF (Merck Millipore, Germany) membranlar kullanıldı. Jeller cam levhalar arasından çıkarıldı, yığıma jeli kesilerek uzaklaştırıldı ve jel transfer tamponu içine alınarak dengelenmesi için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Whatman 3 mm kağıt ve PVDF membranlar jel

ile aynı boyutlarda kesilerek hazırlandı. Bu sırada sünger pedler ve transfer aparatları da transfer tamponu içine alındı. Daha sonra transfer kasedi arasına sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde düzenek hazırlandı. Bu sırada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra kaset, transfer tamponu ile dolu olan blot tankına yerleştirildi ve 100 voltaj akımında 60 dakika transfer yapıldı.

2.2.4.4.4 Antikorun Hazırlanması ve Proteinlerin Belirlenmesi

8 mL 1X reagent ve 8 µL antikor (6 His tag) (1 / 1000) hazırlandı. Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 mL bloklama çözeltisinde (0.1 g bloke edici tampon, %0.1 (v / v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için %0.1 (v / v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı.

Membran primer antikor ile 1 - 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve görüntülemeye geçildi. Membranlar 1 - 2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo, A. B. D.) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1.5 mL alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı. Membran film üzerinde 5 ve 10 dakika olmak üzere 2 kez bastırıldı. Film yıkama makinesine verilerek sonuçlar görünür hale getirildi.

2.2.4.4.5 Protein Saflaştırma Basamağı

SDS-PAGE jeline yüklenen ve görüntülenen proteinin saflaştırılması için Qiagen 30210 Hilden, Germany Ni-NTA kolon saflaştırma protokolü takip edildi.

Ni-NTA kolonu için hazırlanan tamponlar:

Liziz tamponu: 50 mM Na₂H₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol

Yıkama tamponu: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol

Elüsyon tamponu: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol

2.2.4.4.6 Ni-NTA Kolonundan Geçirmek İçin Liziz Basamağı

Ön kültürden inoküle edilen ve bir gece büyümede bekletilen 200 mL'lik örnek daha önce anlatılan yıkama tamponu ile yıkandı. En son basamakta çöktürülen örnek miktarı tartıldı ve 1 g için 2 – 5 mL olacak şekilde yaklaşık olarak 3 mL liziz tamponu eklendi. 1mg / mL lizozim eklenerek 30 dakika buzda bekletildi. 200 – 300 W'de 10 saniye sonikatör de bekletildi. Lizatın vizkozluğu devam ediyorsa *RN_{az} A* (10µg / mL) ve *DN_{az} I* (5µg / mL) eklenerek 10 – 15 dakika buzda bekletildi. 10 000 x g'de 20 – 30 dakika + 4°C'de santrifüj edildi. Supernatantı alındı ve - 20°C'de saklandı.

2.2.4.4.7 Ni-NTA Klonundan Geçirme Basamağı

%50 Ni-NTA agarozundan 1 mL ve 4 mL lizattan alınarak bir karışım elde edildi. bu karışım 200 rpm'de + 4°C'de 60 dakika çalkalandı. Ni-NTA kolonuna örnek yüklendi. Altta kalan çözelti etiketlenerek toplandı. 4 mL Tablo 2.24'te görüldüğü şekilde hazırlanan yıkama tamponu eklendi (bu işlem 2 kez yapıldı). Yıkama basamaklarından herbirinden örnekleme yapıldı. 0.5 mL elüsyon tamponu ile 4 kez eklenerek kolondan örnekleme yapıldı.

Kolondan elde edilen tüm örnekler (OD₂₈₀) de ölçerek proteinin geldiği fraksiyon belirlendi.

2.2.4.4.8 Kryoprotektif Aktivitenin Belirlenmesi

Dehidrinin kryoprotektif aktivitesinin belirlenmesi için, Lin ve arkadaşlarının [400] geliştirmiş oldukları protokole göre tamponlar hazırlandı.

Kryoprotektif aktivite belirleme çalışmasında kullanılan tamponlar: 2.5 µg / mL LDH (L5132, Sigma, Dublin, Republic of Ireland), 10 mM (pH 7) Potasyum fosfat (P3786 (500 gr), Sigma, Dublin, Republic of Ireland), 80 mM (pH 7.5) Tris-HCl (A3452, Applichem, Danimark), 100 mM KCl (7447-40-7, Biochemica, Germany), 2 mM Pürivik asit (107360, Sigma, Dublin, Republic of Ireland), 0.3 mM NADH (93205, Sigma, Dublin, Republic of Ireland) [400].

20 µL dehidrin lizati 50 µL 10 mM potasyum fosfat (pH 7.5) içinde çözülerek 50 µL 10 mM potasyum fosfat (pH 7.5) tamponu içinde çözülmüş olan LDH (2.5 µg / mL) ile steril ependorf tüpünde karıştırıldı (1: 1 örnek / LDH). Tüplerden birine dehidrin lizati eklenirken diğerine eklenmedi. Kontrol olarak BSA (10 mg / mL) kullanıldı. 3 tüp - 20 °C’de bir gece bekletildi. Aynı zamanda aynı örnekler oda sıcaklığında da bekletildi. Örnekler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 2.5: Kryoroprotektif için örnekleme gösterilmesi

1. Tüp	2. Tüp	3. Tüp	
Dehidrin + LDH	LDH	LDH + BSA	- 20 °C
4. Tüp	5. Tüp	6. Tüp	
Dehidrin + LDH	LDH	LDH + BSA	+ 24 °C

- 20 °C’de bir gece örnekler oda sıcaklığında 10 dakika çözünmesi beklendi ve + 24 °C’de bekletilen örneklerden 20 µL alındı ve son konsantrasyonları Tablo 2.26’da verilen pürivat, NADH, KCl ile 1 mL olacak şekilde saf suyla tamamlanan enzim solusyonuna eklendi ve hızlıca (OD_{340}) absorbansına bakıldı.

2.2.4.5 Dizileme

DNA dizilemesi BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Fostercity, CA) ile ABI 3130XL Genetic Anaylzer (Applied Biosystems, Fostercity, CA) cihazını kullanan ReFGeN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) adlı ticari kuruluşuna kitin içindeki kontrol primerleri ile yaptırıldı.

3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında 2 farklı metod ile toplam 6 tane zeytin gen kütüphanesi elde edildi. Buna göre; aşağıdaki şekilde özetlendiği gibi hazırlanan kütüphanelere ait bulgulara gruplandırılarak anlatılmıştır.



Şekil 3.10: Zeytin gen kütüphanelerinin oluşturulması

DNA dizilemesi BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Fostercity, CA) ile ABI 3130XL Genetic Anaylzer (Applied Biosystems, Fostercity, CA) cihazını kullanan ReFGeN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) adlı ticari kuruluşa yaptırıldı. İnsertler aynı primerler ile (pUC47, F primeri) en az iki defa dizilendi ve sadece doğruluğu teyid edilen nükleotit miktarları dizilerin analizi için kullanıldı. Klonlar Oe (*Olea europaea*) şeklinde isimlendirildi. Dijital olarak elde edilen insert DNA dizileri BioEdit [401] ve FinchTV v1.4 (Geospiza, Seattle, WA) programlarıyla kromatogram kalitesi ve ortak dizi (contig) yönlerinden kontrol edildikten sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [402] programlarının nonredundant (nr) veritabanlarında homoloji analizine tabi tutuldu ve zeytin genomuna ait elde edilen nükleotit dizilerinin diğer bitki ve / veya organizmalarla benzerlik gösterdiği (homolog) diziler tespit edildi. Bu veri tabanlarında istatistiki olarak anlamlı benzeşme bulunamayan (E değeri $1e^{-5}$ 'ten daha büyük) insert dizileri Gen

Bankasındaki diğer bütün veritabanlarına ilaveten (refseq_rna, refseq_genomic, chromosome, EST, GSS, HTGS, PAT, DBSTS, WGS, ENV_nt), RepeatMasker [403] ve Web Promoter Scan [404] gibi farklı biyoinformatik yazılımlarla analiz edildi. 100 veya daha fazla aminoasitten oluşan bir açık okuma çerçevesi (ORF, Open Reading Frame) taşıyan insert dizileri aminoasit kompozisyonları için ayrıca incelendi. Hydropathy grafikleri Kyte ve Doolittle algoritmasına [182] göre oluşturulurken, hücre zar yerleşim yapısı TopPred II [405] programıyla yapıldı. Her iki yazılım da internet üzerinden (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>) adresi kullanıldı [406]. Uzun diziler için RNA ikincil yapı tahmini yapabilen bir program [407, 408] kullanılarak (<http://www.tbi.univie.ac.at/RNA>) bilinmeyen dizilerin saç tokası (hairpin) oluşturma potansiyelleri tespit edildi. Muhtemel promotörleri tespit etmek için yukarıda bahsedilen Web Promoter Scan veritabanı kullanıldı. İki nükleotitli, üç nükleotitli ve dört-nükleotitli basit dizi tekrarlarını (Simple Sequence Repeats, SSRs) veya uydu DNA'ları (Mikrosatellitler) tespit etmek için insert dizileri dijital olarak yazım programının arama fonksiyonuyla tarandı.

cDNA kütüphanelerinden elde edilen klonlar Temmuz “var yılı” örnekleri TV , Temmuz “yok yılı” örnekleri TY, Kasım “var yılı” örnekleri, Kasım “yok yılı” örnekleri, Meyve kütüphanesi örnekleri MK şeklinde isimlendirildi.

DNA dizilemesi BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Fostercity, CA) ile ABI 3130XL Genetic Anaylzer (Applied Biosystems, Fostercity, CA) cihazını kullanan ReFGeN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) adlı ticari kuruluşa yaptırıldı. Insertler pJET1.2 R - F primerleri ile en az iki defa dizilendi ve sadece doğruluğu teyid edilen nükleotit miktarları dizilerin analizi için kullanıldı. Dijital olarak elde edilen insert DNA dizileri BioEdit [401] ve FinchTV v1.4 (Geospiza, Seattle, WA) programlarıyla kromatogram kalitesi ve ortak dizi (contig) yönlerinden kontrol edildikten sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [402] programlarının nonredundant (nr) veritabanlarında blast analizine tabi tutuldu ve zeytin genomuna ait elde edilen nükleotit dizilerinin diğer bitki ve / veya organizmalarda benzerlik gösterdiği homolog diziler tespit edildi. Ancak bu kütüphaneden elde edilen dizilerin mRNA oldukları bilindiği için, genomik dizilerin

analizinde kullanılan tahmini promotör testi ve saç tokası oluşturma potansiyeli gibi araçlar kullanılmadı.

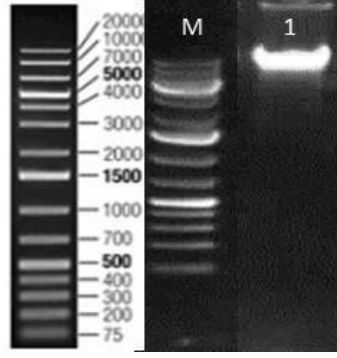
Kütüphanelerdeki tüm genlerin translasyon sonrası özelliklerini anlamak için ExPASy [409], lokalizasyon tahmini için Predator programı [410] transit peptit özelliğini belirlemek için TARGET-P programı [411] proteininin yüzey özelliklerinin ve lokalizasyonunu belirlemek için SOSUI programı [412] kullanıldı.

Kasım “var” yılına ait olan CK2 klonunun dizi analizi sonucu gelin R ve F primerlerine ait dizilerin BIOEDIT [413], BLASTn ve BLASTx [414] analizi ile dehidrin geni ile homoloji gösterdiği tespit edildi. Dehidrin geninin translasyon sonrası özelliklerini anlamak için kullanılarak ExPASy [409], lokalizasyonu belirlemek için Predator programı [410] transit peptit özelliğini belirlemek için TARGET-P programı [411], proteininin yüzey özelliklerinin ve lokalizasyonunu belirlemek için SOSUI programı [412] kullanıldı.

3.1 gDNA Kütüphanesine Ait Bulgular

Zeytinde periyodisitede etkili genlerin tespit edilmesi amacıyla farklı dönemlerde toplanan yaprak ve meyve örneklerinden oluşturulan cDNA kütüphanelerine ek olarak, cDNA kütüphanelerine referans olması için ve zeytin genomu hakkında bilgi edinmek amacıyla yapraktan total gDNA izole edilerek bir havuz elde edildi.

Zeytin yapraklarından gDNA izolasyonu materyal metod bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı ve izole edilen gDNA örneği %0.8’lik agaroz jelde yürütülerek Şekil 3.11’deki gibi görüntülendi.



Şekil 3.11: Zeytin gDNA örneğinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (M: DNA büyüklük belirteci, 1: Ayvalık gDNA örneği)

Elde edilen gDNA örneği materyal metod bölümünde anlatıldığı gibi *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesildi ve yine aynı şekilde kesilmiş ve defosforile edilmiş pUC19 klonlama vektörü ile ligasyon yapılarak *E. coli* GM2163 kompetan hüresine transforme edildi. Petride görülen kolonilerden rastgele 100 tanesi seçilip inoküle edildi ve plazmitleri izole edildi. pUC47 primerleri ile gDNA kütüphanesinden elde edilen plazmitlerin hepsi ayırt edilmeden dizilendi.

Dizilen kolonilerin insert kontrolünün tekrar teyit edilmesi için plazmit izolasyonu yapılan örnekler *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesildi ve %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek, Şekil 3.12'de görüldüğü gibi bir insert kontrolüne ait jel görüntüsü elde edildi.



Şekil 3.12: Zeytin gDNA kütüphanesine ait klonların *SmaI* restriksiyon enzimi kesimi ile elde edilen insert kontrolünün agaroz jel görüntüsü (M: DNA büyüklük belirteci, rakamlar; klon numaralarıdır)

gDNA kütüphanesinden elde edilen insertler *Olea europaea* L. *Oe* olarak isimlendirildi. Dizileme firmasından temin edilen insert dizileri FinchTV v1.4 (GeoSpiza Inc., Seattle, WA) ve BIOEDIT [401] yazılımlarıyla kromatogramları kontrol edilerek analiz edildi ve kontig (birleştirilmiş ortak dizi, dizileme sırasında F ve R primerleri ile ayrı ayrı dizilendiği için gelen sonuçlarda bir klona ait iki dizi bulunmaktadır. Bu dizilerin BIOEDIT programıyla kontiglerinin elde edilmesi o diziye ait fullentgh ve doğru dizi olması açısından önemlidir). Kontigler ile elde edilen doğru diziler Gen Bankası BLASTn ve BLASTx [402] programlarının non-redundant (nr) veritabanlarında homoloji analizine tabi tutuldu ve diğer bitki ve / veya organizmalarda benzerlik gösterdiği homolog genler veya dizi kayıtları tespit edildi ve bu verilere göre Tablo 3.6 ve 3.7’de görülen veriler elde edildi. Bu veritabanlarında istatistiksel olarak anlamlı benzeşme bulunmayan insert dizileri Gen Bankasındaki diğer bütün veritabanlarına ilaveten (refseq_rna, refseq_genomic, chromosome, EST, GGS, HTGS, PAT, DBST, WGS, env_nt), RepeatMasker [415] ve Web Promoter Scan [416] gibi farklı biyoinformatik yazılımlar kullanılarak analiz edilmiştir. 100 veya daha fazla amino asitten oluşan açık okuma çerçevesi (ORF, Open Reading Frame) taşıyan insert dizileri amino asit kompozisyonları için daha detaylı araştırmalar yapıldı. İnternet aracılığıyla <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form-topped>) [417] adresi kullanılarak, Hydropathy grafikleri Kyte ve Doolittle algoritmasına [182] göre ve hücre zar yerleşim yapısı TopPred II [405] programıyla yapıldı.

Tablo 3.6: Genomik DNA kütüphanesine ait klonların homoloji analizleri ve NCBI BLASTn ve BLASTx kayıtları

İnsert no	Genbank numarası	Dizi uzunluğu	BLASTn sonucu	E değeri	Homolog bitkinin genbank numarası
Oe12	GS262902	372	<i>Pinus radiata</i> sitokrom P450 (PRE74) mRNA	$6e^{-04}$	Gi2935524
Oe80 Oe113 Oe119 Oe128 Oe143 Oe155 Oe160	GS262903	735	<i>Lactuca sativa</i> NADH dehidrogenaz altbirim 2 (ndhB) geni.	0.0	Gi66865837

Tablo 3.6 (Devam)

Oe117 Oe145	GS262905	725	<i>Nicotiana tabacum Ycf2 geni (kloroplast geni)</i>	3e-117	Gi7564778
Oe125	GS262907	777	<i>Olea europaea matK geni (kloroplast geni)</i>	0.0	EmbAJ429335
Oe129 Oe164	GS262908	832	<i>Nicotiana tabacum RNA polimeraz beta alt birimi (kloroplast geni)</i>	1e-127	Gi3735092
Oe137	GS262909	225	<i>Anethum graveolens Ycf2 geni (kloroplast geni)</i>	2e-89	Gi156573684
Oe163	GS262911	801	<i>Sonneratia alba PSII 10 kDa fosfoprotein (kloroplast geni)</i>	4e-13	gbACS68679
Oe110	GS262904	715	<i>Solanum tuberosum apositokrom b (cob) geni mitokondrial gem</i>	2e-118	Gi800845
Oe123	GS262906	687	<i>Triticum aestivum mitokondrial ATP sentaz B zinciri öncüsü</i>	1e-37	Gi3800069

Tablo 3.6 (Devam)

Oe141	GS262910	647	<i>Cucumis sativus</i> NADH dehidrogenaz alt birim 5 (nad5) geni mitokondri geni	$4e^{-23}$	Gi31322694
-------	----------	-----	---	------------	------------

Tablo 3.7: BLASTn ve BLASTx programlarının tekrarsız (nr) veritabanlarına göre hiçbir dizi kaydına benzerlik göstermeyen genomik DNA dizileri. BLASTn ve BLASTx programlarının nr dışındaki veritabanlarına ilaveten farklı biyoinformatik araçlarla yapılan analiz sonuçları

Klon numarası	Genbankası kodu	Dizi Uzunluğu	Homoloji sonucu	Biyoinformatik analizi
Oe3	GS262912	762	Tüm genom shotgun dizileri genbank accession no: EMBcaap02001845 <i>Vitis vinifera</i> tüm genom shotgun dizisi e değeri: $2e^{-91}$	ORF: 58 aa AT: %59 G: %20 C: %21
Oe101	GS262914	210	Benzersiz	ORF: 69 aa. AT: %67 G: %20 C: %13

Tablo 3.7 (Devam)

Oe131	GS262918	712	Genomik dizi GenBank Accn:dbjAP009926 <i>Lotus japonicus</i> klon e değeri: $2e^{-65}$	ORF: 50 aa AT: %57 G: %21.90 C: %22
Oe138 Oe142	GS262919	727	Benzersiz	ORF: 59 aa AT: %73 G: %14.86 C: %14.72
Oe146	GS262921	153	Benzersiz	ORF: 46 aa AT: %66 G: %1

				C: %22
Oe149 Oe162	GS262920	705	<i>Ricinius communis</i> genom e değeri: $5e^{-14}$	ORF: 96 aa AT: %57 G: %21.75 C: %21.33
Oe4	GS262913	147	<i>Lycopersicum esculentum</i> post antez e değeri: $2e^{-25}$	ORF: 46 aa AT: %50.62 G: %20 T: %32
Oe106	GS262915	702	Benzersiz	ORF: 107 aa AT: %53 G: %21 C: %24

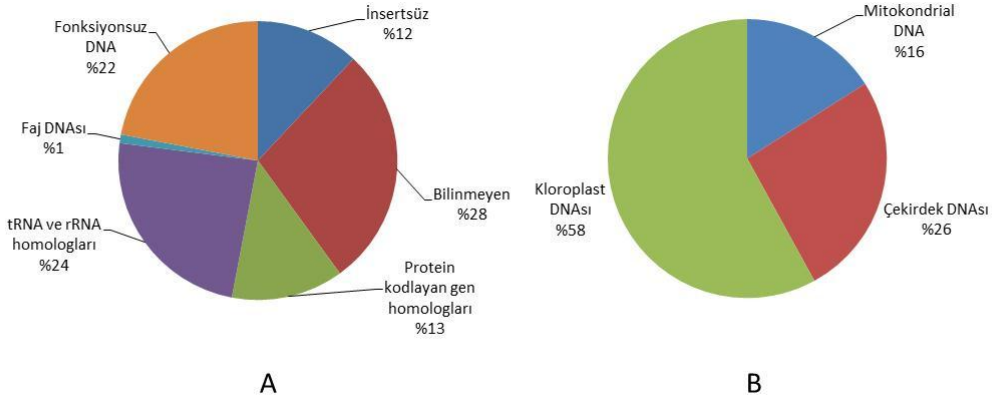
Tablo 3.7 (Devam)

Oe121				ORF: 122 aa
Oe136	GS262916	774	<i>Actinidia deliciosa</i> Hidrojen siyanamid uygulamasından önceki teni çıkan filizlerde e değeri: $2e^{-68}$	AT: %53 G: %21 C: %24
Oe158				
Oe130	Gs262917	753	Benzersiz	ORF: 170 aa AT: %64 G: %36 C: %28
Oe150	GS262922	177	Benzersiz	ORF: 58 aa AT: %54 G: %27, C: %18

Tablo 3.7 (Devam)

Oe154	GS262923	737	<i>Eucalyptus gunni</i> ksilerm e değeri: $6e^{-86}$	ORF: 141 aa AT: %54 G: %21 C: %25
-------	----------	-----	---	--

gDNA kütüphanesi insertlerinden elde edilen homoloji analizine göre aşağıda görülen pasta grafikleri çizildi.



Şekil 3.13: Zeytin gDNA kütüphanesi klonlarının GenBankası BLASTn analizi ile elde edilen homoloji sonuçlarına göre insert dizilerinin dağılımı A. Dizilerin fonksiyonel kategoriye göre genel dağılımı B. Dizilerin çekirdek, kloroplast ve mitokondri benzerliklerine göre genel dağılımı.

3.1.1 SSR Dizilerinin Analizi

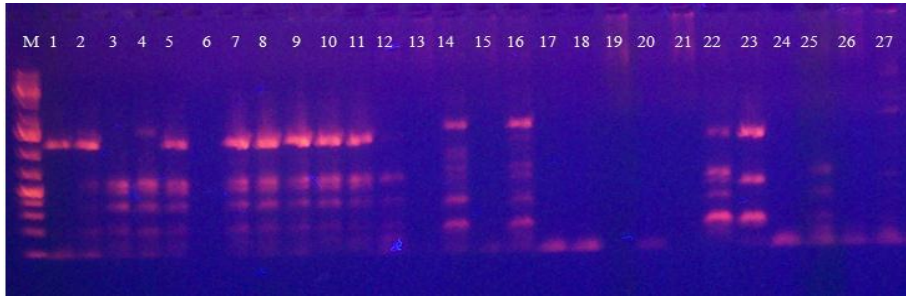
gDNA kütüphanesinden elde edilen her bir klona ait primerler dizayn edilerek, bu genomik klonların çeşit ayrımına uygunluğunun belirlenmesi için SSR deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla Tablo 2.1’de 28 farklı zeytin çeşidinden materyal metot kısmında anlatıldığı gibi gDNA izolasyonu yapıldı ve Tablo 3.8’de görülen SSR primerleri ile PCR yapıldı ve Şekil 3.14-19’da görülen agaroz jel elektroforezi görüntüleri elde edildi.

Tablo 3.8: SSR deneyleri için kullanılan primerler

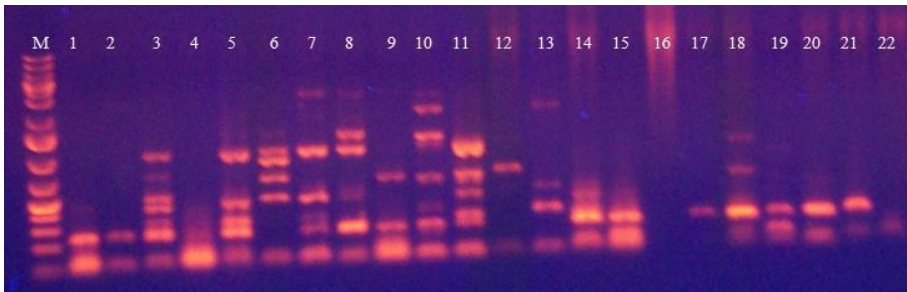
Primer ismi	F ve R primeri
Oe131	5’-TATTTGATTCACCCGTAGTACCAAT-3’ 5’-CAATGGATTTGCTTACATGATAGTG-3’
Oe3	5’-ATTTCTGGCTCAACCCTAGTATCTGTAA-3’ 5’GAAGAAGGAAAGCTACTATACCCAGATA-3’

Tablo 3.8 (Devam)

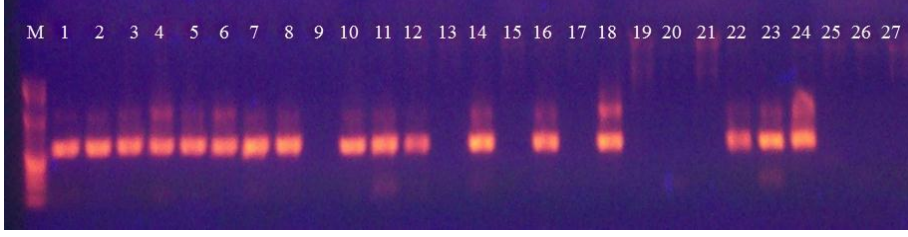
Oe106	5'-GGGCATCAATCACTAGTCCTCTTATT-3' 5'-ATGACCTACGGAATCATTTCATTCAT-3'
Oe138 - 142	5'-GTACCCGGGTTCTAAGTTTTCTATAAT-3' 5'-TCTACAATTTTTATCCACTTTTCTACCA-3'
Oe149 - 162	5'-AGTAGTCAAATGGTCCCTCTATCTAATG-3' 5'-AAGGTAATATTCTTCTCTTAATCCCAGA-3'
Oe121 - 136 - 138	5'-CAAAAGTAATGGGTTTCAGACTGG-3' 5'-CATTTGCTAAGGAATTAGTTTATGGAG-3'
Oe130	5'-AGCCCGTGCAATATGAATACTAA-3' 5'-ACCTCGACAAGTTCCTCACG-3'



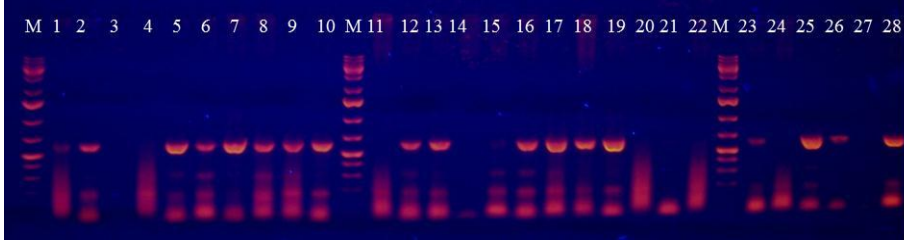
Şekil 3.14: Oe121 - 136 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü



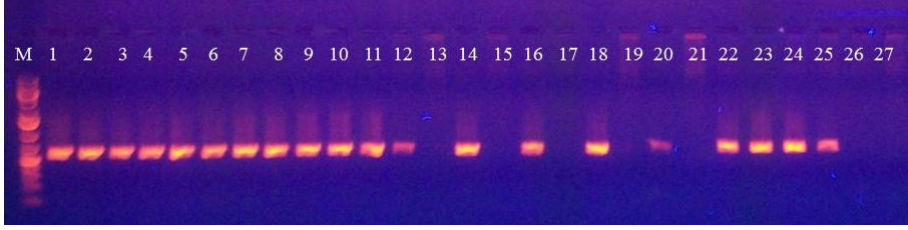
Şekil 3.15: Oe149 - 162 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü



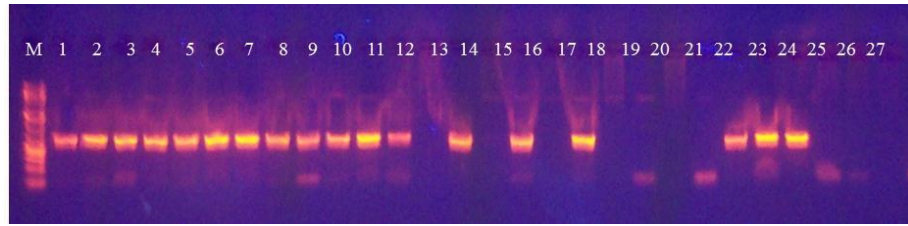
Şekil 3.16: Oe138 - 142 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.17: Oe130 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.18: Oe131 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 3.19: Oe3 SSR analizine ait jel elektroforezi görüntüsü

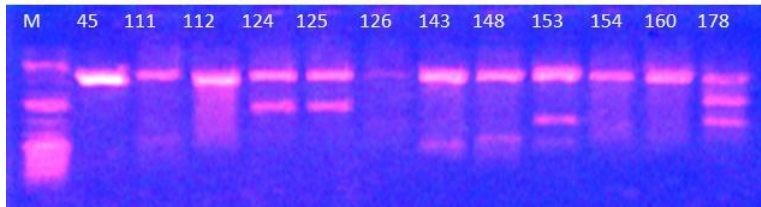
Şekillerde görüldüğü gibi bazı primerler bazı kalıplarda çeşit ayrımını yapabilmektedir. Genel olarak bakıldığında ise bazı kalıplarda tüm primerler

çalışırken bazılarının çalışmadığı görülmektedir. Buradan dizayn edilen primerlerin çeşit ayırımında kullanıma uygun olduğu anlaşılmaktadır.

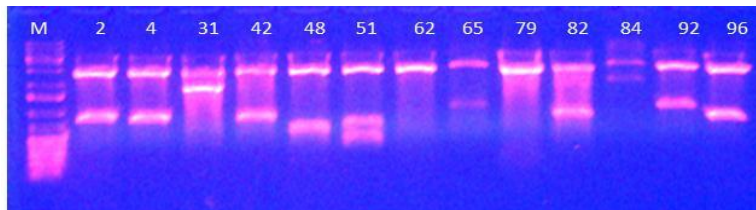
3.2 cDNA Kütüphanelerine Ait Bulgular

3.2.1 İnsert kontrolleri

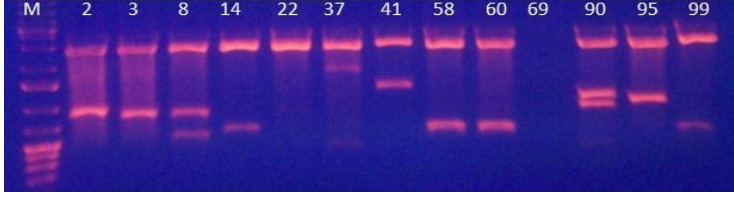
Tüm kütüphanelerden elde edilen klonların dizileme öncesi *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesilip agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bunun amacı seçilen tüm klonların belirli bir büyüklükte olanlarının dizilenmesidir. İlk yapılan kütüphane olan Temmuz “var yılı” kütüphanesinde ilk önce 100 klon dizilenmeye gönderildi ancak gelen dizilerin bir kısmının insertsüz ve bazılarının küçük insertler içerdiği görüldü. Bu nedenle insert kontrolü yapılarak aşağıda görülen jel görüntüleri elde edildi.



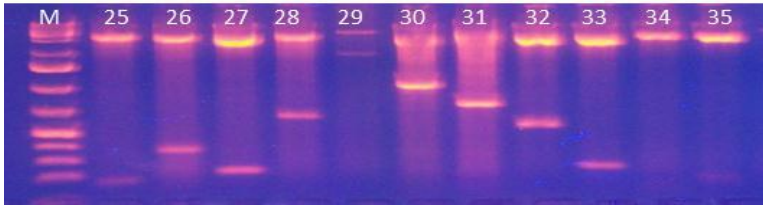
Şekil 3.20: Temmuz “var yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: DNA büyüklük belirteci, rakamlar: klonlara aittir)



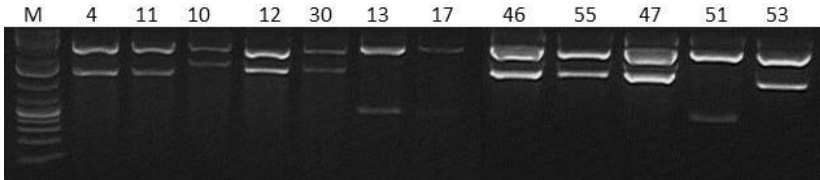
Şekil 3.21: Temmuz “yok yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: DNA büyüklük belirteci, rakamlar: klonlara aittir)



Şekil 3.22: Kasım “var yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: DNA büyüklük belirteci, rakamlar: klonlara aittir)

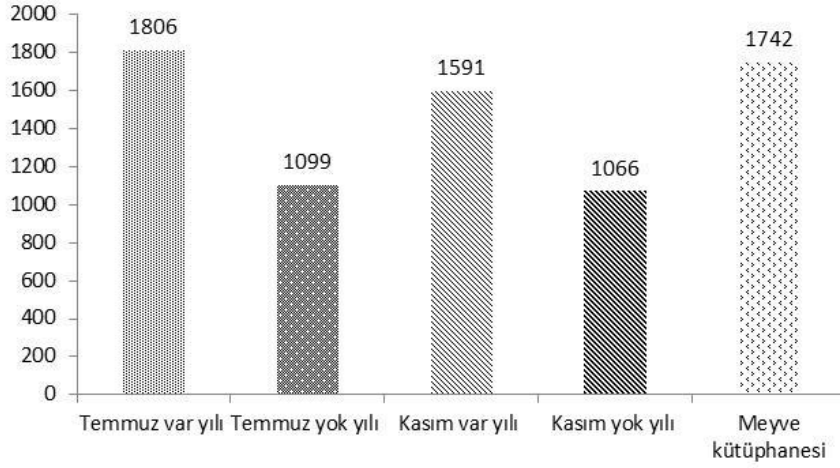


Şekil 3.23: Kasım “yok yılı” kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğünü gösteren agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: DNA büyüklük belirteci, rakamlar: klonlara aittir)



Şekil 3.24: Meyve kütüphanesine ait protein kodlayan genlerin bir kısmının insert büyüklüğüne ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M: DNA büyüklük belirteci, rakamlar: klonlara aittir)

Insert kontrolü ile agaroz jel elektroforezinde ve dizi analizi sonucunda elde edilen dizi büyüklüklerine göre bir istatistiksel bilgi elde edildi. Buna göre bu grafiğe bakıldığında kütüphane cDNA'larından elde edilen klon büyüklüklerinin “var” yıllarındaki cDNA'ların “yok” yıllarına göre daha büyük olduğu Şekil 3.25’de görülmektedir. Buna ek olarak meyve kütüphanesi cDNA’larında “yok” yıllarından fazla olduğu açıktır.



Şekil 3.25: Kütüphanelerden elde edilen klonların insert büyüklükleri

3.2.2 Biyoinformatik Analiz

Tüm kütüphanelerden elde edilen klonların biyoinformatik analizleri NCBI BLASTn analizi ile yapıldı. Burada homoloji gösteren bitki ve o bitkiye ait genin fonksiyon analizine göre tablolar elde edildi.

Klonların EST analizi yapıldığında pek çoğunun NCBI kayıtlarında bulunmadığı tespit edildi ve bu klonlara ait EST kayıtları ilk defa bizim tarafımızdan verildi. Bunlara ait tablolar görülmektedir.

Tablo 3.9: Temmuz “var yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi

İnsert no	Homolog bitki	Accession numarası	Fonksiyonu	E değeri	N. sayısı	ORF	İzoelektrik noktası	Moleküler ağırlığı	EST Kaydı
TV45	<i>Olea europaea</i>	gi 154257296	Sitokrom P450	$5e^{-20}$	419 bp.	90 aa.	10.646999	253939 Dalton	gb GW574239.1
TV46	<i>Arnebia euchroma</i>	gi 151564657	Kloroplast protein 12 (CP12)	$2e^{-60}$	553 bp.	139 aa	4.594999	335942 Dalton	gb GW574240.1
TV111 - 148	<i>Glycine max</i>	gi 113367217	bZIP transkripsiyon faktörü bZIP124	$6e^{-41}$	780 bp.	165 aa	10.630999	472804 Dalton	gb GW574234.1
TV124 - 125 - 143	<i>Capsicum annuum</i>	gi 156152081	Menthone:neomenthol redüktaz I (MNR1)	$4e^{-62}$	1079 bp.	287 aa	6.947000	653879 Dalton	gb GW574234.1
TV126	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 145339670	İntegral membran	$1e^{-80}$	716 bp.	140 aa	9.432000	434306 Dalton	gb GW574235.1

			proteini (HRF1)						
TV153	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 18651691 1	Vakuol yönlendirici protein 39(EMB275)	$7e^{-23}$	836 bp.	141 aa	6.064000	506812 Dalton	gb GW574242.1
TV154 - 160	<i>Tomato</i>	gb M32604. 1	ATP-bağımlı proteaz	$4e^{-121}$	1004 bp.	241 aa	10.593999	609365 Dalton	gb GW574237.1
TV178	<i>Olea europaea</i>	gb FJ50136 7.1 	ATP atpB- rbcL intergenic spacer	0.0	709 bp.	113 aa	10.190999	429142 Dalton	gb GW574238.1
TV146 – 151 – 187	<i>Medicago truncatula</i>	gb DQ3357 83.1 	Sitokrom P450 monooksigen az CYP72A59	$8e^{-29}$	931 bp.	188 aa		564010 Dalton	gb GW574237.1

Tablo 3.10: Temmuz “yok yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi

İnsert no	Homolog bitki	Accession numarası	Fonksiyonu	E değeri	N. sayısı	ORF	İzoelektrik noktası	Moleküler ağırlığı	EST kaydı
TY1	Benzersiz dizi	-	-	-	244	42 aa	4.924999	147684 Dalton	gb GW574243.1
TY2 – 62	<i>Solanum lycopersicum</i>	gb AY568721.1 	Yaralanma / stres proteini	$3e^{-58}$	758	180 aa	7.030000	459958 Dalton	gb GW574247.1
TY4	<i>Medicago truncatula</i>	ref XM_003604466.1 	Hastalığa direnç geni	3.8	737	178 aa	8.499000	447114 Dalton	gb GW574250.1
TY31 – 84	<i>Medicago truncatula</i>	gb DQ335783.1 	Sitokrom P450 monooksijenaz CYP72A59	$1e^{-24}$	1804	520 aa	9.483000	1093050 Dalton	gb GW574245.1
TY32 – 87	Benzersiz dizi	-	-	-	821	92 aa	9.776000	496920 Dalton	gb GW574244.1
TY42 – 82	<i>Lycopersicon esculentum</i>	gb AF096262.1	ER6 proteini	$2e^{-92}$	713	152 aa	8.563000	432067 Dalton	gb GW574246.1

Tablo 3.10 (Devam)

TY51 – 55	<i>Olea europaea</i> cultivar <i>Bianchera</i>	gb GU228899.2 	Kloroplast, tüm genom	0.0	1362	102 aa	10.512999	823915 Dalton	gb GW574248.1
TY56 – 65	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref XM_002889642.1 	Putatif ribozomal protein L10 (At1g08360)	$1e^{-151}$	909	220 aa		551096 Dalton	gb GW574249.1
TY79	<i>Nothapodytes foetida</i>	gb EU604540.1 	Sitokrom P450 redüktaz	0.0	1172	247 aa	10.395999	711457 Dalton	gb GW574251.1
TY83	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NM_112238.4 	Tanımlanmamış protein (AT3G13845)	$2e^{-14}$	590	134 aa	8.415000	357796 Dalton	gb GW574252.1
TY92	<i>Glycine max</i>	ref NM_001248247.1 	DnaJ benzeri protein (J1)	$5e^{-44}$	896	198 aa	9.763000	543677 Dalton	gb GW574253.1

Tablo 3.10 (Devam)

TY96	<i>Medicago truncatula</i>	<u>ref XM_003592671.1 </u>	Thioredoksin-X (MTR_1g114290)	$5e^{-49}$	707	196 aa	9.605000	428520 Dalton	<u>gb GW574254.1 </u>
------	----------------------------	----------------------------	----------------------------------	------------	-----	--------	----------	------------------	-----------------------

Tablo 3.11: Kasım “var yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi

İnsert no	Homolog bitki	Accession numarası	Fonksiyonu	E değeri	N. sayısı	ORF	İzoelektrik noktası	Moleküler ağırlığı	EST kaydı
KV5 – 11 – 37 - 97	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NM_121987.2 	Armadillo/beta-katenin benzeri tekrarları içeren protein(emb2734) mRNA	$7e^{-112}$	961	194 aa	5.875000	582655 Dalton	gb GW574255.1
KV3 - 96	<i>Nicotiana sylvestris</i>	gb DQ231576.1 	Sitokrom 1 (cry1) mRNA	$6e^{-112}$	814	209 aa	9.692000	493864 Dalton	gb GW574256.1
KV8	<i>Lycopersicum esculentum</i>	gi 22074045	Transkripsiyon faktörü JERF1	$5e^{-55}$	1501	392 aa	5.443000	910904 Dalton	gb GW574260.1
KV17 - 90	<i>Arabidopsis lyrata subsp.</i>	ref XM_002878567.1 	Lyrata DNAJ ısı şoku proteinleri ailesi	$2e^{-154}$	1733	433 aa	9.563000	1051530 Dalton	gb GW574257.1
KV69 - 99	<i>Nicotiana tabacum</i>		FotosistemI reaksiyonu alt	$6e^{-86}$	710	190 aa	9.564000	430523 Dalton	gb GW574258.1

			birimi (PsaN)						
KV2	<i>Avicennia marina</i>	gb EU121851.1 	Dehidrin (DHN)	$3e^{-28}$	878	194 aa	8.075000	533144 Dalton	gb GW574259.1
KV9	<i>Avicennia marina</i>	gb AF334141.1 	Sınıf I tip 2 metallothionein mRNA	$1e^{-41}$	527	98 aa		319472 Dalton	gb GW574261.1
KV22	<i>Olea europaea subsp. cuspidata</i>	emb FN996944.1 	Kloroplast genomu	0.0	1220	359 aa	6.060000	739821 Dalton	gb GW574262.1
KV41	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NM_125823.2 	Putatif splaying faktör (AT5G64270) mRNA	0.0	1976	251 aa	5.774000	1199105 Dalton	gb GW574263.1
KV58	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	ref XM_002871548.1 	Lyrata glikozil hidrolaz ailesi38 Protein	$5e^{-120}$	911	259 aa	10.216999	552634 Dalton	gb GW574264.1
KV60	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	ref XM_002864669.1 	ATEXO70E2	$2e^{-12}$	993	207 aa	9.537000	601752 Dalton	gb GW574265.1

KV95	<i>Datura stramonium</i>	<u>emb AJ25</u> <u>1898.1 </u>	Arjinin dekarboksilaz 1 (adc1 gen)	$3e^{-54}$	1060	165 aa	11.784999	643577 Dalton	<u>gb GW57426</u> <u>6.1 </u>
------	--------------------------	-----------------------------------	--	------------	------	--------	-----------	------------------	----------------------------------

Tablo 3.12: Kasım “yok yılı” kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi

İnsert no	Homolog bitki	Accession numarası	Fonksiyonu	E değeri	N. sayısı	ORF	İzoelektrik noktası	Moleküler ağırlığı	EST kaydı
KY14 – 36 - 85	<i>Ricinus communis</i>	ref XM_002533481.1 	Putatif ariadne-1 proteini	$1e^{-161}$	1436	347 aa	9.915999	871195 Dalton	gb GW574267.1
KY91- 97	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ref NM_179048.2 	Pre-mRNA splicing faktör 3B altbirim 10 kDa (AT4G14342)	$4e^{-56}$	698	109 aa	9.260000	422974 Dalton	gb GW574268.1
KY23	<i>Solanum lycopersicum</i>	ref NM_001247903.1 	Sıcakta indüklenen lipokalin (TIL), mRNA	$7e^{-130}$	745	196 aa	7.702000	451655 Dalton	gb GW574270.1
KY24	<i>Nicotiana tabacum</i>	gb AY702653.1 	Ökaryotik translasyon başlatma faktörü	$7e^{-138}$	1116	260 aa	6.764000	676905 Dalton	gb GW574271.1

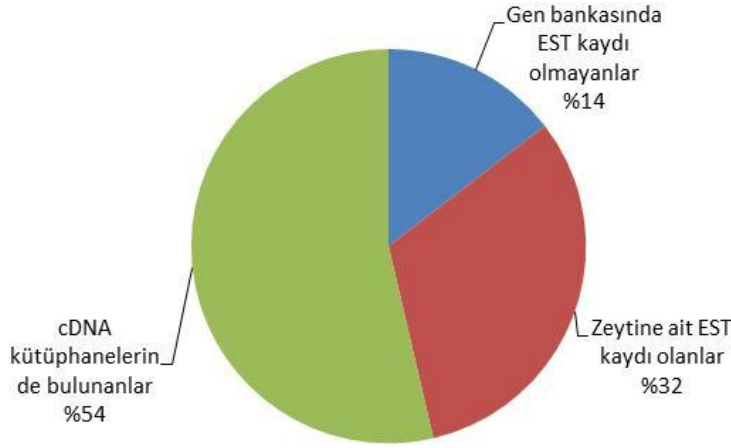
			eIF4E mRNA						
KY29	<i>Ricinus communis</i>	ref XM_002 510271.1 	F-box ve wd40 domain proteini	$4e^{-130}$	1616	334 aa	9.904999	980498 Dalton	gb GW57427 2.1/
KY31	<i>Plantago major</i>	emb AJ844 001.1 	Soğuk stresinde indüklenen protein (src1 gene)	$9e^{-27}$	767	225 aa	6.745000	465385 Dalton	gb GW57427 3.1/
KY32	<i>Olea europaea subsp.</i>	emb FN996 943.2 	Kloroplast genomu	0.0	634	102 aa	10.725999	383456 Dalton	gb GW57427 4.1/
KY59	<i>Arabidops is thaliana</i>	gb AF23682 6.1 	Plastid-spesifik ribozomal protein	$2e^{-39}$	505	108 aa	10.443999	306235 Dalton	gb GW57427 5.1/

Tablo 3.13: Meyve kütüphanesinden elde edilen cDNA dizilerinin nükleotit sayıları ve NCBI veritabanına göre benzeşme kayıtlarının gösterilmesi

İnsert no	Homolog bitki	Accession numarası	Fonksiyonu	E değeri	N. sayısı	ORF	İzoelektrik noktası	Moleküler ağırlığı	EST kaydı
MK4 - 22	<i>Solanum chacoense</i>	gb AY438596.1 	Triozfosfat izomeraz sitosolik izoformu mRNA,	0.0	1203	271 aa	8.935000	729751 Dalton	gb GW574277.1
MK13 - 17	<i>Digitalis lanata</i>	emb AJ249834.1 	Açıl-CoA bağlayan protein (acbp4 gene) mRNA	$3e^{-81}$	499	105 aa	9.650000	302452 Dalton	gb GW574279.1
MK46- 55 - 57	<i>Ricinus communis</i>	ref XM_002514749.1 	Protein ariadne-1, putative, mRNA	0.0	1449	328 aa	9.390000	878970 Dalton	gb GW574276.1
MK10	<i>Vitis vinifera</i>	ref XM_002265694.1 	Hypothetical protein LOC100251875 (LOC100251875)	$2e^{-16}$	668	195 aa	10.664999	405196 Dalton	gb GW574280.1
MK12- 20	<i>Solanum tuberosum</i>	gb AY197749.1 	UDP-glukoz 4-epimeraz (StUGE45) mRNA	0.0	1468	350 aa	8.846000	890547 Dalton	gb GW574278.1

MK51	<i>Olea europaea</i>	<u>gb GU2288</u> <u>99.2 </u>	Kloroplast genom	0.0	632	102 aa	10.542999	382205 Dalton	<u><i>gb GW5742</i></u> <u><i>81.1 </i></u>
------	----------------------	----------------------------------	------------------	-----	-----	--------	-----------	------------------	--

Zeytin bitkisi ile ilgili çalışmalar son yıllarda büyük oranda bir artış göstermiştir. Şöyle ki; 2010 yılının Temmuz ayında NCBI veritabanına 'olive' yazıldığında çıkan EST kayıt sayısı 3734 iken, 2012 Temmuz yılında EST kayıt sayısı 35316 dır. Buradan da anlaşıldığı gibi zeytin bitkisine ait genom projesine dair çalışmalar hızla artmaktadır. Bu çalışma ile NCBI veritabanına 48 tane yeni EST verilmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen cDNA kütüphaneleri EST analizine Şekil3.26'da görüldüğü gibi, %54 oranında kütüphanede bulunan klonlar, %14 oranında EST kaydı olmayanlar ve %32 oranında daha önceden zeytin EST kaydı olanlar bulunmaktadır. Buradan şu sonuç çıkmaktadır gen bankası verilerinde henüz kaydı olmayan %14 lük bir yeni bilgi elde edilmiştir.



Şekil 3.26: Kütüphanelerde ki klonların databanklardan elde edilen EST analizi

Bu tez kapsamında elde edilen yeni EST kayıtları kütüphanelere göre gruplandırılarak aşağıdaki tablolarda verilmiştir. NCBI kaydı adlı bölme daha önceden verilen EST kaydını göstermektedir.

Tablo 3.14: Temmuz “var yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi

İnsert No	NCBI Kaydı	Yeni EST kayıtları
TV45	gb GO246058.1 	gb GW574239.1
TV46		gb GW574240.1
TV111 – 148 -		gb GW574234.1
TV124 – 125- 150		gb GW574235.1
TV126		gb GW574241.1
TV146 – 151 – 187		gb GO243727.1
TV153		gb GW574242.1
TV154 - 160		gb GW574237.1
TV178		gb GW574238.1

Tablo 3.15: Temmuz “yok yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi

İnsert No	NCBI Kaydı	Yeni EST kayıtları
TY1		<i>gb GW574243.1 </i>
TY2 – 62	<u>gb GO245994.1 </u>	<i>gb GW574247.1 </i>
TY4	<u>gb GO243128.1 </u>	<i>gb GW574250.1 </i>
TY31 – 84	<u>gb GO244276.1 </u>	<i>gb GW574245.1 </i>
TY32 – 87		<i>gb GW574244.1 </i>
TY42 – 82		<i>gb GW574246.1 </i>
TY51 – 55	<u>gb GO244508.1 </u>	<i>gb GW574248.1 </i>
TY56 – 65	<u>gb GO244574.1 </u>	<i>gb GW574249.1 </i>
TY79		<i>gb GW574251.1 </i>
TY83		<i>gb GW574252.1 </i>
TY92		<i>gb GW574253.1 </i>
TY96		<i>gb GW574254.1 </i>

Tablo 3.16: Kasım “var yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi

İnsert no	NCBI Kaydı	Yeni EST kayıtları
KV5 – 11 – 37 - 97		gb GW574255.1
KV3 - 96	gb GO245557.1 	gb GW574256.1
KV8		gb GW574260.1
KV17 – 90		gb GW574257.1
KV69 - 99		gb GW574258.1
KV2		gb GW574259.1
KV9	gb GO243287.1 	gb GW574261.1
KV22	gb GO244970.1 	gb GW574262.1
KV41		gb GW574263.1
KV58		gb GW574264.1
KV60		gb GW574265.1
KV95		gb GW574266.1

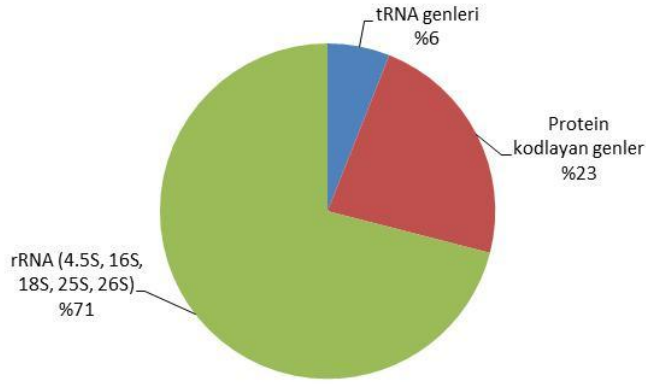
Tablo 3.17: Kasım “yok yılı” kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi

İnsert no	NCBI Kaydı	Yeni EST kayıtları
KY14 – 36 – 85		gb GW574267.1
KY91 – 97		gb GW574268.1
KY23		gb GW574270.1
KY24		gb GW574271.1
KY29		gb GW574272.1
KY31	gb GO243444.1 	gb GW574273.1
KY32	gb GO244508.1 	gb GW574274.1
KY59		gb GW574275.1

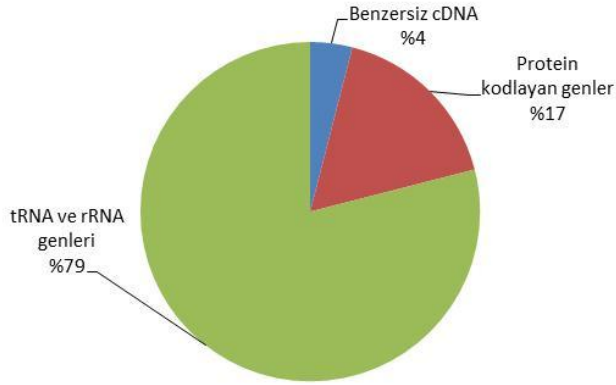
Tablo 3.18: Meyve kütüphanesine ait klonların NCBI da bulunan çeşitli veritabanlarındaki kayıt analizi

İnsert no	NCBI Kaydı	Yeni EST kayıtları
MK4 – 22	gb GO244052.1 	gb GW574277.1
MK13 – 17	 gb GO245447.1 	gb GW574279.1
MK10		gb GW574280.1
MK12 – 20		gb GW574278.1
MK51	gb GO244508.1 	gb GW574281.1
MK46 – 55 - 57		gb GW574276.1

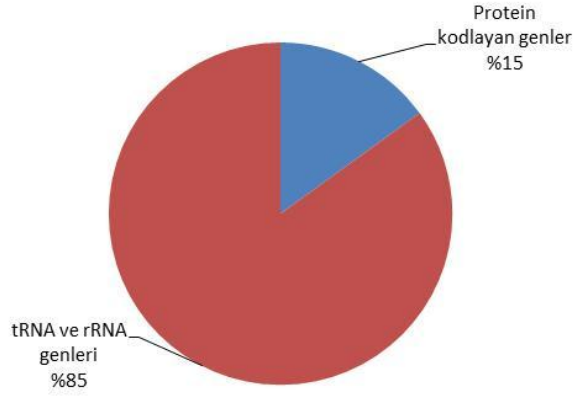
NCBI BLASTn analizinden elde edilen homoloji bilgilerine göre aşağıda görülen Şekil 3.27-31 pasta grafikleri elde edildi. Bu grafiklere bakıldığında insert içeren, tRNA-rRNA genleri, protein kodlayan genler gibi bir gruplandırma görülemektedir. Kütüphane insert profiline göre bu oranlar değişmektedir.



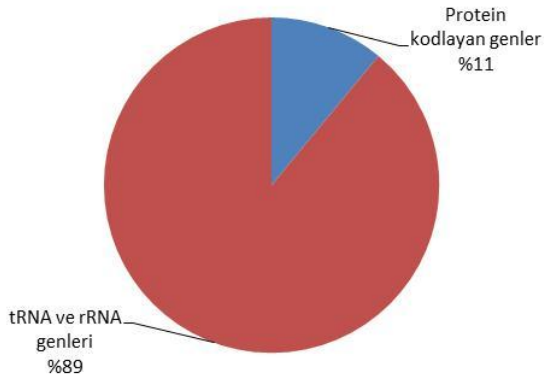
Şekil 3.27: Temmuz “var yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.



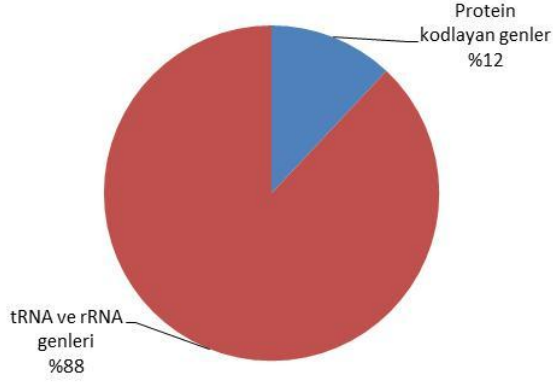
Şekil 3.28: Temmuz “yok yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.



Şekil 3.29: Kasım “var yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.



Şekil 3.30: Meyve kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.



Şekil 3.31: Kasım “yok yılı” kütüphanesine ait cDNA dizilerinin NCBI kayıtlarına olan benzerliklerinden elde edilen profili.

3.2.3 Anlık Gösterimli PCR’a Ait Bulgular

Tüm kütüphane klonlarından aşağıdaki tablolarda verilen primerler dizayn edildi ve buna göre anlık gösterimli PCR deneyleri yapıldı.

