



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



DOKTORA TEZİ

***Agrobacterium tumefaciens* ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ KONAK
FAKTÖRLERİN ARPA (*Hordeum vulgare* L.) BİTKİLERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Nadia EL SARRAF

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL**

Haziran, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



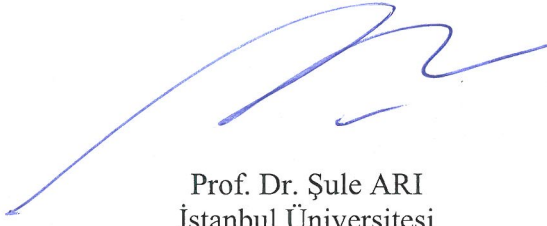
Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ
Gebze Teknik Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 20134 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik hayatım boyunca bana her aşamada yol gösteren ve destek olan, tez çalışmam süresince değerli eleştirilerde ve değerlendirmelerde bulunan danışmanım Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL'e özel saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez süresince değerli zamanlarını ayıran ve tavsiyelerde bulunan tez izleme jüri üyeleri Doç. Dr. Bedia PALABIYIK ve Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Başkanı Prof. Dr. Nazli ARDA ve öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen bitki biyoteknolojisi grubundan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Cunevt UÇARLI, Dr. Feyza TUFAN, Dr. F. ELİF ÇEPNİ YÜZBAŞIOĞLU, ve Burcu KARAHALİL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım Dr. Sevgi MARAKLI, Yunus AKSUT, ve Onur DOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı 20134 numaralı proje ile maddi destek veren İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Bana destek ve güç veren sevgili eşim Elie NASR'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve eğitimimdeki en büyük destekçilerim olan sevgili ve saygıdeğer ebeveynlerim Carmen-Lourdes ve Georges EL SARRAF'a, Amcam Zeki EL SARRAF'a, halalarım Rahmé EL SARRAF-FARFOUR ve Samar EL SARRAF'a, kardeşlerim Zeki, Michel, Cesar ve Fadi EL SARRAF'a en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu tezi, Babaannem Nadia ve ailemizin vaftiz babası olan başpiskopos Paul Bandali'ye adadım.

Haziran 2018

Nadia EL SARRAF

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xiv
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BİTKİ GENETİK TRANSFORMASYONUNA GENEL BAKIŞ.....	3
2.2. ARPA (<i>HORDEUM VULGARE</i> L.)	5
2.3. AGROBACTERIUM CİNSİ	6
2.4. AGROBACTERIUM TUMEFACIENS'İN BİYOLOJİSİ	7
2.4.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Bitki Transformasyonu	8
2.5. AGROBACTERIUM-ARACILI TRANSFORMASYON İLE İLGİLİ KONAK FAKTÖRLERİ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
2.5.1. Vir Protein/T-DNA İçerik Aktarım Sürecine Aracılık Eden Faktörler	11
2.5.2. T-DNA Kromatin Hedeflemesine Aracılık Eden Konak Faktörleri.....	12
2.6. VIP1'İN GENETİK TRANSFORMASYONA KATKISI	16
2.6.1. VIP1 Konak Faktörünün Yapısal ve İşlevsel Özellikleri	16
2.6.2. Transformasyon ve Stres Düzenlemesinde VIP1'in İkili Rolü	17
2.6.3. VIP1 Tarafından Düzenlenen Genler	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	20
3.2. ARPA'DA VIRE2 İLE ETKİLEŞEN VIP1 PROTEİNİNİN TANIMLANMASI.....	21
3.2.1. Arpa Genomunda VIP1'İN Araştırılması.....	21
3.2.2. <i>HvVIP1</i> 'in Çoğaltılması ve Klonlanması	22
3.2.3. VIP1-Taşıyan Plazmitlerin İzolasyonu.....	24
3.2.4. Dizi Analizleri	25
3.3. ARPA'DA XRCC4 PROTEİNİNİN TANIMLANMASI.....	25