Tablo 3.19: Anlık gösterimli PCR da kullanılan TV kütüphanesine ait primerler

Klon ismi	F ve R primeri
TV124 -	5'-GGAGTAAGTGTAGAGGGAGATGTCTTA-3'
TV150	5'-ACAACCTTAAGAGTGGAATAAATGCTT-3'
TV126	5'-TGCAGTCAATTTTATTATTTTGTGTTGA-3' 5'-TTTTCCAAATATATTAATGCCAGAACT-3'
TV153	5'-TTTTATTGTCTGCATTTCTTCAGTTC-3' 5'-ATAAACAGAATTGTCCACCACTACAA-3'
TV154 -	5'-TGTGTTAGAACTCTCACTAGAGGAAGC-3'
TV160	5'-CACCATCTAATAACCTGTGTACGAAAT-3'
TV178	5'-AACTTTCTCAAGATTCTTATTCATCCA-3' 5'-ATAGCACGGAGATCAGTTAATTCAATA-3'
TV45	5'-GAGTACAAGGGACAACATTTTGAGTT-3' 5'-AGTGGATTCTTCTTCCTCAAAGTTAAT-3'
TV46	5'-GTAGGATGTACGTCCACCCAGT-3' 5'-GTTGTCCTTGCAGTAATCTTCCA-3'
TV111 -	5'-ATCTCCTGGTGCATTTAATTATTGAT-3'
TV148	5'-ATTTTAGTACAATACACGACGAACACA-3'
TV146 -	5'-TTCTCGTTTGAGATTTACCTACTTAT-3'
TV151 -	5'-AGAGAGAATGCATAACAACATACGATA-3'
TV187	

Tablo 3.20: Anlık gösterimli PCR da kullanılan TY kütüphanesine ait primerler

Klon ismi	F ve R primeri
TY1	5'-AACTGACACAATTGCAAAGAGG-3' 5'-CACAGTCATTAATTAACAACCAAAGAA-3'
TY32 - TY87	5'-TCACTTCAATATACATGAAACAAAATCTC-3' 5'-AGATAACCAAGAAAAAGAAAGAAGGAG-3'
TY56 - 65	5'-CAAAAACCTATGATCCACAGAAGGATA-3' 5'-CTTAACCAGTTTCTTGTTTTTGTTC-3'
TY79	5'-TCAAACCTCCTGCTGATTCTAAAGT-3' 5'-AAAGTTGTTCAACTCATCCTCGTAG-3'
TY83	5'-GCGTAGTGACTAATCCTTGTCTACC-3' 5'-AAGTTGGTAAAAGACAAATTTCAACA-3'T
TY92	5'-TGATTGAGATCAAACAAGCATACAG-3' 5'-ATGTCTAAATCGTACAACGCTCTCTT-3'
TY96	5'-TTGAAAAATACAAGGTATATGGATTGC-3' 5'-TCTAAGTAACAGACACAGACCTCAGAA-3'
TY42-82	5'-TGCTCTTCAAATTTGCTCTAATAAAA-3' 5'-TTTGAACAATAGTTGCTAACACTTCC-3'
TY4	5'-GGACATGTTGTTTTGGAATATACTCTT-3' 5'-CATAACAACCTAAAGATGAAAAGAACC-3'
TY2 - 62	5'-AGTGTACCCAGGTAAGTTTCACTGTAG-3' 5'-CAAAGTCCAACAACCTCTACATTACAGA-3'

Tablo 3.21: Anlık gösterimli PCR da kullanılan KV kütüphanesine ait primerler

Klon ismi	F ve R primeri
KV22	5'-GCCTCTAGGAATTTCTGGTACTTTC-3' 5'-GTAACCTGCATTAGCAGATTCATTT-3'
KV41	5'-TTATTGAACATGGTCTTAATGATGAAA-3' 5'-ATATATGGCATCCATAAGTGGTATGAT-3'
KV58	5'-TTTATTAAGAAGGAGTTTGGTGTGACT-3' 5'-AACGACTTCAAGACTCTCTCATATTC-3'
KV60	5'-ATGAGGTAGTGAAAGAAGATGGACTTA-3' 5'-ATTATTTAGGCTCAATCTCTCCAAACT-3'
KV69 - 99	5'-GTACCATATATTTCTGAGGACTTGGAG-3' 5'-GTTTAGAAGTTGCAAGTGGAAAAATAG-3'
KV8	5'-GAGAAACCGCCAACAATAAGTATAG-3' 5'-ATTTCTGGAGTTTTAGCACAATTTTC-3'
KV95	5'-CTAATCACCTTCCAAGATCTTTACT-3' 5'-AGAAAGCGTGGAGTATGAGTAGTATGT-3'
KV9	5'-GAATTGTATGAATGTTTTGGGTAAATC-3' 5'-TTGGTTTTTCGGTATATAATTAAGCAG-3'
KV2	5'-ATGAAGGAACTTACGACTTCAAC-3' 5'-TAATACAAACATGAAAAAGCACACG-3'
KV17 - 90	5'-ATGCTGAAGAGAAGTTTAAGGAGATTAG-3' 5'-TCAAATAATGACTCAAATAGATCAAAGG-3'
KV5 - 11 - 37 - 97	5'-CTGGTTGAGCTGCTTACCTATAAAA-3' 5'-TTGCTCTGTAGCAAGATCTTTACCT-3'
KV3 - 96	5'-AAACGGTTAGAACCATCAATACTTTC-3' 5'-CCAGTGAATTGATCAGAGAAATTAGA-3'

Tablo 3.22: Anlık gösterimli PCR da kullanılan KY kütüphanesine ait primerler

Klon ismi	F ve R primeri
KY23	5'-ATATAAGTCTGATCCCAATAGTGACGA-3' 5'-TTCTGTACAAGCATGTAGTGTATCTCC-3'
KY24	5'-GAATGTCAGATTAAGGCAGGATAAAA-3' 5'-AGCTTCTTAGCATCCTCATGAAATA-3'
KY29	5'-GGTTGTGTATAGTGGGAGTCTTGATA-3' 5'-ACTTTGATTTGATCAATACTTTGCTG-3'
KY31	5'-AAAAAGAAGAAAGACAAGAAAAAGCAT-3' 5'-ATACACAATCAAAGAGTAGCCAACAAC-3'
KY36	5'-CAGGAATCAAAGAAAATATTCTGAAC-3' 5'-TCGACTCATAGACAACTATGTACAGG-3'
KY59	5'-ATTCTCTCACATCAATCTCATCTCC-3' 5'-GTCCTCTTCCCTTATTCTTGCCT-3'
KY23	5'-ATATAAGTCTGATCCCAATAGTGACGA-3' 5'-TTCTGTACAAGCATGTAGTGTATCTCC-3'
KY24	5'-GAATGTCAGATTAAGGCAGGATAAAA-3' 5'-AGCTTCTTAGCATCCTCATGAAATA-3'
KY29	5'-GGTTGTGTATAGTGGGAGTCTTGATA-3' 5'-ACTTTGATTTGATCAATACTTTGCTG-3'
KY31	5'-AAAAAGAAGAAAGACAAGAAAAAGCAT-3' 5'-ATACACAATCAAAGAGTAGCCAACAAC-3'
KY36	5'-CAGGAATCAAAGAAAATATTCTGAAC-3' 5'-TCGACTCATAGACAACTATGTACAGG-3'
KY59	5'-ATTCTCTCACATCAATCTCATCTCC-3' 5'-GTCCTCTTCCCTTATTCTTGCCT-3'
KY91 - 97	5'-TTCTATCGGGTGTATAATTTGATCTTT-3' 5'-TGACTATCAAATTCTATCGGGTGTAT-3'

Tablo 3.23: Anlık gösterimli PCR da kullanılan MK kütüphanesine ait primerler

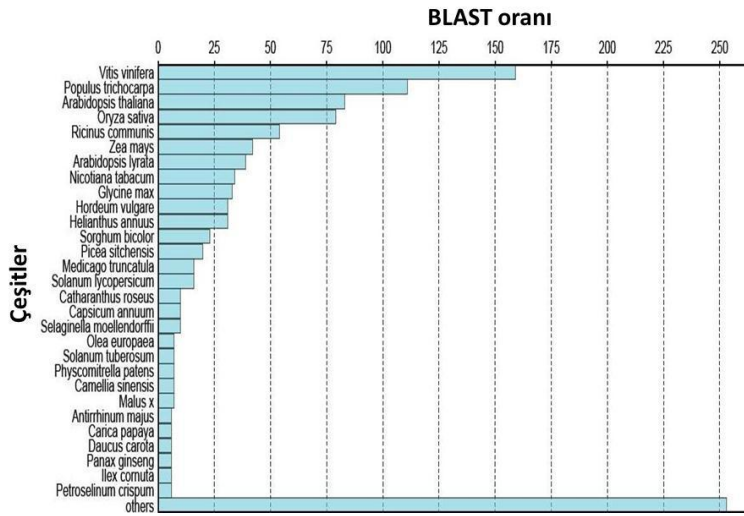
Klon ismi	F ve R primeri
MK10	5'-GTCGTCTTCCCAAATATAGAACTC-3' 5'-GGGTCTCTACACCTTTAGACTTTTTG-3'
MK12 - 20	5'-TATATTGCTGAGGTTCAATCCAG-3' 5'-TGCTAAATCCACAACATGGATATAAT-3'
MK13 - 17	5'-CAAGCTTGTTCTTTATGGACTTTACA-3' 5'-CATGGATGAGTACTTAGTTATGCTGCT-3'
MK51	5'-CTTGAAATCCAATTCTAAAAGATCAAA-3' 5'-ATAATAGAGGAATGGGGTAGAGTAGA-3'
MK4 - 22	5'-CCTGGATTAACCTGTGCATTTATACTT-3' 5'-CATCTAAGCGAAGTTCCAAATAGATAC-3'

Tablo 3.24: Anlık gösterimli PCR da kullanılan kontrol primerleri

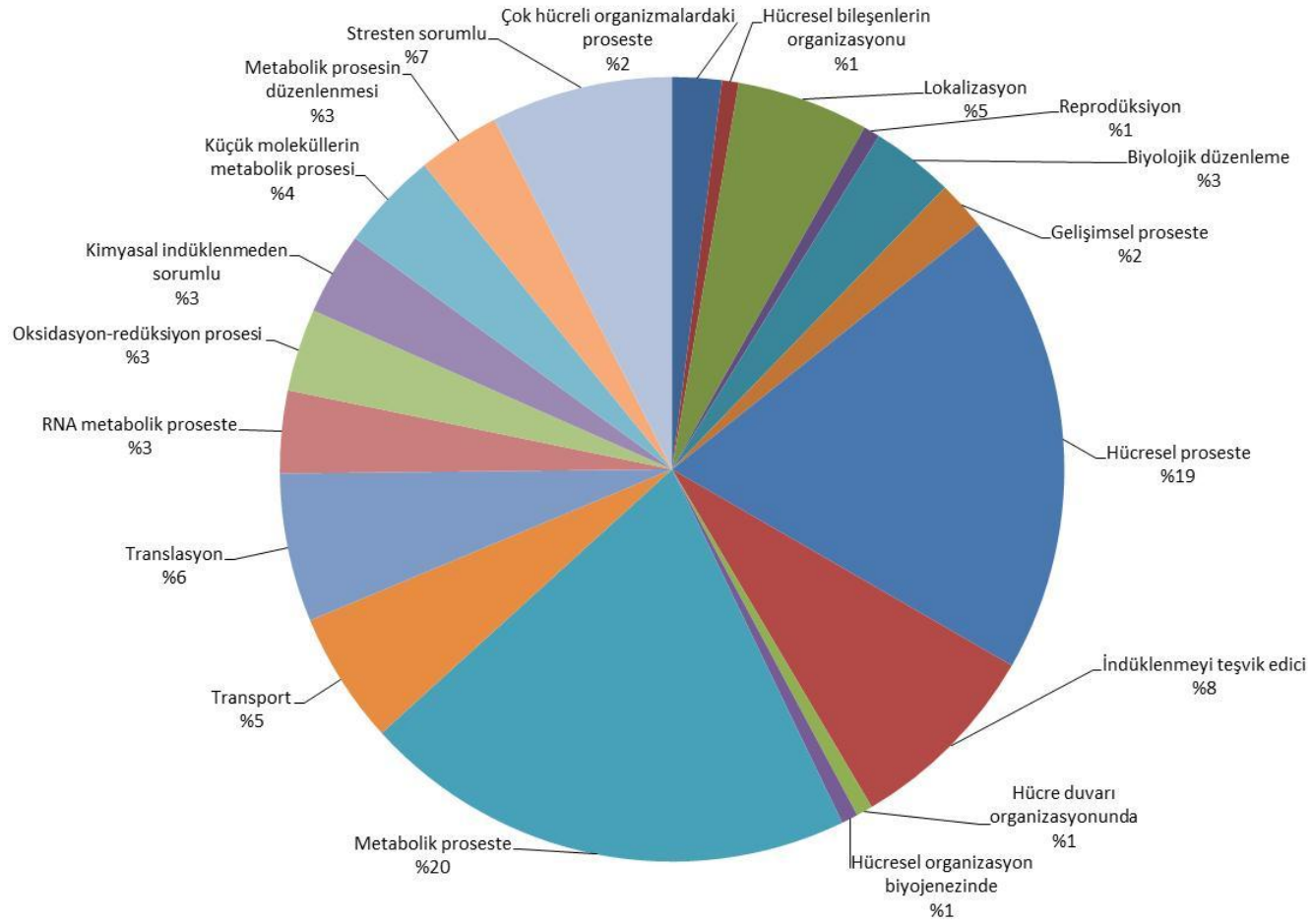
Kontrol primerinin ismi	F primeri R primeri
Olest34 (CK087212.1)	5'-GACCGTAGGTGCGATGATTT-3' 5'-CCGCCTGGACAATTAGACAT-3'
α -tubulin (B2BGT6)	5'-TCACTGGTATGTGGGTGAGG-3' 5'-TGAGACCATTGGCTTGATTG-3'
β -aktin (Q8GTL3)	5'-GAATTGCCAGATGGACAGGT-3' 5'-GAACCACCACTGAGGACGAT-3'
GAPDH (B2BGU9)	5'-ACAGCTCCTGGTAAGGGTGA-3' 5'-GGCTTGCGTCAAGAAGTCTC-3'
26S rRNA	5'-GACTTAGAGGCGTTCAGTCAT-3' 5'-GTGAGACAGGTTAGTTTTACC-3'
β -tubulin	5'-CCGGTACAAAGCGACAATGAT-3' 5'-AGGGGATGGGAAGACAGAGAAAGT-3'
18S rRNA	5'-ATTTAAGTTGTTGCAGTTAAA-3' 5'-GCACTCTAATTTCTTCAAAGT-3'

3.2.1 cDNA Gen Kütüphaneleri Klonlarının BLASTGO Analizine Göre Fonksiyonel Olarak Gruplandırılması

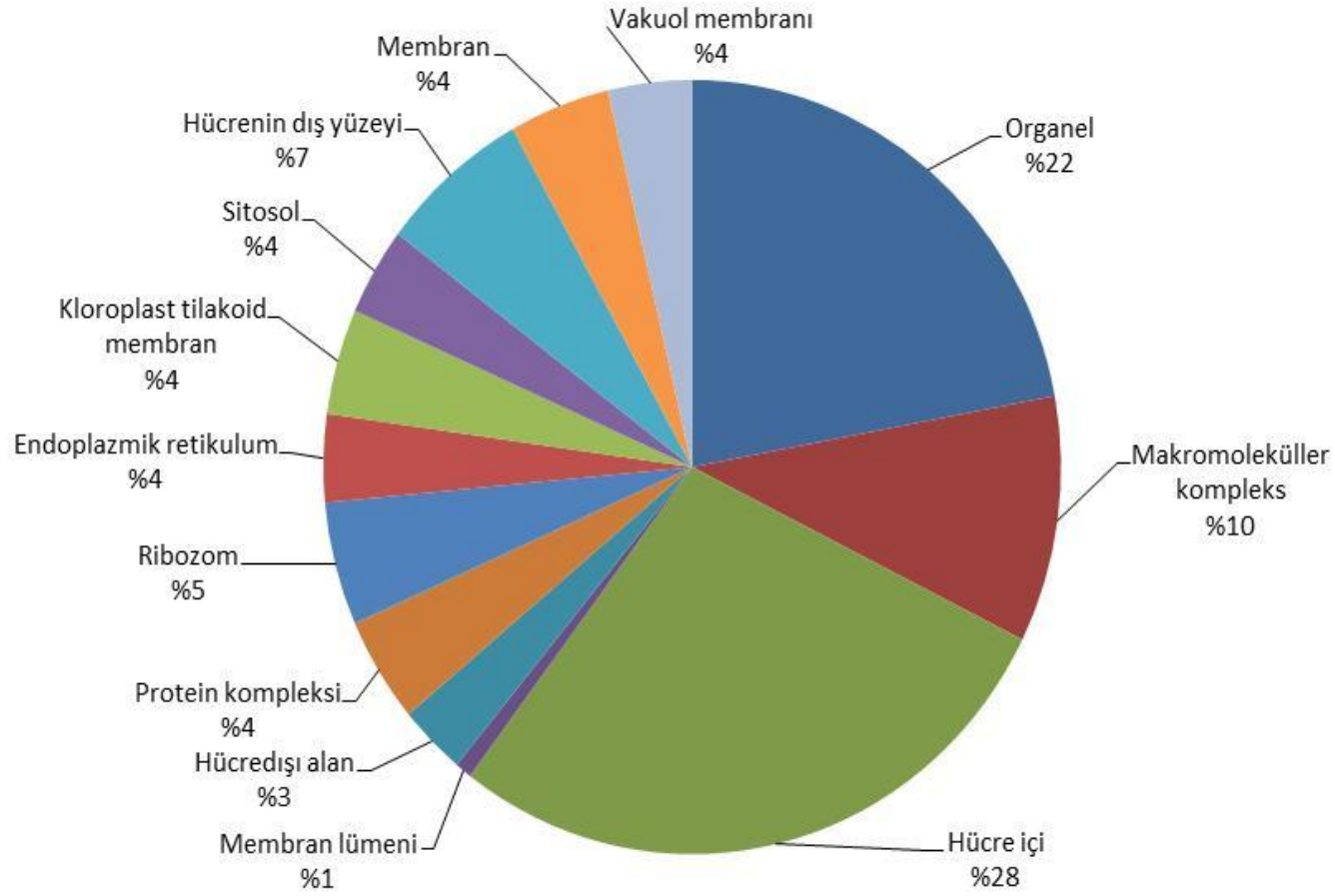
BLASTn analizine ek olarak gen ontoloji analizi yaprak kütüphanelerinden ve meyve kütüphanesinden yapıldı. Bunun için Blast2GO adlı program kullanıldı. Bu program BLASTx benzeri bir program olup çeşitli çalışılan genlerin protein fonksiyonlarını ve anotasyonlarına göre verileri elde etmeye yaramaktadır [418, 419]. Kütüphanelerden elde edilen klonların diğer bitkiler ile benzerlikleri Şekil 3.32’de görülmektedir. Ayrıca bu program ile biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşenler gibi 3 farklı kategoride kütüphane genlerine ait bilgiler edinilmektedir. Bu programdan elde edilen veriler Şekil 3.33-35’de görüldüğü gibi düzenlenmiştir.



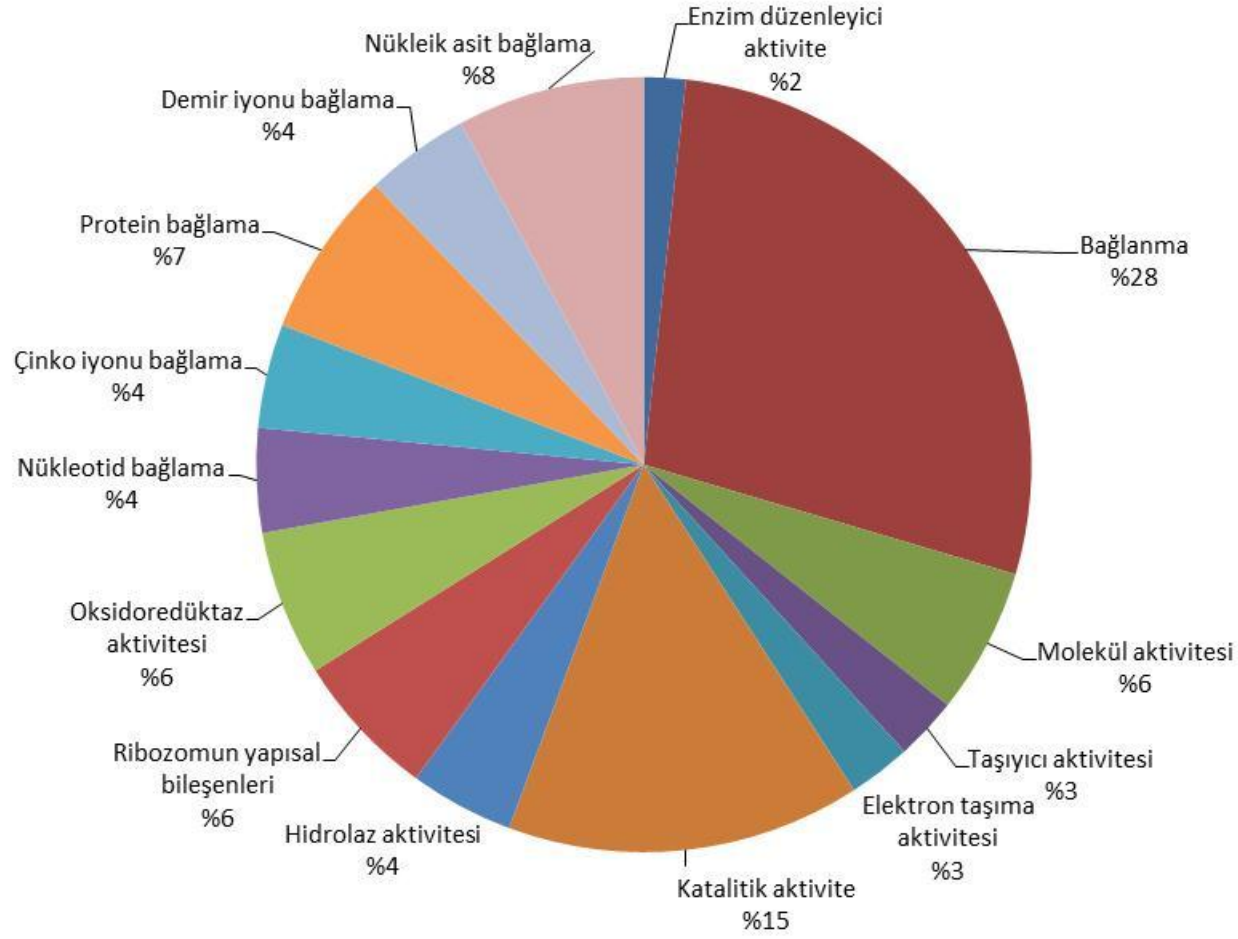
Şekil 3.32: Kütüphanelerden izole edilen cDNA’ların benzerlik gösterdiği bitkilerin dağılımı



Şekil 3.33: Kütüphanelerden izole edilen cDNA'ların biyolojik proses kategorisindeki dağılımı



Şekil 3.34: Kütüphanelerden izole edilen cDNA'ların fonksiyonel proses kategorisindeki dağılımı



Şekil 3.35: Kütüphanelerden izole edilen cDNA'ların moleküler proses kategorisindeki dağılımı

Şekil 3.33, 3.34 ve 3.35'te görülen pasta grafiklerine kütüphane klonlarının metabolik ve hücrenel süreçte daha fazla görev aldıkları, fonksiyonlarına bakıldığında hücre içi ve organellerde daha fazla bulunduğu, moleküler süreçte bakıldığında ise moleküler sürece bakıldığında ise bağlanma ve katalitik aktivitede daha fazla görev aldıkları görülmektedir.

Kütüphanelerden elde edilen cDNA'ların BLASTn analizi incelemeleri Tablo 3.25'de görülmektedir. En fazla cDNA'nın Kasım "var" yılında elde edildiği görülmektedir. TV146 – 151 – 187 ve TY31 – 84 numaralı klonların ve TY51 – 55, KV32 ve MK51 numaralı klonların, KV14 – 36 – 85 ve MK46 - 55 – 57 numaralı klonların aynı gen oldukları tespit edildi.

Tablo 3.25: Bütün kütüphanelerin istatistiki değerleri ve karşılaştırılması

İnsert profili	Kütüphaneler					Ortalama
	TV	TY	KV	KY	MK	
Toplam cDNA sayısı	14	19	20	12	11	15
Birden fazla görülen cDNA sayısı	4	6	4	2	4	4
cDNA çeşit sayısı (aynı mRNA'nın farklı bölgelerini içeren cDNA dizileri farklı çeşit kabul edildi)	9	12	14	9	6	10
Farklı homolog gen sayısı	7	10	11	7	4	7
En bol bulunan homolog gen sayısı	3	3	4	3	3	3
Tüm kütüphanelerde görülen cDNA sayısı	0	0	0	0	0	0

Tablo2.25 (Devam)

Dört kütüphanelerde görülen cDNA sayısı	0	1	1	1	1	0.8
Sadece meyve kütüphanesinde görülen gne sayısı	0	0	0	0	4	0.8
Benzersiz cDNA dizileri	0	4	0	0	0	0.8
Ortalama insert büyüklüğü (kb)	1.81	1.1	1.5	1.0	1.74	1.46
		0	9	7		

cDNA dizilerinin BLASTn analizinde benzerlik gösterdiği bitkilerin genel olarak dağılımı Tablo 3.26’da görülmektedir. Her kütüphanede elde edilen dizilerin benzerlik gösterdiği bitkilerde genel olarak ve beklendiği üzere farklılık göstermesine rağmen, en fazla *Arabidopsis thaliana*’ya benzerlik en fazladır. Aynı zamanda *Olea europaea* L. bitkisine benzeyen 4 tane gen bulunmuştur. Zeytine benzeyen genlerin ayrıntılı bilgileri Tablo 3.27’de görülmektedir. Bu genlerin özelliklerine bakıldığında ise fotosentez ile ilgili oldukları görülmektedir.

Tablo 3.26: Kütüphanelerdeki klonların homoloji gösterdiği bitkilerin isimleri ve istatistikleri

Bitkiler	Kütüphaneler				
	TV	TY	KV	KY	MK
<i>Glycine max</i>	1	-	-	-	-
<i>Capsicum annuum</i>	1	1	-	-	-
<i>Nicotiana sp.</i>	1	1	1	1	-
<i>Olea europaea L.</i>	2	1	-	-	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	2	7	6	4
<i>Spinacia oleracea</i>	1	-	-	-	-
<i>Arnebia euchroma</i>	1	-	-	-	-
<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	1	1	1	-
<i>Carpodocus roseus</i>	-	1	-	-	-
<i>Populus trichocarpa</i>	-	1	-	-	-
<i>Avicennia marina</i>	-	-	2	-	-

Tablo 2.26 (Devam)

<i>Oryza sativa</i>	-	-	1	-	-
<i>Datura stramonium</i>	-	-	1	-	-
<i>Vitis vinifera</i>	-	-	-	1	1
<i>Plantago major</i>	-	-	-	1	-
<i>Retama raetam</i>	-	-	-	1	-
<i>Solanum tuberosum</i>	-	-	-	-	1
<i>Digitalis lanata</i>	-	-	-	-	1
<i>Petunia x hybrida</i>	-	-	-	-	1

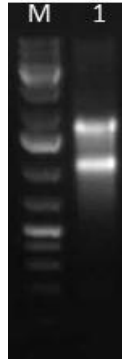
Tablo 3.27: Kütüphane klonlarının NCBI BLASTn analizinde zeytin kayıtlarına olan benzerlikleri

İnsert No	Homoloji gösterdiği fonksiyon	E değeri	Dizi uzunluğu	NCBI kaydı
TV178	<i>Olea europaea</i> ATP synthase epsilon subunit	1e-31	3200	embCAD 23950
TV45	<i>Olea europaea</i> putative cytochrome P450 mRNA	5e-20	3000	gi154257 296
TY51	<i>Olea europaea</i> cultivar Bianchera PSII component (psbJ) gene, partial cds;	0.0	1210	gi170785 617
KY32		0.0	600	
MK51		0.0	800	
KV22	<i>Olea europaea</i> cultivar Bianchera tRNA-His (trnH) gene	0.0	1000	gi170785 601

Kütüphane cDNA dizilerinin protein özelliklerini belirlemek için SOSUI [420] analizi yapıldı.. Çözülebilir protein özelliğine sahip klonların numaraları şu şekildedir; TV111 -148, TV124 - 150, TV146 - 187, TV154 - 160, TV178, TV45, TV46, TV153, TY4, TY42 - 82, TY51 - 55, TY56 - 65, TY79, TY83, TY92, TY96, KV5 - 11, KV3 - 96, KV69 - 99, KV17 - 90, KV8, KV2, KV9, KV41, KV60, KV95, KY36 - 85, KY91 - 97, KY23, KY24, KY29, KY31, KY59, MK4 - 22, MK13 - 17, MK12 - 20, MK51, MK10

Farklı çıkan klonlar ise TV126 (hrfl iç membran proteini), TY31 - 84 (P450), TY2 - 62 (yaralanma stres geni), KV22 (tRNA his geni), KV58 (Glikozil hidrolaz) dir.

Öncelikle zeytin yaprak örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen total RNA örnekleri %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek Şekil 3.36'daki gibi görüntülendi.



Şekil 3.36: Zeytinden total RNA örneğinin agaroz jel görüntüsü. (M: RNA büyüklük belirteci, 1: Total RNA örneği)

Total RNA örneğinden Reverz Transkriptaz enzimi ile tek iplikli cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA ürünleri *RNaz H* ile muamele edilerek RNA - DNA hibrid sarmallarındaki RNA molekülleri uzaklaştırıldı ve DNA Polimeraz I enzimi ile ikinci zincir sentezi yapıldı. Elde edilen çift zincirli cDNA molekülleri 15 ünite T4 Polimeraz enzimi ile küt uçlu hale getirildi ve küt uçlu pJET1.2 klonlama vektörü ile

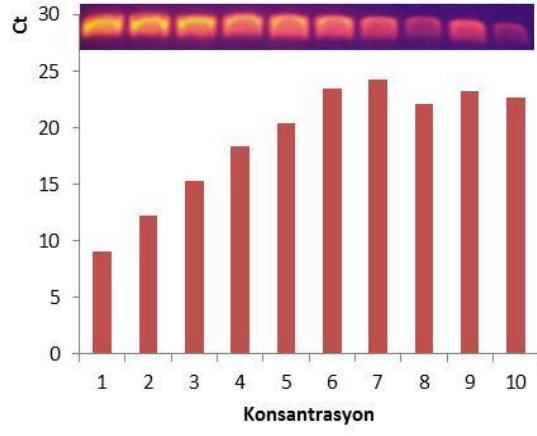
E. coli GM2163 kompetan hücrelerine klonlandı. Petrilerden elde edilen koloniler numaralandırılarak 100 adet koloni rastgele seçilerek plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit izolasyonu yapılan örnekler insert kontrolü için *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesildi ve %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek, her kütüphaneye ait jel görüntüleri elde edildi.

Kütüphanelerden elde edilen klonların buldukları dönemlerin doğru dönem olduğu ve / veya olmadığı ile ilgili bilgiler edinmek amacıyla anlık gösterimli PCR deneyleri yapıldı. Bütün anlık gösterimli PCR primerleri 150 - 200 nükleotit uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlandı ve tüm reaksiyonlar 3 tekrarlı kuruldu. Anlık gösterimli PCR için öncelikle standart çalışması yapıldı ve buna göre bir formül elde edildi ve bu formüle göre Ct değerleri gen kopya sayısına dönüştürerek grafikler çizildi.

$$\text{Kopya sayısı} = (-0,3909\Delta^{Ct} + 13,8664)$$

Tablo 3.28: Anlık gösterimli PCR için kullanılan standartların seyreltme oranları

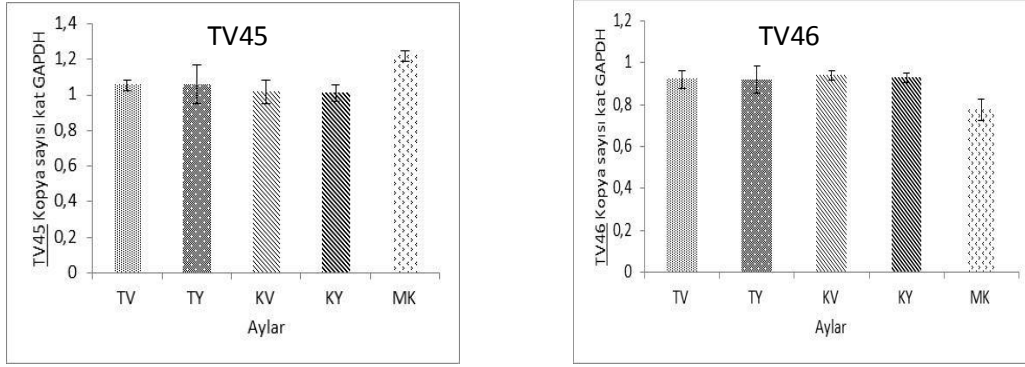
Standartlar	seyreltme oranı	Ct
1	1	9,11
2	0,1	12,23
3	0,001	15,26
4	0,0001	18,32
5	0,00001	20,43
6	0,000001	23,42
7	0,0000001	24,28
8	0,00000001	22,09
9	0,000000001	23,23
10	1E-10	22,66



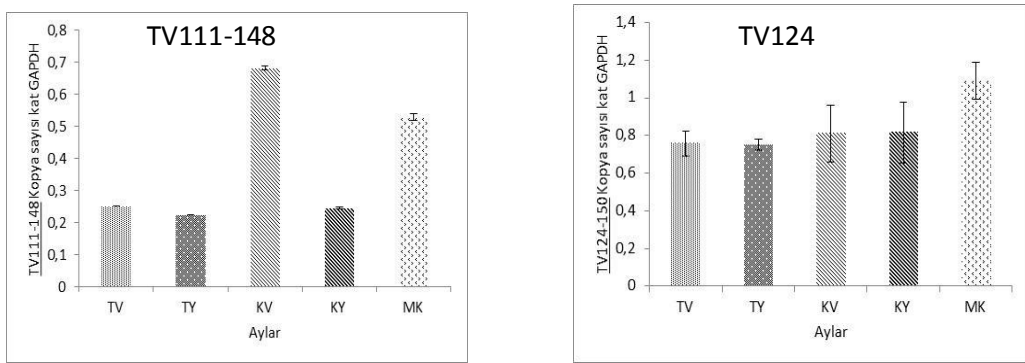
Şekil 3.37: Anlık gösterimli PCR için standart çalışması

3.2.1.1 Temmuz “Var” Yılına Ait Klonların Anlık Gösterimli PCR Sonuçları

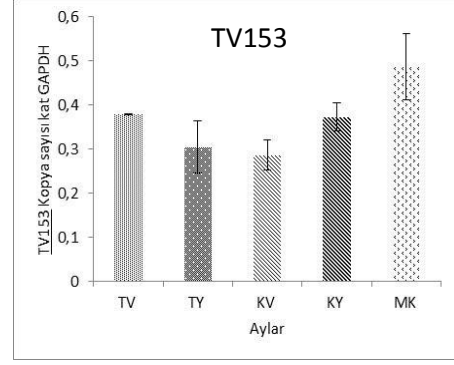
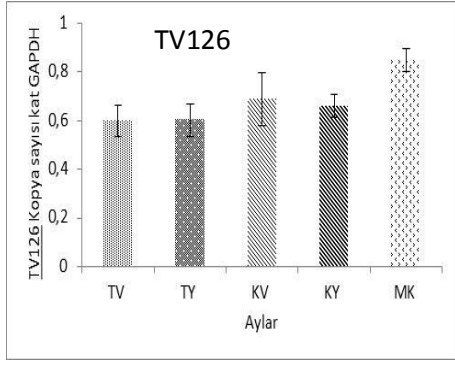
Tablo 3.19’da görülen primerler ile Temmuz “var yılı” klonlarının 2 farklı yılda toplanmış, 2 farklı aya ait ve bir tane meyve örneğinden elde edilen cDNA kalıpları BIONEAR anlık gösterimli PCR makinesi kullanılarak yapıldı. Ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kontrol primeri olarak kullanılan GAPDH ile orantılanarak şekillerde görülen genlere ait kopya sayısı grafikleri elde edildi.



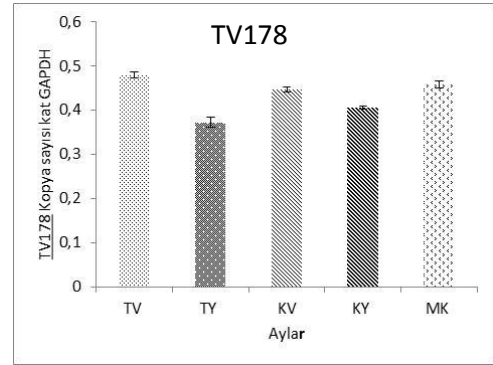
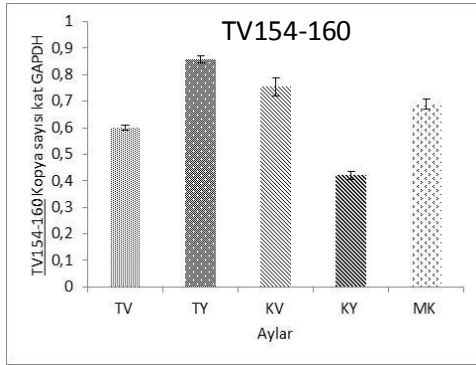
Şekil 3.38: Temmuz “var yılı” 45 ve 46 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



Şekil 3.39: Temmuz “var yılı” 111 - 148 ve 124 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



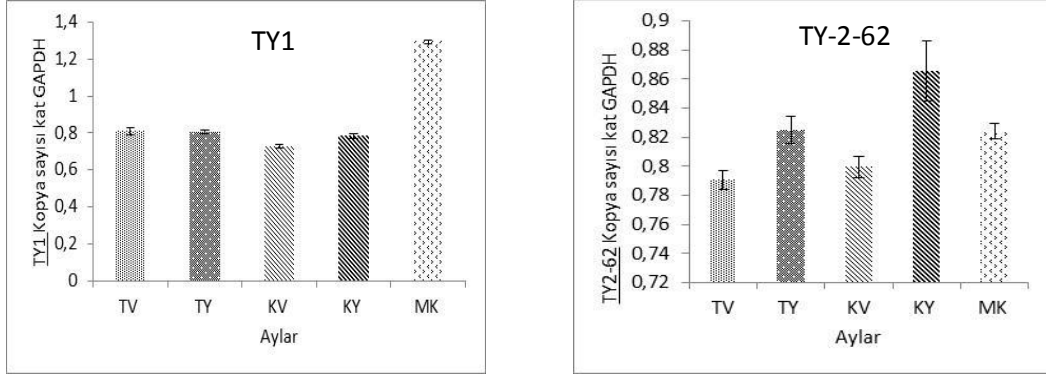
Şekil 3.40: Temmuz “var yılı” 126 ve 153 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



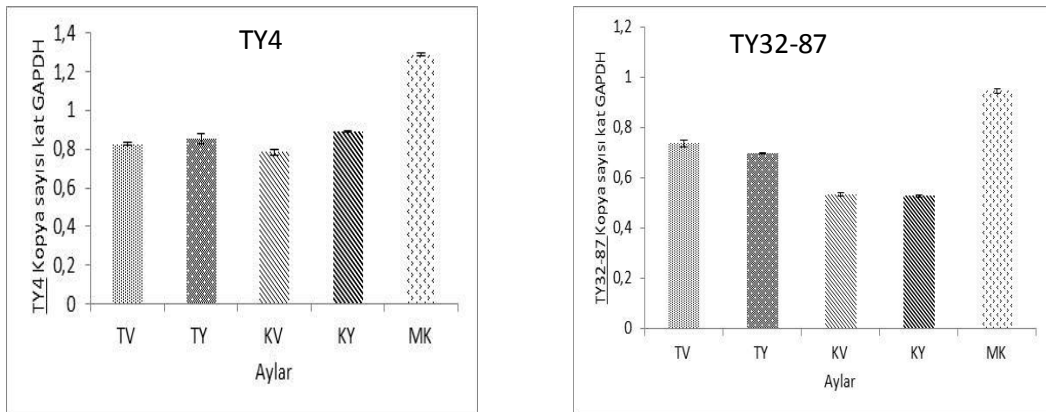
Şekil 3.41: Temmuz “var yılı” 154 - 160 ve 178 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri

3.2.1.2 Temmuz “Yok” Yılına Ait Klonların Anlık Gösterimli PCR Sonuçları

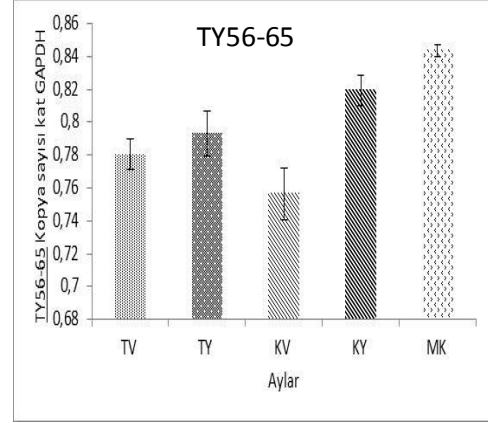
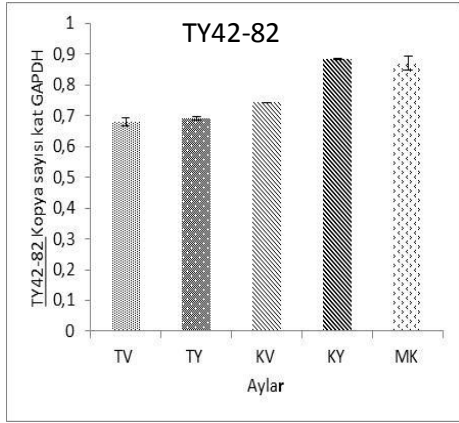
Tablo 3.20’de görülen primerler ile Temmuz “yok yılı” klonlarının 2 farklı yılda toplanmış, 2 farklı aya ait ve bir tane meyve örneğinden elde edilen cDNA’lar ile BIONEAR anlık gösterimli PCR makinesi kullanılarak ekspresyon seviyeleri kontrol primeri olarak kullanılan kat GAPDH ile orantılanarak şekillerde görülen genlere ait kopya sayısı grafikleri elde edildi.



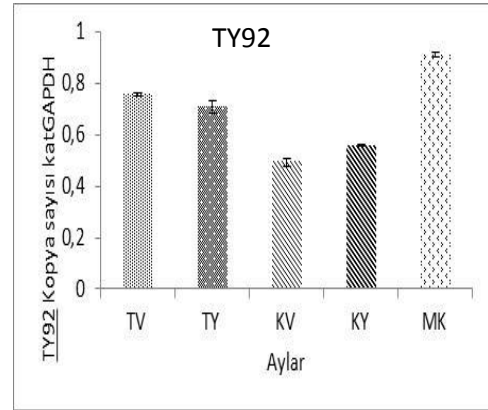
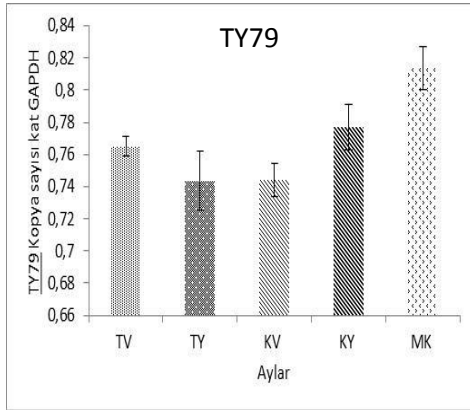
Şekil 3.42: Temmuz “yok yılı” 1 ve 2 - 62 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



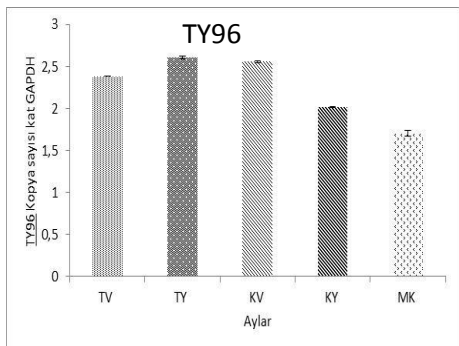
Şekil 3.43: Temmuz “yok yılı” 4 ve 32 - 87 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



Şekil 3.44: Temmuz “yok yılı” 42 – 82 ve 56 - 65 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



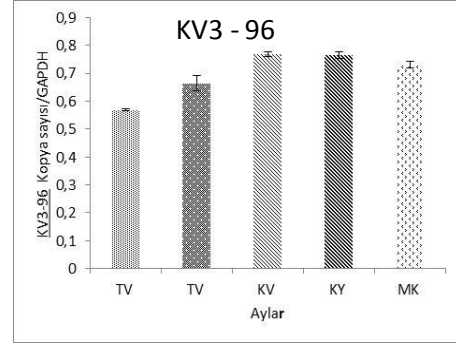
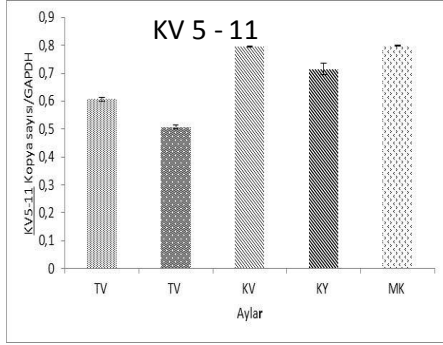
Şekil 3.45: Temmuz “yok yılı” 79 ve 92 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



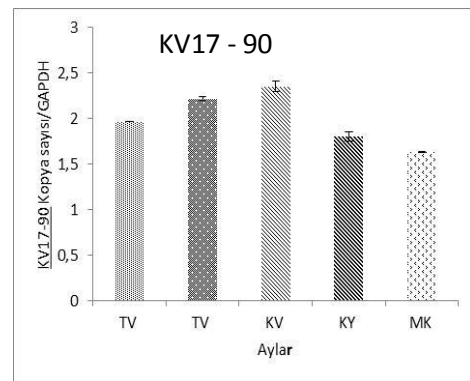
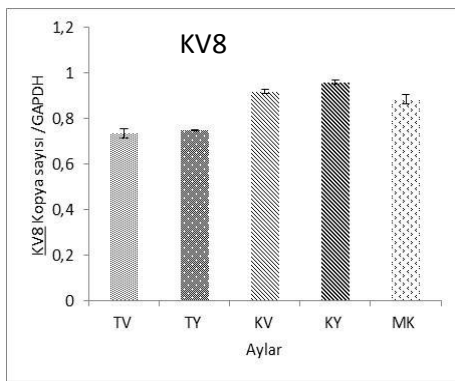
Şekil 3.46: Temmuz “yok yılı” 96 numaralı klona ait anlık gösterimli PCR grafiği

3.2.1.3 Kasım “Var Yılı” Klonlarının Anlık Gösterimli PCR Sonuçları

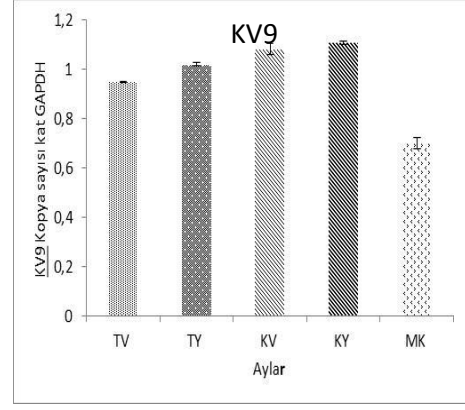
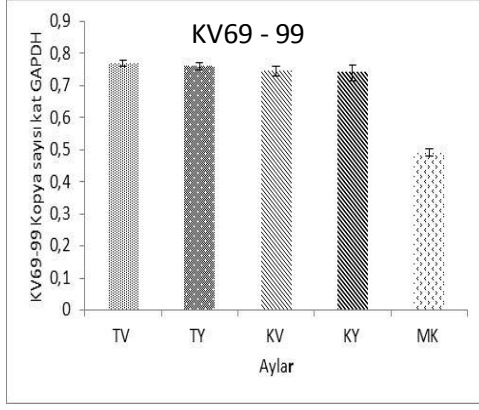
Tablo 3.21’de görülen primerler ile Kasım “var yılı” klonlarının 2 farklı yılda toplanmış, 2 farklı aya ait ve bir tane meyve örneğinden elde edilen cDNA’lar ile BIONEAR anlık gösterimli PCR makinesi kullanılarak ekspresyon seviyeleri kontrol primeri olarak kullanılan kat GAPDH ile orantulanarak şekillerde görülen genlere ait kopya sayısı grafikleri elde edildi.



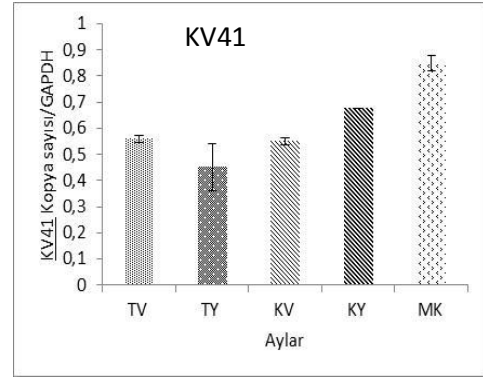
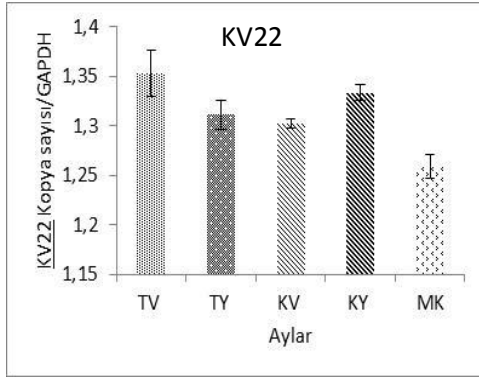
Şekil 3.47: Kasım “var yılı” 5 – 11 ve 3 – 96 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



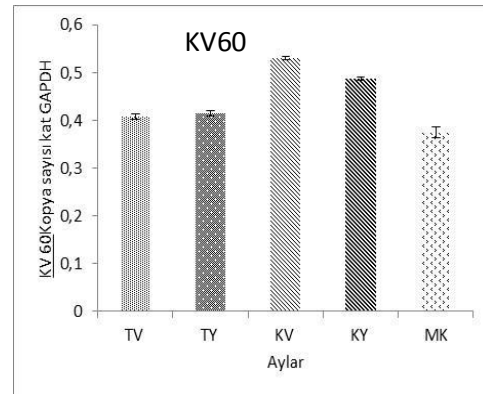
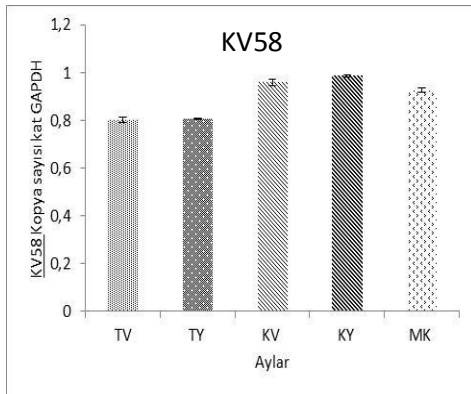
Şekil 3.48: Kasım “var yılı” 8 ve 17 – 90 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



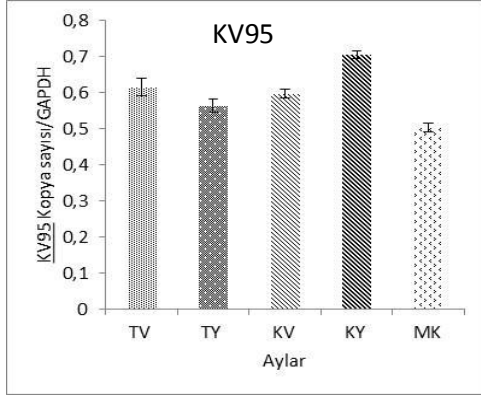
Şekil 3.49: Kasım “var yılı” 69 – 99 ve 9 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



Şekil 3.50: Kasım “var yılı” 22 ve 41 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



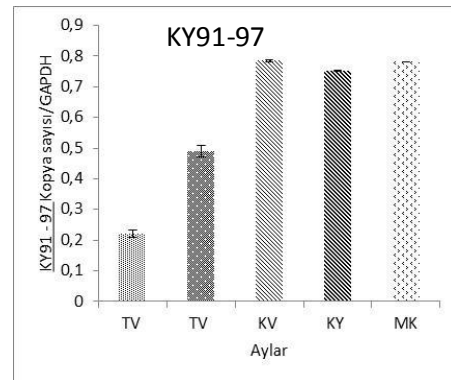
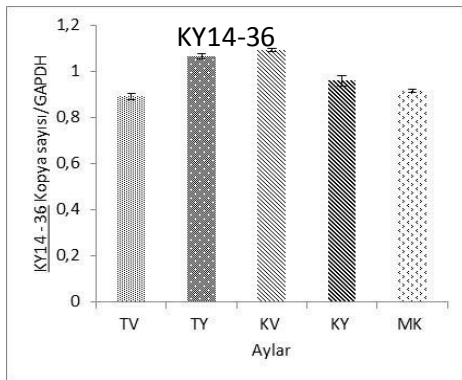
Şekil 3.51: Kasım “var yılı” 58 ve 60 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



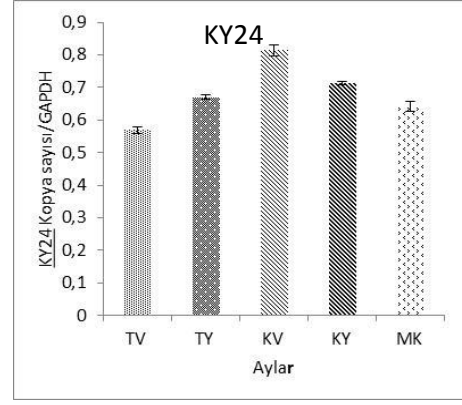
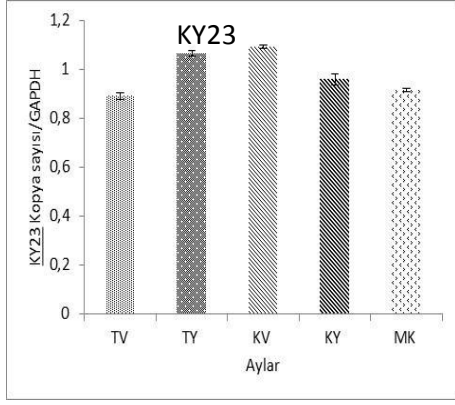
Şekil 3.52: Kasım “var yılı” 95 numaralı klona ait anlık gösterimli PCR grafiği

3.2.2 Kasım “Yok Yılı” Klonlarının Anlık Gösterimli PCR Sonuçları

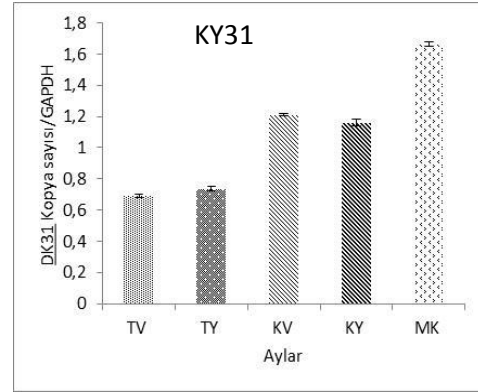
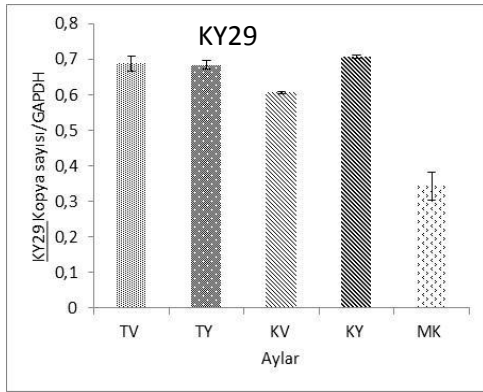
Tablo 3.22’de görülen primerler ile Kasım “yok yılı” klonlarının 2 farklı yılda toplanmış, 2 farklı aya ait ve bir tane meyve örneğinden elde edilen cDNA’lar ile BIONEAR anlık gösterimli PCR makinesi kullanılarak ekspresyon seviyeleri kontrol primeri olarak kullanılan kat GAPDH ile orantılanarak şekillerde görülen genlere ait kopya sayısı grafikleri elde edildi.