3.4. <i>HvVIP1</i> 'İN DOKU-SPESİFİK GEN ANLATIMI	26
3.5. BİYOTİK VE ABİYOTİK STRES ALTINDA <i>HvVIP1</i> GEN ANLATIMI	26
3.5.1. Kuraklık Şoku Stresi.....	26
3.5.2. Tuzluluk Stresi.....	27
3.5.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Enfeksiyonu.....	27
3.5.4. <i>Fusarium culmorum</i> Enfeksiyonu	29
3.6. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ	30
3.6.1. Total RNA İzolasyonu.....	31
3.6.2. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi	32
3.6.3. Gen Anlatımlarının Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile Belirlenmesi	32
3.6.4. qPCR ile Gen Anlatımı Analizleri.....	33
3.6.5. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. ARPADA <i>HvVIP1</i> TANIMLANMASI	37
4.1.1. <i>HvVIP1</i> Dizi Analizi.....	37
4.1.2. VIP1-Benzeri Proteinlerin Moleküler Filogenisi	38
4.1.3. VIP1 Proteinin Yapısal Özellikleri.....	41
4.1.4. <i>HvVIP1</i> Gen Modeli	42
4.1.5. <i>HvVIP1</i> Tam Uzunluktaki Kodlama Dizisi	43
4.2. ARPADA <i>HvXRCC4</i> TANIMLANMASI	44
4.2.1. <i>HvXRCC4</i> Dizi Analizi.....	44
4.2.2. XRCC4-Benzeri Proteinlerin Moleküler Filogenisi	46
4.3. <i>HvVIP1</i> ANLATIMININ ANALİZİ	47
4.3.1. Arpa'da Doku-Spesifik <i>HvVIP1</i> Anlatım Analizi	47
4.3.2. Abiyotik Stres Koşulları Altında Gen Anlatım Analizi	49
4.3.2.1. Dehidrasyon Şoku Altındaki <i>HvVIP1</i> Geninin Anlatım Analizi	49
4.3.2.2. Tuzluluk Stresi Altındaki <i>HvVIP1</i> Geninin Anlatım Profili.....	51
4.3.3. Biyotik Stres Altında Gen Anlatım Analizi.....	53
4.3.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Enfeksiyonu Altında <i>HvVIP1</i> Gen Anlatımı	53
4.3.3.2. <i>Fusarium culmorum</i> Enfeksiyonunda <i>HvVIP1</i> Gen Anlatımı.....	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	73
EKLER	87
EK 1. Martı çeşidinde <i>HvVIP1</i> dizisi	87

EK 2. VIP1-benzeri proteinler listesi	88
EK 3. Arpada VIP1 genomik dna dizisi (morex data base, mloc_71198).	90
EK 4. VIP1-benzeri proteinlerinin dizi karşılaştırmaları	93
EK 5. XRCC4-benzeri proteinler listesi.....	95
EK 6. XRCC4-benzeri proteinlerinin dizi karşılaştırmaları.....	97
ÖZGEÇMİŞ	99



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Tümör indükleyici plazmidin yapısal özellikleri (pTi) (Christie, 2014) - Mikrobiyoloji Danışma Ansiklopedisi). (I) enfeksiyona (T-DNA ve vir bölgesi) katkıda bulunan pTi bölgeleri; (ii) tümör ortamında hücre hayatta kalma (opin katabolizma bölgesi); (iii) pTi'nin alıcı *Agrobacterium*'a (tra ve trb bölgeleri) konjugal transferi. Bitkilerdeki oksinler, sitokininler ve opinler için 25 bç'lik diziler (Siyah ok) kodları ile sınırlanan T-DNA bölgesi; OD ("Overdrive" bölgesi), T-DNA sınır dizilerinde VirD2'den bağımsız işlemeyi geliştirir. 9
- Şekil 2.2:** Bitki hücresinde T-DNA/Vir protein kompleksinin oluşması. Bakteriyel T4SS ile T-DNA ve Vir proteinleri hücrenin sitoplazmik boşluğuna taşınır ve burada T-kompleksini (virE2-VirD2-T-DNA) oluştururlar. T-DNA daha sonra konak hücre nükleusuna yönlendirilir ve nükleusa girer. Farklı bir rekombinasyon süreci sergileyerek konak kromozomlarına entegre edilir. 12
- Şekil 2.3:** Bakteriyel ve konak hücre proteinleri arasındaki etkileşim. Konakçı faktörler mavi renkte belirtilmiştir; kırmızı daire içine alınmış proteinler T-ipliği ile doğrudan ilişkili olan bakteri efektörleridir. 14
- Şekil 3.1:** Her iki çeşitindeki embriyogenik kalluslar (8 haftalık). (A) Martı ve (B) Golden Promise, *Agrobacterium* AGL-1 suşu ile enfekte edilmeden önce, karanlıkta 2.5 mg/L Dicamba ile desteklenmiş MS besiyerinde yetiştirilmiştir. 28
- Şekil 3.2:** Embriyogenik kalluslar (4 haftalık) ko-kültivasyon ortamına alınmadan önce kaplarda bulunan 10 mL aşılama ortamına (IM) 30 dakika boyunca daldırılarak karanlıkta oda sıcaklığında tutulmuştur. 29
- Şekil 3.3:** Kontrol ve *F. culmorum* (F16) ile enfekte Martı kökleri (MR) (Tufan ve diğ., 2016). 30
- Şekil 4.1:** *H. vulgare* cv. Martı'da HvVIP1'in 972 bç'lik tam uzunluktaki cDNA dizisi. Yeşil renkte vurgulanan dizinin başında ve sonunda işaretlenmiş kısımlar Başlat ve Dur kodonlarıdır; 115., 204., 872., 896. bç pozisyonlarındaki dört SNP ise sarı renk ile vurgulanmaktadır. 37
- Şekil 4.2:** HvVIP1 proteininin dizisi. bZIP alanı, 157. amino asitte başlar ve 223. bakiyede sona erer. Bazik bölge içinde (i) 165 ve 183. bakiyeler arasında bipartit NLS (KR-X11-K (KR) -X- (K/R)); (ii) 170 ve 178. bakiyeler arasında N-X7-R/K olarak bilinen DNA bağlama bölgesi; (iii) bazik bölgenin sonunu işaret eden 6 amino asitin (açık mavi) bağlantı bölgesi yer alır. Yaklaşık beş heptad lösin tekrarından oluşan Lösin Fermuar bölgesi 187. bakiyede başlar ve 223. bakiyede sona erer. Korunmuş Lösin bakiyeleri (L) sarı renkle işaretlenmiştir ve altı amino asitlik (X6) enterkalasyon yeşil renkte vurgulanmıştır. 79. pozisyondaki serin bakiyesi (S), HvVIP1 proteininin fosforil aktivasyonunu işaret etmektedir. 38

Şekil 4.3: Çeşitli homolog bitki proteinlerinin (ClustalW 2.0) VIP1 bZIP domenlerinin dizi karşılaştırmaları. HvVIP1'in bZIP domeni clustalW algoritması-EMBL-EBI/MUSCLE kullanılarak <i>Oryza sativa</i> (OsVIP1), <i>Brachypodium distachyon</i> (BdVIP1), <i>Hordeum vulgare</i> [tahmini klon HvVIP1 (erişim numarası: BAJ96285.1) ve bizim tahmini HvVIP1_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır] <i>Triticum aestivum</i> (TaVIP1), <i>Oryza brachyantha</i> (ObVIP1), <i>Sorghum bicolor</i> (SbVIP1), <i>Setaria italica</i> (SiVIP1) ve <i>Zea mays</i> (ZmVIP1)'deki homologlarının benzer motifleri ile karşılaştırılmıştır. Burada (i) bazik bölge mor renkte vurgulanmıştır, (ii) bazik bölge içindeki bipartit (iki parçalı) NLS hemen dizinin altında siyah renkli yatay bir çubuk ile gösterilmiştir, (iii) bazik bölge içerisindeki korunmuş N-X7-K/R motifi dizinin üzerindeki siyah renkli yatay bir çubuk ile gösterilmiştir, (iv) Lösın-Fermuar bölgesi (yedi lösın heptatı) sarı/yeşil ile vurgulanmıştır, (v) bZIP domeni içindeki SNP'ler tek tek işaretlenmiş ve AtVIP1'e göre tanımlanmıştır. Tamamen korunmuş bakiyeleri (*), daha az korunmuş bakiyeler ise (:) ve (.) ile gösterilmiştir.	39
Şekil 4.4: VIP1 benzeri proteinlerin maksimum likelihood yöntemi ile moleküler filogenetik analizi. <i>Oryza sativa</i> (OsVIP1), <i>Brachypodium distachyon</i> (BdVIP1), <i>Hordeum vulgare</i> [tahmini klon HvVIP1 (erişim numarası: BAJ96285.1) ve bizim tahmini HvVIP1_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır], <i>Triticum aestivum</i> (TaVIP1), <i>Oryza brachyantha</i> (ObVIP1), <i>Sorghum bicolor</i> (SbVIP1), <i>Setaria italica</i> (SiVIP1), <i>Zea mays</i> (ZmVIP1) ve <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtVIP1)'de VIP1'e ait amino asit dizileri karşılaştırılmıştır. Mavi düğümler varsayılan ataları; Kırmızı düğüm ise tarihsel nihai ortak atayı temsil eder.	40
Şekil 4.5: IntFOLD sunucusundan elde edilen tam uzunlukta <i>Hordeum</i> dizisini kullanan 3D model (McGuffin ve diğ., 2015). bZIP transkripsiyon faktörü domaini, Pfam'a göre 160-221. aa'ler arasındadır. DISOclust'a göre sıralı bölge ise 146-257. aa'ler arasındadır.	41
Şekil 4.6: DISOclust'tan tam uzunluktaki <i>Hordeum</i> dizisinin intrinsek bozuk tahmin profili McGuffin (2008).	42
Şekil 4.7: IntFOLD sunucusundan elde edilen <i>Hordeum vulgare</i> 'nin 146-257. aa'ler arası bölgesinin 3D modeli (McGuffin ve diğ., 2015).	42
Şekil 4.8: HvVIP1'in tahmini gen modeli. bZIP alanı bazik bölge, Ekson 1 ve 2 (E-1 ve E-2) arasında uzanır. Bazik bölge içinde bipartit (iki parçalı) NLS (yıldızlar arası) ve korunmuş DNA bağlanma motifi (N-X7-R/K) bulunmaktadır. Lösın Fermuar domeni ise ekson 2 ve 3 (E-2 ve E-3) üzerinde bulunur.	43
Şekil 4.9: NCBI veritabanı içinde tanımlanan <i>HvVIP1</i> tam uzunluktaki kodlama dizisi.	44
Şekil 4.10: <i>H. vulgare</i> cv. Martı'da <i>HvXRCC4</i> 'un 843 bç'lik tam uzunluktaki cDNA dizisi; 682., 729., 769., 774. bç pozisyonlarındaki dört SNP ise sarı renk ile vurgulanmaktadır.	45
Şekil 4.11: HvXRCC4 proteininin dizisi.	45