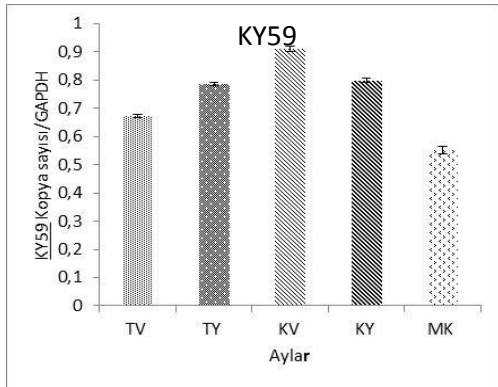
Şekil 3.53: Kasım “yok yılı” 14 - 36 ve 91 – 97 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



Şekil 3.54: Kasım “yok yılı” 23 ve 24 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



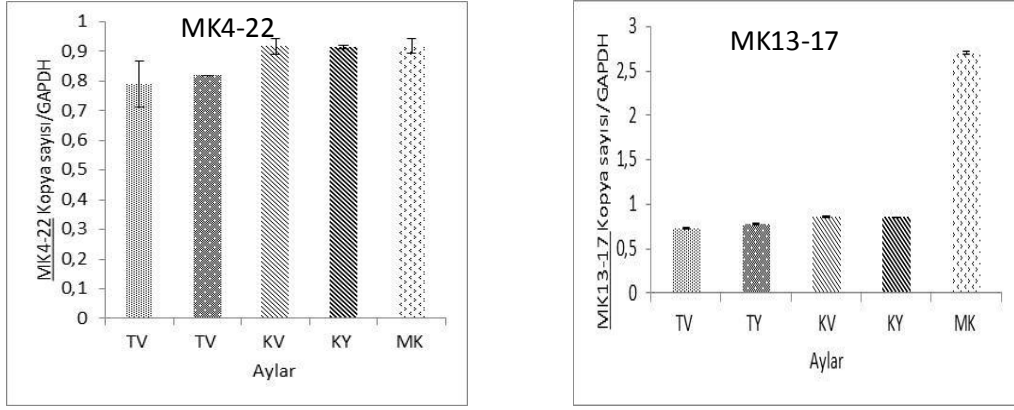
Şekil 3.55: Kasım “yok yılı” 29 ve 31 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri



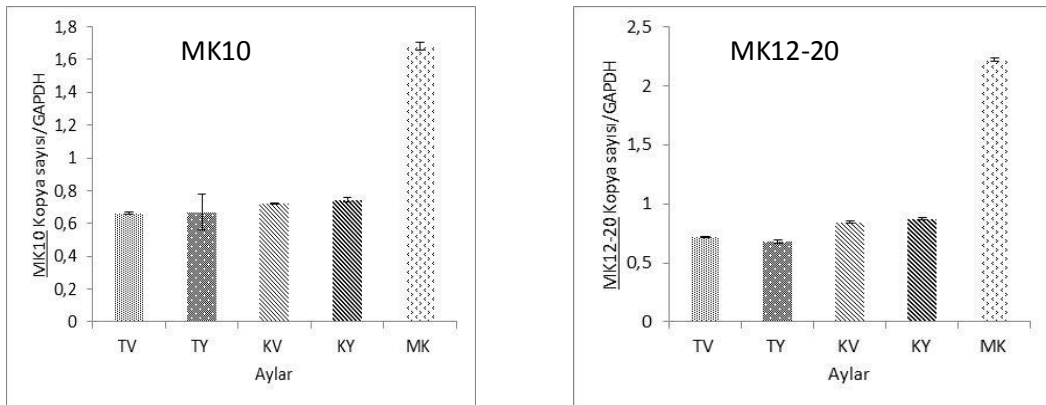
Şekil 3.56: Kasım “yok yılı” 59 numaralı klonuna ait anlık gösterimli PCR grafiği

3.2.2.1 Meyve Kütüphanesine Ait Klonların Anlık Gösterimli PCR Sonuçları

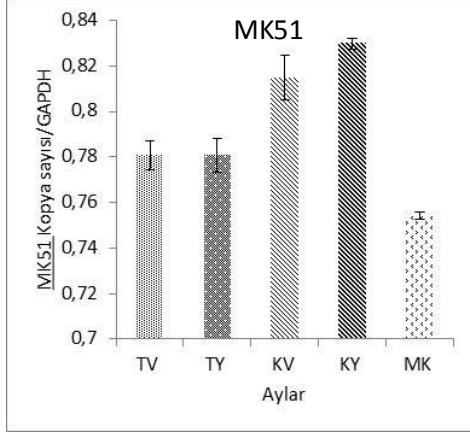
Tablo 3.23’de görülen primerler ile meyve kütüphanesi klonlarının BIONEAR anlık gösterimli PCR makinesi kullanılarak ekspresyon seviyeleri kontrol primeri olarak kullanılan kat GAPDH ile orantılanarak şekillerde görülen genlere ait kopya sayısı grafikleri elde edildi.



Şekil 3.57: Meyve kütüphanesi 4 – 22 ve 13 – 17 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri

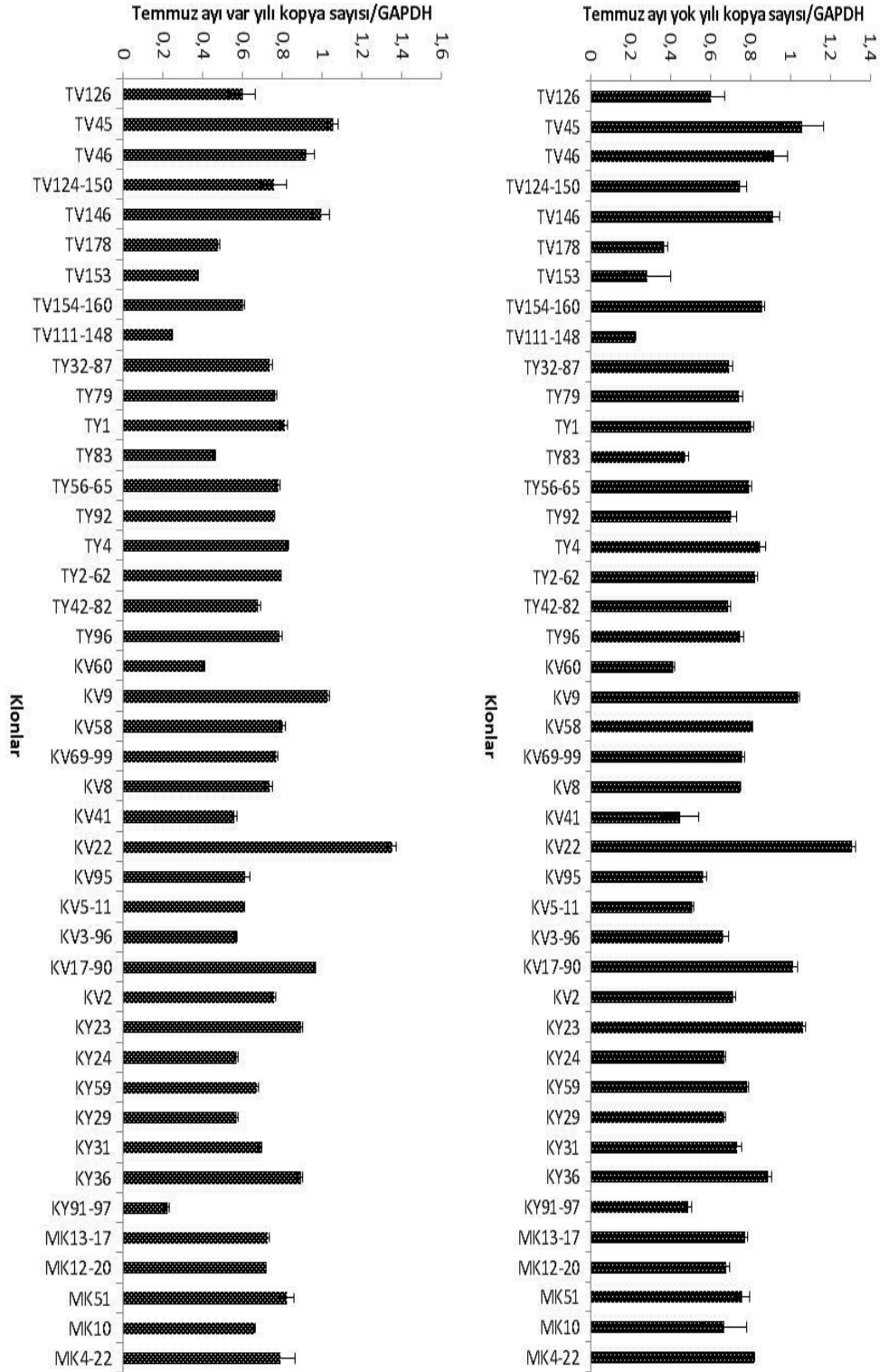


Şekil 3.58: Meyve kütüphanesi 10 ve 12 - 20 numaralı klonlarına ait anlık gösterimli PCR grafikleri

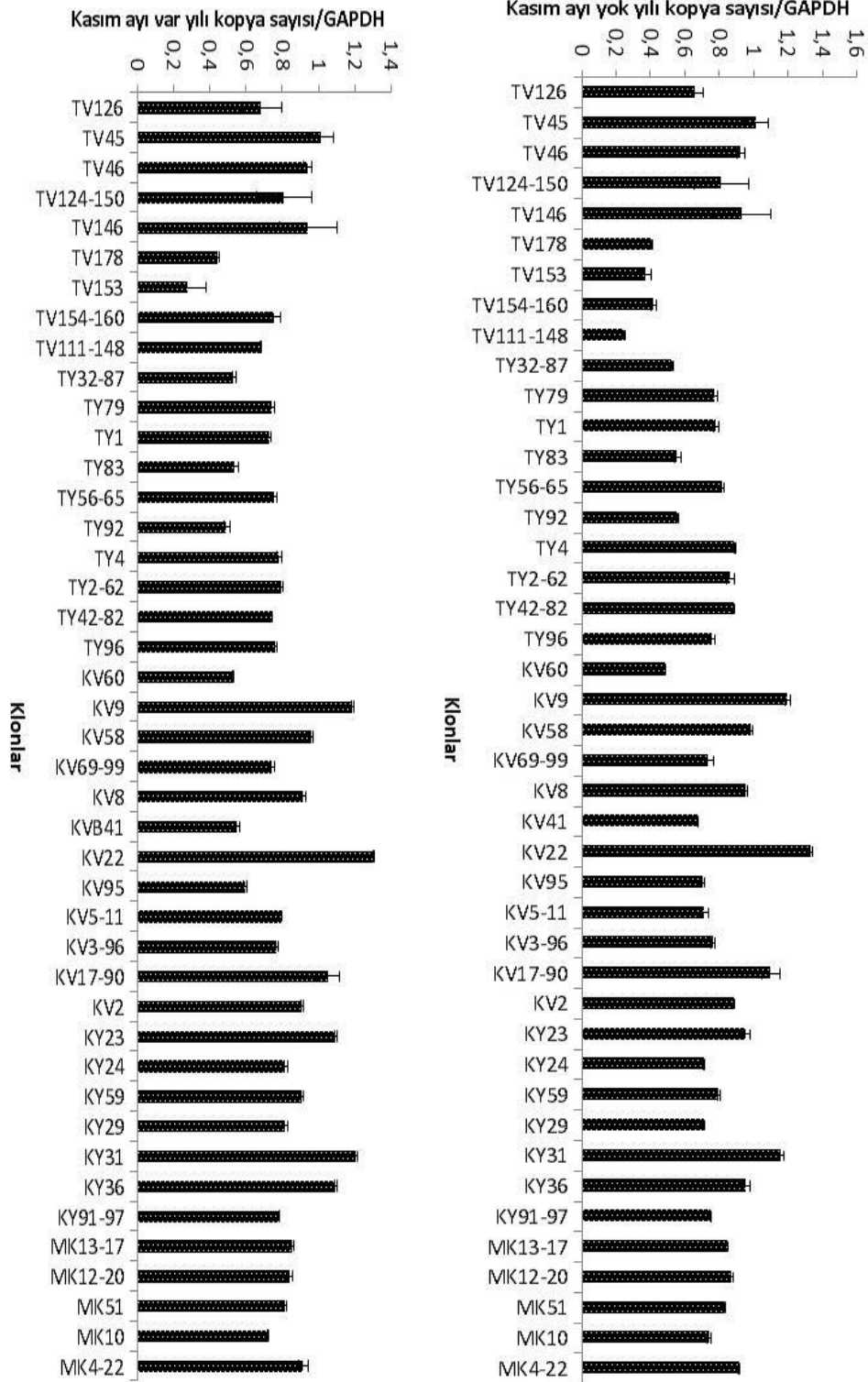


Şekil 3.59: Meyve kütüphanesi 51 numaralı klonuna ait anlık gösterimli PCR grafiği

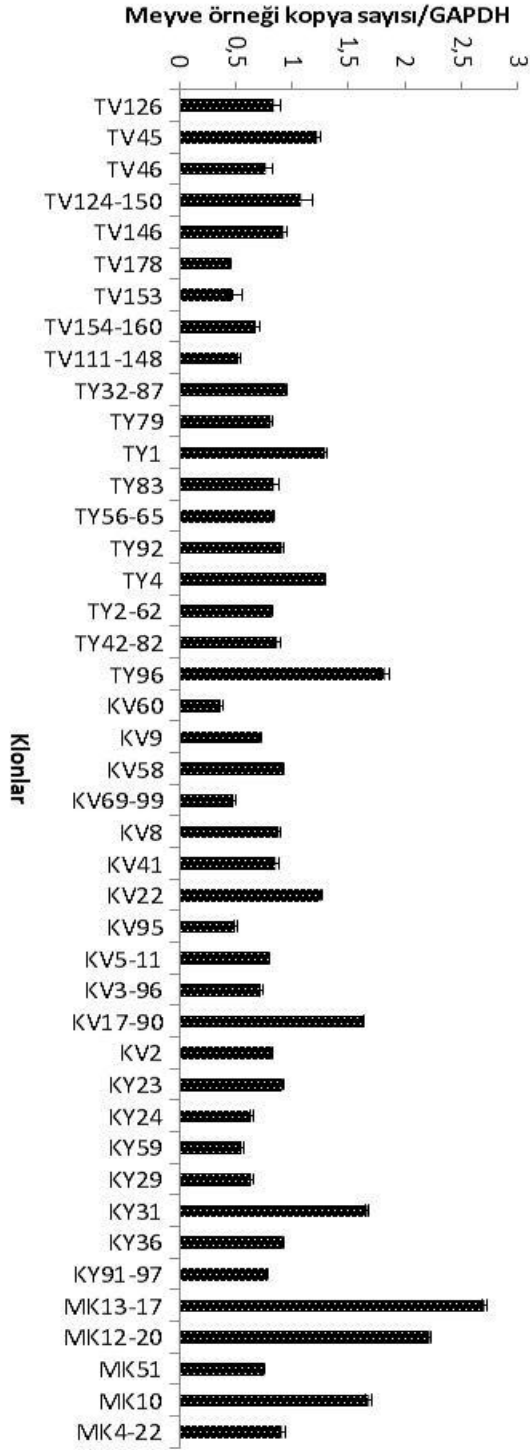
Kütüphanelerden elde edilen klonların tek tek anlık gösterimli PCR grafiklerine ek olarak aynı anda aynı kalıplardaki ekspresyonlarına da şekillerde görüldüğü gibi bakıldı. Buna göre Temmuz ve Kasım “var - ‘yok’” yılları ve meyve örneği cDNA kalıpları kullanılarak grafikleri çizildi.



Şekil 3.60: Bütün kütüphanelerden izole edilen cDNA'ların Temmuz "var yılı" ve Temmuz "yok yılı" yapraklarındaki miktarlarının anlık gösterimli PCR grafiği



Şekil 3.61: Bütün kütüphanelerden izole edilen cDNA'ların Kasım "var yılı" ve Kasım "yok yılı" yapraklarındaki miktarlarının anlık gösterimli PCR grafiği



Şekil 3.62: Bütün kütüphanelerden izole edilen cDNA'ların meyvedeki miktarlarının anlamlı gösterimli PCR grafiği

3.3 Zeytin Dehidrin Geni İle İlgili Bulgular

Zeytin dehidrin geni Kasım ‘‘var’’ yılı kütüphanesinden elde edilen bir klondur. Bu gene ait biyoinformatik analizler, fizyolojik analizler, biyokimyasal analizler yapıldı. Dehidrin EST kaydı NCBI da ilk defa bizim tarafımızdan verildi.

Tablo 3.29: Dehidrin için kullanılan tüm primerler

Primer ismi	Amaç	Dizi
Dhn <i>EcoR</i> I	<i>Pichia</i>	5'-GATTTTAGAGTTGCGAATTCAGAGAAAGA-3'
Dhn <i>Xba</i> I	<i>pastoris için</i>	5'-TACACAACATTAACATAAAACATCTAGACA-3'
DhnAmp F	Çoğaltma	5'-AGAGTTGCAAATTAAGAGAAAGAAATG-3'
DhnAmp R		5'-CACAACATTAACATAAAACATCAGACA-3'
DhnL	Real Time	5'-ATGAAGGAACTTACGACACTTCAAC-3'
DhnR	PCR	5'-TAATACAAACATGAAAAAGCACACG-3'
Dhn	Tail PCR 1. set	5'-GTGAACAGGGTTGCCATAGTTATC-3' 5'-TTCATCTGTCTGACGAATTTCTCT-3' 5'-CTTAATTTGCAACTCTAAAATCAAACA-3'
Dhn	Tail PCR 2. set	5'-CAATGGCAGGAGAGGCTTAC-3' 5'-ATTCAACCGACACGTTAGGG-3' 5'-TGGATAAGATAAAACAAATTGAAGGTT-3'
Dhn51F	Alicator primerleri	5'-GGTGATGATGATGACAAGATGGCCCAGTACAAGGACGAATACG-3'
Dhn51R		5'-GGAGATGGGAAGTCATTATTAGTGGTGACCAGGCATTTTCTCCT-3'
DhnSF	Southern Blot için	5'-AACCTCTCCTTTATCTTTTCTTTCAG-3'
DhnSR		5'-CACTACTGGTACACATGGAACACTG-3'

Tablo 3.29 (Devam)

DhnProm1	Genome	5'- CGGATAGGATTGCCATATTCATCTGTC-3'
DhnProm2	walker	5'- CCTTGTACTGGGCCATTTCTTTCTCTT-3'

3.3.1 Genin Yapısına Ait Bulgular

Kasım “var yılı” kütüphanesinde elde edilen dehidrin geninin çeşitli biyoinformatik analiz programları kullanılarak aşağıdaki şekilde analizi yapıldı. Tablo 3.30’da dehidrin geninin genel özellikleri, Şekil 3.63’de dehidrin geninin amino asit dizisi, Şekil 3.64’te amino asitlerin bulunma oranlarına ait grafik, Şekil 3.65’te korunmuş domainleri ve üye olduğu gen ailesi, Şekil 3.65’te protein databankasına göre protein dizisi, Şekil 3.66’da hidrofobik özelliği, Şekil 3.67’de izoelektrik noktası ile ilgili bilgiler görülmektedir.

Tablo 3.30: Zeytin dehidrin geninin genel bilgileri

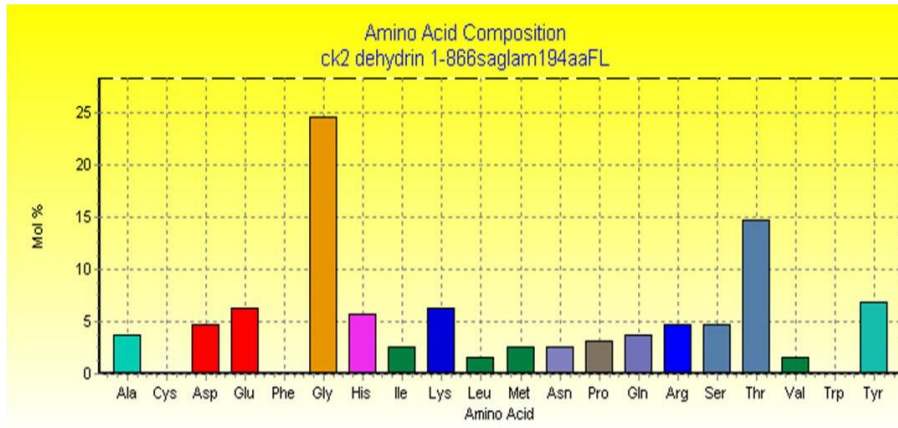
Klon ismi	KV2
Bulunduğu dönem	Kasım var yılı
Homoloji gösterdiği bitki	<i>Avicennia marina</i>
Accession numarası	gb EU121851.1
Fonksiyonu	Dehidrin
E değeri	3e ⁻²⁸
Benzerlik oranı	162/218
Benzerlik yüzdesi	%74
Nukleotid sayısı	878
ORF	194 aa
Izoelektrik noktası	8.075
Moleküler ağırlığı	19.8 kDa
EST kaydı	Yok
Yeni EST kaydı	gb GW574259.1

```

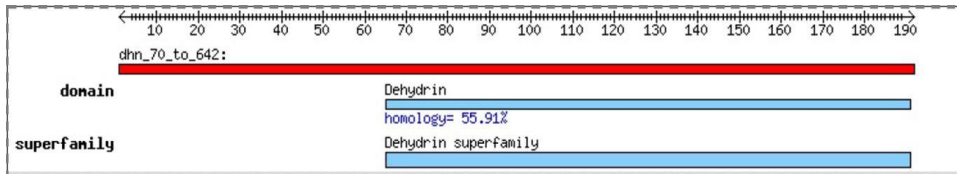
00001 MAQYKDEYGR EIRQTDEYGN PIRQTDEYGN PIRQTDNYGN PVHHTGGTMG EYGTGTHGT TGYGTTGAHG DGATGYGTTG
00081 AHGGAGYGTG GTTGAYGTHG GNVPGTTCAG LTGQHRRSQS SSSSSSEDDG MGRRRKKGLK EKIKERLPGG HKDEGTYDTS
00161 TTTGYGYSEG GQHQEKKGVM GKIKEKMPGH H

```

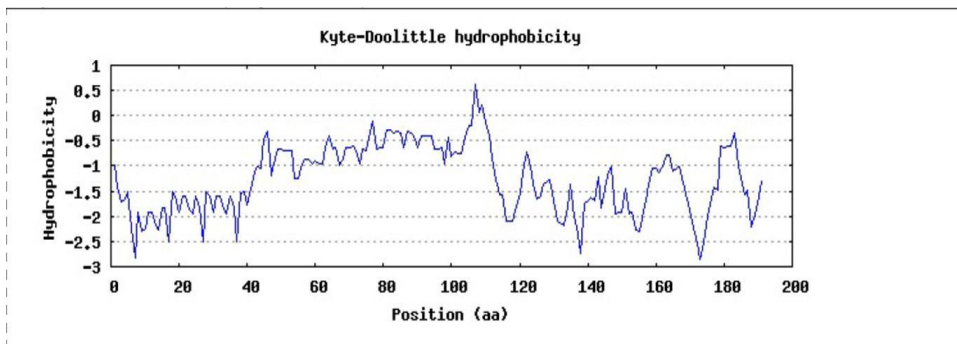
Şekil 3.63: Zeytin dehidrin genine ait amino asit dizisi [421]



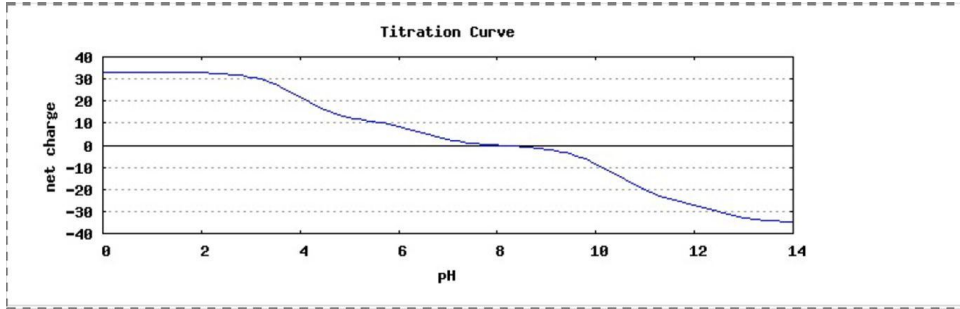
Şekil 3.64: Dehidrin proteininin amino asit kompozisyonu



Şekil 3.65: Dehidrin geninin NCBI korunmuş domain analizi [421]

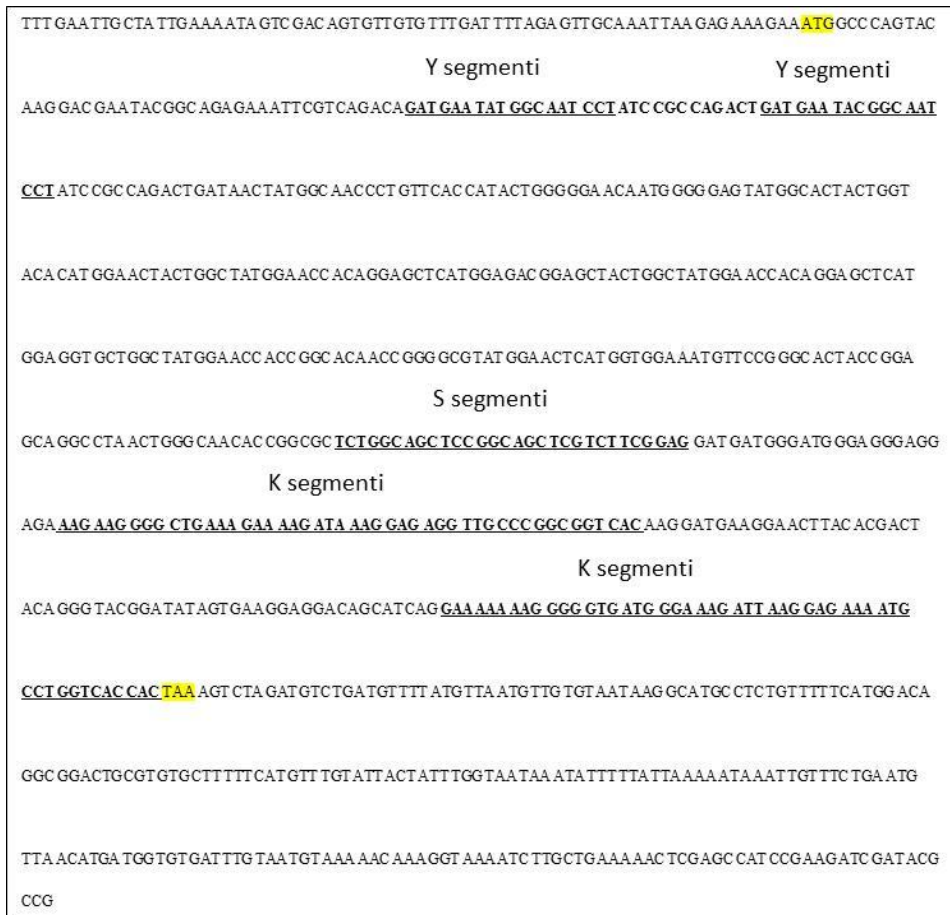


Şekil 3.66: Dehidrin Kyte – Doolittle hidrofobosity analizi [421]



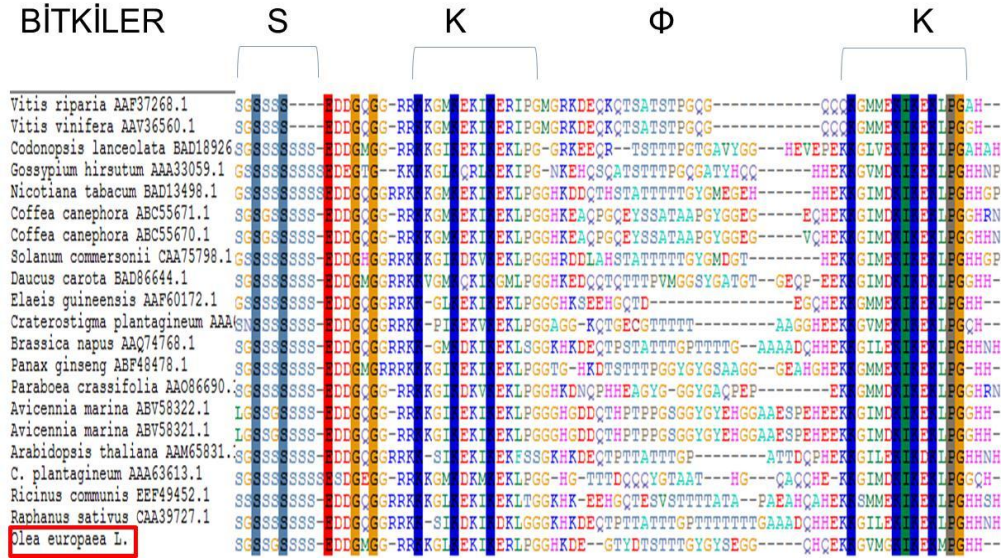
Şekil 3.67: Dehidrin izoelektrik nokta analizi [421]

Zeytin dehidrin geninin segment içeriğini belirlemek amacıyla elde edilen amino asitlere karşılık gelen korunmuş Y, S ve K segmentleri aşağıdaki Şekil 3.68’de görüldüğü şekilde tespit edildi.



Şekil 3.68: Dehidrin Y, S ve K segmentlerinin gösterilmesi

Dehidrin dizisinin amino asit kompozisyonuna bakıldığında, apolar nötür yüklü amino asit olan Glisin amino asitinin en fazla bulunduğu görülmektedir. Glisin amino asitinin özelliğine bakıldığında, antifriz özelliğinin olduğu ve dehidrinin soğuk stresinde bitki hücrelerini korumada etkin görevinin sağlayan amino asitin glisin olduğu sonucu bu analizden çıkmaktadır.



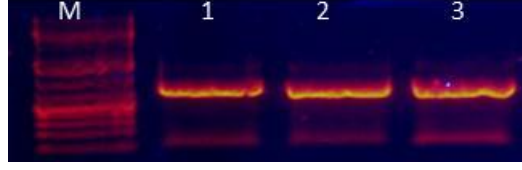
Şekil 3.69: Bazı bitkilerde ve zeytinde korunmuş S, Φ ve K segmentlerin gösterilmesi

Dehidrin amino asit kompozisyonunda korunmuş ve zorunlu bulunan K segmentinin [422], S ve Φ segmentinin diğer bitkiler ve zeytin ile karşılaştırılması Şekil 3.69'da görülmektedir. Buna göre; zeytin dehidrin amino asit kompozisyonu diğer pek çok bitki ile homoloji göstermektedir.

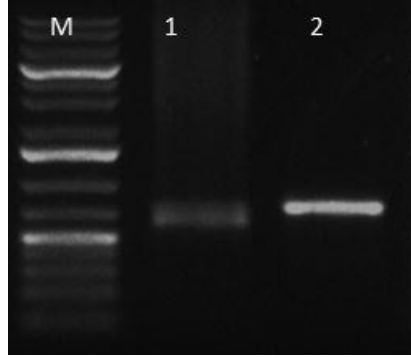
3.3.1 Dehidrin Geninin İntron Analizine Ait Bulgular

Dehidrin geninin intron bölgesini belirlemek için ve farklı metotlar ile izole edilen zeytin gDNA örneğinin PCR'daki verimini test etmek amacıyla 3 farklı metot ile (fenol / kloroform metodu ile, NaAc ile muamele ederek, Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasına ait Gen Elute Plant Genomic DNA Miniprep Kiti (Katalog No:

G2N70-1KT) ile) zeytin gDNA'sı izole edildi. Ancak Şekil 3.70'de görüldüğü gibi herhangi bir farklılık görülmedi.

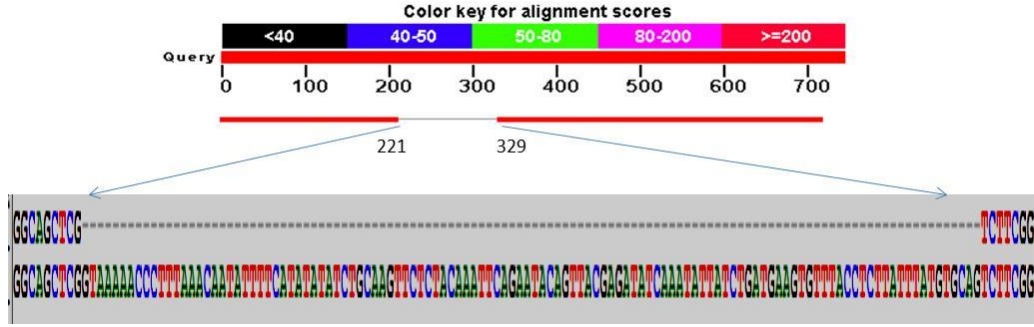


Şekil 3.70: Farklı metot ile izole edilmiş DNA örnekleri ile Dehidrin primerlerine ait PCR görüntüsü (1: Fenol/Kloroform methodu ile izole edilen gDNA, 2: NaAc ile muamele edilmiş gDNA, 3: kit ile izole edilen gDNA)



Şekil 3.71: Ayvalık çeşidine ait gDNA ve cDNA kalıpları ile yapılan PCR sonucu

Şekil 3.71'de görüldüğü gibi genomik DNA ve cDNA kalıbı ile yapılan PCR ürünü arasında farklılık görülmektedir. gDNA ürünü yaklaşık 700 baz çifti büyüklüğündeyken, cDNA kalıbı yaklaşık olarak 600 baz çifti büyüklüğündedir. Bu sonucun doğruluğunun kanıtlanması için elde edilen gDNA PCR ürünü dizilendi. Bu dizi NCBI'da gDNA ile cDNA dizisi BLASTn de karşılaştırıldığında Şekil 3.72'de görülen sonuç elde edilmiştir.



Şekil 3.72: Dehidrin genomik dizisinde intron bölgesinin yeri.

Dehidrin intronunun cDNA – gDNA BLASTn analizi sonucu

Query	1	TAGACTTTAGTGGTGACCAGGCATTTTCTCCTTAATCTTTCCCATCACCCCTtttttttC	60
Sbjct	651	TAGACTTTAGTGGTGACCAGGCATTTTCTCCTTAATCTTTCCCATCACCCCTTTTTTTC	592
Query	61	CTGATGCTGTCTCCTTCACTATATCCGTACCCCTGTAGTCGTTGAAGTGTCGTAAGTTCC	120
Sbjct	591	CTGATGCTGTCTCCTTCACTATATCCGTACCCCTGTAGTCGTTGAAGTGTCGTAAGTTCC	532
Query	121	TTCATCCTTGTGACCGCGGGCAACCTCTCCTTTATCTTTTCTTTCAGCCCTTCTTTCT	180
Sbjct	531	TTCATCCTTGTGACCGCGGGCAACCTCTCCTTTATCTTTTCTTTCAGCCCTTCTTTCT	472
Query	181	CCTCCCTCCCATCCCATCATCTCCGAAGAC	<u>211</u>
Sbjct	471	CCTCCCTCCCATCCCATCATCTCCGAAGAC	441
Query	329	CGAGCTGCCGGAGCTGCCAGAGCGCCGGTGTGGCCAGTTAGGCCTGCTCCGGTAGTGCC	388
Sbjct	441	CGAGCTGCCGGAGCTGCCAGAGCGCCGGTGTGGCCAGTTAGGCCTGCTCCGGTAGTGCC	382
Query	389	CGGAACATTTCCACCATGAGTTCCATACGCCCCGGTTGTGCCGGTGGTTCCATAGCCAGC	448
Sbjct	381	CGGAACATTTCCACCATGAGTTCCATACGCCCCGGTTGTGCCGGTGGTTCCATAGCCAGC	322
Query	449	ACCTCCATGAGCTCCTGTGGTTCCATAGCCAGTAGCTCCGTCTCCATGAGCTCCTGTGGT	508
Sbjct	321	ACCTCCATGAGCTCCTGTGGTTCCATAGCCAGTAGCTCCGTCTCCATGAGCTCCTGTGGT	262
Query	509	TCCATAGCCAGTAGTTCCATGTGTACCAGTAGTGCCATACTCCCCATTGTTCCCCCAGT	568
Sbjct	261	TCCATAGCCAGTAGTTCCATGTGTACCAGTAGTGCCATACTCCCCATTGTTCCCCCAGT	202
Query	569	ATGGTGAACAGGGTTGCCATAGTTATCAGTCTGGCGGATAGGATTGCCGTATTCATCAGT	628
Sbjct	201	ATGGTGAACAGGGTTGCCATAGTTATCAGTCTGGCGGATAGGATTGCCGTATTCATCAGT	142
Query	629	CTGGCGGATAGGATTGCCATATTCATCTGTC TGACGAATTTCTGCGGTATTCGTCCTT	688
Sbjct	141	CTGGCGGATAGGATTGCCATATTCATCTGTC TGACGAATTTCTGCGGTATTCGTCCTT	82
Query	689	GTACTGGGCCATTTCTTTCTCTGAATT	<u>715</u>
Sbjct	81	GTACTGGGCCATTTCTTTCTCTTAATT	55

Zeytin dehidrin geninin intron, pıromotör, segment, ORF, 3' UTR bölgelerini gösteren gene şekil aşağıda Şekil 3.73'de görülmektedir.

aac atttttggg alataaatggaa agttgaagac aalc caaaa grgatattggc aaatgaattc agfacattggg cttcagga gggfac atttatatcatgggacccc tcc atggggggttbaatga ttba agtagttgc cgtta
 aa ttatcaactttta gsaataaacatgggacagaataa gttc aa aaatgggc ggc atgaatccagaac cagc agttgtgaaa aa tggg gttgattcgatcaatggc tcatc ac aac ag gattcggcc gaggcaagccc actc g
 cagttc cacctc taatcac ggggtggcca aac cgaatgaacttalc ccc cc ttthtga atac gac ctc acta tggggc ac gr gggc gac gccc cggg tggtaaaccttca atttthtalc ttatccatattggc gac agaa acaca
 cgttc gta gtagtactggc cagc taaatbc aatttggccc baac gttcgggtgaattactc atgcaaac actgtaagcc tctcctgcc attgccaatc ggtcaacaacc ttctc ttctatataaac tcaatctga tcc ggc at
 ac tgr aca aaatca ta agta gaa gaggc TTTGAATTGCTATTGAAAATAGTCGACAGTGTGTGTTGATTTTAGAGTTGC AAATT AAGAGAAAGAA ATG

M

GCC CAG TAC AAG GAC GAA TAC GGC AGA GAA ATT CGT CAG ACA GAT GAA TAT GGC AAT CCT ATC CGC CAG ACT AAT CCT
 A Q Y K D E Y G R E I R Q T D E Y G N P I R Q T D E

GAT GAA TAC GGC ATC CGC CAG ACT GAT AAC T AT GGC AAC CCT GTT CAC CAT ACT GGG GGA ACA ATG GGG GAG T AT GGC
 Y G N P I R Q T D N Y G N P V H H T G G T M G E Y G
 ACT ACT GGT ACA CAT GGA ACT ACT GGC TAT GGA ACC ACA GGA GCT CAT GGA GAC GGAGCT ACT GGC TAT GGA ACC ACAGGA
 T T G T H G T T G Y G T T G A H G D G A T G Y G T T G
 GCT CAT GGA GGT GCT GGC TAT GGA ACC ACC GGC ACA ACC GGG GCG TAT GGA ACT CAT GGT GGA AAT GTT CCG GGC ACT ACC
 A H G G A G Y G T T G T T G A Y G T H G G N V P G T T

GGA GCA GGC CTA ACT GGG CAA CAC CGG CGC TCT GGC AGC TCC GGC AGC TCG TCT CTGCAAGTTC TCTACAAATTCTGCACT
 G A G L T G Q H R R S G S S G S S S

GC.AAGTTCCTC.TAC.AAATTC.AGAATACAGTTACGAG.ATAT.CAAATATTATCTGATGAAGTGTTLACC.TCTTATTATGTGCA TCG GAG GAT GAT
 S E D D

GGG ATG GGA GGG AGG AGA AAG AAG GGG CTG AAA GAA AAG ATA AAG GAG AGG TTG CCC GGC GGT CAC AAG GAT
 G M G G R R K K G L K E K I K E R L P G G H K D
 GAA GGA ACT T AC GAC ACT TCA ACG ACT ACA GGG TAC GGAT AT AGT GAA GGA GGACAG CAT CAG GAA AAA AAG GGG
 E G T Y D T S T T T G Y G Y S E G G Q H Q E K K G

GTC ATG GGA AAG ATT AAG GAG AAA ATG CCT GGT CAC CAC TAA AGT CTA GAT GTC TGA TGT TTT ATG TTA ATG TTG TGT
 V M G K I K E K M P G H H

aa taa ggc atgc ctg tttttc atggacagggcggactgr gttgtttttcatgtttgattactaattggtaataaata tttttataaaa ata aattgttctgaatgta ac atga tggg gttgattt gtaatgta aaacaa aagta aaatcttgc
 tgaaaaactc gaggc catic gaaagalc gataccgg

Şekil 3.73: Dehidrin geninin intron bölgesi, promotör bölgesi ve (Y, S, K) segmentlerinin gösterilmesi

3.3.2 Dehidrin Promotör Analizine Ait Bulgular

Dehidrin geninin promotör bölgesini belirlemek için ilk çalışmalar Cardiff Üniversitesi'nde genome walker (Clontech Kat No: 638904) CA, USA) kiti ile

yapıldı. İki farklı metot ile pürifiye edilen gDNA örnekleri Şekil 3.74’te görülmektedir.

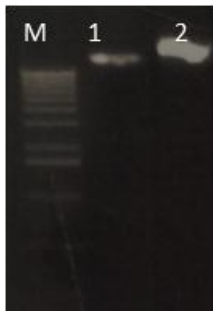
Tablo 3.31: Genome walker için AP primerleri

Primer ismi	Sıcaklık	GC oranı	Dizisi
AP1	56.1 °C	%45.4	5’-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3’
AP2	64.4 °C	%57.8	5’-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3’

Tablo 3.32: TAIL PCR’da kullanılan AD primerleri

Primer Adı	Primer Dizisi
AD1	5’-NTCGASTWTSGWGT-3’
AD2	5’-NGTCGASWGANAWGAA-3’
AD2A	5’-STTGNTASTNCTNTG-3’
AD3	5’-WGTGNAGWANCANAGA-3’
AD5	5’-WCAGNTGWTNGTNCTG-3’

Her AD primer için ayrı reaksiyon kuruldu ve bir tanede tüm AD primerleri eşit miktarlarda alınarak AD karışımı oluşturuldu.



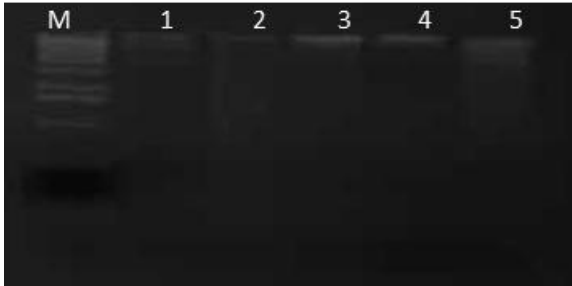
Şekil 3.74: Farklı methodlarla pürifiye edilen DNA örnekleri (1; Nucleopuron ile pürifiye edilen gDNA, 2; Etanol ile presipite edilen gDNA)

Bu metotlarla pürifiye edilen gDNA örnekleri kitle belirtildiği gibi *DraI* enzimi ile Şekil 3.75’de görüldüğü gibi kesildi. Bu jel görüntüsüne göre en iyi sonucun etanol ile pürifiye edilen gDNA örneği olduğuna karar verildi ve diğer çalışmalar etanol ile pürifiye edilen gDNA ile devam edildi.



Şekil 3.75: Farklı methodlarla pürifiye edilen gDNA örneğinin *DraI* restriksiyon enzimi ile kesim sonucu (1; Etanol ile pürifiye edilen gDNA, 2; Nuclepuron ile pürifiye edilen DNA, 3; Pürifiye edilmeyen DNA, 4; Kontrol insan DNA örneği)

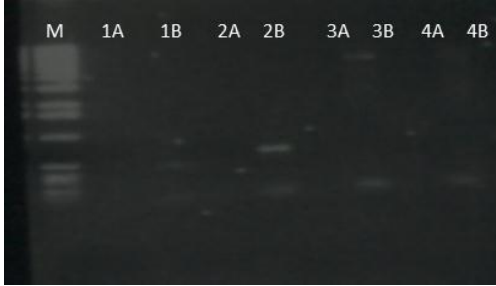
DraI enzimi ile kontrol kesiminin ardından 4 farklı restriksiyon enzimleri ile Şekil 3.76’daki gibi kesim sonucu elde edildi.



Şekil 3.76: Farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş örneklerin jel de yürütülmesi (1; *EcoRV*, 2; *DraI*, 3; *PvuII*, 4; *StuI*)

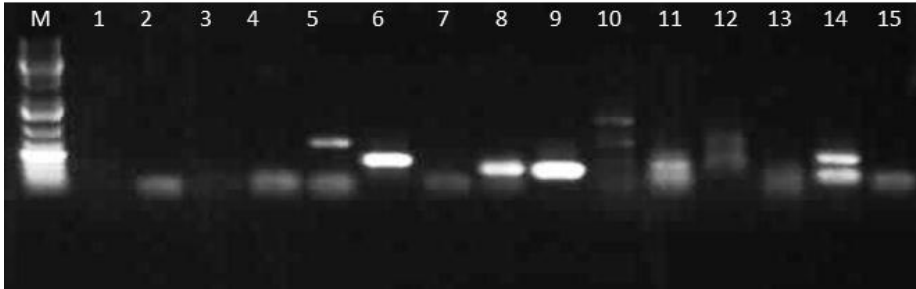
Kitte belirtildiği gibi ligasyon ve PCR basamakları yapıldı ve şekildeki PCR sonucu elde edildi. Şekil 3.77’de görüldüğü gibi *EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *StuI*. kalıpları ve kontrol primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilmiştir. Burada en iyi bantın *DraI*’da verdiği ve PCR2’de ise en büyük bantı *Pvu II* ile kesilmiş kalıbın kullanıldığı görülmektedir. Cardiff Üniversitesi’ndeki dizileme cihazındaki

problemden dolayı örnekler dizilenemedi. Ancak PCR kalıplarının Türkiye'ye getirilmesi ile çalışmalara TAIL PCR ile devam edildi.



Şekil 3.77: Genome walker jel görüntüsü (1A; *EcoRV* PCR1, 1B; *EcoRV* PCR2, 2A; *DraI* PCR1, 2B; *DraI* PCR2, 3A; *PvuII* PCR1, 3B; *PvuII* PCR2, 4A; *StuI* PCR1, 4B; *StuI* PCR2)

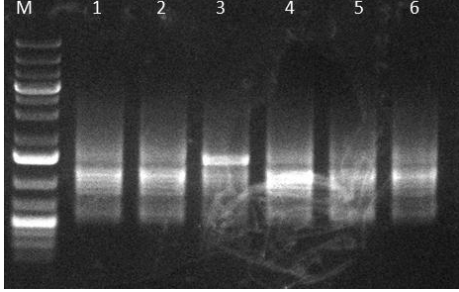
Türkiye'ye getirilen genome walker PCR kalıpları ile Tablo 3.29'da görülen primerler ile TAIL PCR yapıldı ve Şekil 3.78'de görüldüğü gibi parlak ve büyük bantlar elde edildi. Burada 8 numaralı PCR ürününün dizilenmesi ile dehidrin promotörüne ait yaklaşık olarak 264 bazlık bir bölge tespit edildi.



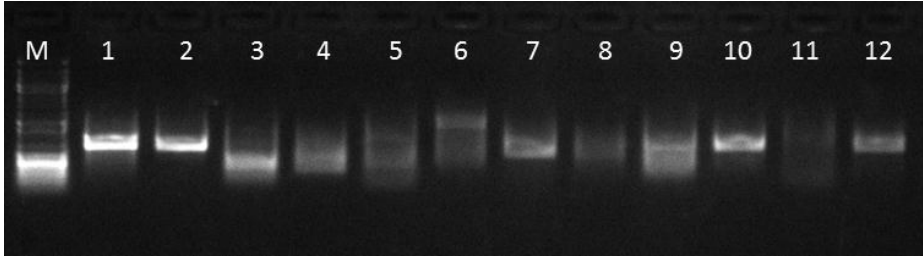
Şekil 3.78: Genome walker PCR1 kalıbı kullanılarak yapılan TAIL PCR sonucu (1; AD1 TAIL PCR1, 2; AD1 TAIL PCR2, 3; AD1 TAIL PCR3, 4; AD2 TAIL PCR1, 5; AD2 TAIL PCR2, 6; AD2 TAIL PCR3, 7; AD2A TAIL PCR1, 8; AD2A TAIL PCR2, 9; AD2A TAIL PCR3, 10; AD3 TAIL PCR1, 11; AD3 TAIL PCR3, 12; AD5 TAIL PCR1, 13; AD5 TAIL PCR2, 14; AD5 TAIL PCR3, 15; ADMIX TAIL PCR1, 16; ADMIX TAIL PCR2, 17; ADMIX TAIL PCR3)

Elde edilen 264 bazlık yeni bölgeye göre dizayn edilen yeni TAIL PCR primerleri ile çalışmalara devam edildi. Şekil 3.79 ve 3.80'de görüldüğü şekilde

TAIL PCR1, 2, 3 jel görüntüleri elde edildi. şekildeki 1 numaralı PCR ürünün dizilenmesi ile 435 bazlık yeni bir bölge daha tespit edildi.



Şekil 3.79: Dehidrin 2. Set primerler ile TAIL PCR1 sonucu (1; AD1, 2; AD2, 3; AD2A, 4; AD3, 5; AD5, 6; ADMIX)



Şekil 3.80: Dehidrin 2. Set primerler ile TAIL PCR2 ve 3 sonucu (1; AD1 TAIL PCR2, 2; AD1 TAIL PCR3, 3; AD2 TAIL PCR2, 4; AD2 TAIL PCR3, 5; AD2A TAIL PCR2, 6; AD2A TAIL PCR3, 7; AD3 TAIL PCR2, 8; AD3 TAIL PCR3, 9; AD5 TAIL PCR2, 10; AD5 TAIL PCR3, 11; ADMIX TAIL PCR2, 12; ADMIX TAIL PCR3)

Dehidrin promotör dizisinin Softberry [423] programında yapılan analizler sonucunda promotör bölgesi içerdiği 578'de TATA bölgesinin bulunduğu belirlendi. Şekilde görüldüğü gibi dehidrin promotör bölgesi üzerinde bitkilerde korunmuş olan çeşitli domainler işaretlendi.


```

AACATTTTTTTGGAAATATAAATGGAAAAGTTTGAAGGACAATCCAAAAGCGATATTG GTCAAATGAATTC
CAGTACATTGGGCCCTTCAGGAGGGTACATTTTATATCATGGGATCCCTCCATGGGGGTTTAAATGATTT
ACAGTAGTTGCCGTTAAATTTTATCAACTTTTTAGTAATAAACATGGGATCAGAATAAGTCCAAAAATG
AGTCCGATGAATCCAGAACCAGCAGCTGTGAAAAATGTfGTTTGATTGATCAATGGCTCATCAAAA
ACGAGTTCCGACCGAGGCAAGCCACTAGCAGTTCCACCTCTAATCACGGGTGTGGCCAAACCGATGAA
CTTATCCCCCTTTTTGTAATACGACCTCACTATAGGGCAGCGTGGTGGACGGCCCAGGGCTGTGTA AAC
CTTCAATTTGTTATCTTATCCATATTG CCGACAGAAACAC ACGTTCGTTAGTAGTGACTGTGCCACGCT
AAATTACAATTTGCCCTAACGTGTGTTGAATTACTTCATGCAAACACTGTAAGCCTCTCCTGCCATT
GCCATTGAGTCAACAACCTTTTCTTCTATATAAACTCAAATCTGATCCGTGCGCTACTGCACAAAAT
CATAAGTTAG AAGAGCTTTGAATTGCTATTGAAAATAGTCGACAGTGCTGTGGTTGATTTAGAGTTGC
AAATTAAGAGAAAGAAATGGCCAGTACAAGGACGAATACGGCAGAGAAATTCGTCAGACAGATGAA
TATGGCAATCCTATCCGCCAGACTGATGAATACGCAATCCTATCCGCCAGACTGATAACTATGGCAAC
CCTGTTCACTACTGGGGGAACAATGGGGGAGTATGGCACACTGGTACACATGGAACACTGCTGCTA
TGGAACCACAGGAGCTCATGGAGACGGAGCTACTGCTATGGAACCACAGGAGCTCATGAGGTGCT
GGCTATGGAACCACCGGCACAACCGGGCGTATGGAACCTCATGGTGGAAATGTTCCGGGCACTACCG
GAGCAGGCCTAACTGGGCAACACCGGGCGTCTGGCAGCTCCGGCAGCTCGTCTTGGAGGATGATGG
GATGGGAGGGAGGAGAAAAGAGGGGCTGAAAGAAAAGATAAAAGGAGAGGTTGCCCCGGCGTCACA
AGGATGAAGGAACCTTACGACACTTCAACGACTACAGGGTACGGATATAGTGAAGGAGGACAGCATCA
GGAAAAAAAGGGGGTGATGGGAAAGATTAAGGAGAAAATGCCTGTCACCACTAAAGTCTAGATGTG
TGATGTTTATGTTAATGTTGTGTAATAAGGCATGCCTCTGTTTTTCATGGACAGGGGGACTGCGTGTG
CTTTTTCATGTTGTATTACTATTTGGTAATAAATATTTTATTAAAAATAAATGTTTCTGAATGTTAAC
ATGATGGTGTGATTGTGTAATGTA AAAACAAAGGTAAAATCTTGCTGAAAAACTCGAGCCATCCGAAGA
TCGATACGCCGAG

```

Şekil 3.81: Dehidrin promotör bölgesinin ve önemli korunmuş dizilerin gösterilmesi (kırmızı alan; Transkripsiyon başlama noktası, LTRE bağlanma bölgesi, CCGACAG; DRE bağlanma bölgesi, ACGT; G kutusu, pembe alan; cDNA)

Softberry [423] programı kullanılarak yapılan promotör analiz sonucu şu şekildedir;

> test sequence

Length of sequence- 1516

Thresholds for TATA+ promoters - 0.02, for TATA-/enhancers - 0.04

1 promoter/enhancer(s) are predicted

Promoter Pos: 609 LDF- 0.12 TATA box at 578 22.20

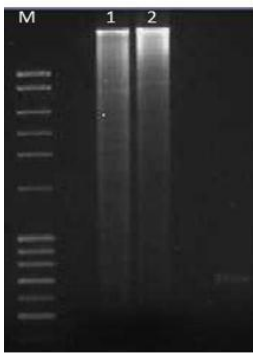
Dehidrin geninin intron bölgesi, promotör bölgesi ve segment analizi şekilde görüldüğü gibi özetlenmiştir. Bu çalışma zeytinde dehidrin ile ilgili ilk çalışma açısından ve bu verilerin ilk defa veriliyor olması açısından önemlidir.

3.3.3 Dehidrin Geninin Kopya Sayısının Belirlenmesine Ait Bulgular

Dehidrin geninin zeytin genomundaki kopya sayısı ile ilgili henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Farklı bitkilerde dehidrin geninin çok kopyalı gen ailesine üye olduğu tespit edilmiştir [424]. Bu amaçla Cardiff Üniversitesi'nde yürütülen çalışmalarda ilk olarak radyoaktif prob kullanılarak kopya sayısının belirlenmesi deneyleri yapıldı. Ancak başarılı sonuçlar elde edilmedi.

3.3.3.1 Radyoaktif Prob ile Yapılan Southern Blot ile İlgili Bulgular

Radyoaktif prob ile yapılan Southern blot tekniğinde Şekil 3.82 A'da görüldüğü gibi *EcoRI* ve *EcoRV* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve Şekil 3.82 B'de görülen kesim sonucu elde edildi ve şekilde görülen düzenek ile transfer mekanizması kuruldu.



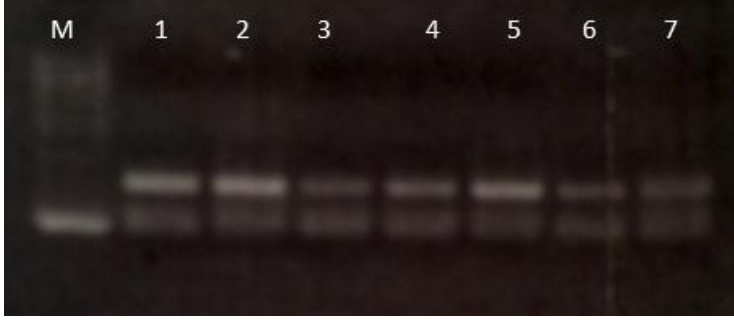
A



B

Şekil 3.82: A:Dehidrin geninin *EcoRI* (1) ve *EcoRV* (2) enzimleri ile kesilmiş jel görüntüsü. B: Southern blot için hazırlanan transfer düzeneği.

Tablo 3.29’da görülen primerler ile PCR kuruldu ve Şekil 3.83’deki jel görüntüsü elde edildi ve ^{32}P ile işaretlemesi yapıldı.

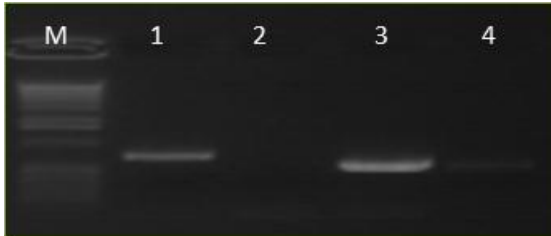


Şekil 3.83: Dehidrin prob primerleri ile yapılan PCR sonucu

Radyoaktif olmayan prob ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilemedi ve radyoaktif olmayan prob ile çalışmaya Cardiff Üniversitesi’nde devam edildi.

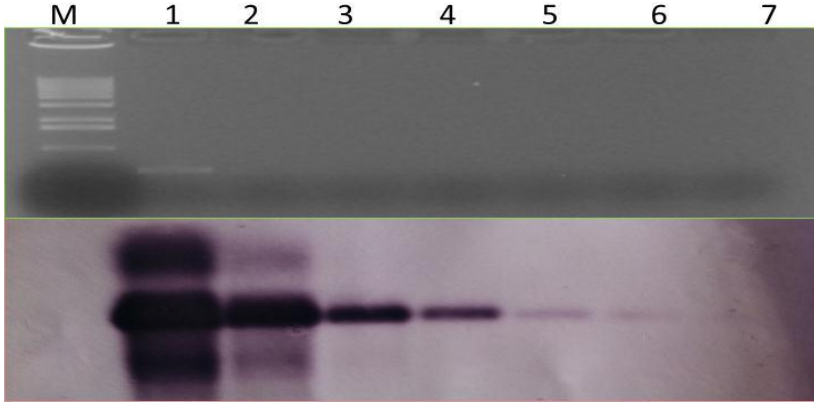
3.3.3.2 Radyoaktif Olmayan Probla Yapılan Southern Blot ile İlgili Bulgular

gDNA örneği, *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Bu yöntemde kitle belirtilen PCR protokolüne göre prob işaretlendi ve aşağıdaki Şekil 3.84’te görülen jel görüntüsü elde edildi.

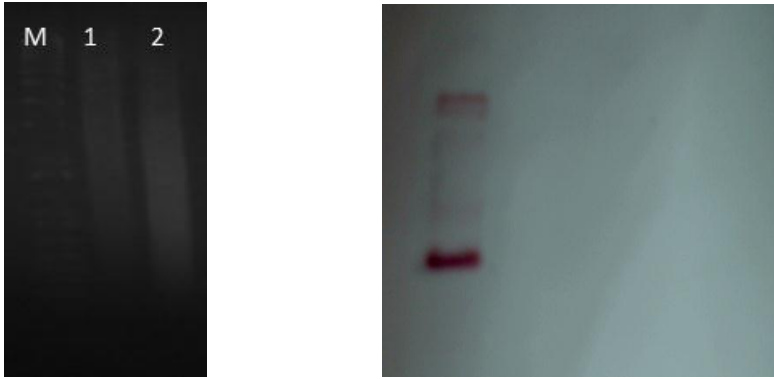


Şekil 3.84: DIG ile işaretlenmiş dehidrin probu ile yapılan PCR sonucu (1; dehidrin, 2; negatif kontrol, 3; pozitif kontrol, 4; kit kontrol)

Elde edilen prob ile ilk olarak dehidrin içeren plazmitten farklı oranlarda kalıp seyreltmesi yoluyla örnekler hazırlandı, membrana aktarıldı ve aşağıdaki jel ve membran görüntüsü elde edildi. Şekil 3.86'da ise gDNA örneği kullanılarak yapılan bir Southern blot membranı ve kesim sonucu görülmektedir.



Şekil 3.85: Plazmit kalıp olarak kullanılarak yapılan Southern blot denemesi (1; Direkt 2 μ L, 2; 0,2 ng / μ L, 3; 20 pg / μ L, 4; 2 pg / μ L, 5; 0,2 pg / μ L, 6; 20 fg / μ L, 7; 2 fg / μ L)



Şekil 3.86: gDNA örneğinin *EcoRI* (1) ve *HindIII* (2) restriksiyon enzimleri ile kesim ve dehidrin Southern blot sonucu

Radyoaktif ve radyoaktif olmayan probler kullanılarak yapılan Southern blot çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilemedi. Bunun sebebi olarak zeytin gDNA örneğinin restriksiyon enzimleri ile kesilme zorluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Dehidrin kopya sayısının belirlenmesine ile ilgili deneyler anlık gösterimli PCR ile aşağıdaki şekilde devam edildi.

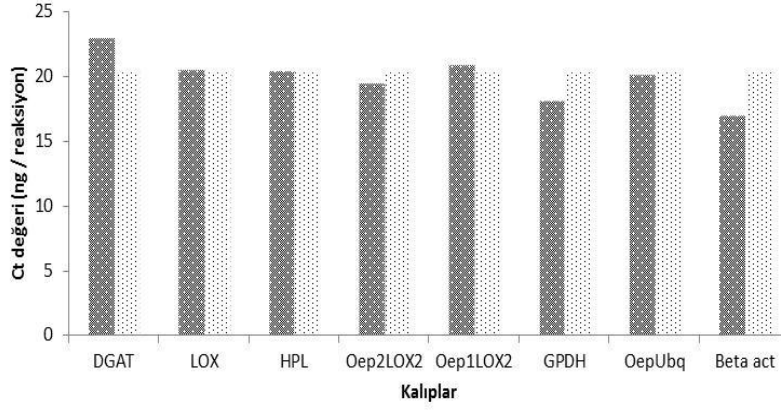
3.3.3.3 Anlık Gösterimli PCR ile Dehidrin Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesine Ait Bulgular

Tablo 3.33: Anlık gösterimli PCR’da kullanılan kontrol primerleri ve dizileri

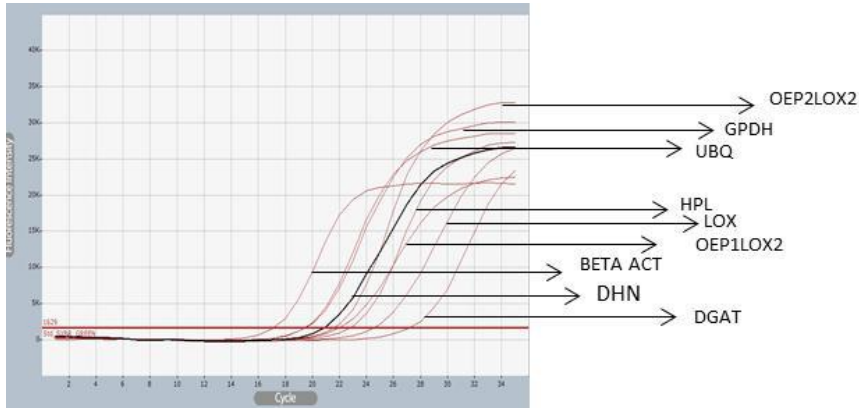
Standard Gen Adı / Accn no:	F primeri	R primeri
DGAT (GU357635)	5'-CCAAAATAAATTCCCCGTGA-3'	5'TGAGCCAAATGAGAACATGAA-3'
LOX (EU678670)	5'-TTTTGTCAAGCCATTCATCG-3'	5'-AACCCGGTTTCTCCATTTTT-3'
HPL (EUS13350)	5'-GTGGCTTATTTGTTTCAGAGATATGAT-3'	5'-ACTTTGTGCAAAGATAAGGCATATAAC-3'
Oep2LOX1 (EU513352)	5'-TGAACATAGAGAGGCTTCAGAGTTT-3'	5'-ATATGGTACGTGTGGCATATTCTTT-3'
Oep1LOX2 (EU513353)	5'-CGGCTAAAACAATATACTCAGTGCT-3'	5'-AAAGCAAGACATTCTTTTCAACATC-3'
OepUbq (AF429430.1)	5'-AAGACAATTACCCTTGAAGTTGAGA-3'	5'-CAAAGTGATGGTTTTTCCAGTAAGA-3'
GPDH (B2BGU9)	5'-ACAGCTCCTGGTAAGGGTGA-3'	5'-GGCTTGCGTCAAGAAGTCTC-3'
β -aktin (Q8GTL3)	5'-GAATTGCCAGATGGACAGGT-3'	5'-GAACCACCACTGAGGACGAT-3'

Anlık gösterimli PCR’ın genomik kopya sayısının belirlenmesi amacıyla kullanıldığını gösteren pek çok yayın bulunmaktadır [425-428]. Yapılan çalışmalara bakıldığında genel olarak daha önceden kopya sayısı belirlenmiş genler ile çalışılan genin Ct değerlerinin karşılaştırılma prensibine dayanmaktadır [429]. Bu çalışmada kopya sayısı bilinen DGAT (GU357635), LOX (EU678670) HPL (EUS13350), Oep2LOX1 (EU513352), Oep1LOX2 (EU513353), OepUbq (AF429430.1), ubikitin (AF429430.1), GPDH (B2BGU9), β -aktin (Q8GTL3) kullanıldı. Bunlardan tek

kopyalı olan genler; LOX [430], DGAT [431], HPL [432] ve Oep2LOX2 [433] çok kopyalı genler ise Oep1LOX2 [433], GPDH [434], ubikitin [435] ve β -aktin [436] olarak literatürden tespit edildi. Elde edilen Ct değerleri ile çizilen grafik Şekil 3.88’de cihazdan elde edilen original grafik ise Şekil 3.87’de görülmektedir.



Şekil 3.87: Dehidrin geninin anlık gösterimli PCR ile kopya sayısını gösteren grafik



Şekil 3.88: Dehidrin geninin anlık gösterimli PCR ile genomik kopya sayısını gösteren cihaz grafiği

Bu çalışmanın sonucunda dehidrin geninin kopya sayısının bir yada 2 kopyalı olduğu tahmin edilmektedir.

3.3.4 Dehidrin Geninin Çeşitler Arasındaki Polimorfizminin Belirlenmesi

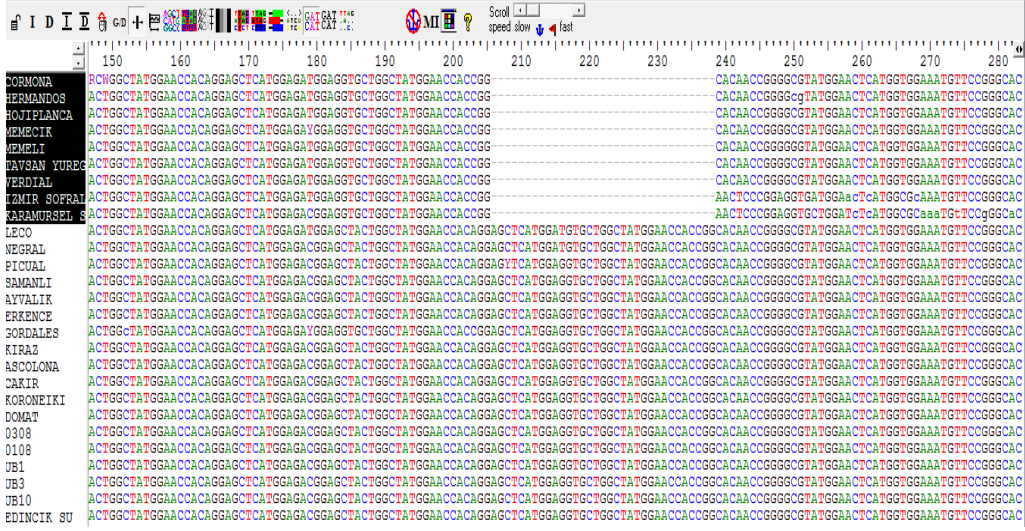
Çeşitler arasındaki dehidrin geninin polimorfizmini belirlemek için materyal metot bölümünde anlatıldığı şekilde 27 çeşit zeytin yaprağından izole edilen gDNA örneği ile çalışıldı. Elde edilen PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucunda elde edilen contiglerden BIOEDIT programı aracılığıyla clustal analizi yapıldı ve aşağıda görülen bir ağaç MEGA4 programı [437] ile çizildi.

Ancak bazı çeşitlerde Şekil 3.89’da görüldüğü gibi yaklaşık olarak 33 bazlık bir bölgenin Cormona, Verdial, Memecik, Memeli, Hermandos, Hojiplanca, İzmir sofralık, Karamürsel su ve Tavşan yüreği çeşitlerinde delesyona uğradığı belirlendi.

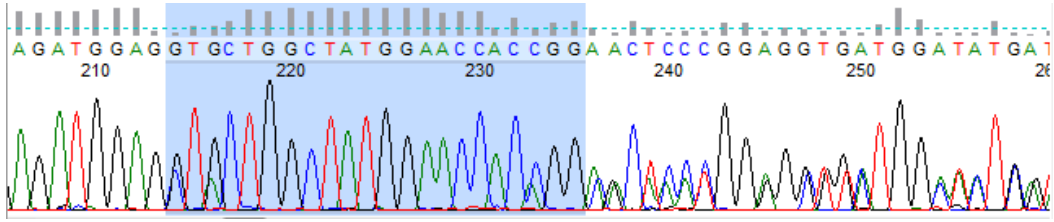
HERMANDOS	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTXATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
HOJIPLANCA	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
İZMİR SOFRAL	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XLPVWELMRAQFRALPELA*LMFPGPLEEXPHFGKNPFWN
VERDIAL	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTXATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
TAVŞAN YUREĞİ	FISXXVRAIISARLMTAIIISARLMTATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LVNTGALAXQQLGKKNPLNK
CORMONA	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTATLFTILGQNGSTALLAHMEXXAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
MEMECİK	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTXATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMEXEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
MEMELİ	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTXATLFTILGQNGSTALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPFX-----XQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
KARAMÜRSEL S	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLMTATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMTEVLAMEPFX-----XLPVLDLMAQFRALPELV*LMFPGPPEEXPHFGKNPFWN
ÇAKIR	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLITMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
DOMAT	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
ERKEÇE	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
LECCO	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIVNMTLFTILGQNGSMALLAHMELLAMEPQELMMEVLAMEPQELMDVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXQQLGKKNPLNK
ASCOLONA	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLITMATLFTILGQNGSMALLAHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
GORDALES	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMEXEVLAMEPPELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXR*KPFKQXLNK
KIRAZ	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNK
KORONİKİ	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
NEGRAL	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMDVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
PICUAL	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQEXMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
SAMANLI	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLIXMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN
AYVALIK	FVRQNMMAILSARLMTAIIISARLITMATLFTILGQNGSMALLVHMELLAMEPQELMETELLAMEPQELMEVLAMEPPAQPGRMELMVEFRALPEQA*LGNTGALAXRQQLGKKNPLNN

Şekil 3.89: Zeytin çeşitleri arasındaki delesyon bölgesinin aminoasit dizilerinde gösterilmesi.

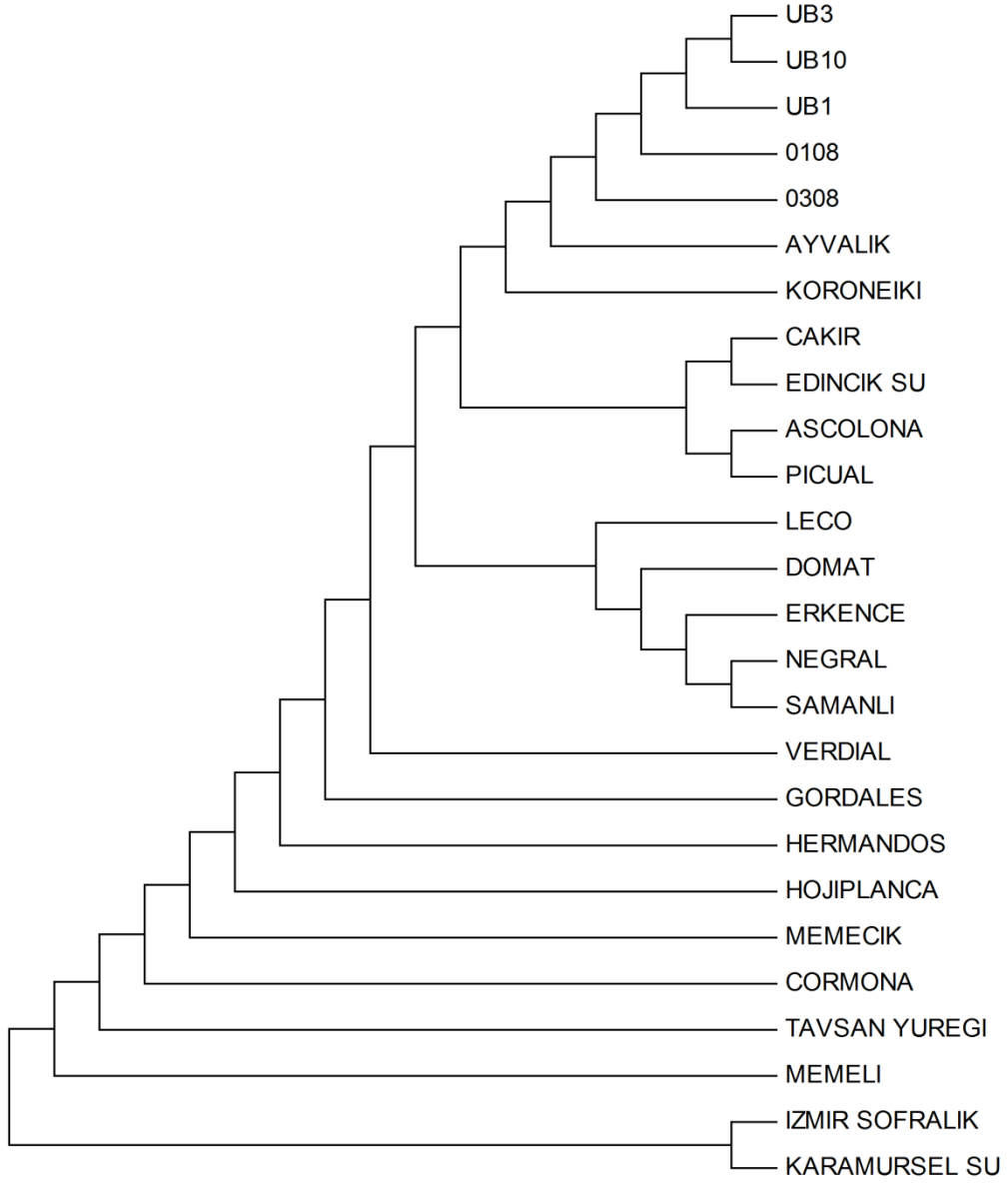
Şekil 3.90’da ise delesyon içeren bölgelerin nükleotit dizileri görülmektedir. Ayrıca, Şekil 3.91’de İzmir sofralık çeşidinde delesyon olan bölgenin kramatogramı görülmektedir. Burada dizinin doğruğu ve iyi okunulduğu açıktır.



Şekil 3.90: Zeytin çeşitleri arasındaki delesyon bölgesinin nükleotid dizilerinde gösterilmesi



Şekil 3.91: İzmir sofralık zeytin çeşidinde delesyon bölgesinin gösterilmesi

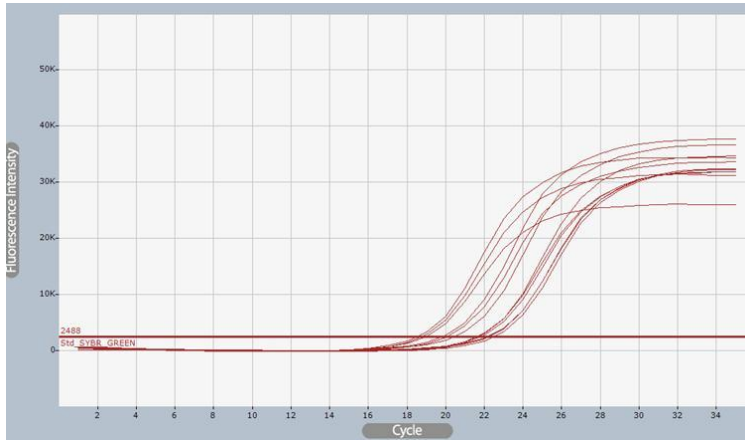


Şekil 3.92: 27 zeytin çeşidine ait polimorfizm analizini gösteren dendrogram

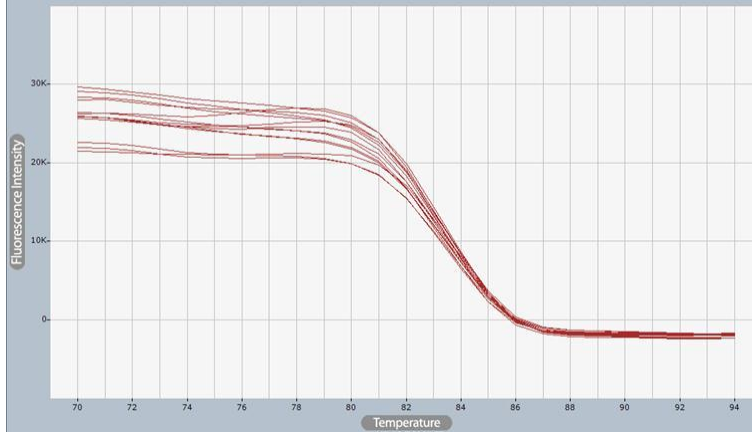
Şekilde görülen dendrograma göre; Cormona, Memecik, Hojiplanca, Hermandos, Gordales, Memeli, İzmir sofralık, Karamürsel su, Tavşan yüreği ve Verdial çeşitlerinin ayrı bir grup, Domat, Leço, Samanlı, Kiraz, Negral, Erkence ve UB1 çeşitlerinin de ayrı bir grup olduğu görülmektedir. İkinci grubun daha çok sofralık olarak kullanılması

3.3.5 Dehidrin Geninin Ekspresyonuna Ait Bulgular

Zeytin dehidrin geninin Ayvalık zeytin çeşidi Kasım “var” yılında bulunmasının anlık gösterimli PCR ile kanıtlanması çalışmaları yapıldı. Bu amaçla total RNA izole edilerek cDNA elde edildi ve Tablo 3.29’da görülen primerler ile reaksiyon kuruldu. Dehidrinin melting curve grafiği Şekil 3.94’te görülmektedir. Buna göre primer dimerizasyonunun olmadığı açıktır. Şekil 3.93’te ise cihazdan elde edilen piklerin gösterildiği orjinal anlık gösterimli PCR grafiği görülmektedir. Anlık gösterimli PCR için öncelikle standart çalışması yapıldı ve buna göre bir formül elde edildi ve bu formüle göre Ct değerlerinden gen kopya sayısına dönüştürerek veriler elde edildi ve grafiğe dönüştürüldü. Tüm anlık gösterimli PCR deneyleri 3 tekrarlı yapıldı. Cihazdan elde edilen Ct (Cycle treshold) verilerine göre materyal metot bölümünde verilen formül ile aşağıdaki kopya sayısı grafikleri çizildi.

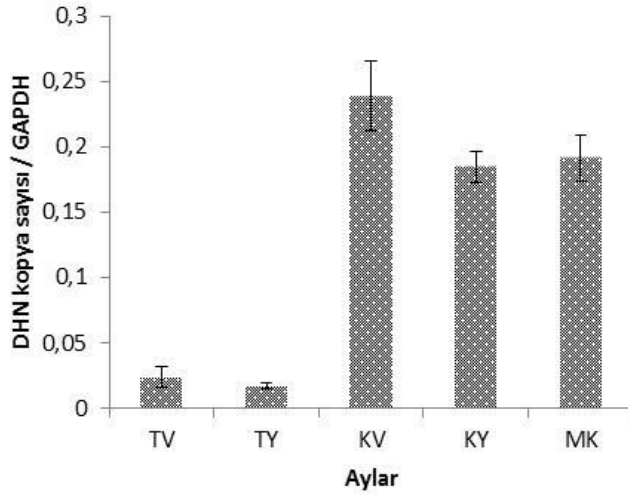


Şekil 3.93: Dehidrin geninin original anlık gösterimli PCR grafiği

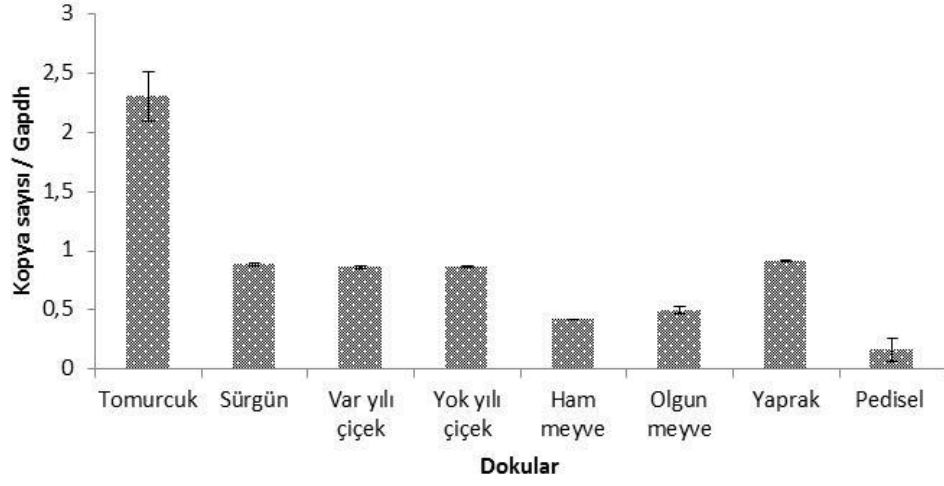


Şekil 3.3.94: Dehidrin genine ait melting curve grafiği

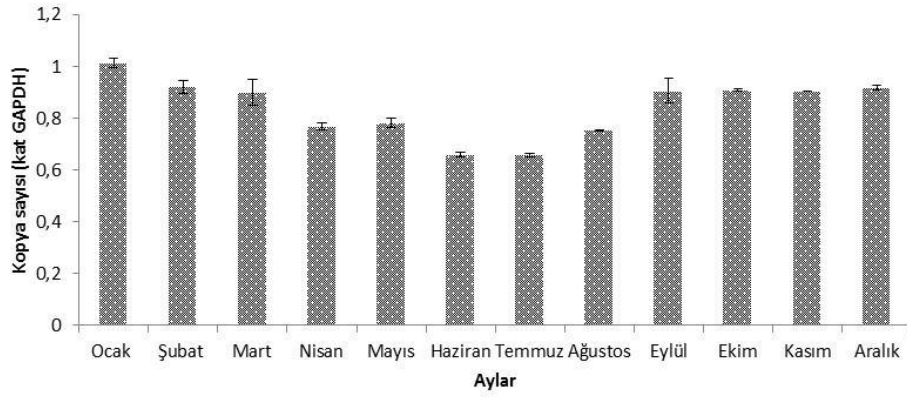
Dehidrin geni Ayvalık çeşidine ait Kasım “var yılı” kütüphanesinden izole edildi. Dehidrinin fonksiyonuna bakıldığında soğukta indüklenmesi ve soğuk aylarda ekspresyonunun artması beklenen bir durumdur. Bunun kesinlik kazanması için anlık gösterimli PCR çalışması şekilde görüldüğü gibi 5 farklı kalıpta (Temmuz “var - yok”, Kasım “var – yok” ve meyve), 12 ay “var” ve “yok” yıllarında, 8 farklı dokuda (tohum, sürgün, “var - yok” yılları çiçek, ham ve olgun meyve, yaprak, pedisel) ekspresyon çalışması yapıldı.



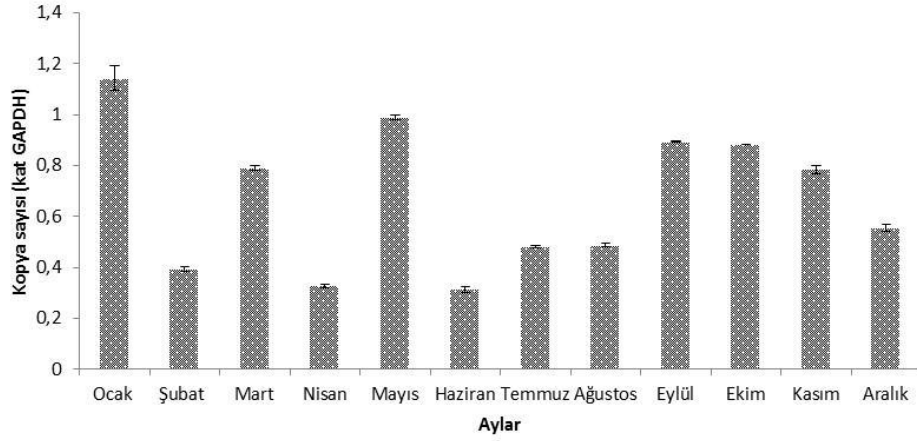
Şekil 3.95: : Zeytin dehidrin geninin 5 farklı dokudan yapılan anlık gösterimli PCR grafiği



Şekil 3.96: Zeytin dehidrin geninin 8 farklı dokudan yapılan anlık gösterimli PCR grafiği



Şekil 3.97: Zeytin dehidrin geninin “var” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PCR grafiği



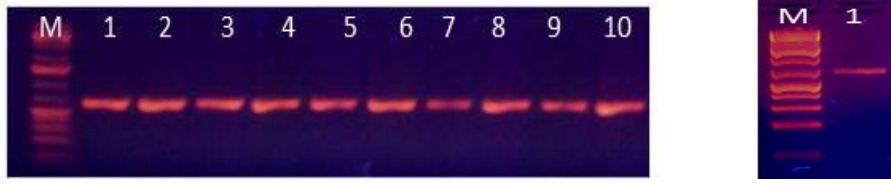
Şekil 3.98: Zeytin dehidrin mRNA'sının “yok” yılına ait yapraklarda anlamlı gösterimli PCR ile tespit edilen sentez miktarları

3.3.6 Dehidrin Geninin Protein Karakterizasyonuna Ait Ekspresyon Analizi Bulguları

3.3.6.1 *Pichia pastoris* e Vektörü İle Yapılan Çalışmalara ait Bulgular

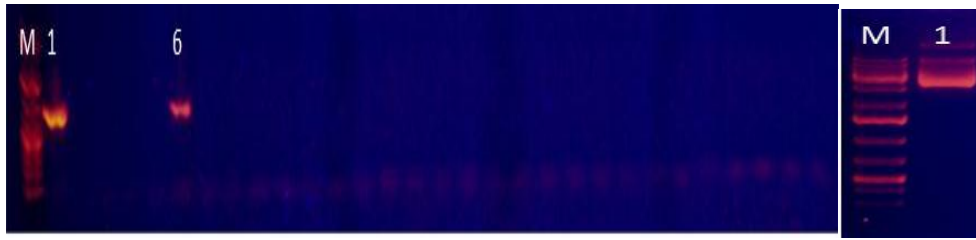
Dehidrin geninin protein ekspresyonunun belirlenmesi için çalışmalar 3 farklı şekilde yapıldı. İlk olarak *Pichia pastoris* sistemi kullanıldı, ikinci olarak pet21a vektöründe denendi ve en son olarak pLATE51 vektörü kullanılarak sonuç elde edildi. Tüm ekspresyon çalışmalarında Tablo 3.29'da görülen primerler kullanıldı ve materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi uygun restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini içeren primerler ile cDNA kalıbından dehidrin insertü çoğaltıldı. Daha sonra uygun restriksiyon enzimleri ile vektör ve dehidrin insertünün kesilip ligasyon yapılarak kompetan hücreye transformasyonu gerçekleştirildi.

Şekil 2.8'de görüldüğü gibi pPICZαB vektörüne klonlamak için *EcoR* I ve *Xba* I restriksiyon kesim bölgelerini içeren primerler ile Şekil 3.99'da görüldüğü gibi PCR yapıldı ve aracı vektör olan pblueScript Prep SK (+) vektörüne klonlamak için jelden geri kazanılarak miktar tayini yapıldı.



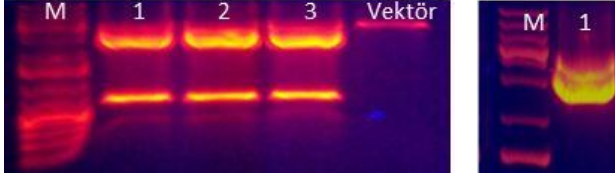
Şekil 3.99: PCR sonucu ve ligasyon için miktar tayinine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Petride elde edilen kolonilerden koloni PCR yapılarak pozitif çıkan koloni Şekil 3.100’de görüldüğü gibi tespit edildi ve 1 numaralı plazmitten çalışmalara devam edildi.

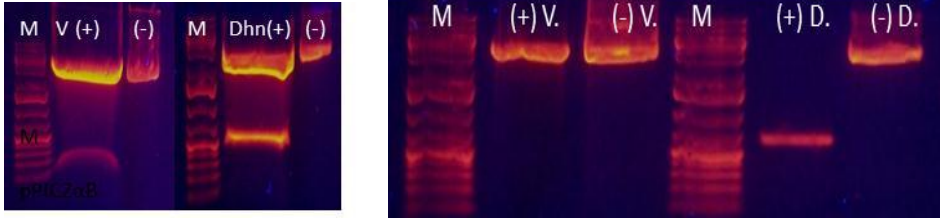


Şekil 3.100: Koloni PCR sonucunun ve 1 numaralı plazmitin %0.8’lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

pPICZ α B vektörü - 80 °C stoğundan çıkarılarak maksiprep yapıldı. Elde edilen pPICZ α B vektörünün ligasyon için miktar tayini yapıldı ve 20 mg / μ L olarak belirlendi. Maksiprep ile izole edilen pPICZ α B vektörüyle koloni PCR ile teyit edilen 1 numaralı dehidrin kolonisi materyal metot bölümünde anlatılan oranlarda kesildi ve aşağıdaki jel görüntüsü elde edildi.



Şekil 3.101: *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pPICZαB vektörü ve 1 numaralı koloninin jel görüntüsü.



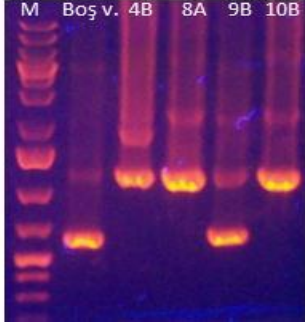
Şekil 3.102: pPICZαB vektörü ve dehidrinin *EcoRI* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri ile kesilen ürünlerin jelden geri kazanılmış agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: Belirteç (marker), V(+): Kesik vektör, V(-): Kesik olmayan vektör, D(+): Kesik dehidrin, D(-): Kesik olmayan dehidrin

Dehidrin ve pPICZαB vektörü ligasyon yapılarak DH5α kompetan hücrelerine aktarıldı. Transformasyon sonucunda koloniler elde edildi. Bu kolonilerden koloni AOX primerleri PCR yapıldı. Bir tane insert olan koloni elde edildi ancak dehidrinin beklenen bölgesinde olmadığı için geçersiz sayıldı.

Yeni pPICZαB vektörü ile direkt DH5α kompetan hücrelerine aktarıldı ve 15 tane koloni elde edildi ve plazmit izole edilerek stokları hazırlandı. Bundan sonra ki çalışmalar yeni izole edilen vektörden devam edildi. Yeni vektörden ligasyon yapıldı ve agaroz jelinde yürütüldü. Vektör miktarı 5 µL (A) ve 10 µL (B) olacak şekilde 2 ayrı transformasyon yapıldı.

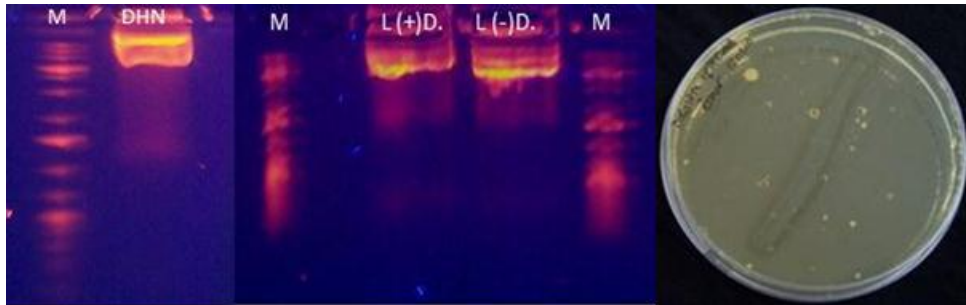
Elde edilen petrilere 5 µL ligasyon olan petri A, 10 µL ligasyon olan petri B den 24 tane plazmit inoküle edildi. Plazmit izole edilip, *EcoRI* / *XbaI* enzimleri ile (7 µL plazmit, 1 µL enzim, 1 µL enzim 1 µL tampon) kesildi insert kontrolü için. Şekil 3.103'te görüldüğü gibi en iyi bant 4B de elde edildi.

Emin olmak için 4B, 8A, 9B, 10B plazmitlerinden AOX primerleri ile PCR yapıldı.



Şekil 3.103: Plazmitlerin AOX primerleri ile Koloni PCR görüntüsü

4B numaralı plazmitin dehidrin insertünü içerdiğinden emin olduktan sonra 4B numaralı plazmit ve diğer pozitif çıkan plazmitlerden maksiprep yapılarak Şekil 3.99’da görülüşü gibi jel görüntüsü elde edildi. Mayaya aktarmak için linerizasyon işlemi yapıldı ve Şekil 3.104’te görülen jel görüntüsü elde edildi.

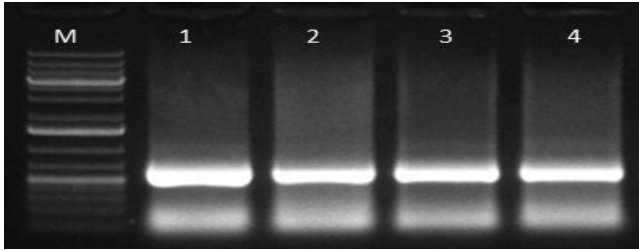


Şekil 3.104: Maksiprep yapılmış dehidrin, linerize olan ve olmayan dehidrin, maya transformasyon sonucu elde edilen petri görüntüsü.

Çizgisel (linear) olmuş dehidrin mayaya aktarmaya hazır hale geldi ve maya kompetan hücrelerine material-metot kısmında anlatıldığı gibi transformasyonu yapıldı ve Şekil 3.100'de görülen koloniler elde edildi. Kolonilerden 5 mL'lik sıvı YPD'ye inokülasyonu yapıldı ve 30 °C'de 260 rpm'de 15 saat inkübe edildi. Maya hücrelerinden gDNA izole edildi ancak sonuç çıkmadı. Aynı kültürden yine örnek alınıp MGY besiyerine ekildi 30 °C'de 2 gece çalkalandı buradan 5 mL kültür alınıp 20 mL'lik MGY'ye aktarıldı ölçümleri alındı. SDS-PAGE yapıldı, ancak ekspresyon olmadı.

3.3.6.1 *E. coli* sistemi pLATE51 Vektörü İle Yapılan Çalışmalara ait Bulgular

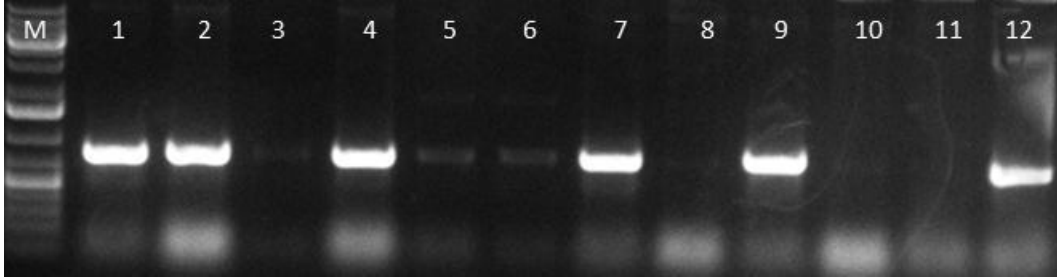
pLATE51 vektörüne dehidrin geninin klonlanması için öncelikle vektöre ait bir bölge dehidrin primerine eklenerek ORF'a ait ilk ATG'den başlayarak ve yaklaşık 20 baz eklenerek F primeri, sonlandırma kodonuna denk gelecek şekilde vektöre ait olan primer dizisine eklenerek R primeri PRIMER3 programı ile [398] dizayn edildi. Yapılan ilk PCR'da şekilde görüldüğü gibi başarılı sonuç elde edildi.



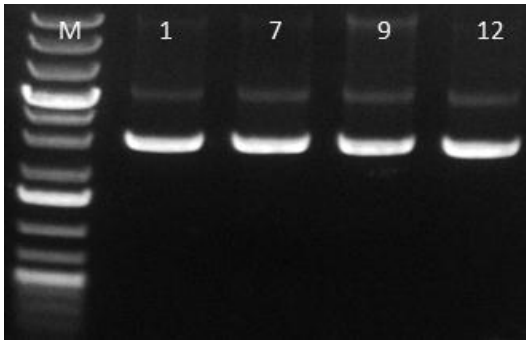
Şekil 3.105: pLATE51 vektörü klonlama bölgesi içeren primerler ile yapılan PCR sonucu

Jelden geri kazanılan dehidrin PCR ürünleri pLATE51 vektörü ile ligasyonu ve DH10B kompetan hücrelerine transformasyonu yapıldı. Petride elde edilen kolonilerden 12 tanesi ile şekilde görüldüğü gibi kit içinde gelen kontrol primerleri ile PCR yapıldı. Şekil 3.106'da görüldüğü gibi 6 tane kolonide pozitif sonuç elde

edildi. bu kolonilerden inokülasyon yapıldı ve izole edilen plazmitler dizilemeye gönderildi.



Şekil 3.106: pLATE51 kontrol primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu



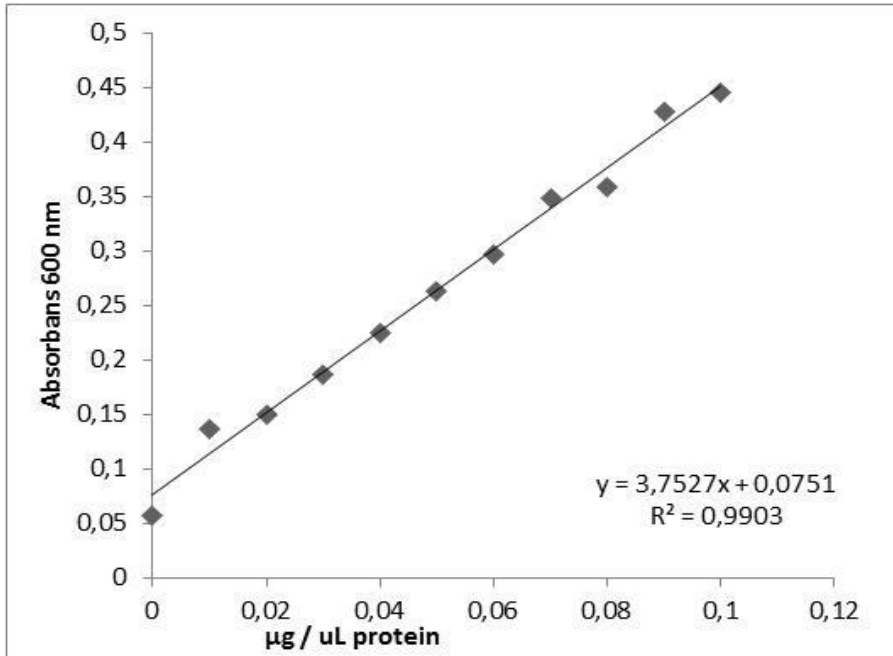
Şekil 3.107: Koloni PCR sonucunda pozitif çıkan plazmitlere ait jel görüntüsü

Dizinin doğruluğundan emin olduktan sonra ekspresyon için ise *E. coli*'nin diğer suşları olan BL21codon (+), BL21(DE3) ve BL21phylss kullanıldı. İlk olarak BL21(DE3) ekspresyon suşuna klonlama yapılarak koloniler elde edildi. Elde edilen kolonilerden tek koloni ekimi 12.5 µL'lik LB'ye (50 µg / mL ampisilin) inoküle edildi. Ön kültür 100 mL'lik LB'ye (12.5 µg / mL ampisilin) aktarıldı, 3 saat sonra ölçüm (OD₆₀₀) alındı, OD₆₀₀ değeri 0.8'e geldiğinde ilk örnekleme yapıldı ve 1 mM IPTG ile indüklendi. Yıkama ve liziz işlemleri yapıldı. Liziz aşamasında protamin sülfat ekmeden önce ham ekstraktan 500 µL ayrıldı ve lizozim miktarı normal prosedüre göre 4 kat artırılarak eklendi. Lowry yöntemi ile protein miktarı belirlendi

ve 30 µg olacak şekilde hesaplamalar yapılarak SDS - PAGE jeline yüklendi. SDS - PAGE sonuçları Şekil 3.109 ve Şekil 3.110’da görülmektedir

3.3.7 Dehidrin Geninin Fonksiyonel Analizine Ait Bulgular

Dehidrin protein karakterizasyonu için öncelikle miktar tayinin belirlemek amacıyla Lowry yöntemi kullanıldı [438]. Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Bu yöntemle protein miktar tayininde sığır serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltideki proteine karşılık gelen absorbans değerleri materyal metot bölümünde anlatılan yöntemle bulunarak Tablo 3.34’teki veriler elde edildi ve Şekil 3.108’deki grafik çizildi. Elde edilen grafiğin doğru denkleminde ilgili absorbansa karşılık gelen mg protein miktarı hesaplanmıştır.

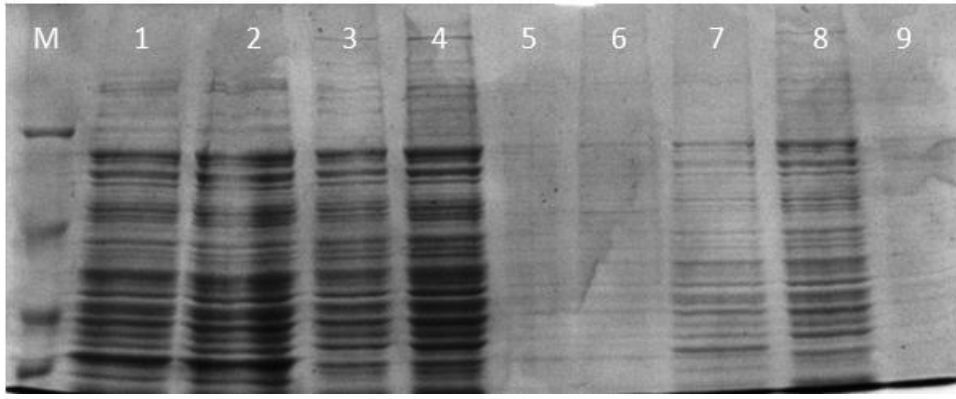


Şekil 3.108: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafiği

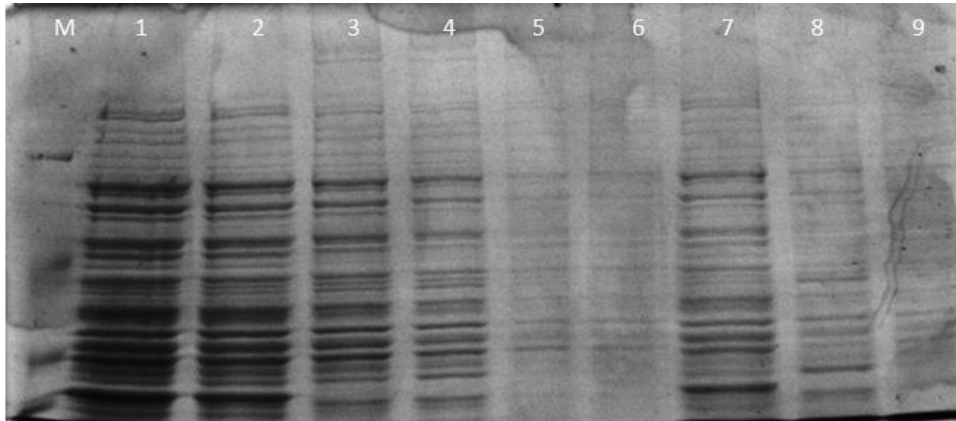
Tablo 3.34: Lowry yöntemi ile dehidrin taşıyan ve taşımayan (kontrol) hücrelerden elde edilen proteininin miktarları

Örnek	Protamin öncesi ham ekstrakt	Protamin sülfat sonrası supernatant	Protamin sülfat sonrası pellet	30 µg olacak şekildeki miktarı		
İndüklenme yen kontrol	106.4 µg / mL	116 µg / mL	31.5 µg /mL	283	259	968
İndüklenen kontrol 3 saat	172 µg / mL	121 µg / mL	29.4 µg / mL	174	248	1034
İndüklenme yen DHN	134.5 µg / mL	143.5 µg / mL	20 µg / mL	224	210	1500
İndüklenen DHN 3 saat	124 µg / mL	153 µg / mL	67.5 µg / mL	242	196	444
BL21	141 µg / mL	100 µg / mL	31.6 µg / mL	213	300	949
BL21 3 saat	101 µg / mL	138 µg / mL	20 µg / mL	297	217	1500

Bu grafikten elde edilen veriler doğrultusunda 30 ng / µL olacak şekilde protein miktarı hesaplandı ve SDS – PAGE jeline yüklendi ve şekildeki jel görüntüleri elde edildi.



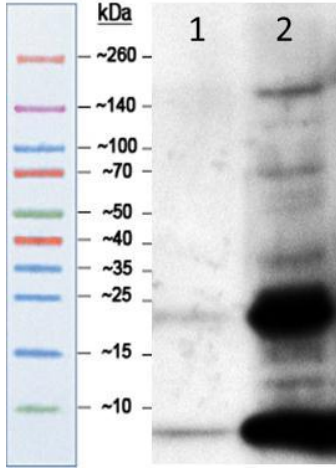
Şekil 3.109: İndüklenmemiş (dehidrin içeren ve içermeyen) hücrelerden elde edilen proteinlere ait SDS PAGE görüntüsü (Kontrol indüklenmemiş protamin öncesi pellet. 2. Dhn indüklenmemiş protamin sülfat öncesi pellet. 3. Kontrol indüklenmemiş protamin sülfat sonrası süpernatant. 4. Dhn indüklenmemiş protamin sülfat sonrası süpernatant. 5. Kontrol indüklenmemiş protamin sülfat sonrası pellet. 6. Dhn indüklenmemiş protamin sülfat sonrası pellet. 7. BL21 indüklenmemiş protamin sülfat sonrası pellet. 8. BL21 indüklenmemiş protamin sülfat sonrası süpernatant. 9. BL21 indüklenmemiş protamin sülfat sonrası pellet.)



Şekil 3.110: İndüklenmiş (dehidrin içeren ve içermeyen) hücrelere ait SDS PAGE görüntüsü (Kontrol indüklenmiş 3. saat protamin öncesi pellet 2. Dhn indüklenmiş 3. saat protamin öncesi pellet 3. Kontrol indüklenmiş 3. saat protamin sülfat sonrası süpernatant 4. Dhn indüklenmiş 3. saat protamin sülfat sonrası süpernatant 5. Kontrol indüklenmiş 3. saat protamin sülfat sonrası pellet 6. Dhn indüklenmiş 3. saat protamin sülfat sonrası pellet 7. BL21 3. saat protamin sülfat öncesi pellet 8. BL21 3. saat protamin sülfat sonrası pellet)

Bu aşamada kitin içinde çıkan ve kloromfenikal genini içeren bir plazmit kontrol olarak kullanıldı. Tüm işlem basamakları onun içinde yapıldı. Negatif kontrol

olarak ise boş kompetan hücresi kullanıldı. Sadece IPTG ile indüklenme basamağı farklı olarak diğer işlemlere devam edildi.



Şekil 3.111: Dehidrin içeren hücrelerin SDS-PAGE jeliyle yapılan Western blot görüntüsü 1. Dehidrin indüklenmiş 3. saat protamin öncesi pellet 2. Dehidrin indüklenmiş 3. saat protamin sülfat sonrası süpernatant

Biyoinformatik analiz ile elde edilen verilere göre dehidrin proteinin moleküler ağırlığı 19.8 kDa olarak bulunmaktadır. Bazı biyoinformatik yazılımları dehidrinin çözünebilir bir protein olduğu sonucunu verirken çözünürlüğü düşük bir protein olduğunu veren biyoinformatik yazılımları da bulunmaktadır. Antifriz özelliğinden ve hidrofilik aminoasitleri (glisin) fazla miktarda içermesinden dolayı çözünebilir protein olması beklenmektedir. Ancak Western blot analizinde dehidrin proteininin protamin sülfat öncesi ham ekstrakta, protamin sülfat ekleme sonrasında ise hem pellet hem de supernatantta bulunması (Şekil 3.110) anlaşılmayan bir mekanizma / faktör nedeniyle bu proteinin bir kısmının hidrofobik davrandığını göstermektedir.

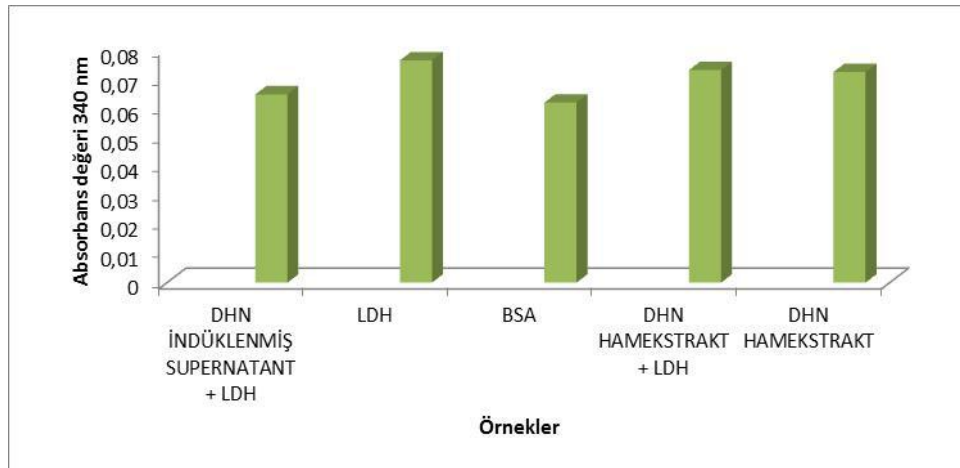
3.3.8 Dehidrin Geninin Kryoprotektif Aktivitesinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Dehidrin genini kryoprotektif aktivitesinin belirlenmesine yönelik çalışmalar pek çok bitkide bulunmaktadır [233, 320, 439, 440]. Lin ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada dehidrin geninin kryoprotektif aktivitesinin belirlenmesinde LDH enziminin katalizlediği pürivat ve NADH₂'den NAD ve laktat oluşumundan NADH miktarının azalmasını tespit etmeye dayalı bir yöntem olduğunu ilk olarak göstermişlerdir [400, 441].

LDH enzimi ve dehidrin geninin birlikte bulunduğu test tüpünün soğuk şartlarda (-20 °C) yaklaşık olarak 15 – 30 dakika bekletilerek ve oda sıcaklığına alınıp çözünmesi yoluyla LDH aktivitesinin bozulması beklenmektedir. Ortamda dehidrin geni varken, LDH aktivite gösterecek ve NADH miktarı azalacaktır. Bu durum (OD₃₄₀) absorbans değerinde ölçülerek tespit edildi. Kontrol grubunda ise dehidrin olmayan LDH kullanıldı bazı çalışmalarda BSA'nında kryoprotektif aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir [400] bu nedenle pozitif kontrol olarak da BSA kullanıldı.

Şekil 3.112'de ki grafikte dehidrin geninin kryoprotektif aktivitesi görülmektedir. Buna göre; dehidrin ortamda varken NAD oluşmakta ve LDH görevini yapmaktadır.



Şekil 3.112: Dehidrin kryoprotektif aktivitesini gösteren grafik

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, zeytin genomuna ait yeni veriler elde etmek amacıyla bir gDNA kütüphanesi, “var” ve “yok” yılları takip edilerek yapılan 4 farklı yaprak cDNA kütüphanesi ve bir Ekim ayında toplanan meyve örneğine ait cDNA kütüphanesi yapıldı. Bir çok bitkide genomik DNA kütüphanelerine ilaveten yaprak [442, 443], fosfat stresli kök [444], kök tüyü [445], glukoz stresli kök ucu [446], nodül [447], olgun meyve kopma bölgesi [448] gibi çok çeşitli organ ve dokulardan özel şartlarda elde edilen cDNA kütüphaneleri bulunmasına rağmen zeytinde cDNA kütüphaneleri büyük ölçüde sadece meyve cDNA kütüphaneleri [449-451] ile sınırlı kalmıştır. Özgentürk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, zeytin yaprak ve ham meyve örneğinden cDNA kütüphanesinden 3734 adet EST kaydını NCBI veritabanına vererek, zeytin genomuna önemli ölçüde katkıları olmuştur [390]. Bu tez kapsamında ise yaprak cDNA kütüphaneleri periyodisiteyi takiben yapıldığı için literatürde bulunan diğer çalışmalardan farklıdır.

gDNA kütüphanesi için izole edilen total genomik DNA örneği *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesilerek pUC19 klonlama vektörü ile ligasyonu ve transformasyonu yapıldı. Rastgele seçilen 100 koloninin dizilenmesi ile gDNA kütüphanesine ait klonlar elde edildi. Bu klonlar çift taraflı (R ve F primerleri ile) olarak dizildiği için tüm dizilerin kromatogramları FinchTV v1.4 ile kontrol ederek kontigleri yapıldı ve doğru dizilere ulaşıldı. Daha sonra bu kolonilerin NCBI veritabanında BLASTn analizi sonucunda homoloji gösterdiği genlere göre fonksiyon analizi yapıldı ve tablolar çizildi. İlk dizilemede rastgele seçilen 100 adet koloninin hepsi dizilendi. Ancak dizilenen klonların hepsinin insert içermediği ya da çok küçük insertler içerdiği belirlendi ve elde edilen 100 koloni *SmaI* restriksiyon enzimi ile kesilerek bir insert kontrolü analizi yapıldı. Buna göre dizilenen ve anlamlı sonuçlar elde edilen kolonilerin insert büyüklükleri Şekil 3.25’de görüldüğü gibi tespit edildi.

gDNA kütüphanesindeki klonlar total genomik DNA'dan elde edildiği için, gen kodlamayan bölgeler, ekzonlar, ve intronlar birlikte bulunmaktadır. Ancak daha önce de belirtildiği gibi zeytin gDNA kütüphanesinin yapılmasındaki amaçlardan biri zeytin genomu hakkında yeni ipuçları elde etmek ve cDNA kütüphanelerine referans olmasıdır.

Elde edilen kolonilerin biyoinformatik analizine bakıldığında klonların numaraları (kütüphanede elde edilen koloniler 1'den 100'e kadar numaralandırıldı ve benzerlik gösteren koloniler ile birlikte Oe şekline isimlendirildi), homoloji gösterdiği genin fonksiyonu ve bitki ismi, e değeri ve gen numarası (Accession number) ve bizim NCBI veritabanına verdiğimiz gen numaralarından oluşan tablo elde edildi. 31 Ağustos 2012 tarihi itibarıyla NCBI zeytin GSS kaydına bakıldığında 25 tane GSS kaydı görülmektedir ve bunlardan 22 tanesi bu tez kapsamında elde edilen gDNA kütüphanesi klonlarına ait olan ve bizim verdiğimiz klonlardır.

Total zeytin genomik DNA'dan yapılan bu kütüphanede beklendiği gibi kloroplast ve mitokondrial DNA'lar bulunmaktadır. Klonların yapılan analizleri sonucunda %16 mitokondrial DNA, %26 oranında çekirdek DNA'sı ve %58 oranında kloroplast DNA'sına ait diziler bulunmaktadır. Genel olarak fonksiyon analizi yapıldığında, %12 insert içermeyen diziler, %22 fonksiyonsuz diziler, %1 faj DNA'sı, %24 tRNA – rRNA homologları, %13 oranında protein kodlayan gen homologları ve %28 bilinmeyen diziler elde edildi. gDNA kütüphanesinden elde edilen bütün dizilerin yarısından fazlasının zeytin kloroplast dizilerinin (diğer bitkilerin kloroplast dizileriyle homolog olan dizilerin) oluşturduğu görülmektedir. Kütüphane oluşturmak için kullanılan toplam DNA, çekirdek DNA'sından daha çok kloroplast DNA'sı taşıdığı bilinen [452] yeşil yapraklardan elde edildiği için bu aslında beklenen bir sonuçtur. Ancak çekirdek DNA'sının sitoplazmik DNA içermesi (genleri taşıması) ihtimali de akla gelmektedir. *Arabidopsis* 2. kromozomda mitokondri genomunun %75'inin bulunması [453] ve bitkiler dahil bir çok fotosentetik organizmanın çekirdeğinde kloroplast kökenli dizilerin bulunması [454] bu ihtimalin yabana atılmaması gerektiğini düşündürmektedir. Çünkü organel DNA'sı içermeyen (sadece çekirdek DNA'sı ile yapılan) gDNA kütüphaneleri de

kloroplast ve mitokondri kökenli diziler içermektedir. *N. plumbaginifolia* genomunun %84'ünü kapsayan 22000 klondan oluşan bir genomik kütüphanenin %6 oranında kloroplast kökenli diziler içerdiği bildirilmiştir [455]. Aynı şekilde 69276 klondan oluşan pirinç genomik kütüphanesinde %11.8 kloroplast ve %0.9 mitokondri kökenli diziler tespit edilmiştir [456]. Bu iki kütüphanenin [455, 456] organel DNA'sı elimine edilerek yapıldığı dikkate alındığında, toplam genomik DNA'dan yapılan bu çalışmada zeytin kloroplast ve mitokondri kökenli dizi oranlarının diğer bitkilerdekine benzer olduğu söylenebilir.

Protein kodlayan genlere benzeyen insert dizileri kütüphanenin %13'ünü oluşturmaktadır. Potansiyel olarak birçok kodlamayan bölge ve intron içeren 46 kromozomluk bir genomdan, hemen hemen hepsi sitoplazmik organel kökenli de olsa %13 oranında gen bilgisi elde etmek için çok verimsiz olmadığını göstermektedir. Öte yandan bilinmeyen dizilerin oranı da (%28) zeytin genomunun bugüne kadar tamamı dizilenmiş bitki genomlarından ciddi düzeyde bir farklılık içerdiğini düşündürmektedir. Uzunluğu 153 ila 753 nükleotid arasında değişen beş adet insert dizisine (Oe101, Oe106, Oe130, Oe146, ve Oe150) ait, bugüne kadar erişilebilen hiçbir nükleotid veritabanında benzer bir kayda rastlanmamıştır. Bu bakımdan bu diziler nükleotid veri bankaları için tamamen yenidir ancak aynı sebeple bu dizilerin görevleri hakkında hiçbir ipucu da bulunmamaktadır.

Oe12 klonu bitki sitokrom P450 enzimine benzerlik gösterir ve ilk defa 1990'da klonlanmış [457] ve çok iyi çalışılmıştır [458]. Sterollerin sentezinde [459, 460] absisik asit, gibberelik asit metabolik yolunda, brassinosteroidlerde siklik terpenlerin modifikasyonunda [461-463] görev alan sitokrom P450 enzimlerinin büyük bölümünün oksidasyon reaksiyonlarında görev aldığı kanıtlanmış [464], 400'den fazla bitkide 85 alt aileye ayrılarak, dizilenmiş ve genel isim olarak CYP denilmiştir [465].

Oe126 – 127 – 128 – 141 klonu Mitokondrial kompleks I da olarak adlandırılan ve çoğunlukla dikotillerden olmak üzere pek çok bitkiden izole edilen

NADH Dehidrogenaz ile benzerlik gösterir. Pancar (*Beta vulgaris*) bitkisinden saflaştırılan NADPH dehidrogenazın, jel filtrasyonu ve native PAGE analizi ile moleküler ağırlığının 700 kDa olduğu [466], 35.8 ve 42 kDa'lık 2 alt birimden oluştuğu [467], mısırdan saflaştırılan NADPH dehidrogenazın ise 32 ve 58 kDa'lık alt birimlerden [468, 469] oluştuğu cis-trans splicing ve RNA editing gibi işleme mekanizmalarında görev aldığı bulunmuştur [470-472].

Genomik kütüphanesinde tRNA genlerinin %12 olması yani ribozomal RNA genlerinin oranıyla (%13) hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Detaylı analiz yapıldığında bu oranın 16S rRNA, *ndhB* ve *rbs7* gibi genlerle bitişik olan tRNA genlerinden kaynaklandığı görülmüştür. tRNA ve rRNA genleri ile birlikte bulunan *ndhB* ve *rbs7* genlerinin özelliklerine bakıldığında; *ndhB* (NADH dehidrogenaz) bazal metabolizmada, fotosistem elektron akışında görev alan bir gen olduğu görülmektedir ve özellikle siklik elektron akışında önemli bir rolü vardır [473]. İlk defa buğdayda tanımlan *rbs7* geni ise ribozomal protein olup, yüksek bitkilerin mitokondrilerinde lokalize olur [474]. Kloroplast ve mitokondri DNA dizilerinin birbirlerine oranı bu organellerin genom büyüklükleri ile uyumlu görünmekle beraber, kütüphane yapımı için büyük çoğunluğu çekirdek DNA'sı olan toplam DNA kullanıldığı dikkate alınır, elde edilen sonuçlar zeytin çekirdek genomunda çok yüksek miktarda organel DNA dizileri bulunduğuna işaret etmektedir ki bu ilginç durum *Arabidopsis* genomunda da gözlenmiştir [475]. Protein kodlayan genlere benzer dizilerin oranının (%14) kabaca beklenen bir düzeyde olduğunu ya da anormal bir gözlem olmadığını söylemek mümkündür. Ancak bu miktarın zeytin genomunun gen yoğunluğu hakkında bir fikir vermesi açısından önemli olduğunu vurgulamak gerekir. NCBI veri bankasındaki hiç bir kayda benzerlik göstermeyen genlerin oranı da (%20) makul görünmekle beraber, en az iki nedenden dolayı ilgi çekicidir. Birincisi, hakkında hiç bir ipucu olmayan dizilerin oranının nispeten az (%20) olması gDNA kütüphanesi dizileme yönteminin bir genom hakkında anlamlı ölçüde (%80) fikir verebileceği sonucudur. İkincisi ise gen bankasına %20 oranında daha önce hiç benzeri görülmemiş DNA dizilerinin kazandırılmasıdır. Fonksiyonsuz DNA (dizinin doğruluğu tespit edilmiş ancak veritabanında henüz fonksiyonu tanımlanmamış, kloroplast DNA'sı *Arabidopsis thaliana* kromozom 2) miktarı %22

iken, rRNA ve tRNA dizilerinin toplamı %24 oranında gözlenmiştir. Protein kodlayan genlere benzerlik gösteren insert oranı ise %13'tür. Ayrıca gDNA kütüphanesinde zeytin yaprağında yaşadığına dair bir kanıt olarak *Burkholderia* [476] adlı faja ait DNA dizisinin (GenBank Accession: gi163716655) %1 oranında bulunduğu görülmüştür.

Oe12 hariç, Gen Bankası'ndaki karakterize edilmiş (ya da en azından doğruluğu teyit edilmiş) dizilere benzeyen bütün insert dizileri ya kloroplast kökenli ya da mitokondri kökenli görünürken, çekirdek kökenli olduğu tespit edilen bütün diziler (Oe12 hariç) fonksiyonsuz kategoriye dahil olmuşlardır. Bu sonuç zeytin çekirdek DNA'sındaki intron ve / veya kodlamayan DNA bölgelerinin beklenildiği gibi yüksek oranda olduğuna işaret etmektedir. Bir başka ilginç gözlem de ikisi hariç bütün rRNA / tRNA dizilerinin kloroplast kökenli olmasıdır ki bu bir yandan başlangıç toplam genomik DNA'daki kloroplast DNA'sı oranının yüksek olduğunu teyit ederken bir yandan da kloroplast genomundaki rRNA / tRNA kodlayan bölgelerin oranının yüksekliğine işaret etmektedir.

DNA kütüphanesindeki klonların dizilenmesi ile elde edilen klonlara ait dizilerden tekrarlı bölgelerin tespit edilmesi ve bu primerler ile çeşit ayrımını yapılabilirliğini test etmek amacıyla klona özgü dizayn edilen primerler ile 1960'lı yıllarda bulunan SSR tekniği yapıldı. Bu teknik, ökaryotik genomlarda, genomik DNA içinde rastgele tekrarlanmış bölgelerin yoğunluk gradient santrifügasyonu ile bulunan satellit pikler ile tanımlanmıştır [477]. Bu satellit DNA'ların izolasyonu ve dizilenmesi sonucunda genom içinde DNA tekrarının olduğu tespit edilmiştir [478]. Bitkilerde SSR'ların varlığı ilk olarak, tropikal ağaç genomlarındaki faj kütüphanelerinde poly (A - G) ve poly (G - T) oligonükleotid problemlerin hibridizasyonu ile tespit edilmiştir [479]. DNA dizilerinin sonuçlarına ilişkin yayınlarda, çeşitli bitki genomlarında bol miktarda bulduklarını göstermektedir [480, 481]. Bu nedenle, SSR'lar bitki genomları ve ekoloji analizi için moleküler markır sistemlerinde tercih edilmektedir [482]. SSR çalışmaları, genel olarak gDNA kütüphanelerinden yapılıyor olsa da *Hordeum chilense* bitkisinde EST'lerden de yapılmıştır. Zeytinde SSR çalışmaları çok olmasına rağmen, hemen hemen hepsinde

daha önce ki yayınlarda verilen primerler kullanılmıştır. Bu primerler; ssrOeUA-DCA08, ssrOeUA-DCA09, ssrOeUA-DC10, ssrOeUA-DCA11, ssrOeUA-DC13, ssrOeUA-DCA16, ssrOeUA-DCA18 [483]; UDO99-11, UDO99-24, UDO99-43, [484], EMO03 [485]. SSR primerleri kullanılarak güney İtalya'daki zeytin çeşitlerinden bir dendrogram elde edilmiştir [486]. Giorio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 20 farklı zeytin çeşidinden gDNA kütüphanesi oluşturularak 20 farklı primer ile [487], güney Marmara bölgesinde 70 örnekten Cipriani ve arkadaşlarının dizayn ettiği primerler kullanılarak SSR analizi yapılmıştır [488]. Periyodisiteye toleranslı 24 Gemlik zeytin kültürü seçilerek daha önce dizayn edilen 10 SSR primeri ile çalışmışlardır [489]. Yapılan tüm çalışmalarda genel olarak aynı primerler kullanılmıştır. Bizim yaptığımız bu çalışmada, zeytin gDNA kütüphanesinde dizilenen her bir klona ait spesifik 7 primerler dizayn edilerek 27 zeytin çeşidinde SSR analizi yapıldı. Buna göre bu primerlerle yapılan PCR ürünlerinin yürütülmesi ile elde edilen jel görüntülerinde Şekil 3.14-19'da görülmektedir. Bazı primerler çoklu bantlar şeklinde ayrılıp bu bantlar çeşitler arasında farklılık gösterirken Oe149 – 162 primerinde olduğu gibi, diğerlerinde tek bant vardır ancak bu primerlerde her çeşitte çalışmamıştır. Buradan bu primerler ile çeşit ayrımını yapabilmek mümkündür ve sadece bir PCR aşamasıyla yapılmaktadır. Ayrıca, Ayvalık zeytin çeşidinden elde edilen tüm klonların benzer özellik göstermeleri ve bölgesel, yağlık – sofralık, yabancı – yerli, zeytin klonlarının ayrımların yapılmasında bu primerlerin önemi görülmektedir. Asıl önemli olan nokta ise bu primerlerin literatürde pek çok yazar tarafından kullanılan primerlerden farklı ve özgün olmasıdır.

Temmuz ve Kasım aylarında "var yılı" ve "yok yılı" yaprak örneklerinden ve Ekim ayı meyve örneklerinden toplam RNA izole edilerek 5 ayrı cDNA kütüphanesi elde edildi. Bu kütüphaneler için izole edilen yaprak ve meyve örneklerine ait toplam RNA örneğinden Ters Transkriptaz enzimi ile cDNA elde edildi ve DNA Polimeraz I enzimi ile çift zincirli hale getirildi. Çift zincirli cDNA'nın, pJET1.2 klonlama vektörüne ligasyonu ve transformasyonu yapıldı.

Periyodisite bol meyveli yılı, daha az meyveli bir yılın takip etmesiyle oluşan bir fenomendir. Zeytin ise periyodisite gösteren önemli bitkilerdendir. Bu çalışmada

zeytinin bu özelliği dikkate alınarak iki yılı takiben zeytin meyvesinin ilk oluşum aşaması olan Temmuz ve hasat zamanı olan Kasım aylarında ikişer defa örnekleme yapılarak Temmuz ve Kasım “var - yok” yıllarına ait 4 adet zeytin yaprak cDNA kütüphanesi oluşturuldu. Ayrıca Ekim ayına ait bir tane meyve kütüphanesi yapıldı.

Tüm kütüphanelerden elde edilen genlere baktığımızda ortak özellikleri ve hatta bazı kütüphanelerde aynı genlerin bulunmasına rağmen, bu kütüphaneler farklı dönemlerde toplanan yapraklardan ve farklı zamanlarda yapılmıştır. Bu nedenle, aynı genlerin farklı dönemlerde görülmesinde deney hatasının olmadığı açıktır. Ayrıca kütüphanelerde bulunan genlerin bazıları aynı kütüphane içinde farklı klonlarda (TV146 - 151 - 187 de olduğu gibi) bulunmuştur. Bu şu anlama gelmektedir; rastgele seçilen kolonilerden 3 tanesi aynıdır oysa ki koloni seçimlerinde birbirinden uzak ve tek kolonilerin seçilmesine dikkat edilmiştir. Bu bölümde kütüphaneler önce tek tek değerlendirilecek sonrasında ise tüm kütüphaneler karşılaştırılarak yorumlanacaktır.

Temmuz “var” yılı kütüphanesinden elde edilen yaklaşık 100 adet plazmit seçilerek Şekil 3.20’de ki gibi insert kontrolü yapıldı ve biyoinformatik analiz sonucuna göre sınıflandırılmış profili Şekil 3.27 ve homoloji tablosu Tablo 3.9’da görülmektedir. En büyük kategoride %71 ile rRNA genleri (4.5S, 16S, 18S, 25S, 26S), ikinci olarak %23 ile protein kodlayan genler ve son olarak %6 ile tRNA genleri bulunmuştur. Temmuz “var yılı” kütüphanesinin protein kodlayan genlerine baktığımızda (her ne kadar tanımlanmış bir enzimin / polipeptidin mRNA’sına benzeyen cDNA’lar büyük bir çoğunlukla protein kodluyor olsalar da, burada protein kodladıkları tahmin edilen genlerin tamamen benzedikleri proteinlere bakılarak tahmin edilmektedir. Çünkü nadiren de olsa bu cDNA’ların yalancı gen veya protein kodlamayan gen olma ihtimali vardır.) 4 adet P450 monooksijenaz (3 adet CYP72A56 ve 1 adet CYP76A1), 3 adet dehidrogenaz, 2 adet transkripsiyon faktörünün (bZIP124) en çok sentezlenen genler arasında bulunma ihtimali bulunmaktadır. Bu genlerin konstitüif genler olarak yaprakta bulunmaları doğal olsa da, ribozomal RNA (rRNA) transkriptleri ile yarışacak kadar çok miktarda olmaları, Temmuz ayındaki yaprağa has genler oldukları ya da bu dönemde daha çok ihtiyaç duyulan genler oldukları yönündeki ihtimalleri kuvvetlendirmektedir. Bunlara

ilaveten 1 adet kloroplast proteini, 1 adet integral membran proteini (HRF1 family protein) ve 1 adet de küçük GTPaz regülatör proteini (TVLP1) mRNA'larının diğeri 2 kütüphanede bulunmaması bu genlerin Temmuz ayı meyveli yapraklarda ("var yılı") daha çok bulunduğunu göstermektedir

Temmuz "var yılı" kütüphanesinde ki klonların anlamlı gösterimli PCR analizi sonuçlarına bakıldığında Şekil 3.38 - 3.41'de görüldüğü gibi bu döneme has bazı genler ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. TV45 (sitokrom P450), TV124 (MNR1) isimli klonlara bakıldığında her ikisi de bazal metabolizmada görev alan genlerdir ve bu genlerin ekspresyonu tüm yaprak kütüphanelerinde ve meyve kütüphanesinde fazladır. TV124 (MNR1) bitki genomlarında geniş dağılım gösteren, bazal metabolizmada rol alan, sekonder metabolitlerde (terpenoidler, phytidexinler, glukosinolatlar) patojen saldırılarını önlemede, böceklerin, polinatörlerin ve doğal düşmanların saldırılarını önlemede rol alırlar [490-495].

TV46 numaralı klon kloroplast protein 12 olarak isimlendirilir ve yaprak kütüphanelerindeki ekspresyonu meyve kütüphanesine göre daha fazladır. Genin fonksiyonuna bakıldığında C12 küçük, doğal olarak yapılandırılmamış kloroplast proteini olup [496, 497] ferredoksin / tioredoksin düzenleyici sistemi tarafından redoks döngüsündeki hedef proteindir [498, 499]. Karanlıkta, Calvin – Benson döngüsü enzimlerinden fosforibulokinaz ve gpdh'in ayrılmasında platform olarak görev alırlar [497, 500, 501]. TV153 (vakuol yönlendirici protein) klonu TGF- β (transforming growth factor- β) proteinleri ile homoloji gösteren çok fonksiyonlu sinyal bileşenlerin dahil olduğu, meyve sineğinden insana kadar pek çok organizmada önemli rol oynayan genlere ait büyük bir ailedir [502]. TGF- β sinyalleri, hücre yüzeyinde lokalize olan reseptörleri (TGF - β reseptörü ile etkilemiş proteinler TRIPs) içeren downstream proteinleri ile etkilemiş transmit sinyalleri içerir TGF- β , reseptör proteinleri ya da TGF- β sinyali ile etkileştiğinde, birçok bitki gelişiminde, hormonal yanıt, hastalığa dirençlilik gibi birçok metabolik yolda önemli rol oynar. TV126 (HRF1) klonları meyve örneğinde diğeri yaprak kalıplarına göre daha fazla bir ekspresyon söz konusudur. TV111 - 148 numaralı

bZIP transkripsiyon faktörünün en fazla Kasım “var yılı” kütüphanesinde ekspre olduğu görülmektedir. Bitki bZIP transkripsiyon faktörü; ışık stresi sinyal iletimi, patojen savunması, tohum olgunlaşması, çiçek gelişimi gibi bir çok metabolik yolda görev almaktadır [503]. Bitki genomunda 75 çeşit bZIP transkripsiyon faktörü 10 gruba ayrılmıştır (A-I ve S) [504]. bZIP transkripsiyon faktörü genleri *Arabidopsis* AtABI5 [505], HY5 [506], AtEm6 [507-510], mısır OsABI5 [511], domates *LebZIP1* [512, 513], buğday HBP-1a, HBP-1b [514], havuç DcBZ1 [515] gibi pek çok bitkide çalışılmıştır. Genel olarak bakıldığında bu transkripsiyon faktörünün stres genleri ile korelasyon içinde olduğu bilinmektedir [503]. Sonra ki bölümlerde bahsedilecek olan Kasım “var yılı” kütüphanesinde stres genlerinin fazla bulunduğu konusunda detaylı bilgi verilecektir. Farklı zamanlarda ve farklı kalıplardan yapılması göz önüne alınarak, bu genin özellikle Temmuz “var yılı” döneminde bulunmasına rağmen Kasım “var” yılında fazla ekspre olması, kütüphane verilerinin doğruluğu ve benzerlik gösteren klonların fonksiyon tespiti açısından önemlidir. TV178 numaralı klonuna ait ekspresyon profilinde bir dalgalanma görülmektedir. Bu klonun fonksiyonu yüksek korunmuş kloroplast geni olan psaA - psbB nükleotit dizileri filogenetik analiz için kullanılmıştır [516]. Tilakoid membran bağımlı yapısal proteinler ve kloroplast fotosistemI - II’de görev alan proteinler, psaA ve psbB tarafından kodlanır [517]. Rbcl ve atpB’ye benzerlik gösterirler ve genel olarak ağacın meyveli dönemi olan “var” yılında daha fazla ATP harcanacağı için bu dönemlerde fazla sentezlenmeleri beklenen bir durumdur. TV154 - 160 numaralı klonuna bakıldığında ise tam tersi bir durum söz konusudur. Bu klonun özelliği ATP bağımlı proteazdır. Bu gen ise TY ve KV dönemlerinde en fazla sentezlenmektedir.

Temmuz “yok yılı” kütüphanesinden elde edilen yaklaşık 100 adet plazmit seçilerek Şekil 3.21’deki gibi insert kontrolü yapıldı ve biyoinformatik analiz sonucuna göre sınıflandırılmış profili Şekil 3.28 ve homoloji tablosu Tablo 3.10’da görülmektedir. Temmuz “yok yılı” kütüphanesi klonlarında %79 oranında tRNA ve rRNA genleri, %4 benzersiz cDNA ve %17 protein kodlayan genler bulunmaktadır. Temmuz “yok yılı” kütüphanesinde, Temmuz “var” yılında bulunan monooksijenazı (TV31 - 84, CYP72A56 benzeri) içerdiği görülmektedir. Bu durum iki yönden çok önemlidir. Birincisi bu monooksijenazın meyveli (“var” yılı) ve meyvesiz (“yok yılı”) yapraklardan çok Temmuz ayına özgü bir gen olduğu ihtimali

çok yüksektir. Ayrıca, bağımsız olarak yapılan 2 ayrı kütüphanede en çok rastlanan genin aynı olması ve aynı oranda (%3) bulunması, dizileme yoluyla kütüphane tarama yönteminin doku ve zamana has genleri bulmada kullanılabilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir. Bu durumda bir kütüphanede bulunup diğerinde bulunmayan genlerin, özellikle bir kütüphanede birden fazla bulunup diğerlerinde bulunmayan genlerin bu kütüphaneye has genler olduğu düşünülebilir. Temmuz “yok yılı” kütüphanesine genel olarak bakıldığında önemli oranda stres genlerinin olduğu göze çarpmaktadır. Yaralanma stres genleri, hastalığa direnç geni, tiyoredoksin, ER6 proteini gibi genlerin özelliklerine bakıldığında bitkinin herhangi bir stres durumunda ya da bir etken ile karşılaştığında ekspre olan genler olduğu görülmektedir.

Temmuz “yok yılı” kütüphanesinde ki klonların anlak gösterimli PCR analizi sonuçlarına bakıldığında Şekil 3.42 - 3.46’da görüldüğü gibi bu döneme has bazı genler ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Bu kütüphanede tespit edilmiş ve henüz fonksiyonu bilinmeyen klonlardan TY1 ve TY32 - 87 numaralı klonların meyvede daha fazla ekspre oldukları görülmektedir. TY32 - 87 numaralı klonda ise diğerinden farklı olarak özellikle TV ve TY kalıplarında daha fazla ekspre olduğu görülmektedir. Buradan gen fonksiyonu bilinmediği için tahmin etmek zor olmakla birlikte Temmuz ayına has bir gen olabileceği düşünülebilir. Aynı şekilde soya fasulyesinde, tohum kılıfının pigmentasyonunun kontrolünden sorumlu bağımsız 3 genetik lokus (I, R, T) bulunan [518], R - T allellik kombinasyonunun ürünü, tohum kılıf rengi antosiyanin ve proantosiyanidin üretimini kontrol ederken, I lokusu, tohum kılıfının protoantosiyanidin pigmenti ve antosiyanin birikimini ve kısmen dağılımını kontrol eden DNAj benzeri genine homolg TY92 klonudur [519, 520]. Bu I geninin *Glycine max*’taki GmIRCHS homoloğu DnaJ-like geni promotörünü içermektedir [521] TY92 numaralı klonunda özellikle Temmuz ayına has olduğu görülmektedir. Temmuz “yok yılı” genlerinin daha önce de belirtildiği gibi daha çok stres ile ilgili genler olduğu göze çarpmaktadır. TY2 - 62 (yaralanma / stres geni) Bitkilerde, doğal kaynaklı yaralanmalar çeşitli olmakla birlikte; yangın, herbivorlar, rüzgâr, yağmur, dolu, ultraviyole radyasyon, kum, çigneme gibi faktörlerle ile bitkiler baş etmek zorundadır. Ancak bu doku zararlıları, gen ekspresyonunun değişimine sebep olur [522-525]. Birçok sistematik yaralanma sorumlusu proteinler

(yaralanma sinyalinin hücrelerarası iletimini takiben zararlı olmayan dokularda ekspre olurlar) domates bitkisinde çok iyi karakterize edilmiştir [526]. TY56 - 65 (putatif ribosomal protein) klonlarının yaprak kütüphaneleri arasında bir karşılaştırma yapıldığında –meyve kütüphanesi hariç- daha çok “yok yılı” dönemine has oldukları görülmektedir. TY4 (hastalığa direnç geni), TY79 (sitokrom P450 redüktaz) ve TY96 (tiyoredoksin) numaralı klonların ise fonksiyonlarıyla korelasyon içinde tüm yaprak kütüphanelerinde eşit seviyede ekspre olduğu görülmektedir. Thioredoksin sistemi bakteri ve ökaryotlarda, temel redoks sistemlerinden, çeşitli biyolojik proseste redoks kontrolünü glutasyon sistemi ile birlikte yapan 2 önemli redoks sisteminden biridir [527].

Anlık gösterimli PCR sonucunda elde edilen bu ekspresyon analizine göre sadece Temmuz ayında veya Kasım ayında bulunan genlerin bir dönemde veya ayda bulunmaları o genlerin o döneme has olabilecekleri konusunda önemli bir ipucu vermektedir.

Kasım “var yılı” kütüphanesinden elde edilen yaklaşık 100 adet plazmit seçilerek Şekil 3.22’de ki gibi insert kontrolü yapıldı ve biyoinformatik analiz sonucuna göre sınıflandırılmış profili Şekil 3.29 ve homoloji tablosu Tablo 3.11’de görülmektedir. En büyük kategoride %85 ile tRNA ve rRNA genleri ikinci olarak %15 ile protein kodlayan genler bulunmaktadır. Kasım “var yılı” kütüphanesinin protein kodlayan genlerine baktığımızda 1 adet dehidratif stres ile ilgili gen olarak dehidrin ve yine stres ile ilgili transkripsiyon faktörlerinden 1 adet JERF1 transkripsiyon faktörü, 1 adet DNA ısı şoku proteinleri, 1 adet metallothionein proteini, 1 adet Exo70 proteini olmak üzere toplam 6 adet stres ile ilgili klon tespit edilmiştir. 2 adet fotosistem ile ilgili klon, 1 adet glikozil hidrolaz ailesi üyesinden bir klon elde edilmiştir. Dolayısıyla, Kasım ayı zeytin yaprak örneklerinden oluşturulan bu kütüphanede, stres ile ilgili bir durumun olduğunu elde edilen klonlardan çıkarabiliriz. Ayrıca, bu genlerin rRNA transkriptleri ile yarışacak kadar çok miktarda olmaları Kasım ayında bitkinin bu döneme has ya da bu dönemde strese karşı savunması açısından ihtiyaç duyulan genler oldukları yönündeki ihtimalleri akla getirmektedir. Kasım ayı olarak belirlenen hasat zamanında,

meyvenin büyümesi, yağ içeriğinin artması ve bulunduğu iklim koşullarına bağlı olarak meydana gelen stres faktörlerine karşı (soğuk, tuzluluk, patojenler vs.) savunma mekanizmasında rol aldığı görülmektedir.

Kasım “var yılı” kütüphanesinde ki klonların anlık gösterimli PCR analizi sonuçlarına bakıldığında Şekil 3.47 - 3.52’de görüldüğü gibi bu döneme has bazı genler ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Kasım “var yılı” kütüphanesinde KV5 - 11 (armadillo / betakatein benzeri protein), KV3 - 96 (sitokrom 1 mRNA), KV17 - 90 (DNA ısı şoku proteini) KV60 numaralı klonların bu döneme has oldukları görülmektedir. KV8 numaralı klonun homoloji gösterdiği fonksiyona bakıldığında JERF1 transkripsiyon faktörüne benzemektedir. Biotik ve abiotik stres durumlarında gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olan ERF proteinini kodlayan, korunmuş ERF, DNA bağlanma motifi içeren ve birçok bitkide özellikle buğdayda klonlanmış olan bir transkripsiyon faktörüdür [539-543]. Bu transkripsiyon faktörü, ERF proteinini kodlayan ve buna uygun DNA bağlama motifi içeren, biotik ve abiotik stres durumlarında ekspresyonda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür [541, 542]. Aynı şekilde KV58 numaralı klonun homoloji gösterdiği karbonhidrat metabolizmasında görev alan [544] glikozil hidrolazda Kasım ayına has gibi görünmektedir. KV69 - 99 numaralı klon fotosistem I reaksiyonunda görev almaktadır ve anlık gösterimli PCR sonucuna bakıldığında TV46 klonu gibi bu klonunun ekspresyon seviyesinde yaprak kütüphanelerinde fazla olması beklenen bir durumdur ve kütüphane için yapılan bu çalışmanın doğruluğunu göstermektedir. Sınıf I tip2 metallothionein fonksiyonuna sahip KV9 klonu, arjinin dekarboksilaz gen özelliğindeki bitki metallothionein (MT) proteinleri gelişim sırasında [545-547], yaşlanmada [548-550] ve oksidatif strese karşı savunmada rol alan [551-553], düşük moleküler ağırlıklı, sistein gruplarına tiyol aracılığıyla bağlanan sisteince zengin proteinlerdir [554]. KV22 kloroplast genom proteinine ait klonu da daha çok yapraklarda ekspre olmaktadır. Putatif splaying faktör görevine sahip olan KV41 numaralı klonu *Arabidopsis*’te splicing gen aileleri ile yapılan çalışmalarda bazı splicing ile ilgili genler, DEAD box RNA helikaz ailesi [560], RNA tanıma motifi (RRM) içeren proteinlerinden olduğu bulunmuştur [561].

Kasım ‘‘yok yılı’’ kütüphanesinden elde edilen yaklaşık 100 adet plazmit seçilerek Şekil 3.23’deki gibi insert kontrolü yapıldı ve biyoinformatik analiz sonucuna göre sınıflandırılmış profili Şekil 3.30 ve homoloji tablosu Tablo 3.12’de görülmektedir. En büyük kategoride %88 ile tRNA ve rRNA genleri, % 12 ile protein kodlayan genler bulunmaktadır. Protein kodlayan genlere baktığımızda farklı özellikler ile birlikte diğer kütüphaneler ile ortak genler de bulunmaktadır. Fotosistem ile ilgili 1 adet gen, sıcaklık, soğuk stresi ile ilgili birer adet gen, çinko parmak transkripsiyon faktörü ile ilgili bir adet gen bulunmuştur. Ayrıca KY29 klonu *Arabidopsis thaliana* bitkisinde transpozon benzeri bir protein ile benzerlik göstermektedir ve KY31 soğuk stres geni olarak tespit edilmiştir ancak soyafasulyesine ait database verilerin baktığımızda dehidrin geni KS segmenti elde edilmiştir. yine aynı şekilde arpa database verilerinde de dehidrin geni tespit edilmiştir.

Kasım ‘‘yok yılı’’ kütüphanesinde ki klonların anlak gösterimli PCR analizi sonuçlarına bakıldığında Şekil 3.53 - 3.56’da görüldüğü gibi bu döneme has bazı genler ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. KY14-36-85 numaralı klonu meyve kütüphanesi klonlarından MK46-55-57 ile aynı fonksiyona sahiptir. Öncül mRNA’nın işlenmesinde görev alan KY91 - 97 numaralı klonunun ve soğukta indüklenen srcl genine ait klon olan KY31’in düşük sıcaklık, bitki gelişimini, büyümesini ve ürün verimini büyük ölçüde etkileyen çevresel faktörlerden biri olduğu bilinmektedir ve ılımlı bölgelerde yetişen birçok bitki, soğuğa ve donmaya karşı tolerans gösterebildiği tespit edilmiştir [562] ve Kasım ayına has olduğu görülmektedir. Soğuğa dayanabilen bitkiler, kompleks bitkilerdir ve soğuğa dayanıklılık lipid, protein ve karbonhidrat kompozisyonunda meydana gelen değişiklikleri, biyolojik ve fizyolojik pek çok değişikliği de beraberinde gerektirmektedir [563, 564].

KY24 translasyonun başlamasında, mRNA’nın işlenmesi 5’ başlık yapısı ve 3’ poly A kuyruğu, ökaryotlar için gereklidir [566-568]. Poly A kuyruğu, Poly A bağlanma proteinleri (PABP) tarafından tanınırken, başlık yapısı başlık bağlanma kompleksi ile etkileşir. Ökaryotik bağlanma faktörleri, eIF4E, 3 alt birimden oluşur.

Bunlar; eIF4E, eIF4G, eIF4E'dir. Bunlar, eIF4G'nin N terminal alanına ve başlık yapısına [569] ve eIF4A'nın merkezi ve C terminal alanına kolayca bağlanabilirler [570]. ve genel olarak ekspresyonuna bakıldığında eşit dağılım göstermekle birlikte Kasım "var" yılındaki ekspresyonu diğerlerine göre fazladır. KY59 genine bakıldığında plastid-spesifik olduğu ve bu durumun anlık gösterimli PCR ile de uyumlu olduğu meyve örneğinde daha az bulunmasıyla ve aynı şekilde KY29 numaralı klon hücre bölünmesi, ubiquitin metabolizmasında görev alan ve yapraklarda daha fazla bulunduğu *Arabidopsis thaliana*'da kanıtlanmış olması [571] bu genlerin yapraklarda fazla bulunması ve meyvede az bulunması durumuyla örtüşmektedir. KY23 lipokalin genine bakıldığında fonksiyonuna Lipokalin, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunan, ekstraselüler proteinlerde küçük bir grup içinde yer alır. Küçük, özel hidrofobik moleküllere bağlanma yeteneği sağlayan korunmuş ligand ile karakterize edilmiştir. Bu ligandlar, steroid, feromonlar, adurant moleküllerin dahil olduğu potansiyel ligandları içerir [572]. Bitkilerde, sadece 2 lipokalin benzeri protein bulunmaktadır. Bu lipokalinler foto-oksidatif zarara karşı korunma amaçlı ksantofil döngüsünden sorumlu anahtar enzimlerde bulunmaktadır [573].

2 homolog cDNA (buğdaydan Tatil, *Arabidopsis*'ten Attil), lipokaline benzeyen korunmuş protein tespit edilmiştir. Bu proteinler, daha önce belirlenmiş olan memeli apolipoprotein D (ApoD), bakterilerde Blc ve böceklerde Lazarilla'daki lipokalin proteinine yüksek oranda homoloji göstermektedir [574]. paralel olarak ekstraselüler proteinlerde korunmuş ligandlar ile karakterize edilen küçük proteinler olup [566] tüm kalıplarda aynı oranda bulunması beklendiği gibidir

Şimdiye kadar yapılan 5 kütüphane (gDNA kütüphanesi ve 4 cDNA kütüphanesi) 2 yıl ve Temmuz ve Kasım aylarını takiben Ayvalık zeytin çeşidi yaprak örneklerinden yapılmıştır. Zeytin meyve kütüphanesi ise Ekim ayı Ayvalık zeytin meyvesinden yapılmıştır. Meyve kütüphanesinden elde edilen yaklaşık 100 adet plazmit seçilerek Şekil 3.24'deki gibi insert kontrolü yapıldı ve biyoinformatik analiz sonucuna göre sınıflandırılmış profili Şekil 3.31 ve homoloji tablosu Tablo 3.13'de görülmektedir. En büyük kategoride %89 ile tRNA ve rRNA genleri, ve %11

oranında protein kodlayan genler bulunmaktadır. Meyve kütüphanesinin protein kodlayan genlerine baktığımızda 2 adet trifosfat izomeraz geni, 2 adet UDP 4 glukoz epimeraz geni, 2 adet açıl KoA bağlayıcı protein, 2 adet çinko parmak ile ilgili protein, 1 adet IBR domain bulunmuştur. Bunlar, bazal metabolizma da rol alan, fonksiyonel genlerdir. Bu açıdan baktığımızda, meyve ve yaprak genleri arasında önemli ölçüde fark olmasıyla birlikte, kütüphaneler içinde ortak olan fotosistem ile ilgili genlerin olması, konstitütif genler olarak beklenen ve / veya tahmin edilen bir durumdur.

Meyve kütüphanesindeki klonların anlık gösterimli PCR analizi sonuçlarına bakıldığında meyveye has bazı genler ile ilgili bilgiler Şekil 3.57 - 3.59'da görüldüğü gibi elde edilmiştir. Açıl-KoA bağlayan protein MK13 - 17, UDP - glukoz 4-epimeraz geni (Kloroplastlarda olan yağ asitleri *de novo* sentezi [586, 587] palmitoyl-CoA ve oleoyl-CoA lipit biyosentezi için endoplazmik retikuluma aktarılır [588]). Bitki ACBP'lerinin, açıl CoA esterlerinin taşınmasında, plastidlerden endoplazmik retikuluma ve mitokondriye ya da hücre zarı içinde veya sitosoldeki açıl CoA esterleri ile birleşerek taşındığı düşünülür [590]. MK12 - 20 UDP-glukoz 4 epimeraz (UGE), UDP - glukoz ve UDP galaktozun birbirine dönüşümünü katalizleyen [591, 592] ve *Arabidopsis* genomunda 5 tane UGE izoformu bulunan bir genidir [596]. Hipotetik protein MK10 klonunu da yapraktan ziyade meyve de ekspre olmaktadır. MK4 -22 Triozfosfat izomeraz geni Triozfosfat izomeraz (TPI) (EC 5.3.1.1), dihidroksiasetonfosfat (GAP) ve D - gliseraldehit3 fosfatının (DHAP) birbirine dönüşümünü katalizler [597, 598]. Kloroplast TPI'si aynı zamanda biyokimyasal seviyede ve enzim saflaştırma çalışmaları olarak, patates [598], ıspanak [605], fasulyede [606] pirinç ve marulda çalışılmıştır [607-609] ve bu çalışmada tüm kalıplarda eşit seviyede ekspre olmaktadır. MK51 klonu *Olea europaea* L.'ye direkt benzerlik göstermektedir ve kloroplast genomundaki fotosistem II bileşeni olup, görüldüğü gibi en fazla yapraklarda en az ise meyvede ekspre olmaktadır.

Temmuz ayı "var" - "yok" yılları ve Kasım ayı "var - yok" yıllarına ait kütüphanelerden elde edilen klonların dizilenip, NCBI genbankası kayıtlarına göre

yapılan BLASTn analizi sonucunda homoloji gösteren genler tespit edilmiştir. Yaprak kütüphanelerinden elde edilen genlerin genel özelliklerine bakıldığında “var” yıllarında metabolizmada rol alan genlerin fazla bulunduğu (P450, MNR, bZIP transkripsiyon faktörü, fotosistemde rol alan alt birimler), “yok yılı” yılında ise daha çok stres ile ilgili genlerin (ER6, EXO70, dehidrin, soğukta indüklenen gen, yaralanma / stres genleri, hastalığa direnç geni, lipokalin) bol bulunduğu görülmektedir. Temmuz ve Kasım aylarını takiben yapılan kütüphanelerde zeytin ağacının “var” ve “yok” yıllarında maruz kaldıkları etkiler farklı olacaktır. Temmuz ayında meyve ilk oluşum aşamasında olup, ağaç ve yapraklar meyve gelişiminde çok fazla etkilenmezken, Kasım ayı hasat zamanıdır ve bu dönemde meyve olgunlaşmıştır dolayısıyla bu geçen süre de ağaç tüm gücünü meyveye harcamıştır [610]. Bu dönemlerde bitkinin farklı streslerle mücadele ettiği, elde edilen klonlardan anlaşılmaktadır. Bitki bu dönemlerde, kuraklık, soğuk, tuzluluk, patojenler gibi farklı birçok biotik ve abiotik stres ile karşılaşmaktadır. Dolayısıyla bu dönemlerde stres ile ilgili genler ve transkripsiyon faktörlerinin dahil olduğu dönemsel genlerin bol bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ancak P450, NADH dehidrogenaz, sitokrom P450 gibi bazal metabolizmada rol almasına rağmen, bu çalışmada dönemsel sentezlenen genler ile bazal metabolizma rol alan genler grubunda ortak grup teşkil etmektedirler. Meyve kütüphanesinde ise, metabolizma ile ilgili oldukları, özellikle meyve oluşumunda rol alan, metabolik enzimleri kodlayan genlerin çoğunlukta olduğu görülmektedir. Meyve oluşumunda rol alan genlerin, yağ asitlerinin oluşumunda sorumlu genlerin, aromatik bileşenlerin, tokoferollerin oluşumu, meyve mezokarpının büyümesi, meyve olgunlaştığı zaman daldan ayrılma mekanizmasıyla ilgili birçok mekanizmada rol alan bazal metabolizmadan sorumlu genlerin hemen hemen her kütüphanede yüksek seviyede olması beklenen bir durumdur. Meyve kütüphanesine baktığımızda, yapraktan elde edilen diğer cDNA kütüphanelerinden önemli ölçüde farklılık görülmektedir. Meyve kütüphanesi Ekim ayı “var yılı” zeytin meyvesinden yapılmıştır. Bu anlamda, meyve kütüphanesinde bazal metabolizmada rol alan genlerin bol bulunması beklenen bir durumdur. Çünkü meyvenin hasat zamanı yaklaşmış, meyve koyu mor renge dönmüş, yağ oluşumu başlamıştır. Bu nedenle bu aşamada zeytin ağacı meyveyi oluşturmaya yönelik bir gelişme göstermiştir. Kasım “var - yok yılı” kütüphanelerinde ve Ekim ayı “var yılı” zeytin meyvesinde elde edilen meyve kütüphanesinde fotosentez ile ilgili olan PSII geni KV69 - 70, KY32, MK51 olmak üzere 3 kütüphanede elde edilmiştir.

Ayrıca fotosentez ile ilgili genler NCBI genbankası kayıtlarına göre yapılan BLASTn analizinde psbA, psbJ gibi farklı alt birimler halinde elde edilen klonlar hiçbir bitki de benzerlik göstermemiştir. (Bizim kütüphanelerde psbJ ve psbA *Olea europaea* ile homoloji göstermiştir) Fotosistem II tilakoid membran dizisi (KV22) ise tüm kütüphanelerde tespit edilmiştir. Bu durum, fotosistem alt birimlerinin döneme göre miktarında farklılık olabileceği konusunda bir fikir verebilir.

Temmuz ve Kasım ayları “var – yok” yılı kalıplarının ayrı genler için ayrı kalıplar kullanılarak ve tek tek anlık gösterimli PCR sonuçları elde edildi. Buna ilave olarak, tek bir kalıp ile tüm kütüphane klonları tek bir reaksiyonda 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Bunun sonucunda 5 farklı anlık gösterimli PCR grafiği Şekil 3.48 – 3.50’de görüldüğü gibi elde edildi. Bu grafiklere bakıldığında, TV45, TV46, TV124, TV146 numaralı klonların diğer kütüphane klonlarına göre (KV22 hariç) bu dönemde ekspres olduğu görülmektedir. Temmuz “yok yılı” yılı kalıplarında ise diğer genlere göre bir farklılık görülmediği gibi, “var yılı” kalıbı ile bir farklılık görülmemektedir. Kasım “var yılı” örneklerine bakıldığında, KV22, KV9 numaralı klonlarının daha çok yaprak kütüphanesine has olduğu görülmekle birlikte diğer klonlarla karşılaştırıldığında bu döneme has oldukları görülmektedir. Kasım “yok yılı” klonlarına bakıldığında, KY31 ve KY23 numaralı klonların Kasım ayına has oldukları görülmektedir. Meyve kütüphanesi klonlarına bakıldığında, MK13 - 17 ve MK12 - 20 numaralı klonların meyveye has oldukları görülmektedir. Bu grafiklerde elde edilen sonuçlar ile bu klonların tek tek elde edilen anlık gösterimli PCR grafikleri arasında farklılıklar görülmektedir. Bunun ana nedeni, tek tek yapılan grafiklerde bir gen 5 kalıpta karşılaştırılmaktadır, oysa ki burada bir kalıpta farklı 43 gen karşılaştırılmaktadır. Dolayısıyla bunların hesaplanması ve birbiri ile orantılanmasında bir farklılık olacak ve bu genler tek bir kalıpta birbirleri ile karşılaştırmalı olarak sonuç vereceklerdir.

Kütüphanelerden elde edilen klonların insert büyüklüklerine bakıldığında birbirinden oldukça farklı oldukları görülmektedir. TV, TY, KV, KY, meyve kütüphanelerinden elde edilen klonların insert büyüklükleri sırası ile, Şekil 3.55 ‘de görüldüğü gibi 1806, 1099, 1591, 1066, 1742 nükleotit olarak sıralanmaktadır. En

büyük insertler TV yılında elde edilirken, en küçük insertler ise KY yılında elde edilmiştir. BLASTn analizine ek olarak tüm kütüphane klonlarının gen ontoloji anotasyonu (GO) Blast2GO programı kullanılarak bir analiz yapıldı 3.33 – 3.35’de görüldüğü gibi grafikler elde edildi. Bu program BLASTx ile benzer olmakla birlikte tüm genlerin fonksiyonel, moleküler ve biyolojik fonksiyonlarını anotasyon şeklinde vermesi ile farklıdır [611, 612]. Şekil 3.32’de görüldüğü gibi kütüphane klonlarının en çok benzerlik gösterdiği bitkilerle ilgili bir grafik elde edilmiştir. Bu grafiğe göre 5 kütüphaneden elde edilen klonların en çok benzerlik gösterdiği bitki *Vitis vinifera*, BLASTn analizinde zeytinde daha önceden bulunan genlere olan benzerlik yüzdesine bakıldığında ise 0 – 25 arasındadır. Blast2GO analizinde kütüphane genlerinin biyoloji proseslerinin dağılımına bakıldığında, %1 hücresel bileşenlerin organizasyonu, %5 lokalizasyon, %1 reproduksiyon, %3 biyolojik düzenleme, %2 gelişimsel proste, %19 hücresel proste, %8 indüklenmeyi teşvik etmede, %4 hücre duvarı organizasyonunda, %1 hücresel organizasyon biyojenezinde, %20 metabolik proste, %5 transport, %6 translasyon, %3 RNA metabolik proste, %3 oksidasyon-redüksiyon prosesinde, %3 kimyasal indüklenmede, %4 küçük moleküllerin metabolik prosesinde, %3 metabolik prosesin düzenlenmesinde, %7 stres durumlarında, %2 çok hücreli organizmalardaki proste görev aldığı görülmektedir. Kütüphane klonlarının fonksiyonel proseslerinin dağılımına bakıldığında, klonların %22 organel, %10 makromoleküler kompleks, %28 hücre içi, %1 membran lümeni, %3 hücre dışı alan, %4 protein kompleksi, %5 ribozom, %4 endoplazmik retikulum, %4 kloroplast tilakoid membran, %4 sitosol, %7 hücrenin dış yüzeyi, %4 membran, %4 vakuol membran da bulunduğu tespit edilmiştir. Kütüphane klonların moleküler proseslerin dağılımına bakıldığında, %2 enzim düzenleyici aktivitesi, %28 bağlanma, %6 molekül aktivitesi, %3 taşıyıcı aktivitesi, %3 elektron taşıma aktivitesi, %15 katalitik aktivite, %4 hidrolaz aktivitesi, %6 ribozomun yapısal bileşenleri, %6 oksidoredüktaz aktivitesi, %4 nükleotit bağlama, %4 çinko iyonu bağlama, %7 protein bağlama, %4 demir iyonu bağlama, %8 nükleik asit bağlama da görev aldıkları görülmektedir. Bu şekilde bir çalışma zeytinde daha önce yaprak ve meyveden elde edilen cDNA kütüphanelerinde Özgentürk ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [390]. İki çalışma karşılaştırıldığında zeytin genomunda fonksiyonu bu iki çalışma ile tanımlanmış genlere ait ve zeytin genomuna ait pek çok yeni bilgi edinilmiştir.

Kütüphane klonlarından elde edilen cDNA sayısına Tablo 3.25’de görüldüğü gibi Temmuz “var” yılından 14, Temmuz “yok yılı” yılından 19, Kasım “var” yılından 20, Kasım “yok” yılından 12, meyve kütüphanesinden 11 tane elde edilmiştir. Bazı klonların örneğin sitokrom P450 monooksijenaz geni TY31 - 84 ve TV146 – 151 - 187 klonlarında bulunmuştur. TY51 - 55, KY32, MK51 numaralı klonlar ise zeytin kloroplast genomu fotosistem II bileşenlerindedir ve 3 ayrı dönemde tespit edilmiştir. KY14 – 36 - 85 ve MK46 – 55 - 57 numaralı klonlar IBR domain olup 2 farklı dönemde bulunmuştur. Ancak tüm kütüphanelerde ortak bulunan bir gen tespit edilmemiştir. Şimdiye kadar fonksiyonu bilinmeyen genler ise TY kütüphanesinde bulunmuştur. Tablo 3.26’da kütüphaneler arasında en çok benzerlik gösteren bitkilerin tek tek dağılımına bakıldığında, diğer kütüphanelerde *Arabidopsis thaliana*’ya benzeyen klonlar fazladır ancak TV yılında *Olea europaea* L. ve *Arabidopsis thaliana* eşit sayıdadır. Zeytin genomu henüz bilinmemekle birlikte NCBI kayıtlarından kütüphanelerde elde edilen klonların 6 tanesi zeytin ile direkt homoloji göstermiştir. Bunlara ilişkin bilgilerin verildiği Tablo 3.41’e göre, TV178, TV45, TY51, KY32, MK51, KV22 numaralı klonlardır. Bu genlerin genel özelliklerine bakıldığında ise daha çok fotosistem ve bazal metabolizma da rol alan genler olduğu görülmektedir.

Kütüphanelerden elde edilen klonların biyoinformatik analizinde, NCBI genbankasında BLASTn nin yanı sıra tBLASTx te EST (Expressed Sequence Tag) analizi de yapılmıştır. NCBI veritabanında ‘*Olea*’ yazıldığında 8303 adet EST kaydı çıkmaktadır (31.08.2012). Arama çubuğuna ‘*Gemlik*’ yazıldığında, Özgentürk ve arkadaşlarının elde ettiği 3734 tane ‘*Gemlik*’ zeytin çeşidine ait EST, ‘*Leccino*’ yazıldığında 1102 tane EST, ‘*Ayvalik*’ yazılığında 48 adet tez kapsamında elde edilen EST’ler görülmektedir. Elde edilen cDNA klonlarının EST analizi için NCBI veritabanında araştırma yapıldığında Şekil 3.56’da görüldüğü gibi %14 oranında henüz EST kaydı olmayan diziler bulunmuştur. Bu dizilerin fonksiyonları henüz tanımlanmamış anlamındadır. %32 oranında zeytinde homoloji gösteren EST kayıtları bulunmuştur. Çeşitli biyoinformatik analizler ile bu diziler hakkında bilgi edinebilecektir. Bu anlamda, zeytin genomuyla ilgili önemli bir gelişme sağlanacaktır. Bu analize benzer bir çalışma meşe ağacında yapılmıştır [613]. EST’lerden %54 lük bir kısım henüz zeytinde tespit edilmiştir ancak fonksiyonları

diğer bitkilerde (*Coffea canephora*, *Mimulus lewisii*, *Antirrhinum majus*, *Cajanus scarabaeoides*, *Actinidia chinensis*, *Puccinia striiformis*, *Triticum aestivum*) çalışılmıştır. Bunlardan bir kısmı Özgentürk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadakiler ile örtüşmektedir ancak farklılıklar bulunmaktadır. Onların yaptığı çalışma Gemlik zeytin çeşidinden sadece bir adet yaprak ve meyve örneğinden yapılmıştır. Bu çalışmada ise Temmuz ve Kasım ayları takiben “var – yok yılı” örneklerinden yapılmıştır. Bu tez kapsamında Tablo 3.14’de görüldüğü gibi TV dönemine ait 9 adet EST, Tablo 3.15’de görüldüğü gibi 12 adet EST, Tablo 3.16’da görüldüğü gibi KV dönemine ait 12 adet EST, Tablo 3.17’de görüldüğü gibi KY dönemine ait 8 adet EST, Tablo 3.18’de görüldüğü gibi 6 adet EST kaydı NCBI veritabanına verildi.

Kütüphanede elde edilen klonlara ait proteinlerin özelliklerini belirlemek için SOSUI analizi yapıldı. Bu analizde hydropathy profiline göre proteinin çözümler olup olmadığına ilişkin bilgiler elde edilmektedir. Buna göre pek çok klonun çözümler özellikte olduğu (TV111 -148, TV124 - 150, TV146 - 187, TV154 - 160, TV178, TV45, TV46, TV153, TY4, TY42 - 82, TY51 - 55, TY56 - 65, TY79, TY83, TY92, TY96, KV5 - 11, KV3 - 96, KV69 - 99, KV17 - 90, KV8, KV2, KV9, KV41, KV60, KV95, KY36 - 85, KY91 - 97, KY23, KY24, KY29, KY31, KY59, MK4 - 22, MK13 - 17, MK12 - 20, MK51, MK10) görüldü. Sadece TV126 (hrfl iç membran proteini), TY31 - 84 (P450), TY2 - 62 (yaralanma stres geni), KV22 (tRNA his geni), KV58 (Glikozil hidrolaz) numaralı klonların çözümler özellikleri farklıdır [614].

Dehidrin ismi ‘dehydration induced’ yani dehidrasyon koşullarında indüklenen anlamında kullanılmaktadır [615] ve dehidrinlerin en önemli özelliği, kaynama noktasında bile çözümler kalmalarıdır. Daha öncede anlatıldığı gibi yüksek derecelerde çözümler kalmalarında önemli olan yüksek oranda glisin içermeleri, hidrofilik olmaları, dönüşümlü aminoasit kompozisyonuna ve polar rezidülerine sahip olmalarıdır. İlk dehidrin dizisi elde edildiğinde, dehidrinlerin, sistein ve triptofan içermediği görülmüştür [138, 198, 245]. Genel olarak dehidrinin biyoinformatik özelliklerine bakıldığında dehidrin geni 878 nükleotid uzunluğunda, 194 aminoasitten oluşmaktadır. Dehidrinin antifriz özelliğinden dolayı Şekil 3.63’de

görüldüğü gibi glisin amino asitinin yüksek olması beklenen bir durumdur. Glisine göre daha az olan ancak diğer aminoasitlere göre fazla olan diğer aminoasitler ise tirozin, lizin, glutamin, histidindir, triptofan, sistein ve fenilalanin aminoasitleri ise bulunmamaktadır. Yüksek oranda yüklü ve apolar aminoasitler içermeleri dehidrin polipeptitlerinin hidropatik alanlarda son derece hidrofilik davranmasını sağlar. Bu polar yüklü aminoasit düzenine ilişkin çalışmalar, yüksek sıcaklıklarda çözünebilen dehidrinlerin özelliklerini açıklar. Bu karakteristik özelliklerinden dolayı, LEA proteinlerinin dehidrasyon koşullarında bitki hücrelerini korumada etkili olduğu tahmin edilmektedir [146, 163, 173].

Dehidrin antifriz özelliğine sahip bir proteindir ve bu özelliğinden dolayı hidrofilik olması beklenmektedir. Özellikle K segmentinin sınıf A amfipatik helikse benzemesinden dolayı su tutma kapasitesinde önemli bir fonksiyona sahiptir. Sınıf A amfipatik heliksler, negatif yüklü rezidülerin karşılarında hidrofobik yüz ile ve pozitif yüklü rezidüleri ile polar / non-polar ara yüzü polar ve non polar yüzlerinde bulundurmalarıyla ayrılırlar [293]. Bu nedenle dehidrin proteinin katlanmasına bağlı olarak hidrofilik / hidrofobik özelliği değişmektedir. Bitkilerde su eksikliğinde su tutma kapasitesi arttırarak, kristalleşmeyi önleyerek bitkilerin strese karşı tolerans göstermelerini sağlar. Membranla ilişkili dehidrinler ile ilgili öneriler ile dehidrinlerin biriktiği plazma membranları ya da membranca zengin alanların etrafındaki lipitler ve protein keselerini gösteren birçok immunolokalizasyon çalışmaları birbiriyle tutarlıdır [216, 357, 616, 617]. K segmenti hidrofilik ve hidrofobik rezidüleri zıt yüzeylerde düzenlenmiş A2 amfipatik α -heliks sınıfı formunda olduğu tahmin edilmektedir [618]. Amfipatik α -heliks membran ve proteinler ile ilişkili yapısal element olarak bilinmektedir [619].

Y_nSK_2 dehidrinleri: Dehidrinler içinde en bol bulunan sınıftır. Y segment miktarı 1 - 3 arasında değişir. 1 tane S, 2 tane K segmenti bulunur. Bunlar kuruma ve ABA (sadece soğuk derecelerde değil) ile indüklenir. Örneğin; buğday dehidrinleri, DHN1, DHN2, DHN3, DHN4, DHN6, DHN9, YSK₂ yapısını içerirler. Bu grup filizlerde, ABA uygulamasında dehidrasyon durumunda sentezleri artarken, hipotermia sırasında içerikleri değişmeden kalır [300]. Hiçbir stres koşulunda

vejetatif dokularda sentezlenmezken, gelişme aşamasındaki embriyolarda sentezlenen buğday DHN12 dehidrinide bu sınıfa aittir [301].

Dehidrasyona bağlı stresten sorumlu dehidrin fonksiyonunu K segmentinin esas olduğu farz edilmektedir [618, 620] ve K segmenti amfipatik α heliks formunda olabilir, biyokimyasal olarak önemli olan protein - protein ve protein - lipit etkileşimi için gereklidir [146, 619]. Dehidrinin segment analizine bakıldığında bu durum son derece önem kazanmaktadır ve Şekil 3.66'da görüldüğü gibi pek çok bitkide bu segment korunmuştur. Zeytin dehidrinini Y_2SK_2 dir ve *Arabidopsis thaliana* RAB18 (X68042) [621] de aynı segment özelliğindedir.

Şekil 3.66'da Kyte-Doolittle analizine göre de dehidrin geninin hidrofobik özelliğinin 1'in altında olduğu açıktır. Şekil 3.65'de görüldüğü gibi dehidrin geninin dehidrin superailisi ile homologdur ve biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen izoelektrik noktası 8.075 dir (Şekil 3.67). Daha önce de anlatıldığı gibi dehidrinler hücre içinde mitokondri, kloroplast gibi pek çok farklı yerde bulunmaktadır. Zeytinde de bu durum en genel anlamıyla hücre dışındadır.

Dehidrin geninin intron bölgesinin belirlenmesi için farklı gDNA izolasyon yöntemleri denendi Şekil 3.72'de görüldüğü gibi verim açısından bir farklılık görülmediği gibi ve Tablo 3.29'da görülen amplifikasyon primerleri ile yapılan PCR sonucunda da bir farklılık gözlenmedi. Bunu takiben zeytin cDNA ve gDNA örneklerinden yapılan PCR ürünlerinin jelde yürütülmesiyle Şekil 3.71'de görüldüğü gibi bantlar arasında beklenen büyüklük farklılığı görüldü. gDNA örneği 700 baz çifti büyüklüğünde bir bant verirken, cDNA örneği 600 baz çifti büyüklüğünde bir bant verdi. Bu örneklerin dizilenmesiyle net büyüklükleri elde edildi ve yapılan gDNA ile cDNA'nın multiple alignment analizinde dehidrin geninin 211 ve 329 luk bölgelerinde 118 baz çifti büyüklüğünde Şekil 3.72'de görüldüğü gibi intron bölgesi tespit edildi. Zeytin dehidrininin intron analizi de bu tez kapsamında yapılan pek çok çalışma gibi ilk defa belirlenmiştir.

Dehidrin geninin promotör analizi ile ilgili çalışmalar ilk olarak Cardiff üniversitesinde genome walker kiti ile yapıldı. Materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi deney basamakları yapıldı ancak Cardiff üniversitesindeki dizileme cihazındaki problemden dolayı örnekler dizilenemedi. Türkiye'ye getirilen PCR ürünleri ile TAIL PCR protokolü takip edilerek yapılan çalışmalarda AD2A primerleri ile yapılan TAIL PCR2 sonucunda yaklaşık olarak 1000 baz çifti büyüklüğünde Şekil 3.79'd görülen tek bant elde edildi. TAIL PCR ürününün dizilenmesi ile 264 baz çifti büyüklüğünde yeni bir bölge tespit edildi. Bu yeni bölgeden 5' ucuna doğru yeni primerlerin dizayn edildi ve yine aynı basamaklardan sonra Şekil 3.81'de görülen 1 ve 2 numaralı bantların dizilenmesi ile toplamda 699 baz çifti büyüklüğünde zeytin dehidrin promotör bölgesi tespit edildi. *Avicennia marina* bitkisine ait dehidrin promotör bölgesinin tespitinde de TAIL PCR kullanılmış ve 795 baz çifti büyüklüğünde bir bölge tespit edilmiştir [625]. Promotör analizi için kullanılan biyoinformatik araçlardan biri olan softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) programı ile zeytin dehidrin promotör bölgesi analiz edildi ve buna göre 578. nükleoitte başlayan TATA kutusu tespit edildi. *Avicennia marina* bitkisindeki çalışmaya benzer olarak zeytin dehidrin promotör bölgesinde DRE ve LTRE bağlanma bölgeleri, transkripsiyon başlama bölgesi TATA kutusu belirlendi. Zeytin dehidrin genine ait intron, promotör, segment verileri şekilde görüldüğü gibi toplu halde gösterilmiştir.

Zeytin dehidrin geninin genomdaki kopya sayısının belirlenmesi amacıyla Cardiff Üniversitesi'nde radyoaktif ve radyoaktif olmayan probalar ile Southern Blot deneyleri yapıldı. Ancak zeytin gDNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesiminden kaynaklanan problemden dolayı başarılı sonuç elde edilemedi. Literatürde bulunan ve nispeten yeni bir teknik olan gDNA örneği kullanılarak anlak gösterimli PCR'da genomik kopya sayısının belirlenmesi çalışmaları yapıldı. Burada asıl amaç kopya sayısı bilinen genlerin Ct değerleri ile kopya sayısı bilinmeyen genin Ct değerini karşılaştırmaya dayanmaktadır [626]. Beklendiği gibi, genom içinde kopya sayısı fazla olan örneğin Ct değeri daha düşük olacaktır. Son yıllara kadar Southern blot ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile gen kopya sayısının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ancak iki teknik için sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır. Örneğin Southern blot için çok fazla miktarda gDNA örneği gerekmektedir, uzun

zaman alır, FISH ise tek hücre seviyesinde kopya sayısını belirler ve kısmi gen delesyonlarının belirlenmesi için uygun değildir. Tüm bunların aksine anlık gösterimli PCR ile PCR sonrası herhangi bir uygulama olmadan, gayet hızlı, minimal miktarda gDNA örneğinin gerekli olduğu bir tekniktir [627]. Akciğer kanserli 51 hastada HER – 2 / neu [628], sitokrom P450 [629], *E. coli*'de rRNA [630] genlerinin kopya sayılarının belirlenmesi içinde bu teknik kullanılmıştır. Bu tez kapsamında anlık gösterimli PCR ile zeytin dehidrin gen kopya sayısı, tek kopyalı olduğu bilinen DGAT (GU357635) [431], LOX (EU678670) [430], Oep2lox2 (EU513352) [433], HPL (EUS13350) [432], çok kopyalı genler; Oep1lox2 (EU513353) [433], ubiquitin (AF429430.1) [435], GPDH (B2BGU9) [434], β -aktin (Q8GTL3) [436] genleriyle karşılaştırılarak bulundu. FAD2, FAD6 ve SAD genleride kullanıldı ancak bu 3 gen için başarılı sonuçlar elde edilemedi. Şekil 3.89'da görüldüğü gibi elde edilen Ct değerlerine göre çizilen grafiğe ve Şekil 3.90'da anlık gösterimli PCR'dan elde edilen orijinal grafikteki piklere bakıldığında dehidrin geninin tek kopyalı genlere daha yakın bir Ct değerine sahip olduğu ve buradan tek kopyalı olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır. *Capsicum annuum* bitkisinde yapılan çalışmalarda dehidrin geninin arpada olduğu gibi [299], 2 kopyalı olduğu [631] Arabidopsis genomunda ise çok kopyalı [239] olduğu, *Coffea canephora* bitkisinde [632] ve *Cichorium intybus* L. bitkisinde de tek kopyalı olduğu [633] tespit edilmiştir.

Dehidrin geninin 27 zeytin çeşidinde polimorfizminin belirlenmesi için çalışmalar materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı. 27 zeytin çeşidine ait PCR ürünlerinin dizilenmesiyle elde edilen sonuçlar çift taraflı okunduğu için her bir zeytin çeşidine ait en az 2 dehidrin dizi sonucu bulunmaktadır. Bu dizilerin tereddütsüz doğru olmaları son derece önemlidir. Bu nedenle, nükleotitlerin doğruluğu Finch Tv (Geospiza, Seattle, WA) ile kromatogramlara bakılarak tek tek kontrol edildi ve Bioedit [401] programı ile contigleri (ortak doğru dizileri) elde edildi. Bu çeşitler arasında Cormona, Memeli, Memecik, Hermandos, Hojiplanca, İzmir sofralık, Karamürsel Su, Verdial ve Tavşan yüreği çeşitlerinde 33 bazlık bir bölgede Şekil 3.118'de görüldüğü gibi bir delesyon tespit edildi. Bu bölgede meydana gelen delesyonun 9 çeşitte aynı bölgede görülmesi bu olayın tesadüfi olma olasılığını ortadan kaldırmaktadır. Buradaki amino asitlere bakıldığında, 'LMEVLAMEPP' lösin, metiyonin, glutamat, valin, alanin, prolin amino asitlerinden

oluştugu görülmektedir. Bu amino asitelerin genel özelliği, hidrofobik alan içermeleridir. Delesyon olan bölge ekzon bölgesinde bulunmaktadır ve çeşitlerin genel özelliklerine bakıldığında hemen hepsinin soğuğa ve kuraklığa dayanıklı olduğu görülmüştür [639, 640] 28 zeytin çeşidine ait dehidrin dizileri kullanılarak MEGA4 programı [437] ile Şekil 3.119'da görüldüğu gibi bir ağaç elde edildi. Benzer çalışma *Helianthus* [641], *Malus domestica* [642], ve *Cornus sericea* L. [643] bitkilerinde de yapılmıştır. Bu ağaçtan görüldüğu gibi dehidrin dizisi açısından çok büyük farklar içeren zeytin çeşitlerine karşın birbirinin tıpkısı diziler içeren çeşitler de çok sayıda bulunmaktadır. Dolayısıyla dehidrinin bir genetik belirteç olarak kullanılamayacağı anlaşılmalı beraber zeytin çeşitlerinin soğuğa karşı toleranları hakkında ipucu sağlama potansiyeli bulunduğu ve bu potansiyelin araştırmaya değer olduğu söylenebilir.

Dehidrin Kasım “var yılı” kütüphanesinde bulundu ancak bunu doğrulamak için anlık gösterimli PCR çalışmaları yapıldı. Bu amaç için dizayn edilen primerlerin herhangi bir lup oluşturulmadığına dair melting curve grafikleri Şekil 3.94'de görülmektedir ve Şekil 3.93'de dehidrin geninin original anlık gösterimli PCR görüntüleri görülmektedir. Burada da görüldüğu gibi dehidrinin anlık gösterimli PCR sonucunda pikler sorunsuz görülmektedir. Tüm anlık gösterimli PCR deneyleri 3 tekrarlı çalışıldı, ortalama Ct değerleri alınarak gpdh genine oranlayarak kopya sayısı grafikleri elde edildi. Dehidrin geninin Kasım “var - yok” yıllarında Temmuz “var - yok” yıllarına oranla daha fazla ekspres olduğu Şekil 3.95'de görülmektedir. Kasım aylarında ise özellikle “var” yılındaki ekspresyonu en fazladır. Buradan dehidrin geninin Kasım ayında soğuk stresine maruz kaldığı ve bu nedenle o dönemde total RNA'dan yapılan ve rRNA - tRNA genleriyle yarışabilecek kadar fazla olması bu genin ekspresyon oranının fazla olduğunu göstermektedir. Şeftali ksileminde ki dehidrini ile ilgili yapılan çalışmalarda 60 kDa'luk dehidrin proteinin özellikle Kasım ayında çok fazla bulunduğu ve Ocak ayına kadar bu artışın devam ettiğini, bahar aylarında ise azaldığı, Mayıs ayında ise hiç ekspres olmadığı immuno blot çalışmaları ile tespit edilmiştir [622]. Kayısı da yapılan çalışmalarda ise aynı şekilde Kasım, Ekim ve Aralık aylarında dehidrin protein seviyesinin fazla olduğu bulunmuştur [623]. 12 ayı takiben alınan yaprak RNA örneklerinden yapılan anlık gösterimli PCR çalışmalarda da Şekil 3.96'da görüldüğu gibi, “var” yılındaki

örneklerde Ocak, Şubat, Mart, Eylül, Ekim, Kasım ve Aralık aylarında ekspresyon seviyeleri diğer aylara oranla oldukça fazladır. Şekil 3.97’de “yok yılı” örneklerinden yapılan çalışmaya bakıldığında, aylar arasında bir dalgalanmanın olduğu Ocak, Mart, Mayıs, Eylül, Ekim ve Kasım aylarında ekspresyonun diğer aylara göre daha fazla olduğu şekilde görülmektedir. Bu iki periyot karşılaştırıldığında Eylül ve Kasım aylarında dehidrin ekspresyonunun fazla olduğu görülmektedir. Bu da literatürde belirtilen aylarla örtüşmektedir.

Dehidrin geninin özellikle geç embriyogenesis döneminde ekspre olduğu bilinmektedir [422, 624]. Zeytinde bu durumun tespit edilmesi amacıyla 8 farklı zeytin dokusundan total RNA izole edilerek anlık gösterimli PCR çalışması yapılarak Şekil 3.69’da görülen grafik elde edildi. Buna göre; zeytin dehidrin geni en fazla tomurcukda ekspre olmaktadır. Bu durum o dönemdeki çiçeğin gelişimi açısından önemlidir. Eğer bitki, tomurcuk döneminde strese girip çiçeğe dönüşemezde meyve oluşamayacak ve ürün miktarı azalacak ve periyodisiteye götürecektir ağacı. Ancak bu dönemde dehidrin geninin ekspre olmasıyla tomurcuk kurumayıp çiçeğe dönüşebilecek ve meyve oluşacaktır. Dehidrin gen seviyesi sürgün ve çiçeklerde eşit oranda bulunurken, pediselde ki oran çok az olmakla birlikte, olgun ve ham meyvede de miktar azdır. Yapraktaki oran ise tomurcuktan sonra en fazladır.

Dehidrin geninin kodladığı proteini karakterize etmek amacıyla 3 tane aracı vektör ile 3 farklı ekspresyon vektörüne klonlama çalışmaları yapıldı. Kasım “var” yılında elde edilen dehidrin geni pJET1.2 vektörüne klonlu halde bulunmaktadır. Ökaryotik klonlama vektörü olan *Pichia pastoris* pICZaB vektörü ile restriksiyon enzimleri uymadığı için aracı vektör olan pBluescript II KS(+/-) vektörüne cDNA’dan Tablo 3.29’da verilen primerler ile PCR yapıldı ve materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi çalışmalara devam edildi. Mayadan yapılan gDNA ile yapılan PCR sonucunda bant elde edilemedi ancak protein çalışmalarında devam edilerek metanol ile indüklendi ve SDS-PAGE’de örnekler yürütüldü. Ancak sonuç elde edilemedi Klonlama çalışmaları için pLATE51 klonlama vektörü ile devam edildi. Bu yeni çıkan sistem olup, ilk defa bizim tarafımızdan kullanılmıştır. pLATE51 vektörü için dehidrin geninin ORF bölgesini içerecek şekilde başlangıç

kodonundan itibaren 3' ucuna doğru ve sonlandırma kodonunu içerecek şekilde 5' ucuna doğru 40 nükleotitlik primerlere vektör bölgesini içeren dizide eklendi. Bu primerle yapılan PCR ürünü dehidrin bölgesini içeren primerler bağlandı, vektöre ait bölgeler serbest kaldı ve sonrasında vektör ile ligasyon basamağı olmadan direkt PCR ürünü T4 DNA polimeraz ile LIC klonlama basamağı yapıldı ve DH5 α kompetan hücrelerine transforme edildi. Bu ilk klonlamada 4 tane pozitif sonuç elde edildi ve bu örneklerin dizilenmesiyle dehidrin proteini için alt klonlama yapılmış oldu. Daha sonra *E. coli* kompetan suşları olan sırası ile *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* BL21 phlyss, *E. coli* BL21 codon (+) denendi. Dehidrin için en başarılı sonuç BL21 DE3 kompetan hücrelerinde elde edildi. 1 mM IPTG ile indüklenen proteinlerden indüklenme öncesi, 3 saat sonrası ve bir gece olmak şartıyla örnekleme yapıldı. Örneklerin liziz basamağında protamin sülfat eklemeyen önce ham ekstrakt, ekledikten sonraki supernatant ve pellet olmak üzere 3 ayrı örnek alındı. Bunun nedeni, zeytin dehidrin geninin çözülebilir bir protein olduğu tahmin edilmekle birlikte, bu durumun somut olarak kanıtlanmak istenmesidir. Kontrol grubu olarak kitin içinde bulunan kontrol plazmidi ve boş BL21DE3 kompetan hücresi rekombinant dehidrin proteini ile aynı şartlarda örnekleme yapıldı. Bu örneklerin SDS-PAGE jeline yüklemek için Lowry yöntemi ile miktar tayini yapıldı ve Şekil 3.108'de görülen grafikten bir formül elde edildi ve buna göre 30 ng / μ L olacak şekilde hesaplamalar tabloda görüldüğü gibi yapıldı ve SDS-PAGE jeline yüklendi. Ancak SDS-PAGE jeline dehidrin proteini şekilde görüldüğü gibi çok net bir bant vermedi. Total protein içindeki dehidrin oranı az olduğundan SDS-PAGE jeline net olarak ayrılmamış olduğu düşünüldü ve bunun için pLATE51 klonlama vektöründe bulunan His-Tag kuyruğuna uygun olan His-Tag antikoruna ile Western blot yapıldı. Biyoinformatik analizinde dehidrin proteininin moleküler ağırlığı 19.8 kDa olarak bulunmuştur. Western blot analizinde Şekil 3.111'de görüldüğü gibi 20 kDa civarında görülmektedir. Western blot sonucuna göre dehidrinin hidrofilik özelliğinden dolayı beklendiği gibi supernatantta bulunmaktadır. Ham ekstraktta da bulunmasının nedeni, dehidrinin bazı katlanmalarının hidrofobik bir protein oluşturacak şekilde gerçekleşiyor olması ihtimaliyle açıklanabilir. Keza bazı biyoinformatik yazılımları dehidrini membran proteini (çözünebilir olmayan) olarak tahmin etmektedir. 4 *Arabidopsis* dehidrininin, [LTI29, (SK₃); COR47, (SK₃); RAB18, (Y₂SK₂); LTI30, (K₆)], jel filtrasyonu ve moleküler ağırlığına bağlı ayırma metoduyla moleküler ağırlıkları analiz edilmiştir. Buna göre elde edilen moleküler

ağırlıklarının, aminoasit dizilerinden biyoinformatik veritabanları ile hesaplanan monomerik moleküler ağırlıklarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Jel filtrasyonu; şekil ve kütleden etkilendiği için jel filtrasyonu proteinin oligomerizasyonunun kanıtı için çok güvenilir özellikler taşımamaktadır. Gerçekte, *Arabidopsis* dehidrinleri, doğal formları ile karşılaştırıldığında denaturasyon koşulları altındaki moleküler ağırlığı daha düşüktür, buradan elde edilen sonuçlar ışığında dehidrinlerin oligomerik olmadığı da ileri sürülebilir [291].

Dehidrinin kryoprotektif aktivitesi ilk olarak şeftali bitkisinde çalışılmıştır [233]. Dehidrinlerin donmaya karşı hassas olan enzimlere karşı koruyucu etkisinin bulunduğu başka çalışmalardan da rapor edilmiştir [400, 634, 635]. *Citrus unshiu* CuCOR19 dehidrini ile yapılan çalışmalarda, donma inaktivasyonuna karşı laktat dehidrogenaz ve katalaz enzimlerine karşı koruyucu olduğu ve hatta sükröz, glisin betain, prolin ve BSA'dan daha etkili olduğu bulunmuştur [636]. Laktat dehidrogenaz enzimine karşı dehidrinin koruyucu mekanizması pek çok bitkide çalışılmıştır. Bu bitkiler; *Betula pubescens* [286], *Arabidopsis thaliana* [621], *Rhododendron catawbiense* [634], *Chlorella vulgaris* [637]. Bu çalışmada ilk olarak total protein ile LDH aktivite çalışmaları yapıldı ancak kontrol grubu ile çok önemli bir farklılık tespit edilemedi. Ni-NTA kolonundan geçirilen protein ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuç elde edildi. Ancak Şekil 3.112'de görüldüğü gibi bu durum çok net değildir. Ancak *Arabidopsis thaliana* RAB18 proteini ile yapılan çalışmalarda da belirgin bir farklılık tespit edilmemiştir [638]. RAB18 proteini de zeytin dehidrini ile aynı segment özelliğine ve yaklaşık olarak aynı moleküler ağırlığa sahiptir. Buradan bu sonucun zeytin için anlamlı olduğu düşünülmektedir. Dehidrinin LDH kryoprotektif mekanizması henüz çok iyi bilinmemektedir ancak Close [144] tarafından önerilen mekanizmada dehidrinin K segmentinin lipit bağlayıcı sınıf A amfipatik α -helikse benzerinden kaynaklanmaktadır. Bu element lipitler ile ya da kısmen denatüre olmuş LDH'nin hidrofobik parçalarını ile etkileşerek inaktivasyonu sağlar. Bu sonuçtan, polipeptid içindeki K segmentinin tekrar sayısı ile kryoprotektif özelliği arasında bir korelasyon olduğu beklenmektedir [144]. Dahası, kryoprotektif çalışmalar, donma / erime inaktivasyonuna karşı dehidrinlerin 3 ya da daha az K segmentinin gerekliliğini de göstermektedir. Dehidrinlerin in vitro kryoprotektif aktivitesinin fizyolojik önemi net değildir

ancak COR15a geninin *Arabidopsis thaliana*'daki konstitüf sentezinde iklime uymayan (non-acclimated) bitkilerin yapraklarından kloroplast ve protoplastlarının donmaya karşı toleransını etkilemektedir [328]. Wisniewski [288] şeftali dehidrininde antifriz aktivitesini laktat dehidrogenaz kullanarak donma / erime analizi yapmıştır ve bunu takiben şeftali dehidrasyona maruz kaldığı sırada dehidrinlerin protein denaturasyonunu önlediğine dair bilgiler edinmiştir. Ispanak COR85 [329], buğday WSC120 protein ailesi, mısır DHN1, buğday WSC120, çavdar-ve diğer tahıllarda [330, 331], yaban yasemini [332], şeftali PCA60, limon CuCor19 ve havuçta [333] antifriz proteinleri içerdiği rapor edilmiştir [138, 215, 273, 288, 320].

5. KAYNAKLAR

- [1] Zamora, R., Alaiz, M., and Hidalgo, F.J., "Influence of Cultivar and Fruit Ripening on Olive (*Olea Europaea*) Fruit Protein Content, Composition, and Antioxidant Activity.", *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4267-4270 (2001).
- [2] Angelopoulos, K., Dichio, B., and Xiloyannis, C., "Inhibition of Photosynthesis in Olive Trees (*Olea Europaea* L.) During Water Stress and Rewatering.", *J. Exp. Bot.*, 47: 1093-1100 (1996).
- [3] Selles, G., Ferreyra, R., Selles, Y., and Lemus, G., "Efecto De Diferentes Regimenes De Riego Sobre La Carga Frutal, Tamano De Fruta Y Rendimiento Del Olivo Cv. Sevillana.", *Agric. Tec. (Chile)*, 66: 48-56 (2006).
- [4] Benlloch, M., Arboleda, F., Barranco, D., and Fernandez, E.R., "Response of Young Olive Trees to Sodium and Boron Excess in Irrigation Water.", *Hortscience*, 26: 867-870 (1991).
- [5] Isidoro, D. and Aragues, R., "Modelling Survival of Young Olive Trees (*Olea Europaea* L. Cv. Arbequina) in Saline and Waterlogging Field Conditions.", *Agron. J.*, 98: 795-799 (2006).
- [6] Sanchez, J., "Lipid Photosynthesis in Olive Fruit", *Prog.Lipid.Res.*, 33: 97-104 (1994).
- [7] Principe, D.V., "Dünya Zeytin Ansiklopedisi", Madrid (İspanya). Uluslararası Zeytinyağı Kongresi (1997).
- [8] Tunalı, A., "Ege Yakası", *Aylık, Aktüel, Kültür ve Sanat Dergisi.*, 2(1): 18-19 (2008).
- [9] Duran, M., "Zeytin/Zeytinyağı Sektör Raporu", *Dış Ticaret Uygulama Servisi.*: (2006).
- [10] Tunalioglu, R., "Türkiye'de Zeytinyağı Pazarlamasında Gıda Güvenliği Ve Kalite Güvence Sistemlerinin Uygulanması Ve Gelişmelerin Değerlendirilmesi.", *Tarım Ekonomisi Dergisi.*, 81: 8 (2010).
- [11] Hartmann, H.T., Fedal, M.S., and Hackett, W.P., "Initiation of Flowering and Changes in Endogenous Inhibitors and Promoters in Olive Buds as a Result of Chilling.", *Physiol. Plant.*, 20: 746-759 (1967).
- [12] Gündüzoğlu, G., "Batı Anaolu'da Cbs Yöntemiyle (Zeytin Örneğinde) Doğal Ortam Analizi.", *3. Coğrafi Bilgi İşlemleri Bilişim Günleri.*: (2004).

- [13] Çavuşoğlu, A., "Ege Bölgesininin Belli Başlı Yerli Ve Yabancı Zeytin Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar", *Sonuç Raporu. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü. İzmir.:* (1980).
- [14] Öztürk, F., "Türkiye Ve Dünyada Zeytincilik Sektörünün Genel Görünüü.", *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir:* (2006).
- [15] Dıraman, H. and Yüksel, F., "Doğu Akdeniz Ve Ege Bölgeleri Natürel Zeytinyağlarında Oksidatif Stabilitate Ve Yağ Asidi Bileşenleri", *Zeytin Bilimi*, 1(1): 7-13 (2010).
- [16] Stutte, G.W. and Martin, G.C., "Effect of Killing Seed on Return Bloom of Olive.", *Scientia Hort.*, 29: 107-113 (1986).
- [17] Navarro, C., Fernandez-Escobar, R., and Benlloch, M., "Flower Bud Induction in "Manzanillo" Olive.", *Acta Hort.*, 286: 195-198 (1990).
- [18] Flahault, R., "L'olivier", *Ann. Ecole Nat. Agric. t. II. Montpellier:* (1886).
- [19] Morettini, A., "Olivicoltura", *Ramo Editorile Degli Agricoltori Roma:* (1972).
- [20] Zohary, D., "Centers of Diversity and Centers of Origin", Oxford (1973).
- [21] Zohary, D. and Spiegel-Roy, P., "Beginning of Fruit Growing in the Old World", *Science*, 187: 319-327 (1975).
- [22] Lavee, S., "Evolution of Cultivation Techniques in Olive Growing", *Olive oil quality:* 37-44 (1992).
- [23] Fontanazza, R. and Preziosi, P., "L'olive E Le Basse Temperature. Osservazioni Su 37 Cultivar Di Olio E 20 Cultivar Da Tavola", *L'Italia Agricola*, 106: 7-8 (1969).
- [24] Angelopoulos, K., Dichio, B., and Xiloyannis, C., "Inhibition of Photosynthesis in Olive Trees (*Olea Europaea* L.) During Water Stress and Rewatering.", *J. Exp. Bot.*, 47(301): 1093-1100 (1996).
- [25] Larcher, W., De Morales, J., and Bauer, H., eds. *Adaptive Responses of Leaf Water Potential, Co₂ Gas Exchange and Water Use Efficiency of Olea Europaea During Drying and Rewatering*. Components of Productivity of Mediterranean Climate Regions. Basic and Applied Aspects., ed. N.S. Margaris and H.A. Mooney. 1981, The Hague: W. Junk Publishers. 77-84.
- [26] Bonghi, G. and Long, S., "Light-Dependent Damage to Photosynthesis in Olive Leaves During Chilling and High Temperature Stress.", *Plant Cell Environ*, 10: 241-249 (1987).
- [27] Rallo, L. and Suarez, M.P., "Seasonal Distribution of Dry Matter within the Olive Fruit-Bearing Limb.", *Adv. Hort. Sci.*, 3: 55-59 (1989).

- [28] Ulger, S., Sonmez, S., Karkacier, M., Ertoy N., Akdesir, O., and Aksu, M., "Determination of Endogenous Hormones, Sugars and Mineral Nutrition Levels During the Induction, Initiation and Differentiation Stage and Their Effects on Flower Formation in Olive.", *Plant Growth Regul.*, 42: 89-95 (2004).
- [29] Goldschmidt, E.E., "Regulatory Aspects of Alternate Bearing in Fruit Trees.", *Italus Hortus*, 12: 11-17 (2005).
- [30] Monselise, S.P. and Goldschmidt, E.E., "Alternate Bearing in Fruit Tree.", *Hortic. Rev.*, 4: 129-173 (1982).
- [31] Crane, J.C. and Nelson, M.M., "Effects of Crop Load, Girdling and Auxin Application on Alternate Bearing of the Pistachio.", *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 97(3): 337-339 (1972).
- [32] Cuevas, J., Rallo, L., and Rapoport, H.F., "Crop Load Effects on Floral Quality in Olive.", *Scientia Hort.*, 59: 123-130 (1994).
- [33] Lopez Rivares, E.P. and PazSuarez Garcia, M., "Olive Tree Girdling: Optimum Timing and Widths.", *Olivae.*, 23: 38-41 (1990).
- [34] Tombesi, A., "Olive Fruit Growth and Metabolism", *Acta Horticulture*, 365: 225-232 (1994).
- [35] Hartmann, H.T., "Spray Thinning of Olives.", *Calif. Agric.*, 6: 7 (1952).
- [36] Lavee, S. and Spiegel-Roy, P., "The Effect of Time of Aslication of Two Growth Sunstances on the Thinning of Olive Fruit.", *Proc.Amer. Soc. Hort. Sci.*, 91: 180-185 (1967).
- [37] Suarez, M.P., Fernandez, E.R., and Rallo, L., "Competition among Fruits in Olive II. Influence of Inflorescence or Fruit Thinning and Cross-Pollination on Fruit Set Components and Crop Efficiency.", *Acta Hort.*, 149: 131-144 (1984).
- [38] Cuevas, J., Rallo, J., and Rapoport, H.F., "Crop Load Effects on Floral Quality in Olive.", *Scientia Hort.*, 59: 123-130 (1994).
- [39] Seyyed Nejad, M., Ebrahimzadeh, H., and Talaie, A., "Carbohydrate Content in Olive Zard C.V. And Alternate Bearing Pattern.", *Int. Sugar J.*, 103: 84-87 (2001).
- [40] Drobish, H.E., "Olive Thinning and Other Means of Increasing Size of Olives", *Universita della California, Berkeley*, 490: (1930).
- [41] Lavee, S. and Spiegel-Roy, P., "Spray Thinning of Olives with Growth Regulators", *Ktavim*, 9: 129-138 (1958).

- [42] Beede, R.H. and Goldhamer, D.A., *Olive Irrigation Management. In 'Olive Production Manual'*, L. Ferguson, G.S. Sibbett, and G.C. Martin, Editors. 1994, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, .Oakland, CA. Publications 3353.
- [43] Nejad, M.S. and Niroomand, A., "Carbohydrate Content and It's Roles in Alternate Bearing in Olive.", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(16): 2744-2747 (2007).
- [44] Lavee, S., "Biennial Bearing in Olive (*Olea Europaea*)", *ANNALES. Ser. hist. nat.*, 17: 101-112 (2007).
- [45] Rallo, I. and Fernandez, E.R., "Influence of Cultivar and Flower Thinning within the Inflorescence on Competition among Olive Fruits.", *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 110: 303-305 (1985).
- [46] Rallo, J. and Martin, G.C., "Relationship between Abnormal Embryo Sac Development and Fruitfulness in Olive.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106: 813-817 (1991).
- [47] Rallo, L., Torreno, P., Vargas, A., and Alvarado, J., "Dormancy and Alternate Bearing in Olive", *Acta Hort*, 356: 127-136 (1994).
- [48] Izadyar, A.B., Malakouti, M.J., Talaie, A.R., and Fallahi, E., "Biennial Bearing and Protein Content of Apples as Influenced by High Concentrations of Foliar Nitrogen and Sulfur", *Journal of Plant Nutrition*, 21(4): 649-653 (2008).
- [49] Wood, B.W., Conner, P.J., and Worley, R.E., eds. *Insight into Alternate Bearing of Pecan. Proc. Xxvi Ihc - Deciduous Fruit and Nut Trees.*, ed. A.D. Webster. Vol. 636. 2004, Acta Hort. 617-629.
- [50] Abdel Rahim, A.O.S., Elamin, O.M., and Bangerth, F.K., "Effects of Paclobutrazol (Pbz) on Floral Induction Adn Associated Hormonal and Metabolic Changes of Biennially Bearing Mango (*Mangifera Indica* L.) Cultivars During Off Year.", *Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(2): 55-67 (2011).
- [51] Munoz-Fambuena, N., Mesejo, C., Gonzalez-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Agusti, M., and Iglesias, D.J., "Fruit Regulates Seasonal Expression of Flowering Genes in Alternate Bearing 'Moncada' Mandarin.", *Annals of Botany*, 108: 511-519 (2011).
- [52] Brown, P.H., Weinbaum, S.A., and Picchioni, G.A., "Alternate Bearing Influences Annual Nutrient Consumption and the Total Nutrient Content of Mature Pistachio Trees.", *Trees*, 9: 158-164 (1995).
- [53] Crawley, M.J. and Long, C.R., "Alternate Bearing, Predator Satiation and Seedling Recruitment in *Qercus Robur* L.", *Journal of Ecology*, 83(4): (1995).

- [54] Pillay, A.E., Williams, J.R., El mardi, M.O., Hassan, S.M., and Al-Hamdi, A., "Monitoring of Cadmium in 'on' and 'Off' Date Palms", *Environmental International*, 28: 273-276 (2002).
- [55] Garner, L.C. and Lovatt, C.J., "The Relationship between Flower and Fruit Abscission and Alternate Bearing of 'Hass' Avocado.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 133(1): 3-10 (2008).
- [56] Monselise, S. and .., E.G., "Alternate Bearing in Fruit Trees.", *Hort. Rev.*, 4: 128-173 (1982).
- [57] Li, C.-Y., Weiss, D., and Goldschmidt, E.E., "Girdling Affects Carbohydrate-Related Gene Expression in Leaves, Bark and Roots of Alternate Bearing Citrus Trees.", *Annals of Botany*, 92: 137-143 (2003).
- [58] Vemmos, S.N. *Alternate Bearing and the Possible Role of Carbohydrates in Bud Abscission of Pistachio (Pistacia Vera L.)*. in *XIV GREMPA Meeting on Pistachio and Almonds*. 2010: Option Mediterraneennes.
- [59] Pillay, A.E., Willams, J.R., El Mardi, M.O., Hassan, S.M., and Al-Hamdi, A., "Boron and the Alternate-Bearing Phenomenon in the Date Palm (Phoenix Dactylifera)", *Journal of Arid Environmental*, 62: 199-207 (2005).
- [60] Stutte, G. and Martin, G.C., "Effect of Light Intensity and Carbohydrate Reserves on Flowering in Olive.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111: 27-31 (1986).
- [61] Priestley, C.A., "The Annual Turnover of Resources in Young Olive Trees", *J. Hort. Sci.*, 52: 105-112 (1977).
- [62] Hoad, G.V., "Hormonal Regulation of Fruit-Bud Formation in Fruit Trees.", *Acta Hort.*, 149: 13-23 (1984).
- [63] Mullins, M.G., ed. *Regulation of Flowering in the Grapevine (Vitis Vinifera L.)* Plant Growth Substances, ed. F. Skoog. 1980, Springer Verlag: New York.
- [64] Grochowska, M.J., "Studies on Natural Growth Regulators in Asle Trees in Relation to Biennial Bearing", *Bu. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.*, 11: 585-590 (1963).
- [65] Badr, S.A. and Hartmann, H.T., "Flowering Response of Olive (Olea Europaea L.) to Certain Growth Regulators Aslied under Inductive and Noninductive Enviroments", *Bot. Gaz.*, 133: 387-392 (1972).
- [66] Badr, S.A., Bradley, M.V., and Hartmann, H.T., "Effect of Gibberellic Acid and Indol Acetic Acid on Shoot and Xylem Differentiation and Development in Olive, Olea Europaea L.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 95: 431-431 (1970).

- [67] Lavee, S. and Haskal, A., "Partial Fruiting Regulation of Olive Trees (*Olea Europaea* L.) with Paclobutrazol and Gibberellic Acid in the Orchard.", *Adv. Hort. Sci.*, 7: 83-86 (1993).
- [68] Marcelle, R., "The Flowering Process and Its Control.", *Acta Hort.*, 149: 65-69 (1984).
- [69] Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Ouled, M., S., and Drira, N., "In Vitro Vegetative Growth and Flowering of Olive Tree in Response to Ga₃ Treatment.", *African Journal of Biotechnology.*, 5(22): 2097-2302 (2006).
- [70] Porlings, I.C. and Voyiatzis, D.G., "Influence of Paclobutrazol Plant Growth Regulator on Vegetative and Reproductive Growth of Olives. (*Olea Europaea* L.).", *Acta Hort.*, 179: 587-588 (1986).
- [71] Navarro, C., Fernandez-Escobar, R., and Benlloch, M., "A Low-Pressure, Trunk Injection Method for Introducing Chemical Formulation into Olive Trees.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117: 357-360 (1992).
- [72] Qrunfleh, M.M., "Free and Bound Abscisic Acid in Buds of Nabali Olive (*Olea Europaea* L.)", *Adv. Hort. Sci.*, 3(3): 99-101 (1989).
- [73] Proietti, P. and Tombesi, A., "Effects of Gibberellic Acid, Asparagine and Glutamine on Flower Bud Induction in Olive.", *J. Hort. Sci.*, 7(3): 383-388 (1996).
- [74] Al-Sdiefat, S.M. and Qrunfleh, M.M., "Alternate Bearing of the Olive (*Olea Europaea* L.) as Related to Endogenous Hormonal Content.", *Jordan Journal of Agricultural Sciences.*, 4(1): 12-26 (2008).
- [75] Zeevaart, J.A.D., ed. *Phytohormones and Flower Formation.* ed. G.a.H. Letham. Vol. 2. 1978, Elsevier-1: North-Holland.
- [76] Lavee, S. and Avidan, N., "Protein Content and Composition of Leaves and Shoot Bark in Relation to Alternate Bearing of Olive Trees (*Olea Europaea* L.).", *Acta Hort.*, 356: 143-147 (1994).
- [77] Stutte, G.W. and Martin, G.C., "Effect of Killing the Seed on Return Bloom of Olive.", *Scientia Hort.*, 29: 107-113 (1986).
- [78] Pinney, K. and Polito, V.S., "Flower Initiation in "Manzanillo" Olive. (Abstract).", *Acta Hort.*, 286: 203-205 (1990).
- [79] Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C., and Darnell, R., "Endo-, Para- and Eco- Dormancy: Physiological Terminology and Classification for Dormancy Research.", *Hortscience*, 22(3): 371-377 (1987).
- [80] Ferrara, E., Lorusso, G., and Lamparelli, F., "A Study of Floral Biology and the Technological Features of Seven Olive Cultivars of Different Origins.", *Acta Hort.*, 474: 279-283 (1999).

- [81] Fernandez-Escobar, R. and Benlloch, M., "The Time of Floral Induction in the Olive", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117(2): 304-307 (1992).
- [82] Lavee, S., "Involvement of Plant Growth Regulators and Endogenous Growth Substances in the Control of Alternate Bearing.", *Acta Hort.*, 239: 311-322 (1989).
- [83] Feucht, W. and Johal, C.S., "Effect of Chlorogenic Acid on the Growth of Excised Young Stem Segments of *Prunus Avium*.", *Acta Hort.*, 78: 109-114 (1977).
- [84] Lavee, S. and Avidan, N. *Growth Responses of Tree Callus to Chlorogenic Acid and Related Phenolic Substance.* in *Proc. 5th Cong. Plant Tissue and Cell Culture*,. 1982. Tokyo.
- [85] Kitsaki, C.K., Drossopoulos, J.B., and Trezis, S., "Endogenous Free Abscisic-Acid in Floral, Bark and Leaf Tissues of Olive During Anthesis and Early Fruit Development.", *Scientia Hort.*, 64: 95-102 (1995).
- [86] Monselise, S. and Goldschmidt, E.E., "Alternate Bearing Fruit Trees.", *Hort Reviews*, 4: 128-173 (1982).
- [87] Seyyednejad, M., Ebrahimzadeh, H., and Talaie, A., "Carbohydrate Content in Olive Zard Cv. And Alternate Bearing Pattern.", *Int. Sugar J.*, 103: 84-87 (2001).
- [88] Pritsa, T.S. and Voyiatzis, D.G., "Seasonal Changes in Poly Amine Content of Vegetative and Reproductive Olive Organs. In Relation to Floral Initiation, Anthesis, and Fruit Development.", *Aust. J. Agric. Res.*, 55: 1039-1046 (2004).
- [89] De la Rosa, R., Rallo, J., and Rapaport, H.F., "Olive Floral Bud Growth and Starch Content During Winter Rest and Spring Budbreak.", *HortScience.*, 35: 1223-1227 (2000).
- [90] Fernandez-Escobar, R., Moreno, R., and Garcia-Creus, M., "The Time of Floral Induction in the Olive.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117: 304-307 (1999).
- [91] Fernandez-Escobar, R., Moreno, R., and Sanchez-Zamora, M.A., "Nitrogen Dynamics in the Olive Bearing Shoot.", *HortScience.*, 39: 1406-1411 (2004).
- [92] Troncoso, A., Garcia, J.L., and Lavee, S., *Evaluation of the Present Information on the Mechanism Leading to Flower Bud Induction, Evocation and Differentiation.*, in *5th Int. Congress on olive growing*. 2006, Acta Hort: Turkey.
- [93] Fernandez-Escobar, R., Gómez-Vellador, G., and Rallo, J., "Influence of Pistil Extract and Temperature on in Vitro Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Olive Cultivars ", *J. Hort. Sci.*, 58: 219-227 (1992).

- [94] Ben-Tal, Y. and Wodner, M., "Girdling of Olive Trees, a Partial Solution to Biennial Bearing. II. Influence of Consecutive Mechanical Girdling on Flowering and Yield.", *Riv. Ortoflorofrutti. It.*, 68: 441-451 (1993).
- [95] Baktir, I., Ulger, S., and Himelrick, D.G., "Relationship of Seasonal Changes in Endogenous Plant Hormones and Alternate Bearing of Olive Trees.", *HortScience.*, 39: 987-990 (2004).
- [96] Lavee, S. and Avidan, N., "Possible Involvement of Chlorogenic Acid in Controlling Alternate Fruiting of the Olive.", *Proc. 13th Int. Bot. Cong.*, 62: (1981).
- [97] Lavee, S., Harshemesh, H., and Avidan, N., "Phenolic Acids Possible Involvement in Regulating Growth and Alternate Fruiting in Olive Trees.", *Acta Hort.*, 179: 317-328 (1986).
- [98] Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovch, M., and Robards, K., "Quantitative Changes in Phenolic Content During Physiological Development of the Olive (*Olea Europaea*) Cultivar Hardy's Mammoth.", *Int. J. Food Chem.*, 51: 2532-2538 (2003).
- [99] Morettini, A., ed. *Olivicoltura*. 1950, First Ramo Editoriale degli Agricoltori: Rome.
- [100] Hartmann, H.T., "Time of Floral Differentiation of the Olive in California", *Bot. Gaz.*, 112: 323-327 (1951).
- [101] Hartmann, H.T. and Prolingis, I., "Effect of Different Amounts of Winter-Chilling on Fruitfulness of Several Olive Varieties.", *Bot. Gaz.*, 119: 102-104 (1957).
- [102] Ebrahimzadeh, H., Seyyednejad, M., and Talaie, A., "Carbohydrate Changes in Olive During Fruit Ripening.", *Pak. J. Bot.*, 32: 121-129 (2000).
- [103] Nergiz, C. and Engez, Y., "Composition Variation of Olive Fruit During Ripening.", *Food Chem.*, 69: 55 (2000).
- [104] Lavee, S.H., "Olive.", *CRC Hand Book of Fruit Set and Development*: 261-274 (1988).
- [105] Rinaldi, L.M.R., Menabeni, D., Lambardi, M., and Cimato, A., "Changes of Carbohydrates in Olive Seeds (*Olea Europaea* L.) During Fruit Maturation, Their Correlation with Germination.", *Acta Hort.*, 336: 58-60 (1994).
- [106] Seyyed Nejad, M. and Niroomand, A., "Carbohydrate Content and Its Roles in Alternate Bearing in Olive.", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(16): 2744-2747 (2007).
- [107] Fernandez-Diez, M.S., ed. *The Olive. Biochemistry of Fruits and Their Products.*, ed. A.C. Hulme. 1971, Academic Press.: London. 255-279.

- [108] Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B., and De Angelis, M., "Sugar and Polyol Composition of Some European Olive Fruit Varieties (*Olea Europaea* L.)", *Food Chem.*, 72: 485-490 (2001).
- [109] Villemur, P., "Olives:Alternate Bearing.", *Plant Anal. (An interpretation manuel. Inkata.press.Melbourne.Sydney)*: 218 (1987).
- [110] Simirnoff, N., "Enviromental and Plant Metabolism. Environ. Flexibility and Acclimation Oxford.", *Bios Scinetific Publisher*, (199-211): (1995).
- [111] Wonder, M. and Lavee, S., "Identification and Seasonal Changes of Glucose Fructose and Mannitol in Relation to Oil Accumulation During Fruit Development in *Olea Europaea* L.", *Scientia Hort.*, 36: 47-54 (1988).
- [112] Drossopoulos, J.B. and Niavis, C.A., "Seasonal Changes of the Metabolites in the Leaves, Bark and Xylem Tissues of Olive Tree (*Olea Europaea* L.)", *Annual. Bot.*, 62: 321-327 (1988).
- [113] Hackett, W. and Hartmann, H.T., "Inflorescence Formation in Olive as Influenced by Low Temperaturei Photoperiod, and Leaf Area.", *Bot. Gaz.*, 125: 65-72 (1964).
- [114] Erez, A. and Lavee, S., "Prunin Identification, Biological Activity and Quantitative Change in Comparison to Naringenin in Dormant Peach Buds.", *Plant Pysiol.*, 44: 342-346 (1969).
- [115] Bonghi, G., "Oleuropein; an *Olea Euroapae* Secoiridoid Biologically Active on Growth Regulation.", *Acta Hortic.*, 178: 245-249 (1986).
- [116] Epstein, E., Avidan, N., and Lavee, S., "Quantitation of Chlorogenic Acid in Plants by Hplc", *Hort Science*, 22: 1158- (1987).
- [117] Lavee, S. and Avidan, N., "Protein Content and Composition of Leaves and Shoot Bark in Relation to Alternate Bearing of Olive Trees (*Olea Europaea* L.)", *Acra Hortic.*, 356: 143-147 (1994).
- [118] Ryugo, K., "Fruit Culture, Its Science and Art.", *Wiley and Sons, London*: (1988).
- [119] Jackson, J.E. and Blasco, A.B., "Effect of Rootstock and Crop Load on Fruit Size and Quality of Cox's Orange Pippin and Worcester Permain.", *Report of the East Malling Research Station for 1974*, 45: (1975).
- [120] Testolin, R., "Kiwifruit Yield Efficiency, Plant Density, and Bud Number Per Surface Unit.", *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 115: 704-707 (1990).
- [121] Wolpert, J.A., Howell, G.S., and Mansfield, T.K., "Sampling Vidal Blanc Grapes. Effect of Training System, Pruning Severity, Shoot Exposure, Shoot

Origin and Cluster Thinning on Cluster Weight and Fruit Quality", *American Journal of Enology and Viticulture*, 34: 72-76 (1983).

- [122] Ben Tal, Y. and Lavee, S.H., "Girdling Olive Trees: A Partial Solution to Biennial Bearing. The Influence of Consecutive Mechanical Girdling on Flowering and Yield.", *Rivista Ortoflorofrutticoltura Italiana.*, 68: 441-452 (1984).
- [123] Baratta, B., Caruso, T., and Inglese, P., "Urea as Thinning Agent in Olive : The Influence of Concentration and Time of Application.", *Journal of Horticultural Science.*, 67(219-224): (1992).
- [124] Barone, E., Gullo, G., Zarria, R., and Inglese, P., "Effect of Crop Load Fruit Ripening and Olive Oil (*Olea Europaea* L.) Quality.", *Journal of Horticultural Science.*, 69: 67-73 (1994).
- [125] Caruso, T., Giovannini, D., and Marra, F.P., "Diradamento Della Cultivar "Maravilha" Sottopsta a Semiforzatura.", *Colture Protette.*, 4: 78-92 (1991).
- [126] Eynard, I. and Dalmasso, G., "Viticultura Moderna.", *HOEPLI, Milano. Italy:* (1990).
- [127] Singh, R.P., Tandon, V., Sharma, N., and Singh, J.M., "Irregular Bearing Behavior of Olives- Role of Different Weather Components.", *Acta Hort*, 474: 285-288 (1999).
- [128] Hackett, W.P. and Hartmann, H.T., "The Influence of Temperature on Floral Initiation in the Olive.", *Plant Physiol.*, 20: 430-436 (1967).
- [129] Singh, R.P., Sharma, N., and Tandon, V., "Effect of Pre-Bloom Temperature and Rainfall on Growth, Yield and Productivity of Olive", *Acta Hort*, 474: 309-311 (1999).
- [130] Dimassi, K., Therios, I., and Balatsos, A., "The Blooming Period and Self-Fruitfulness in Twelve Greek and Three Foreign Olive Cultivars.", *Acta Hort*, 474: 275-278 (1999).
- [131] Proietti, P. and Tombesi, A., "Translocation of Assimilates and Source - Sink Influence on Productive Characteristics of the Olive Tree", *Acta Hort*, 10: 11-14 (1996).
- [132] Hartmann, H.T., "Growth of the Olive Fruit.", *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 54: 86-94 (1949).
- [133] Shulman, Y. and Lavee, S., "Fruit Development and Maturation as Effected by Treatments of Auxin.", *Riv. Ortoflorofrutti. It.*, 63: 31-40 (1979).
- [134] Lavee, S. and Wodner, M., "The Effect of Yield, Harvest Time and Fruit Size on the Oil Content in Fruits of Irrigated Olive Trees (*Olea Europaea*), Cvs. Barnea and Manzanillo.", *Sci Hortic*, 99: 267-277 (2004).

- [135] Martin, G.C., Lavee, S., Sibbett, G.C., Nishijima, C., and Carlson, S.P., "A New Approach to Thinning Olives.", *Calif. Agric.*, 34: 7-8 (1980).
- [136] Lavee, S., Haskal, A., and Ben-Tal, Y., "Girdling Olive Trees, a Partial Solution to Biennial Bearing. I. Methods, Timing and Direct Tree Response", *J. Hort. Sci.*, 58: 209-218 (1983).
- [137] Ben-Tal, Y. and Lavee, S., "Girdling Olive Trees, a Partial Solution to Biennial Bearing. II. Influence of Consecutive Mechanical Girdling on Flowering and Yield.", *Riv. Ortoflorofrutt. It.*, 68: 441-451 (1984).
- [138] Close, T.J., "Dehydrins: Emergence of a Biochemical Role of a Family of Plant Dehydration Proteins", *Physiol Plant*, 96: 795-803 (1996).
- [139] Bray, E.A., "Molecular Response to Water Deficit.", *Plant Physiol*, 103: 1035-1040 (1993).
- [140] Bray, E.A., "Classification of Genes Differentially Expressed During Water-Deficit Stress in Arabidopsis Thaliana: An Analysis Using Microarray and Differential Expression. ", *Ann Bot.*, 89: 803-811 (2002).
- [141] Ingram, J. and Bartels, D., "The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants", *Annu Rev Plant Mol Biol* 47: 377-403 (1996).
- [142] Shinozaki, K. and Shinozaki, K.Y., "Molecular Responses to Dehydration and Low Temperature: Differences and Cross-Talk between Two Stress Signalling Pathways", *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 217-223 (2000).
- [143] Kim, H.S., Lee, J.H., Kim, J.J., Kim, C.H., Jun, S.S., and Hong, Y.N., "Molecular and Functional Characterization of Calea6, the Gene for a Hydrophobic Lea Protein from Capsicum Annuum", *Gene*, 344: 115-123 (2005).
- [144] Close, T.J., "Dehydrins: A Commonality in the Response of Plants to Dehydration and Low Temperature", *Physiol Plant*, 100: 291-296 (1997).
- [145] Campbell, S.A. and Close, T.J., "Dehydrins: Genes, Proteins and Associations with Phenotypic Traits.", *New Phytol* 137 61-74 (1997).
- [146] Dure, L.I., ed. *Structural Motifs in Lea Proteins of Higher Plants*. Response of Plants to Cellular Dehydration During Environmental Stress, ed. T.J. Close and E.A. Bray. 1993, American Society of Plant Physiologists, Rockville, TN. 91-103.
- [147] Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R., "Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. ", *Critical Reviews in Plant Sciences.*, 16: 253-277 (1997).
- [148] Cuming, A.C., ed. *Lea Proteins. . Seed Proteins.*, ed. P.R. Shewry and R. Casey. 1999, Kluwer: Dordrecht, The Netherlands. 753-780.

- [149] Dure, L.I., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z.R., "Common Amino Acid Sequence Domains among the Lea Proteins of Higher Plants.", *Plant Molecular Biology*, 12: 475-486 (1989).
- [150] Baker, J., Steele, C., and Dure, L.I., "Sequence and Characterization of 6 Lea Proteins and Their Genes from Cotton.", *Plant Mol. Biol.*, 11: 277-291 (1988).
- [151] Dure, L.I., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z.R., "Common Amino Acid Sequence Domains among the Lea Proteins of Higher Plants.", *Plant Mol. Biol.*, 12: 475-486 (1989).
- [152] Hughes, D.W. and Galau, G.A., "Temporally Modular Basis of Dehydration Tolerance in Plants.", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 377-403 (1989).
- [153] Battista, J.R., Park, M.J., and McLemore, A.E., "Inactivation of Two Homologues of Proteins Presumed to Be Involved in the Desiccation Tolerance of Plants Sensitizes *Deinococcus Radiodurans* R1 to Desiccation.", *43*, (133-139): (2001).
- [154] Stacy, R.A.P. and Aalen, R.B., "Identification of Sequence Homology between the Internal Hydrophilic Repeated Motifs of Group I Late-Embryogenesis-Abundant Proteins in Plants and Hydrophilic Repeats of the General Stress Protein Gsib of *Bacillus Subtilis*.", *Planta J.*, 206(476-478): (1998).
- [155] Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A., and Okuda, T., "Dehydration-Induced Expression of Lea Proteins in an Anhydrobiotic Chironomid.", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 348: 56-61 (2006).
- [156] Hand, S.C., Jones, D., Menze, M.A., and Witt, T.L., "Life without Water: Expression of Plant Lea Genes by an Anhydrobiotic Arthropod.", *J. Exp. Zool.*, 307A: 62-66 (2007).
- [157] Browne, J., Tunnacliffe, A., and Burnell, A., "Plant Desiccation Gene Found in a Nematode.", *Nature*, 416: 38 (2002).
- [158] Gal, T.Z., Glazer, I., and Koltai, H., "Differential Gene Expression During Desiccation Stress in the Insect-Killing Nematode *Steinernema Feltiae* Is-6", *J. Parasitol.*, 89: 761-766 (2003).
- [159] Gal, T.Z., Glazer, I., and Koltai, H., "An Lea Group 3 Family Member Is Involved in Survival of *C. Elegans* During Exposure to Stress.", *FEBS Lett.*, 577: 21-26 (2004).

- [160] Pouchkina-Stantcheva, N.N., McGee, B.M., Boschetti, C., Tolleter, D., Chakrabortee, S., Popova, A.V., Meersman, F., Macherel, D., Hincha, D.K., and Tunnacliffe, A., "Functional Divergence of Former Alleles in an Ancient Asexual Invertebrate.", *Science*, 318: 268-271 (2007).
- [161] Tunnacliffe, A., Lapinski, J., and McGee, B., "A Putative Lea Protein, but No Trehalose, Is Present in Anhydrobiotic Bdelloid Rotifers.", *Hydrobiologia.*, 546: 315-321 (2005).
- [162] Close, T.J. and Lammers, P.J., "An Osmotic Stress Protein of Cyanobacteria Is Immunologically Related to Plant Dehydrins.", *Plant Physiol*, 101: 773-779 (1993).
- [163] Baker, J., Steele, C., and Dure, L.I., "Sequence and Characterization of 6 Lea Proteins and Their Genes from Cotton.", *Plant Mol Biol*, 11: 277-291 (1988).
- [164] Dure III, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.-H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T., and Sung, Z.R., "Common Amino Acid Sequence Domains among the Lea Proteins of Higher Plants.", *Plant Molecular Biology*, 12: 475-486 (1989).
- [165] Hughes, M.A. and Galau, G.A., "Temporally Modular Gene Expression During Cotyledon Development. ", *Genes Dev.*, 3: 358-369 (1989).
- [166] Hughes, D., W., and Gaiou, G., A. , "Temporally Modular Gene Expression During Cotyledon Development," *Genes Dev.*, 3: 358-369 (1989).
- [167] Dure III, L., Greenway, S.C., and Galau, G.A., "Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis.", *Biochem J.*, 20(41): 162-168 (1981).
- [168] Thomashow, M.F., "Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms.", *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 50: 571-599 (1999).
- [169] Mundy, J. and Chua, N.-H., "Abscisic Acid and Water-Stress Induce the Expression of a Novel Rice Gene.", *EMBO J.*, 7: 2279-2286 (1988).
- [170] McCubbin, W.D., Kay, C.M., and Lane, B.G., "Hydrodynamic and Optical Properties of the Wheat Germ Em Protein.", *J. Biochem Cell Biol.*, 63: 803-811 (1985).
- [171] Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., and Randall, S.K., "The Calcium-Binding Activity of a Vacuole-Associated, Dehydrin-Like Protein Is Regulated by Phosphorylation¹", *Plant Physiol*, 130: 675-687 (2002).

- [172] Koag, M.C., Fenton, R.D., Wilkens, S., and Close, T.J., "The Binding of Maize Dhn1 to Lipid Vesicles. Gain of Structure and Lipid Specificity", *Plant Physiol*, 131: 309-316 (2003).
- [173] Bray, E.A., "Molecular Response to Water Deficit.", *Plant Physiol.*, 103: 1035-1040 (1993).
- [174] Bray, E.A., "Molecular Responses to Water Deficit.", *Plant Physiol.*, 103: 1035-1040 (1993).
- [175] Ingram, J. and Bartels, D., "The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants.", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* , 47: 377-403 (1996).
- [176] Bray, E.A., ed. *Response to Abiotic Stresses*. Biochemistry and Molecular Biology of Plants., ed. R.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones. 2000, The American Society of Plant Physiologists.: Rockville. 1158-1203.
- [177] Dure, L.I., ed. *Structural Motifs in Lea Proteins of Higher Plants*. Response of Plants to Cellular Dehydration During Environmental Stress., ed. T.J. Close and E.A. Bray. 1993, American Society of Plant Physiologist.: Rockville, Maryland, USA. 91-103.
- [178] Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., and DeMason, D.A., "Dehydrin: The Protein.", *See Ref.*, 18a: 104-118 (1993).
- [179] Dure, L.I., "A Repeating 11-Mer Amino Acid Motif and Plant Desiccation.", *Plant J.*, 3(3): 363-369 (1993).
- [180] Godoy, A., Jensen, A.B., Culianez-Macia, F.A., Alba, M.M., and Figueras, M., "The Maize Abscisic Acid-Responsive Protein Rab17 Is Located in the Nucleus and Interacts with Nuclear Localization Signals.", *Plant Cell*, 6: 351-360 (1994).
- [181] Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L., and Dure, L.I., "Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos.", *Plant Cell*, 5: 769-780 (1993).
- [182] Kyte, J. and Doolittle, R.F., "A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein.", *Journal of Molecular Biology*, 157: 105-132 (1982).
- [183] Dure, L.I., "A Repeating 11-Mer Amino Acid Motif and Plant Desiccation.", *Plant J.*, 3: 363-369 (1993).
- [184] Wise, M.J., "Leaping to Conclusions: A Computational Reanalysis of Late Embryogenesis Abundant Proteins and Their Possible Roles.", *BMC Bioinform.*, 4: 52 (2003).

- [185] Galau, G.A., Hughes, D.W., and Dure III, L., "Abscisic Acid Induction of Cloned Cotton Late Embryogenesis-Abundant (Lea) Mrnas.", *Plant Mol Biol*, 7: 155-170 (1986).
- [186] Hughes, D.W. and Galau, G.A., "Developmental and Environmental Induction of Lea and Leaa Mrnas and the Postabscission Program During Embryo Culture", *Plant Cell*, 3: 605-618 (1991).
- [187] Bies-Ethe, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., and Delseny, M., "Inventory, Evolution and Expression Profiling Diversity of the Lea (Late Embryogenesis Abundant) Protein Gene Family in Arabidopsis Thaliana", *Plant Mol Biol*, 67: 107-124 (2008).
- [188] Cuming, A.C., "Lea Proteins. In Pr Shewry, R Casey, Eds, Seed Proteins.", Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers. p. 753-780 (1999).
- [189] Bray, E.A., ed. *Alteration in Gene Expression in Response to Water Deficit*. . In ' Stress-Induced Gene Expression in Plants', ed. A.S. Basra. 1994, Harwood Academic Publishers, USA. 1-23.
- [190] Wise, M.J., "The Popp: Clustering and Searching Using Peptide Probability Profiles.", *Bioinformatics*, 18(1): 38-45 (2002).
- [191] Wise, M.J. and Tunnacliffe, A., "Popp the Question: What Do Lea Proteins Do?", *Trends Plant Sci*, 9(1): 13-18 (2004).
- [192] Cuming, A.C., "Developmental Regulation of Gene Expression in Wheat Embryos. Molecular Cloning of a DNA Sequence Encoding the Early-Methionine-Labelled (Em) Polypeptide.", *European Journal of Biochemistry*, 145: 351-357 (1984).
- [193] Cuming, A.C. and Lane, B.G., "Protein Synthesis in Imbibing Wheat Embryos.", *European Journal of Biochemistry*, 99: 217-224 (1979).
- [194] Litts, J.C., Colwell, G.W., Chakerian, R.L., and Quatrano, R.S., "The Nuclotide Sequence of a Cdna Clone Encoding the Wheat Em Protein.", *Nucleic Acids Res.*, 15: 3607-3618 (1987).
- [195] Espelund, M., De Bebout, J.A., Outlaw, W.H., and Jr. and Jacobsen, K.S., "Enviromental and Hormonal Regulation of Barley Late-Embriyogenesis-Abundant (Lea) Mrnas Is Via Different Signal Transduction Pathways.", *Plant Cell and Enviroment*, 18: 943-949 (1995).
- [196] Gaubier, P., Raynal, M., Hull G., Huestis, G.M., Grellet, F., Arenas, C., Pages, M., and Delseny, M., "Two Different Em-Like Genes Are Expressed in Arabidopsis Thaliana Seeds During Maturation.", *Molecular and General Genetics*, 238: 409-418 (1993).

- [197] Shih, M., Hoekstra, F.A., and Hsing, Y.C., "Late Embryogenesis Abundant Proteins.", *Advances in Botanical Research*, 48: 212-240 (2008).
- [198] Close, T.J., Kortt, A.A., and Chandler, P.M., "A Cdna-Based Comparison of Dehydration-Induced Protein (Dehydrins) in Barley and Corn.", *Plant Mol Biol*, 13: 95-108 (1989).
- [199] Gilmour, S.J., Artus, N.N., and Thomashow, M.F., "Cdna Sequence Analysis and Expression of Two Cold-Regulated Genes of Arabidopsis Thaliana.", *Plant Molecular Biology*, 18: 13-21 (1992).
- [200] Rorat, T., "Plant Dehydrins-Tissue Location, Structure and Function", *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11: 536-556 (2006).
- [201] Velten, J. and Oliver, M.J., "Tr288, a Rehydrin with a Dehydrin Twist", *Plant Molecular Biology*, 45: 713-722 (2001).
- [202] Wisniewski, M., Close, T.J., Artlip, T.S., and Arora, R., "Seasonal Patterns of Dehydrins and 70 Kda Heat Shock Proteins in Bark Tissues of Eight Species of Woody Plants.", *Plant Physiol*, 96: 496-505 (1996).
- [203] Abba', S., Ghignone, S., and Bonfante, P., "A Dehydration-Inducible Gene in the Truffle Tuber Borchii Identifies a Novel Group Pf Dehydrins.", *BMC Genomics*, 7: 39 (2006).
- [204] Saavedra, L., Svenson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., and Vidal, S., "A Dehydrin Gene in Physcomitrella Patens Is Required for Salt and Osmotic Stress Tolerance.", *Plant J.*, 45: 237-249 (2006).
- [205] Tunnacliffe, A. and Wise, M.J., "The Continuing Conundrum of the Lea Proteins.", *Naturwissenschaften*, 94: 791-812 (2007).
- [206] Cohen, A., Plant, A.L., Moses, M.S., and Bray, E.A., "Organ-Specific and Environmentally Regulated Expression of Two Abscisic Acid-Induced Genes in Tomato.", *Plant Physiol.*, 97: 1367-1374 (1991).
- [207] Kahn, T.L., Fender, S.E., Bray, E., and O'Connell, M.A., "Characterization of Expression of Drought and Abscisic Acid Regulated Tomato Genes in the Drought Resistant Species Lycopersicon Pennellii.", *Plant Physiol*, 103: 597-605 (1993).
- [208] Almoguera, C. and Jordano, J., "Developmental and Environmental Concurrent Expression of Sunflower Dry-Seed-Stored Low-Molecular-Weight Heat-Shock Protein and Lea Mrnas.", *Plant Mol Biol*, 19: 781-792 (1992).
- [209] Chen, Z.Y., Hsing, Y.I.C., Lee, P.F., and Chow, T.Y., "Nucleotide Sequences of a Soybean Cdna Encoding an 18 Kilodalton Late Embryogenesis Abundant Protein.", *Plant Physiol*, 99: 773-774 (1992).

- [210] Shih, M.D., Lin, S.C., Hsieh, J.S., Tsou, C.H., Chow, T.Y., Lin, T.P., and Hsing, Y.I.C., "Gene Cloning and Characterization of a Soybean (*Glycine Max* L.) Lea Protein, Gmpm16.", *Plant Mol Biol*, 56: 689-703 (2004).
- [211] Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J., "Regulation of Gene Expression Programs During Arabidopsis Seed Development: Roles of the Ab13 Locus and of Endogenous Abscisic Acid.", *Plant Cell*, 6: 1567-1582 (1994).
- [212] Colmenero-Flores, J.M., Moreno, J., Smith, C.E., and Covarrubias, A.A., "Pvlea-18, a Member of a New Late Embryogenesis Abundant Protein Family That Accumulates During Water Stress and in the Growing Regions of Well-Irrigated Bean Seedlings.", *Plant Physiol*, 120: 93-104 (1999).
- [213] Galau, G.A., Wang, H.-Y.C., and Hughes, D., W., "Cotton Lea5 and Lea14 Encode Atypical Late Embryogenesis-Abundant Proteins.", *Plant Physiol*, 101: 695-696 (1993).
- [214] Close, T.J., Fenton, R.D., Yang, A., Asghar, R., DeMeson, D.A., Crone, D.E., Meyer, N.C., and Moonan, F., eds. *Dehydrin: The Protein in Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*. ed. T.J. Close and E.A. Bray. 1993, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 104-118.
- [215] Kazuoka, T. and Odeda, K., "Purification and Characterization of Cor85-Oligomeric Complex from Cold-Acclimated Spinach", *Plant Cell Physiol*, 35: 601-611 (1994).
- [216] Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., and Sarhan, F., "Accumulation of an Acidic Dehydrin in the Vicinity of the Plasma Membrane During Cold Acclimation of Wheat", *The Plant Cell*, 10: 623-638 (1998).
- [217] Moons, A., De Keyser, A., and Van Montagu, M., "A Group 3 Lea Cdna of Rice, Responsive to Abscisic Acid, but Not to Jasmonic Acid, Shows Variety-Specific Differences in Salt Stress Response.", *Gene*, 191: 197-204 (1997).
- [218] Tunnacliffe, A. and Wise, M.J., "The Continuing Conundrum of the Lea Proteins.", *Naturwissenschaften*, 94: 791-812 (2007).
- [219] Alsheikh, M.K., Svensson, J.T., and Randall, S.K., "Phosphorylation Regulated Ion-Binding Is a Property Shared by the Acidic Subclass Dehydrins.", *Plant Cell Environ.*, 28: 1114-1122 (2005).
- [220] Hara, M., Fujinaga, M., and Kuboi, T., "Metal Binding by Citrus Dehydrin with Histidine-Rich Domains.", *J. Exp. Bot.*, 56: 2695-2703 (2005).

- [221] Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B., "Purification of Recombinant Arabidopsis Thaliana Dehydrins by Metal Ion Affinity Chromatography.", *Protein Expr. Purif.*, 20: 169-178 (2000).
- [222] Harada, J.J., Delisle, A.J., Baden, C.S., and Crouch, M.L., "Unusual Sequence of an Abscisic Acid-Inducible Mrna Which Accumulates Late in Brassica Napus Seed Development. ", *Plant Mol. Biol.*, 12: 395-401 (1989).
- [223] Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A., and Takagi, M., "A Tea-Class Gene of Tomato Confers Salt and Freezing Tolerance When Expressed in Saccharomyces Cerevisiae. ", *Gene*, 170: 243-248 (1995).
- [224] Dure, L.I., "Structural Motifs in Lea Protein. In Close Tj, Bray Ea (Eds) Plant Response to Cellular Dehydration During Environmental Stress," *American Society of Plant Physiologists, Rockville*, 10: 91–103 (1993).
- [225] Wise, M.J., "Leaping to Conclusions: A Computational Reanalysis of Late Embryogenesis Abundant Proteins and Their Possible Roles.", *BMC Bioinformatics.*, 4: 52 (2003).
- [226] Bravo, L.A., Gallardo, J., Navarrete, A., Olave, N., Martinez, J., Alberdi, J., Close, T.J., and Corcuera, L.J., "Cryoprotective Activity of a Cold-Induced Dehydrin Purified from Barley.", *Plant Physiol.*, 118: 262-269 (2003).
- [227] Goyal, K., Walton, L.J., and Tunnacliffe, A., "Lea Proteins Prevent Protein Aggregation in an Anhydrobiotic Nematode Protein.", *J. Biol. Chem.*, 388: 151-157 (2005).
- [228] Honjoh, K.I., Matsumoto, H., Shimizu, H., Ooyama, K., Tanaka, K., Oda, Y., Takata, R., Joh, T., Suga, K., Miyamoto, T., Iio, M., and Hatano, S., "Cryoprotective Activities of Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins from Chlorella Vulgaris C-27.", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64: 1656-1663 (2000).
- [229] Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S., and Sarhan, F., "Immunolocalization of Freezing-Tolerance-Associated Proteins in the Cytoplasm and Nucleoplasm of Wheat Crown Tissues.", *Plant J.*, 8: 583-593 (1995).
- [230] Kazuoka, T. and Oeda, K., "Purification and Characterization of Cor85 Oligomeric Complex from Cold Acclimated Spinach.", *Plant Cell Physiol.*, 35: 691-697 (1994).
- [231] Momma, M., Kaneko, S., Haraguchi, K., and Matsukura, U., "Peptide Mapping and Assessment of Cryoprotective Activity of 26/27 KDa Dehydrin from Soybean Seeds.", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67: 1832-1835 (2003).
- [232] Sanchez-Ballesta, M.T., Rodrigo, M.J., Lafuente, M.T., Granell, A., and Zacarias, L., "Dehydrin from Citrus, Which Confers in Vitro Dehydration and Freezing Protection Activity, Is Constitutive and Highly Expressed in the

- Flavado of Fruit but Responsive to Cold and Water Stress in Leaves.", *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1950-1957 (2004).
- [233] Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.M., and Griffith, M., "Purification, Immunolocalization, Cryoprotective, and Antifreeze Activity of Pca60: A Dehydrin from Peach (*Prunus Persica*).", *Physiol Plant*, 105: 600-608 (1999).
- [234] Reyes, J.L., Rodrigo, M.J., Colmenero-Flores, J.M., Gil, J.V., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Bartels, D., and Covarrubias, A.A., "Hydrophilins from Distant Organisms Can Protect Enzymatic Activities from Water Limitation Effects in Vitro.", *Plant Cell Environ.*, 27: 709-718 (2005).
- [235] McGee, B.M., "Hydrophilic Proteins in the Anhydrabiosis of Bdelloid Rotifers.", Published PhD Thesis, University of Cambridge. (2006).
- [236] Svenson, J., Ismail, A.M., Palva, E.T., and Close, T.J., eds. *Dehydrins. Sensing, Signalling and Cell Adaptation.*, ed. K.B. Storey and J.B. Storey. 2002.
- [237] Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., and Garcarrubio, A., "The Enigmatic Lea Proteins and Other Hydrophilins.", *Plant Physiol.*, 148: 6-24 (2008).
- [238] Bravo, L.A., Close, T.J., Corcuera, L.J., and Guy, C.L., "Characterization of an 80-Kda Dehydrin-Like Protein in Barley Responsive to Cold Acclimation.", *Plant Physiol*, 106: 177-183 (1999).
- [239] Nylander, M., Svensson, J., Tapio, P.E., and Welin, B.V., "Stressed-Induced Accumulation and Tissue-Specific Localization of Dehydrins in Arabidopsis Thaliana.", *Plant Mol Biol*, 45: 263-279 (2001).
- [240] Bray, E.A., "Plant Responses to Water Deficit. ", *Trends Plant Sci*, 2: 48-54 (1997).
- [241] Richard, S., Morency, M.J., Drevet, C., Jouanin, L., and Seguin, A., "Isolation and Characterization of a Dehydrin Gene from White Spruce Induced Upon Wounding, Drought and Cold Stresses. ", *Plant Mol Biol*, 1: 1-10 (2000).
- [242] Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., "Molecular Responses to Drought and Cold Stress. ", *Curr Opin Biotechnol*, 7: 161-167 (1996).
- [243] Cornic, G., "Drought Stress Inhibits Photosynthesis by Decreasing Stomatal Aperture- Not by Affecting Atp Synthesis. ", *Trends Plant Sci*, 5: 187-188 (2000).
- [244] Hare, P.D., Cress, W.A., and Van Staden, J., " Dissecting the Roles of Osmolyte Accumulation During Stress.", *Plant Cell Environ*, 21: 535-553 (1998).

- [245] Close, T.J., "Dehydrins: A Commonality in the Response of Plants to Dehydration and Low Temperature.", *Physiol Plant*, 100: 291–296 (1997).
- [246] Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitov, V.A., "The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. ", *Biochemistry (Moscow)*, 68: 945–951 (2003).
- [247] Rorat, T., Szabala, B.M., Grygorowicz, W.J., Wojtowicz, B., Yin, Z., and Rey, P., "Expression of Sk3-Type Dehydrin in Transporting Organs Is Associated with Cold Acclimation in Solanum Species", *Planta*, 224: 205–221 (2006).
- [248] Danyluk, J., Houde, M., Rassart, E., and Sarhan, F., "Differential Expression of a Gene Encoding an Acidic Dehydrin in Chilling Sensitive and Freezing Tolerant Gramineae Species.", *FEBS Lett*, 344: 20–24 (1994).
- [249] Luo, M., Liu, J.H., Mohapatra, S., Hill, R.D., and Hapatra, S.S., "Characterization of a Gene Family Encoding Abscisic Acid and Environmental Stress-Inducible Protein of Alfalfa. ", *J Biol Chem*, 267: 15367–15374 (1992).
- [250] Rouse, D.T., Marotta, R., and Parish, R.W., "Promoter and Expression Studies on an Arabidopsis Thaliana Dehydrin Gene. ", *FEBS Lett* 381: 252–256 (1996).
- [251] Whitsitt, M.S., Collins, R.G., and Mullet, J.E., "Modulation of Dehydration Tolerance in Soybean Seedlings (Dehydrin Mat1 Is Induced by Dehydration but Not by Abscisic Acid).", *Plant Physiol*, 114: 917–925 (1997).
- [252] Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kamada, H., and Harada, H., "Cdna Cloning of Ecp40, an Embryogenic-Cell Protein in Carrot, and Its Expression During Somatic and Zygotic Embryogenesis. ", *Plant Mol Biol* 21: 1053–1068 (1993).
- [253] Houde, M., Danyluk, J., Laliberte, J.-F., Rassart, E., Dhindsa, R.S., and Sarhan, F., "Cloning, Characterization, and Expression of a Cdna Encoding a 50-Kilodalton Protein Specifically Induced by Cold Acclimation in Wheat.", *Plant Physiol*, 99: 1381–1387 (1992).
- [254] Guerrero, F.D., Jones, J.T., and Mullet, J.E., "Turgor-Responsive Gene Transcription and Rna Levels Increase Rapidly When Pea Shoots Are Wilted: Sequence and Expression of Three Inducible Genes. ", *Plant Mol Biol*, 15: 11–26 (1990).
- [255] Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., and Shinozaki, K., "Molecular Cloning and Characterization of 9 Cdnas for Genes That Are Responsive to Desiccation in Arabidopsis Thaliana: Sequence Analysis of One Cdna Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. ", *Plant Cell Physiol*, 33: 217–224 (1992).

- [256] Galau, G.A. and Close, T.J., "Sequences of the Cotton Group 2 Lea/Rabfdehydrin Proteins Encoded by Lea3 Cdnas", *Plant Physiol*, 98: 1523-1525 (1992).
- [257] Grossi, M., Cattivelli, L., Terzi, V., and Stanca, A.M., "Modification of Gene Expression Induced by Aba, in Relation to Drought and Cold Tress in Barley Shoots.", *Plant Physiol Biochem*, 30: 97-103 (1992).
- [258] Grossi, M., Gulli, M., Stanca, A.M., and Cattivelli, L., "Characterization of Two Barley Genes That Respond Rapidly to Dehydration Stress.", *Plant Sci*, 105: 71-80 (1995).
- [259] Takahashi, R., Joshee, N., and Kitagawa, Y., "Induction of Chilling Resistance by Water Stress, and Cdna Sequence Analysis and Expression of Water Stress-Regulated Genes in Rice.", *Plant Mol Biol*, 26: 339-352 (1994).
- [260] Oulet, F., Houde, M., and Sarhan, F., "Purification, Characterization and Cdna Cloning of the 200 Kda Protein Induced by Cold Acclimation in Wheat.", *Plant Cell Physiol.*, 34: 59-65 (1993).
- [261] Sarhan, F., Oullet, F., and Vazquez-Tello, A., "The Wheat Wcs120 Gene Family: A Useful Model to Understand the Molecular Genetics of Freezing Tolerance in Cereals.", *Physiol. Plant*, 101: 439-445 (1997).
- [262] Allagulova, C.R., Gimalov, F.R., Shakirova, F.M., and Vakhitow, V.A., "The Plant Dehydrins:Structure and Putative Functions.", *Biochemistry*, 68: 1157-1165 (2003).
- [263] Monroy, A.F., Castonguay, Y., Laberge, S., Sarhan, F., Vezina, L.P., and Dhindsa, R.R., "A New Cold-Induced Alfalfa Gene Is Associated with Enhanced Hardening at Subzero Temperature.", *Plant Physiol*, 102: 873-879 (1993).
- [264] Goday, A., Jensen, A.B., Culianez-Macia, F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., and Pages, M., "The Maize Abscisic Acid-Responsive Protein Rab17 Is Located in the Nucleus and Interacts with Nuclear Localization Signals. ", *Plant Cell*, 6: 360-361 (1994).
- [265] Scarth, G.W., "Dehydration Injury and Resistance.", *Plant Physiol*, 16: 171-179 (1941).
- [266] Levitt, J., ed. *Frost, Drought and Heat Resistance*. . In *Protoplasmatologia.Viii. Physiologie Des Protoplasmas* ed. L.V. Heilbrunn and F. Weber. 1958, Springer-Verlag,: Wien. 1-87.
- [267] Hanson, A., D., and Hitz, W.D., "Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits", *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 163-203 (1982).

- [268] Steponkus, P.J., eds), pp. 235-255, ed. *A Unified Concept of Stress in Plants?* . In *Genetic Engineering of Osmoregulation*, ed. D.W. Rains, R.C. Valentine, and A. Hollaender. 1980, Plenum Press.: New York, NY. ISBN. 235-255.
- [269] Van Zee, K., Chen, F.Q., Hayes, P.M., Close, T.J., and Chen, T.H.H., "Cold-Specific Induction of a Dehydrin Gene Family Member in Barley.", *Plant Physiol*, 108: 1233-1239 (1995).
- [270] Rinne, L.H., P., Kaikuranta, P.L.M., Van Der Plas, H.W.L., and Van Der Schoot, C., "Dehydrins in Cold-Acclimated Apices of Birch (*Betula Pubescens* Ehrh.): Production, Localization and Potential Role in Rescuing Enzyme Function During Dehydration", *Planta*, 209: 377-388 (1999).
- [271] Tabaei-Aghdaei, S.R., Harrison, P., and Pearce, R.S., "Expression of Dehydration-Stress-Related Genes in the Crowns of Wheatgrass Species [*Lophopyrum Elongatum* (Host) A. Love and *Agropyron Desertorum* (Fisch. Ex Link.) Schult.] Having Contrasting Acclimation to Salt, Cold and Drought.", *Plant Cell Environ.*, 23: 561-571 (2000).
- [272] Zhu, B., Choi, D.W., Fenton, R., and Close, T.J., "Expression of the Barley Dehydrin Multigene Family and the Development of Freezing Tolerance.", *Mol Gen. Genet.*, 145-153: (2000).
- [273] Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte', J., and Sarhan, F., "Immunolocalization of Freezing-Tolerance Associated Proteins in the Cytoplasm and Nucleoplasm of Wheat Crown Tissues.", *Planta J.*, 8: 583-593 (1995).
- [274] Sarhan, F., Ouellet, F., and Vazquez-Tello, A., "The Wheat Wcs120 Gene Family: A Useful Model to Understand the Molecular Genetics of Freezing Tolerance in Cereals", *Physiol Plant*, 101 439–445 (1997).
- [275] Cellier, F., Conejero, G., Breitler, J.C., and Casse, F., "Molecular and Physiological Responses to Water Deficit in Drought-Tolerant and Drought-Sensitive Lines of Sunflower1", *Plant Physiol.*, 116: 319-328 (1998).
- [276] Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J., "Chilling Tolerance During Emergence of Cowpea Associated with a Dehydrin and Slow Electrolyte Leakage", *Crop Sci.*, 37: 1270-1277 (1997).
- [277] Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.A., Downs, C.A., and Voinikov, V.K., "Accumulation of Dehydrin-Like Proteins in the Mitochondria of Cold-Treated Plants.", *J Plant Physiol*, 156: 797-800 (2000).
- [278] Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J., "Allelic Variation of a Dehydrin Gene Co-Segregates with Chilling Tolerance During Seedling Emergence.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 23: 13566–13570 (1999).

- [279] Artlip, T.S., Callahan, A.M., Bassett, C.L., and Wisniewski, M.E., "Seasonal Expression of Dehydrin Gene in Sibling Deciduous and Evergreen Peach (*Prunus Persica* (L.) Batsch).", *Plant Mol. Biol.*, 33: 61-70 (1997).
- [280] Puhakainen, T., Li, C., and Boije-Malm, M., "Short-Day Potentiation of Low Temperature-Induced Gene Expression of a C Repeat -Binding Factor-Controlled Gene During Cold Acclimation in Silver Birch.", *Plant Physiol.*, 136: 4299-4307 (2004).
- [281] Rinne, P.L.H., Kaikutanta, P.L.M., van der Plas, L.H.W., and van der Schoot, C., "Dehydrins in Cold Acclimated Apices of Birch (*Betula Pubescens* Ehrh.): Production, Localization and Potential Role in Rescuing Enzyme Function During Dehydration.", *Planta*, 209: 377-388 (1999).
- [282] Wisniewski, M., Close, T.J., and Artlip, T., "Seasonal Patterns of Dehydrin and 70-Ksa Heat-Shock Proteins in Bark Tissues of Eight Species of Woody Plants.", *Physiol. Plant*, 96: 496-505 (1996).
- [283] Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., and Voinikov, V.K., "Accumulation of Dehydrins and Aba-Inducible Proteins in Wheat Seedlings During Low-Temperature Acclimation", *Russian Journal of Plant Physiology*, 49(2): 229-234 (2002).
- [284] Close, T.J., Fenton, R.D., and Moonan, F., "A View of Plant Dehydrins Using Antibodies Specific to the Carboxy Terminal Peptide. ", *Plant Mol Biol*, 23: 279-286 (1993).
- [285] Campbell, S.A. and Close, T.J., "Dehydrins: Genes, Proteins, and Associations with Phenotypic Traits.", *New Phytol*, 137: 61-74 (1997).
- [286] Rinne, P.L.H., Kaikuraranta, P.L.M., van der Plas, L.H.W., and van der Schoot, C., "Dehydrins in Cold-Acclimated Apices of Birch (*Betula Pubescens* Ehrh.): Production, Localization and Potential Role in Rescuing Enzyme Function During Dehydration.", *Planta.*, 209: 377-388 (1999).
- [287] Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., and Sarhan, F., "Accumulation of an Acidic Dehydrin in the Vicinity of the Plasma Membrane During Cold Acclimation of Wheat.", *Plant Cell.*, 10: 623-638 (1998).
- [288] Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.M., and Griffith, M., "Purification, Immunolocalization, Cryoprotective, and Antifreeze Activity of Pca60: A Dehydrin from Peach (*Prunus Persica*)", *Physiol Plant*, 105: 600-608 (1999).
- [289] Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J., "Purification and Partial Characterization of a Dehydrin Involved in Chilling Tolerance During Seedling Emergence of Cowpea. ", *Plant Physiol*, 120: 237-244 (1999).

- [290] Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A., and Covarrubias, A.A., "Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes Are Common During Conditions of Water Deficit. ", *J. Biol. Chem.*, 275: 5668-5674 (2000).
- [291] Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B., "Purification of Recombinant Arabidopsis Thaliana Dehydrins by Metal Ion Affinity Chromatography", *Protein Expression and Purification*, 20: 169-178 (2000).
- [292] Jarvis, S.B., Tarlor, M.A., Macleod, M.R., and Davies, H.V., "Cloning and Characterization of the Cdna Clones of Three Genes That Are Differentially Expressed During Dormancy Breakage in the Seeds of Douglas Fir (Pseudotsuga Menziesii).", *J Plant Physiol*, 147: 559-566 (1996).
- [293] Segrest, J.P., De Loof, H., Dohlman, J.G., Brouillette, C.G., and Anantharamaiah, G.M., "Amphipathic Helix Motif: Classes and Properties.", *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 8: 103-117 (1990).
- [294] Campbell, S.A., Crone, D.E., Ceccardi, T.L., and Close, T.J., "A Ca. 40 Kda Maize (Zea Mays L.) Embryo Dehydrin Is Encoded by the Dhn2 Locus on Chromosome 9", *Plant Mol Biol*, 38: 417-423 (1998).
- [295] Godoy, J.A., Luna, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M., and Pintor-Toro, J.A., "Expression, Tissue Distribution and Subcellular Localization of Dehydrin Tas14 in Salt-Stressed Tomato Plants.", *Plant Mol Biol*, 26: 1921-1934 (1994).
- [296] Plana, M., Itarte, E., Eritja, R., Goday, A., Pages, M., and Martinez, M.C., "Phosphorylation of Maize Rab17 Protein by Casein Kinase 2.", *J. Biol Chem.*, 266: 22510-22514 (1991).
- [297] Riera, M., Figueras, M., Lopez, C., Goday, A., and Pages, M., "Protein Kinase Ck2 Modulates Developmental Functional Functions of the Abscisic Acid Responsive Protein Rab17 from Maize.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 9879-9884 (2004).
- [298] Ismail, A.M., Hall, A.E., and Close, T.J., "Purification and Partial Characterization of a Dehydrin Involved in Chilling Tolerance During Seedling Emergence of Cowpea. ", *Plant Physiol.*, 120: 237-244 (1999).
- [299] Choi, D.-W., Zhu, B., and Close, T.J., "The Barley (Hordeum Vulgare L.) Dehydrin Multigene Family: Sequences, Allelic Types, Chromosome Assignments, and Expression Characteristics of 11 Dhn Genes of Cv. Dicktoo.", *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1234-1247 (1999).
- [300] Choi, D.W., Zhu, B., and Close, T.J., "The Barley (Hordeum Vulgare L.) Dehydrin Multigene Family: Sequences, Allele Types, Chromosome Assignments, and Expression Characteristics of 11 Dhn Genes of Cv Dicktoo", *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik*, 98: 1234-1247 (1999).

- [301] Choi, D.W. and Close, T.J., "A Newly Identified Barley Gene, Dhn12, Encoding a Ysk2 Dhn, Is Located on Chromosome 6h and Has Embryo-Specific Expression", *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik*, 100: 1274-1278 (2000).
- [302] Levi, A., Panta, G.R., Parmentier, C.M., Muthalif, M.M., Arora, R., Shankerf, S., and Rowland, L.J., "Complementary DNA Cloning, Sequencing and Expression of an Unusual Dehydrin from Blueberry Floral Buds", *Physiol Plant*, 107: 98-109 (1999).
- [303] Close, T.J., Meyer, N.C., and Radik, J., "Nucleotide Sequence of a Gene Encoding a 58.5-Kilodalton Barley Dehydrin That Lacks a Serine Tract", *Plant Physiol*, 107: 289-290 (1995).
- [304] Mtwisha, L., Brandt, W., McCread, L., and Lindsey, G.G., "Hsp12 Is a Lea-Like Protein in *Saccharomyces Cerevisiae*.", *Plant Mol Biol*, 37: 513-521 (1998).
- [305] Kontunen-Soppela, S., Taulavuori, K., Taulavuori, E., Lahtesmäki, K., and Laine, K., "Soluble Proteins and Dehydrins in Nitrogen-Fertilized Scots Pine Seedlings During Deacclimation and the Onset of Growth.", *Physiol Plant*, 109: 404-409 (2000).
- [306] Egertsdotter, U., van, Z.L.M., MacKay, J., Peter, G., Kirst, M., Clark, C., Whetten, R., and Sederoff, R., "Gene Expression During Formation of Earlywood and Latewood in Loblolly Pine: Expression Profiles of 350 Genes.", *Plant Biol*, 6: 654-663 (2004).
- [307] Li, R., Brawley, S.H., and Close, T.J., "Proteins Immunologically Related to Dehydrins in Fucoid Algae.", *J. Phycol.*, 34: 642-650 (1998).
- [308] Kruger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W., and Hell, R., "A Metal-Binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus Communis* L.", *J. Biol. Chem.*, 277: 25062-25069 (2002).
- [309] Arora, R. and Wisniewski, M.E., "Cold Acclimation in Genetically Related (Sibling) Deciduous and Evergreen Peach (*Prunus Persica* [L.] Batsch)", *Plant Physiol*, 105: 95-101 (1994).
- [310] Muthalif, M.M. and Rowland, L.J., "Identification of Dehydrin-Like Proteins Responsive to Chilling in Floral Buds of Blueberry (*Vaccinium*, Section *Cyanococcus*)", *Plant Physiol*, 104: 1439-1447 (1994).
- [311] Golan-Goldhirsh, A. and Shachak, A., "Immunological Cross-Reaction between Bud and Bark Proteins of Dormant Deciduous Trees.", *Sci Hortic*, 73: 165-173 (1998).
- [312] Artlip, T.S., Callahan, A.M., Bassett, C.L., and Wisniewski, M.E., "Seasonal Expression of a Dehydrin Gene in Sibling Deciduous and Evergreen

- Genotypes of Peach (*Prunus Persica* [L.] Batsch.). ", *Plant Mol. Biol.*, 33: 61-70 (1997).
- [313] Wisniewski, M., Basset, C., and Arora, R., "Distribution and Partial Characterization of Seasonally Expressed Proteins in Different Aged Shoots and Roots of 'Loring' Peach (*Prunus Persica*). ", *Tree Physiol.*, 24: 339-345 (2004).
- [314] Wisniewski, M., Basset, C., and Renaut, J., "Differential Regulation of Two Dehydrin Genes from Peach (*Prunus Persica*) by Photoperiod, Low Temperature and Water Deficit.", *Tree Physiol.*, 26: 575-584 (2006).
- [315] Dhanaraj, A.L., Slovin, J.P., and Rowland, L.J., "Isolation of a Cdna Clone and Characterization of Expression of the Highly Abundant, Cold Acclimation-Associated 14 Kda Dehydrin of Blueberry.", *Plant Sci.*, 168: 949-957 (2005).
- [316] Levi, A., Panta, G.R., Parmentier, C.M., Muthalif, M.M., Arora, R., Shanker, S., and Rowland, L.J., "Complementary DNA Cloning, Sequencing and Expression of an Unusual Dehydrin from Blueberry Floral Buds.", *Physiol Plant*, 107: 98-109 (1999).
- [317] Muthalif, M.M. and Rowland, L.J., "Identification of Dehydrin Like Proteins Responsive to Chilling in Floral Buds of Blueberry (*Vaccinium*, Section *Cyanococcus*). ", *Plant Physiol.*, 104: 1439-1447 (1994).
- [318] Arora, R., Rowland, L.J., and Panta, G.R., "Chill-Responsive Dehydrins in Blueberry: Are They Associated with Cold Hardiness or Dormancy Transitions?", *Physiol. Plant*, 101: 8-16 (1997).
- [319] Panta, G.R., Rieger, M.W., and Rowland, L.J., "Effect of Cold and Drought Stress on Blueberry Dehydrin Accumulation.", *Biotechnol. J. Hortic. Sci.*, 76: 549-556 (2001).
- [320] Hara, M., Terashima, S., and Kuboi, T., "Characterization and Cryoprotective Activity of Cold-Responsive Dehydrin from Citrus Unshiu", *J. Plant Physiol.*, 158: 1333-1339 (2001).
- [321] Muthalif, M.M. and Rowland, L.J., "Identification of Dehydrin-Like Proteins Responsive to Chilling in Floral Buds of Blueberry (*Vaccinium*, Section *Cyanococcus*)", *Plant Physiol*, 104: 1439-1447 (1994).
- [322] Arora, R., Rowland, L.J., and Panta, G.R., "Chill-Responsive Dehydrins in Blueberry: Are They Associated with Cold Hardiness or Dormancy Transitions?", *Physiol Plant*, 101: 8-16 (1997).
- [323] Welling, A., Kaikuranta, P., and Rinne, P., "Photoperiod Induction of Dormancy and Freezing Tolerance in *Betula Pubescens*. Involvement of Aba and Dehydrins. ", *Physiol Plantarum*, 100: 119-125 (1997).

- [324] Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G., and Carpin, S., "Dehydrin Induction During Drought and Osmotic Stress in Populus.", *Plant Physiol Biochem*, 40: 1033–1042 (2002).
- [325] Bokor, M., Csizmok, V., Kovacs, D., Banki, P., Friedrich, P., Tompa, P., and K., T., "Nmr Relaxation Studies on the Hydrate Layer of Intrinsically Unstructured Proteins.", *Biophys. J.*, 88: 2030-2037 (2005).
- [326] Svenson, J., "Functional Studies of the Role of the Plant Dhns in Tolerance to Salinity, Desiccation Anf Low Temperature.", Published PhD Thesis, Swedish Univeresity of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweeden. (2001).
- [327] Ceccardi, T.L., Meyer, N.C., and Close, T.J., "Purification of a Maize Dehydrin. ", *Protein Expres Purif*, 5: 266-269 (1994).
- [328] Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C., and Thomashow, M.F., "Constitutive Expression of Coldregulated Arabidopsis Thaliana Cor15a Gene Affects Both Chloroplasts and Protoplasts Freezing Tolerance.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 13404-13409 (1996).
- [329] Sieg, F., Schroder, W., Schmitt, J.M., and Hinch, D.K., "Purification and Characterization of a Cryoprotective Protein (Cryoprotectin) from the Leaves of Cold-Acclimated Cabbage.", *Plant Physiol.*, 111: 215-221 (1996).
- [330] Antikainen, M. and Griffith, M., "Antifreeze Protein Acumulation in Freezing Tolerant Cereals.", *Physiol. Plant*, 99: 423-432 (1997).
- [331] Griffith, M., Antikainen, M., Hon, W.C., Pihakashi-Maunsbach, K., Yu, X.M., Chun, J.U., and Yang, D.S.C., "Antifreeze Proteins in Winter Rye.", *Physiol Plant*, 100: 327-332 (1997).
- [332] Duman, J.G., "Purification and Characterization of a Thermal Hysteresis Protein from a Plant, the Bittersweet Nightshade Solanum Dulcamara.", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1206: 129-135 (1994).
- [333] Worall, D., Elias, L., Ashford, D., Smallwood, M.C.S., and Lillford, P., "A Carrot Leucie-Rich-Repeat Protein That Inhibits Ice Recrystallization.", *Science*, 282: 115-117 (1998).
- [334] McKersie, B.D. and Bowley, S.R., "Active Oxygen and Freezing Tolerance in Transgenic Plants.", *Molecular Biology, Biochemistry and Physiology*, 68: 203-214 (1997).
- [335] Olien, C.R. and Smith, M.N., "Ice Adhesions in Relation to Freeze Stress.", *Plant Physiol.*, 60: 499-503 (1977).
- [336] Guy, C., Haskell, D., and Li, Q.B., "Association of Proteins with the Stress 70 Molecular Chaperones at Low Temperature: Evidence for the Existence of Cold Labile Proteins in Spinach.", *Cryobiology*, 36: 301-314 (1998).

- [337] Livingston, D.P.I. and Henson, C.A., "Apoplastic Sugars, Fructants, Fructan Exohydrolase, Ad Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening.", *Plant Physiol.*, 116: 403-408 (1998).
- [338] Guy, C.L. and Li, Q.B., "The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family.", *Plant Cell*, 10: 539-556 (1998).
- [339] Vilardell, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martinez, M.C., Torne, J.M., and Pages, M., "Gene Sequence, Developmental Expression, and Protein Phosphorylation of Rab-17 in Maize.", *Plant Mol Biol*, 14: 423-432 (1990).
- [340] Jensen, A.B., Goday, A., Figueras, M., Jessop, A.C., and Pages, M., "Phosphorylation Mediates the Nuclear Targeting of the Maize Rab17 Protein. ", *Plant J*, 13: 691-697 (1998).
- [341] Lisse, T., Bartels, D., Kalbitzer, H.R., and Jaenicke, R., "The Recombinant Dehydrin Like Desiccation Stress Protein from the Resurrection Plant *Craterostigma Plantagineum* Displays No Defined Three Dimensional Structure in Its Native State.", *Biol. Chem.* , 377: 555-561 (1996).
- [342] Guy, C.L., Niemi, K.J., and Brambl, R., "Altered Gene Expression During Cold Acclimation of Spinach.", *Proceeding National Academy of Science USA*, 82: 3673-3677 (1985).
- [343] Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., and Somerville, C., "Cloning of a Temperature Regulated Gene Encoding a Chloroplast Omega-3 Desaturase from *Arabidopsis Thaliana*.", *Plant Physiol.*, 106: (1994).
- [344] Anderson, J.V., Li, Q.B., Haskell, D.W., and Guy, C.L., "Structural Organization of the Spinach Endoplasmic Reticulum-Luminal 70 Kilodalton Heat Shock Cognate Gene During Cold Acclimation.", *Plant Physiol.*, 104: 1359-1370 (1994).
- [345] Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J.F., and Hill, S., "Cold Induced Accumulation of Hsp90 Transcripts in *Brassica Napus*.", *Plant Physiol.*, 107: 915-923 (1995).
- [346] Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., and Shinozaki, K., "Atpmks: A Gene Family of Plant Map Kinases in *Arabidopsis Thaliana*", *FEBS Lett.*, 336: 440-444 (1993).
- [347] Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., and Yamaguchi-Shinozaki, K., "A Gene Encoding a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Is Induced Simultaneously with Genes for a Mitogen-Activated Protein Kinase and an S6 Ribosomal Protein Kinase Bt Touch, Cold, and Water Stress in *Arabidopsis Thaliana*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 765-769 (1996).

- [348] Polisensky, D.H. and Braam, J., "Cold-Shock Regulation of the Arabidopsis Tch Genes and the Effects of Modulating Intracellular Calcium Levels.", *Plant Physiol.*, 111: 1271-1279 (1996).
- [349] Jarillo, J.A., Capel, J., Leyva, A., Martinez-Zapater, J.M., and Salinas, J., "Two Related Low-Temperature-Inducible Genes of Arabidopsis Encode Proteins Showing High Homology to 14-3-3 Proteins, a Family of Putative Kinase Regulators.", *Plant Mol. Biol.*, 25: 693-704 (1994).
- [350] Nordin, K., Vahala, T., and Palva, E.T., "Differential Expression of Two Related, Low-Temperature-Induced Genes in Arabidopsis Thaliana (L.) Heynh", *Plant Mol Biol*, 21: 641-653 (1993).
- [351] Baker, S.S., Wilhelm, K.S., and Thomashow, M.F., "The 5' Region of Arabidopsis Thaliana Cor15a Has Cis-Acting Elements That Confer Cold-, Drought-, and Aba-Regulated Gene Expression.", *Plant Mol Biol*, 24: 701-713 (1994).
- [352] Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., "Two Transcription Factors, Dreb1 and Dreb2, with an Erbp/Ap2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought and Low Temperature Responsive Gene Expression, Respectively in Arabidopsis.", *Plant Cell*, 10: 1391-1406 (1998).
- [353] Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R., and Quatrano, R.S., "A Plant Leucine Zipper Protein That Recognizes an Abscisic Acid Response Element.", *Science*, 250: 267-271 (1990).
- [354] Leung, J. and Giraudat, J., "Abscisic Acid Signal Transduction.", *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49: 199-222 (1998).
- [355] Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., "Arabidopsis Basic Leucine Zipper Transcription Factors Involved in an Abscisic Acid Dependent Signal Transduction Pathway under Drought and High Salinity Conditions.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11632-11637 (2000).
- [356] Busk, P.K., Jensen, A.B., and Pages, M., "Regulatory Elements in the Promoter of the Abscisic Acid Responsive Gene Rab17 from Maize.", *Plant J.*, 11: 1285-1295 (1997).
- [357] Egerton-Warburton, L.M., Balsamo, R.A., and Close, T.J., "Temporal Accumulation and Ultrastructural Localization of Dehydrins in Zea Mays.", *Physiol. Plant*, 101: 545-555 (1997).
- [358] Welling, A., Rinne, P., Vihera-Aarnio, A., Kontunen-Soppela, S., Heino, P., and Palva, E.T., "Photoperiod and Temperature Differentially Regulate the Expression of Two Dehydrin Genes During over Wintering of Birch (Betula pubescens Ehrh.).", *J. Exp. Bot.*, 396: 507-516 (2004).

- [359] Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Chua, N., "Nuclear Proteins Bind Conserved Elements in the Abscisic Acid-Responsive Promoter of a Rice Rab Gene.", *Prof. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1406-1410 (1990).
- [360] Baker, S.S., Wilhelm, K.S., and Thomashow, M.F., "The 5'-Region of Arabidopsis Thaliana Cor15a Has Cis-Acting Elements That Confer Cold-, Drought- and Aba-Regulated Gene Expression.", *Plant Mol. Biol.*, 24: 701-713 (1994).
- [361] Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., "A Novel Cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress.", *Plant Cell*, 6: 251-264 (1994).
- [362] Michel, D., Salamini, F., Bartels, D., Dale, P., Baga, M., and Szalay, A., "Analysis of a Desiccation and Aba-Responsive Promoter Isolated from the Resurrection Plant Craterostigma Plantagineum.", *Plant J.*, 4: 29-40 (1993).
- [363] Nelson, D., Salamini, F., and Bartels, D., "Abscisic Acid Promotes Novel DNA-Binding Activity to a Desiccation-Related Promoter of Craterostigma Plantagineum.", *Plant J.*, 5: 451-458 (1994).
- [364] Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K., "An Arabidopsis Myb Homolog Is Induced by Dehydration Stress and Its Gene Product Binds to the Conserved Myb Recognition Sequence.", *Plant Cell*, 5: 1529-1539 (1993).
- [365] Iturriaga, G., Leyns, L., Villegas, A., Gharaibeh, R., Salamini, F., and Bartels, D., "A Family of Novel Myb-Related Genes from the Resurrection Plant Craterostigma Plataginimum Are Specifically Expressed in Callus and Roots in Response to Aba or Desiccation.", *Plant Mol. Biol.*, 32: 707-716 (1996).
- [366] Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K., "Role of Arabidopsis Myc and Myb Homologs in Drought- and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression.", *Plant Cell*, 9: 1859-1868 (1997).
- [367] Söderman, E., Mattsson, J., and Engstrom, P., "The Arabidopsis Homeobox Gene Athb-7 Is Induced by Water Deficit and by Abscisic Acid.", *Plant J.*, 10: 375-381 (1996).
- [368] Lee, Y.H. and Chun, J.Y., "A New Homeobox-Leucine Zipper Gene from Arabidopsis Thaliana Induced by Water Stress and Abscisic Acid Treatment.", *Plant Mol. Biol.*, 37: 377-384 (1998).
- [369] Frank, W., Philips, J., Salamini, F., and Bartels, D., "Two Dehydration-Inducible Transcripts from the Resurrection Plant Craterostigma Plantagineum Encode Interacting Homeobox-Leucine Zipper Proteins.", *Plant J.*, 15: 413-421 (1998).

- [370] Deng, X., Philips, J., Meijer, A.H., sALamini, F., and Bartels, D., "Characterization of Five Novel Dehydration-Responsive Homedomain Leucine Zipper Genes from the Resurrection Plant *Craterostigma Plantagineum*.", *Plant Mol. Biol.*, 49: 601-610 (2002).
- [371] Weil, C.F. and Wessler, S.R., "The Effects of Plant Transposable Element Insertion on Transcription Initiation and Rna Processing.", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 527-552 (1990).
- [372] Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., and Buitink, J., "Mechanism of Plant Desiccation Tolerance.", *Trends Plant Sci.*, 6: 431-438 (2001).
- [373] Galau, G.W., Hughes, D.W., and Dure, L.I., "Abscisic Acid Induct, on of Cloned Cotton Late Embryogenesis Abundant (Lea) Messenger Rnas.", *Plant Mol. Biol.*, 7: 155-170 (1986).
- [374] Mittler, R., "Oxidative Stress, Antioxidants Ans Stress Tolerance.", *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410 (2002).
- [375] Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I., "Calcium Channels Activated by Hydrogen Peroxide Mediate Abscisic Acid Signalling in Guard Cells.", *Nature*, 406: 731-734 (2000).
- [376] Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., and Giraudat, J., "Arabidopsis Ost1 Protein Kinase Mediates the Regulation of Stomatal Aperture by Abscisic Acid and Acts Upstream of Reactive Oxygen Species Production.", *Plant Cell*, 14: 3089-3099 (2002).
- [377] Bartels, D. and Souer, E., "Molecular Responses of Higher Plants to Dehydration.", *Topics in Current Genetics.*, 4: 9-36 (2003).
- [378] Thomashow, M.F., "Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance.", *Plant Physiol*, 118: 1-7 (1998).
- [379] Hughes, M.A. and Dunn, M.A., "The Effecet of Temperature on Plant Growth and Development.", *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 8: 161-188 (1990).
- [380] Sauter, J.J., Westphal, S., and Wisniewski, M., "Immunological Identification of Dehydrin Related Proteins in the Wood of Five Species of *Populus* and in *Salix Caprea* L.", *J. Plant Physiol.*, 154: 781-788 (1999).
- [381] Mantyla, E., Lang, V., and Palva, E.T., "Role of Abscisic Acid in Drought Induced Freezing Tolerance, Cold Acclimation, and Accumulation of Lti78 and Rab18 Proteins Arabidopsis Thaliana.", *Plant Physiol*, 107: 141-148 (1995).
- [382] Cellier, F., Conejero, G., and Casse, F., "Dehydrin Transcript Fluctuations During a Day/Night Cycle in Drought-Stressed Sunflower", *Journal of Experimental Botany*, 51(343): 299-304 (2000).

- [383] Pelah, D., Shoseyov, O., Altman, A., and Bartels, D., "Water-Stress Response in Aspen (*Populus Tremula*): Differential Accumulation of Dehydrin, Sucrose Synthase, Gapdh Homologues, and Soluble Sugars.", *J. Plant Physiol.*, 151: 96-100 (1997).
- [384] Panta, G.R., Rieger, M.W., and Rowland, L.J., "Effect of Cold and Drought Stress on Blueberry Dehydrin Accumulation.", *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 76: 549-556 (2001).
- [385] Ding, J.P. and Pickard, B.G., "Mechanosensory Calcium-Selective Cation Channels in Epidermal Cells.", *Plant J.*, 3: 83-110 (1993).
- [386] Seo, M. and Koshiha, T., "Complex Regulation of Aba Biosynthesis in Plants.", *Trends. Plant Sci.*, 7: 41-48 (2002).
- [387] Danyluk, J., Houde, M., Rassart, J., and Sarhan, F., "Differential Expression of a Gene Encoding an Acidic Dehydrin Sensitive and Freezing Tolerant Gramineae Species in Chilling", *FEBS Lett*, 344: 20-24 (1994).
- [388] Onken, M., "What Is a Cdna Library?". Washington University. MadSci Network: Genetics (1997).
- [389] Old, R.W. and Primrose, S.B., *Principals of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering.*, in *Chapter 6, 5th Edition, Blackwell Science Ltd.* 1994.
- [390] Özgentürk, N.O., Oruç, F., Sezerman, U., Kuçukural, A., Korkut, S.V., Toksöz, F., and Un, C., "Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea Europaea* L.", *Hindawi Publishing Corporation Comparative and Functional Genomics*, 2010: 1-9 (2010).
- [391] Hanahan, D., "In DNA Cloning: A Practical Approach", 1: 109 (1985).
- [392] Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D., "Differential Plasmid Rescue from Transgenic Mouse Dnas into *Escherichia Coli* Methylation-Restriction Mutants.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(12): 4645-4649 (1990).
- [393] Casadaban, M.J. and Cohen, S.N., "Analysis of Gene Control Singles by DNA Fusion and Cloning in *Escherichia Coli*", *J. Mol. Bio.*, 138(2): 179-207 (1980).
- [394] <http://invitrogen.com>: (05.06.2012).
- [395] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual": (1989).
- [396] Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., "A Plant DNA Minipreparation: Version", *II. lant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21 (1983).

- [397] Temizkan, G., "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler": (2004).
- [398] <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>: (23.06.2012).
- [399] Arslan, O., "Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi Ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, " Published PhD Thesis, Atatürk Üniversitesi Erzurum. (1994).
- [400] Lin, C. and Thomashow, M.F., "A Cold-Regulated Arabidopsis Gene Encodes Polypeptide Having Potent Cryoprotective Activity.", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 183: 1103-1108 (1992).
- [401] Hall, T.A., *Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt*, in *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. p. 95-98.
- [402] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., and Lipman, D.J., "Basic Local Alignment Search Tool", *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410 (1990).
- [403] <http://www.repeatmasker.org>: (23.06.2012).
- [404] <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>: (23.06.2012).
- [405] Claros, M.G. and von Heijene, G., "Toppred Ii: An Improved Software for Membrane Protein Structure Predictions.", *Computer Applications in the Biosciences.*, 10: 685-686 (1994).
- [406] <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=toppred>: (23.06.2012).
- [407] Hofacker, I.L., Fontana, W., Stadler, P.F., Bonhoeffer, S., Tacker, M., and Schuster, P., "Fasr Folding and Comparison of Rna Secondary Structures.", *Monatsheft. Chemie*, 125: 167-168 (1994).
- [408] Marhews, D.H., Sabina, J., Zucker, M., and Turner, H., "Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Provides Robust Prediction of Rna Secondary Structure.", *J. Mol. Biol.*, 288(911-940): (1999).
- [409] <http://www.expasy.org>: (24.06.2012).
- [410] Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C., "Predotar: A Tool for Rapidly Screening Proteomes for N-Terminal Targeting Sequences", *Proteomics*, 4(6): 1581-1590 (2004).
- [411] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G., "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on Their N-Terminal Amino Acid Sequence", *J. Mol. Biol*, 300(4): 1005-1016 (2000).

- [412] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S., "Sosui: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins", *Bioinformatics*, 14(4): 378-379 (1998).
- [413] Hall, T.A., "Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt", *In Nucl. Acids. Symp. Ser.:* 95-98 (1999).
- [414] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., and Lipman, D.J., "Basic Local Alignment Search Tool.", *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410 (1990).
- [415] <http://repeatmasker.org>: (01.07.2012).
- [416] <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>: (01.07.2012).
- [417] <http://mobyale.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form-topped>: (05.07.2012).
- [418] Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M., "Blast2go: A Universal Tool for Annotation, Visualization and Analysis in Functional Genomics Research.", *Bioinformatics*, 21(18): 3674-3676 (2005).
- [419] Conesa A. and Gotz, S., "Blast2go: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics.", *International Journal of Plant Genomics*, 2008(619832-619844): 12 (2008).
- [420] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S., " Sosui: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins", *Bioinformatics*, 14: 378-379 (1998).
- [421] <http://www.genscript.com/>: (04.07.2012).
- [422] Close, T.J., "Dehydrins: A Commonalty in the Response of Plants to Dehydration and Low Temperature.", *Physiol Plant*, 100: 291-296 (1997).
- [423] <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>: (04.07.2012).
- [424] Chung, E., Kim, S.-Y., Yi, S.Y., and Choi, D., "Capsicum Annum Dehydrin, an Osmotic-Stress Gene in Hot Pepper Plants.", *Mol. Cells*, 15(3): 327-332 (2003).
- [425] Hoebeek, J., Speleman, F., and Vandersompele, J., "Real-Time Quantitative Pcr as an Alternative to Southern Blot or Fluorescence in Situ Hybridization for Detection of Gene Copy Number Changes", *Methods Mol. Biol*, 353: 205-226 (2007).
- [426] Yuan, S.J., Burris, J., Stewart, N.R., Mentewab, A., and Stewart Jr, N., "Statistical Tools for Transgene Copy Number Estimation Based on Real-Time Pcr", *BMC Bioinformatics*, 8(7): 1-12 (2007).

- [427] Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokelke, L., and Sivonen, K., "Quantitative Real-Time Pcr for Determination of Microcystin Synthetase E Copy Numbers for Mictocystis and Anabaena in Lakes", *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7289-7298 (2003).
- [428] Konigshoff, M., Wilhelm, J., Bohle, R.M., Pingoud, A., and Hahn, M., "Her-2/Neu Gene Copy Number Quantified by Real-Time Pcr: Comparison of Gene Amplification, Heterozygosity, and Immunohistochemical Status in Breast Cancer Tissue", *Clinical Chemistry*, 49(2): 219-229 (2003).
- [429] Bodin, L., Beaune, P.H., and Loriot, M.A., "Determination of Cytochrome P450 2d6 (Cyp2d6) Gene Copy Number by Real-Time Quantitative Pcr", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 3: 248-253 (2005).
- [430] Palmieri-Thiers, C., Canaan, S., Brunini, V., Lorenzi, V., Tomi, F., Desseyne, J.-L., Garscha, U., Oliw, E.H., Berti, L., and Maury, J., "A Lipoxygenase with Dual Positional Specificity Is Expressed in Olives (*Olea Europaea* L.) During Ripening.", *Biochim biophysica Acta (Amsterdam)*, 171(5): 339-346 (2009).
- [431] Banilas, G., Karampelias, M., Makariti, I., Kourti, A., and Hatzopoulos, P., "The Olive Dgat2 Gene Is Developmentally Regulated and Shares Overlapping but Distinct Expression Patterns with Dgat1", *Journal of Experimental Botany*, 62(2): 521-532 (2011).
- [432] Padilla, M.N., Hernandez, M.L., Perez, A.G., Sanz, C., and Martinez-Rivas, J.M., "Isolation, Expression, and Characterization of a 13-Hydroperoxide Lyase Gene from Olive Fruit Related to the Biosynthesis of the Main Virgin Olive Oil Aroma Compounds", *J. Agric. Food Chem.*, 58: 5649-5657 (2010).
- [433] Padilla, M.N., Hernandez, M.L., Sanz, C., and Martinez-Rivas, J.M., "Functional Characterization of Two 13-Lipoxygenase Genes from Olive Fruit in Relation to the Biosynthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil", *J. Agric. Food Chem.*, 57: 9097-9107 (2009).
- [434] Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., and Clark, B.J., "Gapdh as a Housekeeping Gene: Analysis of Gapdh Mrna Expression in a Panel of 72 Human Tissues.", *Physical Genomics*, 21(3): 389-395 (2005).
- [435] Alche, J.D., Butowt, R., Castro, A.J., and Rodriguez-Garcia, M.I., "Ubiquitin and Uniquitin-Conjugated Proteins in the Olive (*Olea Europaea* L.) Pollen.", *Sexual plant reproduction*, 12(5): 285-291 (2000).
- [436] McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., An, Y.-Q., and Meagher, R.B., "Structure and Evolution of the Actin Gene Family in *Arabidopsis Thaliana*", *Genetics*, 142: 587-602 (1996).
- [437] <http://www.megasoftware.net/>: (08.07.2012).

- [438] Lowry O., Rosebrough, R.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, 193(1): 265-275 (1951).
- [439] Arora, R., Peng, Y., Karlson, D., Reyes, J.L., and Covarrubias, A.A., "Physiology of Cold-Hardening in Rhododendron: Role of a Dehydrin Protein from R. Catawbiense (Rcdhn5) in Cryoprotection and Improving Freezing Tolerance", *J. Amer. Rhododendron Soc.*, 62(3): 153-158.
- [440] Jarzabek, M., Pukacki, P.M., and Nuc, K., "Cold-Regulated Proteins with Potent Antifreeze and Cryoprotective Activities in Spruces (Picea Spp.)", *Cryobiology*, 58: 268-274 (2009).
- [441] Carpenter, J.F. and Crowe, J.H., "The Mechanism of Cryoprotection of Proteins by Solutes", *Cryobiology*, 25: 244-255 (1988).
- [442] Bednarek, S.Y., Reynolds, T.L., Schroeder, M., Grabowski, R., Hengst, L., Gallwitz, D., and Raikhel, N.V., "A Small Gtp-Binding Protein from Arabidopsis-Thaliana Functionally Complements the Yeast Ypt6 Null Mutant", *Plant Physiology*, 104(2): 591-596 (1994).
- [443] John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A., and Grierson*, D., "Cloning and Characterization of Tomato Leaf Senescence-Related Cdnas", *Plant Molecular Biology*, 33(4): 641-651 (1997).
- [444] Muchhal, U.S., Pardo, J.M., and Raghothama, K.G., "Phosphate Transporters from the Higher Plant Arabidopsis Thaliana", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(19): 10519-10523 (1996).
- [445] Bucher, M., Brunner, S., Zimmermann, P., Zardi, G.I., Amrhein, N., Willmitzer, L., and Riesmeier, J.W., "The Expression of an Extensin-Like Protein Correlates with Cellular Tip Growth in Tomato", *Plant Physiology*, 128(3): 911-923 (2002).
- [446] Chevalier, C., Bourgeois, E., Pradet, A., and Raymond, P., "Molecular-Cloning and Characterization of 6 Cdnas Expressed During Glucose Starvation in Excised Maize (Zea Mays L) Root Tips", *Plant Molecular Biology*, 28(3): 473-485 (1995).
- [447] Swiderski, M.R., Zaborowska, Z., and Legocki, A.B., "Identification of New Nodulin Cdnas from Yellow Lupine by Differential Display", *Plant Science*, 151(1): 75-83 (2000).
- [448] Wu, Z.C. and Burns, J.K., "A Beta-Galactosidase Gene Is Expressed During Mature Fruit Abscission of 'Valencia' Orange (Citrus Sinensis)", *Journal of Experimental Botany*, 55(402): 1483-1490 (2004).
- [449] la Rosa, R., Angiolillo, A., Guerrero, C., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Bervillé, A., Martin, A., and Baldoni, L., "A First Linkage Map of Olive (Olea Europaea L.) Cultivars Using Rapd, Aflp, Rflp and Ssr Markers", *TAG*

Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik, 106(7): 1273-1282 (2003).

- [450] Poghosyan, Z.P., Haralampidis, K., Martsinkovskaya, A.I., Murphy, D.J., and Hatzopoulos, P., "Developmental Regulation and Spatial Expression of a Plastidial Fatty Acid Desaturase from *Olea Europaea*", *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(2): 109-119 (1999).
- [451] Poghosyan, Z.P., Giannoulia, K., Katinakis, P., Murphy, D.J., and Hatzopoulos, P., "Temporal and Transient Expression of Olive Enoyl-Acp Reductase Gene During Flower and Fruit Development", *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(1): 37-44 (2005).
- [452] Jope, C.A., Hira, A., and Wildman, S.G., "Evidence That the Amount of Chloroplast DNA Exceeds That of Nuclear DNA in Mature Leaves.", *Journal of Cell Biology*, 79: 631-636 (1978).
- [453] Lin, X.K.S., Rounsley, S., Shea, T.P., Benito, M.I., Town, C.D., Fujii, C.Y., Mason, T., Bowman, C.L., Barnstead, M., Feldblyum, T.V., Buell, C.R., Ketchum, K.A., Lee, J., Ronning, C.M., Koo, H.L., Moffat, K.S., Cronin, L.A., Shen, M., Pai, G., Van Aken, S., Umayam, L., Tallon, L.J., Gill, J.E., Adams, M.D., Carrera, A.J., Creasy, T.H., Goodman, H.M., Somerville, C.R., Copenhaver, G.P., Preuss, D., Nierman, W.C., White, O., Eisen, J.A., Salzberg, S.L., Fraser, C.M., and Venter, J.C., "Sequence and Analysis of Chromosome 2 of the Plant *Arabidopsis Thaliana*. ", *Nature*, 402: 731-732 (1999).
- [454] Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., and Kwallik, K.V., "Gene Transfer to the Nucleus and the Evolution of Chloroplasts.", *Nature*, 393: 162-165 (1998).
- [455] Chen, C.-M., Wang, C.-T., Lee, F.-M., and Ho, C.-H., "Construction and Characterization of a *Nicotiana Plumbaginifolia* Genomic Library in a Yeast Artificial Chromosome. ", *Plant Science*, 114: 159-169 (1996).
- [456] Baba, T., Katagiri, S., Tanoue, H., Tanaka, R., Ikeno, M., Ohta, T., Umehara, Y., Matsumoto, T., and Sasaki, T., "Construction and Characterization of Rice Genomic Libraries: Pac Library of Japonica Variety, Nipponbare and Bac Library of Indica Variety, Kasalath. ", *Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources*, 14: 41-52 (2000).
- [457] Bozok, K.R., Sirevag, Y., H., and Christoffersen, R.E., "Sequenece Analysis of Ripening-Related Cytochrome P-450 Cdnas from Avocado Fruit.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 3904-3908 (1990).
- [458] Paquette, S.M., Bak, S., and R., F., "Intron-Exon Organization and Phylogeny in a Large Superfamily, the Paralogous Cytochrome P450 Genes in *Arabidopsis Thaliana*", *DNA Cell Biology*, 19: 307-317 (2000).

- [459] Yoshida, Y., Noshiro, M., Aoyama, Y., Kawamoto, T., Horiuchi, T., and Gotoh, O., "Structural and Evolutionary Studies on Sterol 14-Demethylase P450 (Cyp51), the Most Conserved P450 Monoxygenase: Ii. Evolutionary Analysis of Protein and Gene Structures.", *J. Biochem (Tokyo)*, 122: 1122-1128 (1997).
- [460] Lamb, D.C., Kelly, D.E., and Kelly, S.L., "Molecular Diversity of Sterol 14 α -Demethylase Substrates in Plants, Fungi and Humans", *FEBS Letters*, 425: 263-265 (1998).
- [461] Helliwell, C.A., P.M., C., Poole, A., E.S., D., and Peacock, W.J., "The Cyp88a Cytochrome P450, Ent-Kaurenoic Acid Oxidase, Catalyzes Three Steps of the Gibberellin Biosynthesis Pathway", *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(2065-2070): (2001).
- [462] Bishop, G.J. and Koncz, C., "Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signalling", *Plant Cell*, 14: 97-110 (2002).
- [463] Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Asami, T., Nakano, A., Takatsuto, S., Fujioka, S., Y., E., and S., Y., "The Arabidopsis Cytochrome P450 Cyp707a Encodes Aba 8'-Hydroxylases : Key Enzymes in Aba Catabolism", *EMBOJ*, 23: 1647-1656 (2004).
- [464] Nebert , D.W. and Gonzalez, F.J., "P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation.", *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 945-993 (1987).
- [465] Nelson, D.R., "Cytochrome P450 and the Individuality of Species.", *Biochem. Biophys.*, 3691-10: (1999).
- [466] Rasmusson, A.G., Mendel-Hartvig, J., Moller, I.M., and Wiskich, J.T., "Isolation of the Rotenone-Sensitive Nadh-Ubiquinone Reductase (Complex I) from Red Beet Mitochondria", *Physiologia Plantarum*, 90(3): 607-615 (1994).
- [467] Luethy, M.H., Hayes, M.K., and Elthon, T.E., "Partial Purification and Characterization of Three Nad(P)H Dehydrogenases from Beta Vulgaris Mitochondria ", *Plant Physiol.*, 97: 1317-1322).
- [468] Knudten, A.F., Thelen, J.J., Luethy, M.H., and Elthon, T.E., "Purification, Characterization, and Submitochondrial Localization of the 32-Kilodalton Nadh Dehydrogenase from Maize", *Plant Physiol.*, 106(3): 1115-1122 (1994).
- [469] Luethy, M.H., Thelen, J.J., Knudten, A.F., and Elthon, T.E., "Purification, Characterization, and Submitochondrial Localization of a 58-Kilodalton Nad(P)H Dehydrogenase", *Plant Physiology*, 107(2): 443-450 (1995).
- [470] Brennicke, A., Klein, M., Binder, S., Koop, V., Grohmann, L., Malek, O., and Marchfelder, A., "Molecular Biology of Plant Mitochondria", *Naturwissenschaften*, 83(8): 339-346 (1996).

- [471] Wissinger, B., Brennicke, A., and Schuster, W., "Regenerating Good Sense: Rna Editing and Trans-Splicing in Plant Mitochondria.", *Trend Genetic*, 8: 322-328 (1992).
- [472] Schuster, W. and Brennicke, A., "The Plant Mitochondrial Genome: Physical Structure, Information Content, Rna Editing, and Gene Migration to the Nucleus", *Plant Physiol. Plant Mol. Bio*, 45: 61-78 (1994).
- [473] Ogawa, T., "A Gene Homologous to the Subunit-2 Gene of Nadh Dehydrogenase Is Essential to Inorganic Carbon Transport of Synechocystis Pcc6803", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4275-4279 (1991).
- [474] Zhou, D. and Bonen, L., "Characterization of the S7 Ribosomal Protein Gene in Wheat Mitochondria", *Mol. Gen. Genet.*, 236: 395-401 (1993).
- [475] Lin, X.K., Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Adams MD, Carrera AJ, Creasy TH, Goodman HM, Somerville CR, Copenhaver GP, Preuss D, Nierman WC, White O, Eisen JA, Salzberg SL, Fraser CM, and JC., V., "Sequence and Analysis of Chromosome 2 of the Plant Arabidopsis Thaliana. ", *Nature*, 402: 731-732 (1999).
- [476] Summer, E.J., Gill, J.J., Upton, C., Gonzalez, C.F., and Young, R., "Role of Phages in the Pathogenesis of Burkholderia, or 'Where Are the Toxin Genes in Burkholderia Phages?'.", *Current Opinion in Microbiology*, 10: 407-410 (2007).
- [477] Moustacchi, E. and Williams, D.H., "Physiological Variations in Satellite Components of Yeast DNA Detected by Density Gradient Centrifugation.", *Biochem Biophys Res Commun*, 23: 56-61 (1966).
- [478] Pardue, M.L. and Gall, J.G., "Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA.", *Science*, 168: 1356-1358 (1970).
- [479] Condit, R. and Hubbell, S.P., "Abundance and DNA Sequence of Two-Base Repeat Regions in Tropical Tree Genomes.", *Genome*, 34: 66-71 (1991).
- [480] Morgante, M. and Olivieri, A.M., "Pcr-Amplified Microsatellites as Markers in Plant Genetics.", *Plant J.*, 3: 175-182 (1993).
- [481] Wang, Z., Weber, J.L., Zhong, G., and Tanksley, S.D., "Survey of Plant Short Tandem DNA Repeats.", *Theor. Appl. Genet.*, 88: 1-6 (1994).
- [482] Park, Y.-J., Lee, J.K., and Kim, N.-S., "Simple Sequence Repeat Polymorphisms (Ssrps) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops.", *Molecules*, 14: 4546-4569 (2009).

- [483] Sefc, K.M., Lopes, M.S., Medoca, D., Rodrigez Dos Santos, M., Laimer Da Camara Machado, M., and Da Camara Machado, A., "Identification of Microsatellite Loci in Olive (*Olea Europaea*) and Their Characterization in Italian and Iberian Olive Trees.", *Mol. Ecol.*, 9: 1171-1173 (2000).
- [484] Cipriani, G., Marazzo, M.T., Marconi, R., and Cimato, A., "Microsatellite Markers Isolated in Olive (*Olea Europaea* L.) and Their Transferability to Other Genera in the Oleaceae.", *Theor Appl. Genet.*, 104: 223-228 (2002).
- [485] De La Rosa, R., James, C.M., and Tobutt, K.R., "Isolation and Characterization of Polymorphic Microsatellites in Olive (*Olea Europaea* L.) and Their Transferability to Other Genera in the Oleaceae.", *Mol. Ecol. Notes.*, 2: 265-267 (2002).
- [486] Alba, V., Montemurro, C., Sabetta, W., Pasqualone, A., and Blanco, A., "SSR-Based Identification Key of Cultivars of *Olea Europaea* L. Diffused in Southern-Italy.", *Scientia Hort.*, 123: 11-16 (2009).
- [487] Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., and Giorio, G., "Identification of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Olive (*Olea Europaea* L.)", *Theor Appl. Genet.*, 104: 301-307 (2002).
- [488] Barut, E., İpek, A., and Gülen, H., "Distribution of Olive (*Olea Europaea* L.) Genotypes in the Southern Marmara Region of Turkey.", *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1077-1080 (2009).
- [489] İpek, A., Barut, E., Gülen, H., Oz, A.T., Tangu, N.A., and İpek, N., "SSR Analysis Demonstrates That Olive Production in the Southern Marmara Region in Turkey Uses a Single Genotypes.", *Genet. Mol. Res.*, 8(4): 1264-1272 (2009).
- [490] Arimura, G., Ozawa, R., Shomoda, T., Nishioka, T., Boland, W., and Takabayashi, J., "Herbivory-Induced Volatile Elicitor Defense Genes in Lima Bean Leaves", *Nature*, 406: 512-515 (2000).
- [491] Kliebenstein, D.J., "Secondary Metabolites and Plant/Environment Interactions: A View through *Arabidopsis Thaliana* Tinted Glasses.", *Plant Cell Environ.*, 20: 675-684 (2004).
- [492] Wink, M., "Plant Breeding: Importance of Plant Secondary Metabolites for Protection against Pathogens and Herbivores.", *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik*, 75: 225-233 (1998).
- [493] Osbourn, A.E., Qi, X., Townsend, B., and Qin, B., "Dissecting Plant Secondary Metabolism-Constitutive Chemical Defense in Cereals.", *New Phytol.*, 159: 101-108 (2003).
- [494] Litvak, M.E. and Monson, R.K., "Patterns of Induced and Constitutive Monoterpene Production in Conifer Needles in Relation to Insect Herbivory.", *Oecologia*, 144: 531-540 (1998).

- [495] Biere, A., Marak, H.B., and Van Damme, M.M., "Plant Chemil Defense against Herbivores and Pathogens: Generalized Defense or Trade-Offs?", *Oecologia*, 140: 430-441 (2004).
- [496] Marri, L., Trost, P., Trivelli, X., Gonnelli, L., Pupillo, P., and Sparla, F., "Spontaneous Assembly by Photosynthetic Supramolecular Complexes as Mediated by the Intrinsically Unstructured Protein Cp12.", *J. Biol Chem.*, 283: 1831-1838 (2008).
- [497] Gracient, E., Gans, P., Wedel, N., Lebreton, S., Camadro, J.M., and Gontero, B., "The Small Protein Cp12: A Protein Linker for Supramolecular Complex Assembly.", *Biochemistry*, 42(81): 8163-8170 (2003).
- [498] Marri, L., Zaffagnini, M., Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Lemaire, S.D., and Pupillo, P., "Prompt and Easy Activation by Specific Thioredoxins of Calvin Cycle Enzymes of Arabidopsis Thaliana Associated in the Gapdh/Cp12/Prk Supramolecular Complex.", *Mol. Plant*, 2: 259-269 (2009).
- [499] Trost, P., Fermani, S., Marri, L., Zaffagnini, M., Falini, G., and Scagliarini, S., "Thioredoxin-Dependent Regulation of Photosynthetic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Autonomous Vs. Cp12-Dependent Mechanism.", *Photosynth Res.*, 89: 263-275 (2006).
- [500] Wedel, N., Soll, J., and Paap, B.K., "Cp12 Provides a New Mode of Light Regulation of Calvin Cycle Activity in Higher Plants.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10479-10484 (1997).
- [501] Wedel, N. and Soll, J., "Evolutionary Conserved Light Regulation of Calvin Cycle Activity by Nadph-Mediated Reversible Phosphoribulokinase/Cp12/Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase Complex Dissociation.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 9699-9704 (1998).
- [502] Massague, J., Blain, S.W., and Lo, R.S., "Tgf-Beta Signalling in Growth Control, Cancer and Heritable Disorders.", *Cell*, 103: 296-309 (2000).
- [503] Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and F., P., "Bzip Transcription Factors in Arabidopsis.", *Trends Plant Sci.*, 7: 106-111 (2002).
- [504] Jakoby, M., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., and Prcy, T.K.F., "Bzip Transcription Factors in Arabidopsis", *Trends Plant Sci.*, 7: 106-111 (2002).
- [505] Finkelstein, R. and Lynch, T., "The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene *Abi5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor", *Plant Cell*, 12: 599-609 (2000).
- [506] Andronis, C., Barak, S., Knowles, S.M., Sugano, S., and Tobin, E.M., "The Clock Protein *Cca1* and the Bzip Transcription Factor *Hy5* Physically

- Interact to Regulate Gene Expression in *Arabidopsis*", *Molecular Plant*, 1(1): 58-67 (2008).
- [507] Niu, X.P., Renshaw-Gegg, L., Miller, L., and Guiltinan, M.J., "Bipartite Determinants of DNA-Binding Specificity of Plant Basic Leucine Zipper Proteins", *Plant Molecular Biology*, 41: 1-13 (1999).
- [508] Kim, S.Y., mA, j., Perret, P., Li, Z., and Thomas, T.L., "Arabidopsis Abi5 Subfamily Memebres Have Distinct DNA-Binding and Transcriptional Activities", *Plant Physiology*, 130: 688-697 (2002).
- [509] Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., Echeverria, M., and Delseny, M., "Regulation of Arabidopsis Thaliana Em Gense: Role of Abi5", *Plant Journal*, 30: 373-383 (2002).
- [510] Kang, J.J., Choi, H.H., Im, M.M., and Kim, S.Y., "Arabidopsis Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signalling", *Plant Cell*, 14: 343-357 (2002).
- [511] Zou, M., Guan, Y., Ren, H., Zhang, F., and Chen, F., "Characterization of Alternative Splicing Products of Bzip Transcription Factors Osabi5", *Biochem Biophys Res Commun*, 360: 307-313 (2007).
- [512] Stankovic, B., Vian, A., Henry-Vain, C., and Davies, E., "Molecular Cloning and Characterization of a Tomato Cdna Encoding a Systematically Wound-Inducible Bzip DNA-Binding Protein.", *Planta*, 212: 60-66 (2000).
- [513] Torres-Schumann, S., Ringli, C., Heierli, D., Amrhein, N., and Keller, B., "In Vitro Binding of the Tomato Bzip Transcriptional Activator Vsf-1 to a Regulatory Element That Controls Xylem-Spesific Gene Expression", *Plant Journal*, 9: 283-296 (1996).
- [514] Tabata, T., Nakayama, T., Mikami, K., and Iwabuchi, M., "Hbp-1a and Hbp-1b: Leucine Zipper-Type Transcription Factors of Wheat", *EMBO J.*, 10: 1469-1467 (1991).
- [515] Shiota, H., Ko, S., Wada, S., Otsu, C.T., Tanaka, I., and Kamada, H., "A Carrot G-Box Binding Factor-Type Basic Region/Leucine Zipper Factor Dcbz1 Is Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in Somatic Embryogenesis", *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 550-558 (2008).
- [516] Magallon, S. and Sanderson, M.J., "Relationships among Seed Plants Inferred from Highly Conserved Genes: Sorting Conflicting Phylogenetic Signals among Ancient Lineages", *American journal of botany*, 89(12): 1991-2006 (2006).
- [517] Ort, D.R. and Yocum, C.F., "Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions", *Kluwer, Boston, Massachusetts, USA*: (1996).

- [518] Bernard, R.L. and Weiss, M.G., "Qualitative Genetics. In: Caldwell Be (Ed) Soybean: Improvement, Production, and Uses.", *American Society of Agronomy, Madison*: 117-154 (1973).
- [519] Todd, J.J. and Vodkin, L.O., "Pigmented Soybean (*Glycine Max*) Seed Coats Accumulate Proanthocyanidins During Development.", *Plant Physiology*, 102: 663-670 (1993).
- [520] Zabala, G. and Vodkin, L., "Cloning of the Pleiotropic Y Locus in Soybean and Two Recessive Alleles That Differentially Affect Structure and Expression of the Encoded Flavonoid 3' Hydroxylase.", *Genetics*, 163(295-309): (2003).
- [521] Kasai, A., Kasai, K., Yumoto, S., and Senda, M., "Structural Features of Gmirchs, Candidate of the I Gene Inhibiting Seed Coat Pigmentation in Soybean: Implications for Inducing Endogenous Rna Silencing of Chalcone Synthase Genes. ", *Plant Molecular Biology*, 64: 467-479 (2007).
- [522] Braam, J. and Davis, R.W., "Rain-, Wind-, and Touch-Induced Expression of Calmodulin Related Genes in Arabidopsis.", *Cell*, 60: 357-364 (1990).
- [523] Graham, J.S., Hall, G., Pearce, G., and Ryan, C.A., "Regulation of Synthesis Pf Proteinase Inhibitors I and Ii Mrnas in Leaves of Wounded Tomato Plants.", *Planta*, 169: 399-405 (1986).
- [524] Leon, J., Enrique, R., and Sanchez-Serrano, J.J., "Wound Signalling in Plants.", *J. Exper. Bot.*, 52: 1-9 (2001).
- [525] Schaller, A. and Ryan, C.A., "Molecular Cloning of a Tomato Leaf Cdna Encoding an Aspartic Protease, a Systemic Wound Response Protein.", *Plant Molecular Biology*, 31: 1073-10077 (1996).
- [526] Coker, J.S., Vian, A., and Davies, E., "Identification, Accumulation, and Functional Prediction of Novel Tomato Transcripts Systemically Upregulated after Fire Damage.", *Physiologia Plantarum*, 124: 311-322 (2005).
- [527] Holmgren, A. and Slaby, I., "Thioredoxin-C': Mechanism of Noncovalent Complementation and Reactions of the Refolded Complex and the Active Site Containing Fragment with Thioredoxin Reductase.", *Biochemistry*, 18 5591-5599 (1979.).
- [528] Koç, A., Karakaya, H.Ç., and al., e., "Evidence for the Presence of a Second Electron Donor for the Cytoplasmic Thioredoxins in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*", *Turk J Biol*, 30:: 133-138. (2006).
- [529] Ritossa, F., "A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and Dnp in *Drosophila*.", *Experientia*, 18: 571-573 (1962).

- [530] Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U., "Protein Synthesis in Salivary Glands of *Drosophila Melanogaster*: Relation to Chromosome Puffs.", *J. Mol. Biol.*, 84: 389-398 (1974).
- [531] Caplan, A.J., Cyr, D.M., and Douglas, M.G., "Eukaryotic Homologues of *Escherichia Coli* Dnaj: A Diverse Protein Family That Functions with Hsp70 Stress Proteins.", *Mol. Biol. Cell*, 4: 555-563 (1993).
- [532] Silver, P.A. and Way, J.C., "Eukaryotic Dnaj Homologs and the Specificity of Hsp70 Activity.", *Cell*, 74: 5-6 (1993).
- [533] Hattori, H., Kaneda, T., Lokeshwar, B., Laszlo, A., and Ohtsuka, K., "A Stress-Inducible 40-Kda Protein (Hsp40)- Purification by Modified 2 Dimensional Gel Electrophoresis and Co-Localization with Hsc70(P73) in Heat-Shocked Hela Cells.", *J. Cell Sci.*, 104: 629-638 (1993).
- [534] Robinson, N.G.G., Guo, L., Imai, J., Toh-e, A., Matsui, Y., and Tamanoi, F., "Rho3 of *Saccharomyces Cerevisiae*, Which Regulates the Actin Cytoskeleton and Exocytosis Is a Gtpase Which Interacts with Myo2 and Exo70", *Molecular and Cellular Biology*, 19(5): 3580-3587 (1999).
- [535] Madaule, P., Axel, R., and Myers, M., "Characterization of Two Members of the Rho Gene Family from the Yeast *Sacharomyces Cerevisia*.", *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 779-783 (1987).
- [536] Matsui, Y. and Toh-e, A., "Isolation and Characterization of Two Novel Ras Superfamily Genes in *Sacharomyces Cerevisia*", *Gene*, 114: 43-49 (1992).
- [537] TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., and Novick, P., "The Exocyst Is a Multiprotein Complex Required for Exocytosis in *Sacharomyces Cerevisiae*", *EMBO J.*, 15: 6483-6494 (1996).
- [538] Ferro-Novick, S. and Jahn, R., "Vesicle Fusion from Yeast to Man.", *Nature*, 370: 191-193 (1994).
- [539] Hong, J.P. and Kim, W.T., "Isolation and Functional Characterization of the Ca-Dreblp1 Gene Encoding a Dehydration-Responsive Element Binding-Factor-Like Protein 1 in Hot Pepper (*Capsicum Annuum* L. Cv. Pukang)", *Planta*, 20: 875-888 (2005).
- [540] Mizuno, S., Hirasawa, Y., Sonoda, M., Nakagawa, H., and Sato, T., "Isolation and Characterization of Three Dreb/Erf-Type Transcription Factor from Melon (*Cucumis Melo*).", *Plant Science*, 170: 1156-1163 (2006).
- [541] Nakano, T., Suzuki, K., Fujimuro, T., and Shinshi, H., "Genome-Wide Analysis of the Erf Gene Family in *Arabidopsis* and Rice.", *Plant Physiology*, 140: 411-432 (2006).

- [542] Qin, J., Zhao, J., Cao, Y., Ling, H., Sun, X., and Tang, K., "Isolation and Characterization of an Erf-Like Gene from *Gossypium Barbadosense*.", *Plant Science*, 167: 1383-1389 (2004).
- [543] Zhang, H.B., Huang, Z., Xie, B., Chen, Q., Tian, X., Zhang, X., Zhang, H., Lu, X., Huang, D., and Huang, R., "The Ethylene-, Jasmonate-, Abscisic Acid- and NaCl-Responsive Tomato Transcription Factor *Jerf1* Modulates Expression of Gcc Box-Containing Genes and Salt Tolerance in Tobacco.", *Planta*, 220: 262-270 (2004).
- [544] Henrissat, B. and Davies, G.J., "Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics.", *Plant Physiology*, 124: 1515-1519 (2000).
- [545] Lane, B., Kajioka, R., and Kennedy, T., "The Wheat Germ Ec Protein Is a Zinc-Containing Metallothionein.", *Biochem. Cell Biol.*, 65: 1001-1005 (1987).
- [546] Ledger, S.E. and Gardner, R.C., "Cloning and Characterization of Five Cdnas for Genes Differentially Expressed During Fruit Development of Kiwifruit (*Actinidia Deliciosa* Var. *Deliciosa*).", *Plant Molecular Biology*, 24: 877-886 (1994).
- [547] Zhou, G.K., Xu, Y.F., and Liu, J.y., "Characterization of a Rice Class II Metallothionein Gene: Tissue Expression Patterns and Induction in Response to Abiotic Factors.", *J. Plant Physiol*, 162: 686-696 (2005).
- [548] Garcia-Hernandez, M., Murphy, A., and Taiz, L., "Metallothioneins 1 and 2 Have Distinct but Overlapping Expression Patterns in *Arabidopsis*.", *Plant Physiology*, 118: 387-397 (1998).
- [549] Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A-H-Mackerness, S., and Buchanan-Wollaston, V., "Expression of Senescence Enhanced Genes in Response to Oxidative Stress.", *J. Exper. Bot.*, 54: 2285-2292 (2003).
- [550] Yu, L.H., Umeda, M., Liu, J.Y., Zhao, N.M., and Uchimiya, H., "A Novel Mt Gene of Rice Plants Is Strongly Expressed in the Node Portion of the Stem.", *Gene*, 206: 29-35 (1998).
- [551] Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y., and Yokota, A., "Potent Hydroxyl Radical-Scavenging Activity of Drought Induced Type-2 Metallothionein in Wild Watermelon.", *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 72-78 (2004).
- [552] Gisela, M., Ganai, M., Stephan, U.W., Goldsbrough, P., Atrian, S., and Molinas, M., "A Plant Type 2 Metallothionein (Mt) from Cork Tissue Responds to Oxidative Stress.", *J. Exper. Bot.*, 55: 2483-2493 (2004).
- [553] Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K., and Shimamoto, K., "Down-Regulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small Gtpase *Osrac1* in Rice.", *Plant Physiology*, 135: 1447-1456 (2004).

- [554] Coyle, P., Philcox, i.L.C., Carey, L.C., and Rofe, A.M., "Metallothionein: The Multipurpose Protein.", *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 627-647 (2002).
- [555] Guo, W.J., Bundithya, W., Goldsbrough, P.B., Atrian, S., and Molinas, M., "Characterization of the Arabidopsis Metallothionein Gene Family: Tissue Specific Expression and Induction During Senescence and in Response to Copper.", *New Phytol.*, 59: 369-381 (2003).
- [556] Evans, P.T. and Malmberg, R.L., "Do Polyamines Have Roles in Plant Development?", *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 40: 235-269 (1989).
- [557] Slocum, R.D. and Flores, H.E., "Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants.", *CRC Press Boca Raton FL*: (1991).
- [558] Pegg, A.E., "Recent Advances in the Biochemistry of Polyamines in Eukaryotes.", *Biochem. J.*, 234: 249-262 (1986).
- [559] Tabor, C.W. and Tabor, H., "Polyamines.", *Annu Rev Biochem.*, 53: 749-790 (1984).
- [560] Aubourg, S., Kreis, M., and Lecharny, A., "The Dead Box Rna Helicase Family in Arabidopsis Thaliana.", *Nucleic Acids Res.*, 27: 2152-2165 (1999).
- [561] Lorkovic, Z.J. and Barta, A., "Genome Analysis: Rna Recognition Motif (Rrm) and K Homology (Kh) Domain Rna-Binding Proteins from the Flowering Plant Arabidopsis Thaliana.", *Nucleic Acids Res.*, 30: 623-635 (2002).
- [562] Guy, C.L., "Cold Acclimation and Freezing Stress Tolerance: Role of Protein Metabolism.", *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 41: 187-223 (1990).
- [563] Bohnert, H.J., Nelson, D.E., and Jensen, R.G., "Adaptation to Environmental Stress.", *The Plant Cell*, 7: 1099-1111 (1995).
- [564] Somerville, C., "Directs Test of the Role of Membrane Lipid Composition in Low Temperature Induced Phoinhibition and Chilling Sensivity in Plant and Cyanobacteria", *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 739-743 (1995).
- [565] Kim, K.Y., Park, S.W., Chung, Y.S., Chung, C.H., Kim, J.I., and Lee, J.H., "Molecular Cloning of Low-Inducible Ribosomal Temperature in Proteins from Soybean", *Journal of Experimental Botany*, 55(399): 1153-1155 (2004).
- [566] Gallie, D., "Tha Cap and Poly (a) Tail Function Synergistically to Regulate Mrna Translational Efficiency.", *Genes Dev.*, 5: 2108-2116 (1991).
- [567] Hershey, J.W.B., "Translational Control in Mammalian Cells.", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 60: 717-755 (1991).
- [568] Tarun, S.Z.J. and Sachs, A.B., "A Common Function for Mrna 5' and 3' Ends in Translation Initiation in Yeast. ", *Genes and Dev.*, 9: 2997-3007 (1995).

- [569] Mader, S., Lee, H., Tabata, T., and Sonenberg, N., "The Translation Initiation Factor Elf-4e Binds to Common Motif Shared by the Translation Factor Elf-4e Gamma and the Translational Repressors 4e Binding Proteins.", *Mol. Cell Biol.*, 15: 4990-4997 (1995).
- [570] Imataka, H. and Sonenberg, N., "Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4g (Elf4g) Possesses Two Independent Binding Sites for Elf4a", *Mol. Cell Biol.*, 17: 6940-6947 (1997).
- [571] Kuroda, H., Takahashi, N., Shimada, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Matsui, M., "Classification and Expression Analysis of Arabidopsis F-Box Containing Protein Genes.", *Plant Cell Physiol*, 43(10): 1073-1085 (2002).
- [572] Flower, D.R., "The Lipocalin Protein Family: Structure and Function", *Biochem Journal*, 318: 1-14 (1996).
- [573] Bugos, R.C., Hieber, A.D., and Yamamoto, H.Y., "Xanthophyll Cycle Enzymes Are Members of the Lipocalin Family, the First Identified from Plants", *The journal of biological chemistry*, 274(25): 15321-15324 (1998).
- [574] Charron, F.J.B., Breton, G., Badawi, M., and Sarhan, F., "Molecular and Structural Analyses of a Novel Temperature Stress-Induced Lipocalin from Wheat and Arabidopsis", *FEBS Letters*, 517: 129-132 (2002).
- [575] Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and M., E., "Auxin Regulates Scf(Tir1)-Dependent Degradation of Aux/Iaa Proteins.", *Nature*, 414: 271-276 (2001).
- [576] Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G., "Coi1: An Arabidopsis Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility.", *Science*, 280: 1091-1094 (1998).
- [577] Samach A., Klenz, J.E., Kohalmi, S.E., Risseuw, E., Haughn, G.W., and Crosby, W.L., "The Unusual Floral Organs Gene of Arabidopsis Thaliana Is an F-Box Protein Required for Normal Patterning and Growth in the Floral Meristem.", *Plant Journal.*, 20: 433-445 (1999).
- [578] Nelson, D.C., Laswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., and Bartel, B., "Fkf1, a Clock-Controlled Gene That Regulates the Transition to Flowering in Arabidopsis.", *Cell*, 101: 331-340 (2000).
- [579] Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., and Kay, S.A., "Zeitlupe Encodes a Novel Clock-Associated Pas Protein from Arabidopsis. ", *Cell*, 101: 319-329 (2000).
- [580] Dieterle, M., Zhou, Y.C., Schafer, E., Funk, M., and Krestsch, T., "Eid1, an F-Box Protein Involved in Phytochrome a Specific Light Signalling.", *Genes Dev.*, 15: 939-944 (2001).

- [581] Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K., and Nam, H.G., "Ore9, an F-Box Protein That Regulates Leaf Senescence in Arabidopsis.", *Plant Cell*, 13: 1779-1790 (2001).
- [582] Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D., and Parker, J.E., "Regulatory Role of Sgt1 in Early R-Gene Mediated Plant Defenses.", *Science*, 295: 2077-2080 (2002).
- [583] Azavedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P., "The Rar1 Interactor Sgt1, an Essential Component of R Gene-Triggered Disease Resistance.", *Science*, 295: 2073-2076 (2002).
- [584] Shen, W.H., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Dong, A., Masson, J., Granier, F., Lepiniec, L., Estelle, M., and Genschik, P., "Null Mutation of Atcul1 Causes Arrest in Early Embryogenesis in Arabidopsis.", *Mol Biol Cell*, 13: 1916-1928 (2002).
- [585] Mladek, C., Guger, K., and Hauser, M.T., "Identification and Characterization of the Ariadne Gene Family in Arabidopsis. A Group Putative E3 Ligases.", *Plant Physiol*, 131: 27-40 (2003).
- [586] Ohlrogge, J.B., Kuhn, D.N., and Strumpf, P.K., "Subcellular Localization of Acyl Carrier Protein in Leaf Protoplasts of Spinacia Oleracea.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1194-1198 (1979).
- [587] Roughan, P.G., Holland, R., and Slack, C.R., "On the Control of Long-Chain Fatty Acid Synthesis in Isolated Intact Spinach (Spinacia Oleracea) Chloroplasts.", *Biochem. J.*, 184: 193-202 (1979).
- [588] Leung, K.-C., Li, H.-Y., Mishra, G., and Chye, M.-L., "Acbp4 and Acbp5, Novel Arabidopsis Acyl-Coa-Binding Proteins with Kelch Motifs That Bind Oleoyl-Coa", *Plant Molecular Biology*, 55: 297-309 (2004).
- [589] Knudsen, J., Jensen, M.V., Hansen, J.K., Faergeman, N.J., Neergaard, T.B., and Gaigg, B., "Yeast Acyl-Coa-Binding Protein: Acyl-Coa-Binding Affinity and Effect on Intracellular Acyl-Coa Pool Size.", *The Biochemical Journal*, 302: 479-485 (1999).
- [590] Suzui, N., Nakamura, S., Fujiwara, T., Hayashi, H., and Yoneyama, T., "A Putative Acyl-Coa-Binding Protein Is a Major Phloem Sap Protein in Rice (Oryza Sativa L.)", *Journal of Experimental Botany.*, 57(11): 2571-2576 (2006).
- [591] Lake, M.R., Williamson, C.L., and Slocum, R.D., "Molecular Cloning and Characterization of a Udp-Glucose-4-Epimerase Gene (Gale) and Its Expression in Pea Tissues.", *Plant Physiol. Biochem.*, 36(8): 555-562 (1998).
- [592] Oomen, R.J.F.J., Dao-Thi, B., Tzitzikas, E.N., Bakx, E.J., Schols, H.A., Visser, R.G.F., and Vincken, J.P., "Overexpression of Two Different Potato

Udp-Glc 4-Epimeases Can Increase the Galactose Content of Potato Tuber Cell Walls.", *Plant Science.*, 166: 1097-1104 (2004).

- [593] Citron, B.A. and Donelson, J.E., "Sequence of the *Saccharomyces Gal* Region and Its Transcription in Vivo.", *J. Bacteriol.*, 158: 269-278 (1984).
- [594] Daude, N., Gallaher, T.K., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., Petry, K.G., Haworth, I.S., and Reichardt, J.K., "Molecular Cloning, Characterization, and Mapping of a Full-Length Cdna Encoding Human Udp-Galactose 4-Epimerase.", *Biochem. Mol. Med.*, 56: 1-7 (1995).
- [595] Lemaire, H.G. and Müller-Hill, B., "Nucleotide Sequences of the *Gale* Gene and the *Galt* Gene of *E. Coli.*", *Nucl Acids Res*, 14: 7705-7711 (1986).
- [596] Rösti, J., Barton, C.J., Albrecht, S., Dupree, P., Pauly, M., Findlay, K., Reoberts, K., and Seifert, G.J., "Udp-Glucose 4-Epimerase Isoforms Uge2 and Uge4 Cooperate in Providing Udp-Galactose for Cell Wall Biosynthesis and Growth of *Arabidopsis Thaliana.*", *The Plant Cell*, 19: 1565-1579 (2007).
- [597] Henze, K., Schnarrenberger, C., Kellermann, J., and Martin, W., "Chloroplast and Cytosolic Triosephosphate Isomerase from Spinach: Purification, Microsequencing and Cdna Cloning of the Chloroplast Enzymes.", *Plant Molecular Biology*, 26: 1961-1973 (1994).
- [598] Dorion, S., Parveen, Jeukens, J., Matton, D.P., and Rivoal, J., "Cloning and Characterization of a Cytosolic Isoform of Triosephosphate Isomerase Developmentally Regulated in Potato Leaves.", *Plant Science.*, 168: 183-194 (2005).
- [599] Gottlieb, L.D., "Conservation and Duplication of Isozymes in Plants.", *Science*, 216: 373-380 (1982).
- [600] Fothergill-Gilmore, L.A. and M., M.P.A., "Evolution of Glycolysis.", *Progr Biophys Mol Bio*, 59: 373-380 (1993).
- [601] Kurzok, H.G. and Feirabend, J., "Comparison of a Cytosolic and a Chloroplast Triosephosphate Isomerase Isoenzyme from Rye Leaves. Ii. Molecular Properties.", *Biochim Biophys Acta*, 788: 214-221 (1984).
- [602] Marchionni, M. and Gilbert, W., "The Triosephosphate Isomerase Gene from Maize: Introns Antedate the Plant-Animal Divergence.", *Cell*, 46: 133-141 (1986).
- [603] Xu, Y., Harris-Haller, L.W., McCollum, J.C., Hardin, S. H., and Hall, T.C., "Nuclear Gene Encoding Cytosolic Triosephosphate Isomerase from Rice (*Oryza Sativa L.*)", *Plant Physiol*, 102: 697 (1993).
- [604] Shih, M., "Cloning and Sequencing of a Cdna Clone Encoding Cytosolic Triose Phosphate Isomerase from *Arabidopsis Thaliana.*", *Plant Physiol*, 194: 1103-1104 (1994).

- [605] Tang, G.-L., Wang, Y.-F., Bao, J.-S., and Chen, H.-B., "Overexpression in Escherichia Coli and Characterization of the Chloroplast Triosephosphate Isomerase from Spinach", *Protein expression and purification.*, 16: 432-439 (1999).
- [606] Ireland, H.M.M. and Bradbeer, J.W., "Plastid Development in Primary Leaves of Phaseolus Vulgaris", *Planta*, 96: 254-261 (1971).
- [607] Kurzok, H.G. and Feierabend, J., "Comparison of a Cytosolic and a Chloroplast Triosephosphate Isomerase Isoenzyme from Rye Leaves. I. Purification and Catalytic Properties.", *Biochim Biophys Acta*, 788: 214-221 (1984).
- [608] Kurzok, H.G. and Feierabend, J., "Comparison of a Cytosolic and a Chloroplast Triosephosphate Isomerase Isoenzyme from Rye Leaves. II. Molecular Properties and Phylogenetic Relationships.", *Biochim Biophys Acta*, 788: 222-233 (1984).
- [609] Roesler, K.R. and Ogren, W.L., "Nucleotide Sequence of Spinach Cdna Encoding Phosphoribulokinase. ", *Nucl Acids Res*, 16: 7192 (1988).
- [610] Lavee, S. and Wodner, M., "The Effect of Yield, Harvest Time and Fruit Size on the Oil Content in Fruits of Irrigated Olive Trees (Olea Europaea), Cvs. Barnea and Manzanillo", *Scientia Horticulturae*, 99(3-4): 267-277 (2004).
- [611] Conesa, A., Götz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M., "Blast2go: A Universal Tool for Annotation, Visualization and Analysis in Functional Geneomics Research.", *Bioinformatics*, 21(18): 3674-3676 (2005).
- [612] Conesa, A. and Götz, S., "Blast2go: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Geneomics.", *International Journal of Plant Genomics*, 2008: 1-12 (2008).
- [613] Li, Y.-P., Xia, R.-X., Wang, H., Li, X.C., Liu, Y.-Q., Wei, Z.-J., Lu, C., and Xiang, Z.-H., "Construction of a Full-Length Cdna Library From Chinese Oak Silkworm Pupa and Identification of a Kk-42-Binding Protein Gene in Relation to Pupa-Diapause Termination.", *Internal Journal of Biological Sciences.*, 5(5): 451-457 (2009).
- [614] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S., "Sosui: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins.", *Bioinformatics*, 14: 378-379 (1998).
- [615] Chandler, P.M. and Robertson, M., "Gene Expression Regulated by Abscisic Acid and Its Relation to Stress Tolerance.", *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 45: 113-141 (1994).

- [616] Asghar, R., Fenton, R.D., DeMason, D.A., and Close, T.J., "Nuclear and Cytoplasmic Localization of Maize Embryo and Aleurone Dehydrin. ", *Protoplasma*, 177: 87-94 (1994).
- [617] Puhakainen, T., Hess, M.V., Mäkela, P., Svenson, J., Heino, P., and Palva, E.T., "Overexpression of Multiple Dehydrin Genes Enhances Tolerance to Freezing Stress in Arabidopsis. ", *Plant Mol. Biol.*, 54: 743-753 (2004).
- [618] Close, T.J., "Dehydrins: Emergence of a Biochemical Role of a Family of Plant Dehydration Proteins", *Physiol Plant* 96: 795–803 (1996).
- [619] Epand, R.M., Shai, Y., Segrest, J.P., and Anantharamaiah, G.M., "Mechanisms for the Modulation of Membrane Bilayer Properties by Amphipathic Helical Peptides.", *Biopolymers*, 37: 319-338 (1995).
- [620] Svenson, J., Ismail, A.M., Palva, E.T., and Close, T.J., eds. *Dehydrins. In: Sensing, Signalling and Cell Adaptation.*, ed. K.B.a.S. Storey, J.M. . 2002, Elsevier Science B.V. 155-171.
- [621] Lang, V. and Palva, E.T., "The Expression of a Rab-Related Gene, Rab 18, Is Induced by Abscisic Acid During the Cold-Acclimation Process of Arabidopsis Thaliana (L.) Heynh.", *Plant Mol Biol*, 20: 951-962 (1992).
- [622] Arora, R. and Wisniewsk, M., "Accumulation of a 60-Kd Dehydrin Protein in Peach Xylem Tissues and Its Relationship to Cold Acclimation.", *Hortscience*, 31(6): 923-925 (1996).
- [623] Yamane, H., Kashiwa, Y., Kakehi, E., Yonemori, H.M., Hayashi, K., Iwamoto, K., Tao, R., and Kataoka, I., "Differential Expression of Dehydrin in Flower Buds of Two Japanese Apricot Cultivars Requiring Different Chilling Requirements for Bud Break.", *Tree Physiol*, 26: 1559-1563 (2006).
- [624] Close, T.J., "Dehydrins: Emergence of a Biochemical Role of a Family of Plant Dehydration Proteins.", *Physiol Plant*, 97: 795-803 (1997).
- [625] Mehta, P.A., Rebala, K.C., Venkataraman, G., and Parida, A., "A Diurnally Regulated Dehydrin from Avicennia Marina That Shows Nuclear-Cytoplasmic Localization and Is Phosphorylated by Casein Kinase II in Vitro.", *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 701-709 (2009).
- [626] Ingham, D.J., Beer, S., Money, S., and Hansen, G., "Quantitative Real-Time Pcr Assay for Determining Transgene Copy Number in Transformed Plants", *Biotechniques*, 31: 132-140 (2001).
- [627] Hoebeeck, J., Speleman, F., and Vandesompele, J., "Real-Time Quantitative Pcr as an Alternative to Southern Blot or Fluorescence in Situ Hybridization for Detection of Gene Copy Number Changes.", *Methods in Molecular Biology*, 353: 205-226 (2007).

- [628] Königshoff, M., Wilhelm, J., Bohle, R.M., Pingoud, A., and Hahn, M., "Her-2/Neu Gene Copy Number Quantified by Real Time Pcr; Comparison of Gene Amplification, Heterozygosity, and Immunohistochemical Status in Breast Cancer Tissue.", *Clinical Chemistry*, 49(2): 219-229 (2003).
- [629] Bodin, L., Beaune, P.H., and Loriot, M.A., "Determination of Cytochrome P450 2d6 (Cyp2d6) Gene Copy Number by Real Time Quantitative Pcr.", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2005(3): 248-253 (2005).
- [630] Lee, C., Lee, S., Shin, S.G., and Hwang, S., "Real-Time Pcr Determination of Rrna Gene Copy Number; Absolute and Relative Quantification Assays with Escherichia Coli", *Appl Microbial. Biotechnol.*, 78: 371-376 (2008).
- [631] Chung, E., Kim, S.Y., Yi, S.Y., and Choi, D., "Capsicum Annuum Dehydrin, an Osmotic-Stress Gene in Hot Pepper Plants", *Mol. Cells*, 15(3): 327-332 (2003).
- [632] Hinniger, C., Caillet, V., Michoux, F., Amor, M.B., Tanksley, S., Lin, C., and McCarthy, J., "Isolation and Characterization of Cdna Encoding Three Dehydrins Expressed During Coffea Canephora (Robusta) Grain Development.", *Annals of Botany*, 97: 755-765 (2006).
- [633] Mingeot, D., Dauchot, N., Van Cutsen, P., and Watillon, B., "Characterization of Two Cold Induced Dehydrin Genes from Cichorium Intbus L.", *Mol. Biol. Rep.*, 36: 1995-2001 (2009).
- [634] Arora, R., Peng, Y., Karlson, D., Reyes, J.L., and Covarrubias, A.A., "Physiology of Cold-Hardening in Rhododendron: Role of a Dehydrin Protein from R. Catawbiense (Rcdhn5) in Cryoprotection and Improving Freezing.", *Journal American Rhododendron Society.*, 62(3): 153-158 (2008).
- [635] Carpenter, J.F. and Crowe, J.H., "The Mechanism of Cryoprotection of Proteins by Solutes.", *Cryobiology*, 25: 244-255 (1988).
- [636] Hara, M., Terashima, S., and Kuboi, T., "Characterization and Cryoprotective Activity of Cold-Responsive Dehydrin from Citrus Unshiu", *J. Plant Physiol*, 158: 1333-1339 (2001).
- [637] Liu, X., Wnag, Y., Gao, H., and Xu, X., "Identification and Characterization of Genes Encoding Two Novel Lea Proteins in Antarctic and Temperate Strains of Chlorella Vulgaris", *Gene*, 482: 51-58 (2011).
- [638] Bozovic, V., "Cryoprotective Activity of Four Dehydrins Expressed in E. Coli and Their Influence on Thylakoid Membrane Permeability in Comparison to Cryoprotectin.", Published PhD Thesis, Institut für Pflanzenphysiologie, Mikrobiologie und Biochemie der Pflanzen-FU Berlin FU Berlin. (2007).
- [639] Kailis, S. and Harris, D., "Producing Table Olives.", Australia. Landlinks Press. (2007).

- [640] <http://www.zae.gov.tr/>.
- [641] Giordani, T., Natali, L., and Cavallini, A., "Analysis of a Dehydrin Encoding Gene and Its Phylogenetic Utility in Helianthus.", *Theor Appl. Genet.*, 107: 316-325 (2003).
- [642] Garcia-Banuelos, M.L. and Gardea, A.A., "Characterization of a Midwinter-Expressed Dehydrin (Dhn) Gene from Apple Trees (*Malus Domestica*)", *Plant Mol Biol Rep*, 27(4): 476-487 (2009).
- [643] Sarnighausen, E., Karlson, D.T., Zeng, Y., Goldsbrough, P.B., Raghobhama, K.G., and Ashworth, E.N., "Characterization of a Novel Ynskn Class of Dehydrin-Like Cdnas from Cold Acclimated Red-Osier Dogwood (*Cornus Sericea* L.) Xylem", *Journal of Crop Improvement*, 10: 17-35 (2004).

EKLER

6. EKLER

6.1 EK A Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar

1. Suakar, Ö., ve Dündar E. 2010 "Zeytin genomundan yeni SSR dizilerinin tespiti ve çeşit ayırımında kullanımı " 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, DENİZLİ
2. Akgün, Ş., Dündar E., ve Suakar, Ö. 2010 "Benzersiz bir zeytin mRNA dizisinin klonlanması ve moleküler karakterizasyonu " 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, DENİZLİ
3. Çetin, G., Suakar, Ö., ve Dündar, E., 2010 "Zeytin tahminin tiyoredoksin geninin moleküler karakterizasyonu ve biyoinformatik analizi" 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, DENİZLİ
4. Söngü, Ş., Suakar, Ö., ve Dündar E., 2010 "Zeytinde tahmini DNAJ geninin klonlanması ve moleküler karakterizasyonu" 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, DENİZLİ
5. Suakar, Ö., ve Dündar E. 2010 "Zeytinde periyodisite ile ilgili adaptif genlerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu" 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, DENİZLİ
6. Suakar, Ö., ve Dündar E., 2010 "Zeytin tahmini dehidrin geninin moleküler ve fizyolojik analizi " 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, DENİZLİ
7. Dündar, E., Suakar, O., Akgun, S. 2010 Zeytinde periyodisite ve meyve dokumu ile ilgili aday genlerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. ANTALYA

8. Suakar, Ö. ve Dündar, E. 2008 Zeytin Genomunun Gen Yoğunluğu Hakkında Yeni İpuçları. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, TRABZON.
9. Suakar, Ö. ve Dündar, E. 2012 Zeytin Dehidrin Geninin, (*OeDhn*) Moleküler, Biyoinformatik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. ANTALYA
10. Dündar, E., Sönmez, H.G. D., Suakar, O. Zeytin Tahmini Hastalık Direnç Cevap Geninin İzolasyonu ve Bioinformatik Analizi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. ANTALYA

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Dündar, E., and Suakar, Ö., 2010, Mining olive genome through library sequencing and bioinformatics: Novel sequences and new microsatellites. African Journal of Biotechnology Vol. 9, (17), pp. 2499-2509