Şekil 4.12: XRCC4 benzeri proteinlerin maksimum likelihood yöntemi ile moleküler filogenetik analizi. <i>Oryza sativa</i> (OsXRCC4), <i>Brachypodium distachyon</i> (BdXRCC4), <i>Hordeum vulgare</i> [tahmini XRCC4 (erişim numarası: BAJ89333.1) ve bizim tahmini HvXRCC4_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır], <i>Triticum aestivum</i> (TaXRCC4), <i>Oryza brachyantha</i> (ObXRCC4), <i>Sorghum bicolor</i> (SbXRCC4), <i>Zea mays</i> (ZmXRCC4) ve <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtXRCC4)'da XRCC4'e ait amino asit dizileri karşılaştırılmıştır. Mavi düğümler varsayılan ataları; Kırmızı düğüm ise tarihsel nihai ortak atayı temsil eder.....	47
Şekil 4.14: <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın yaprak, kök, olgunlanmamış embriyo, kallus ve koleoptil dokularındaki <i>HvVIP1</i> mRNA seviyelerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.15: Kuraklık stresi etkisindeki <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki <i>HvVIP1</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P<0,05$; *** $P<0,001$).....	50
Şekil 4.16: Kuraklık stresi etkisindeki <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki <i>HvBAS1</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P<0,05$; *** $P<0,001$).....	50
Şekil 4.17: Tuz stresi etkisindeki <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki <i>HvVIP1</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$).....	51
Şekil 4.18: Tuz stresi etkisindeki <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök ve yaprak dokularındaki <i>HvVIP1</i> görelî mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (*** $P<0,001$).....	52
Şekil 4.19: Tuz stresi etkisindeki <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki <i>HvBAS1</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (** $P<0,01$; *** $P<0,001$).....	52
Şekil 4.20: <i>A. tumefaciens</i> (AGL-1 suşu) ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cvs. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki <i>HvVIP1</i> görelî mRNA seviyelerinin ilgili zamanlara göre karşılaştırılması (* $P<0,05$; *** $P<0,001$).....	54
Şekil 4.21: <i>A. tumefaciens</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki <i>HvPR1</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (*** $P<0,001$).....	55
Şekil 4.22: <i>A. tumefaciens</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cvs. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki <i>HvPR4</i> mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (* $P<0,05$; *** $P<0,001$).....	56
Şekil 4.23: <i>A. tumefaciens</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cvs. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki <i>HvPR10</i> görelî mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (*** $P<0,001$).....	57
Şekil 4.24: <i>A. tumefaciens</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cvs. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki <i>HvBAS1</i> mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (** $P<0,01$; *** $P<0,001$).....	58

Şekil 4.25: <i>A. tumefaciens</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cvs. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki <i>HvMPK3</i> mRNA seviyelerinin zamana göre karşılaştırılması ($*P < 0,05$; $***P < 0,001$).	58
Şekil 4.26: <i>F. culmorum</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök dokularındaki <i>HvVIP1</i> 'nin görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($***P < 0,001$).	59
Şekil 4.27: <i>F. culmorum</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök dokularında <i>HvPRI</i> 'nin görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($*P < 0,05$).	60
Şekil 4.28: <i>F. culmorum</i> ile aşılamaadan sonra Martı köklerinde <i>HvVIP1</i> ve <i>HvPRI</i> anlatım profilleri arasındaki karşılaştırmalı analiz.	60
Şekil 4.29: <i>F. culmorum</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök dokularındaki <i>HvPR4</i> 'ün görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($**P < 0,01$; $***P < 0,001$).	61
Şekil 4.30: <i>F. culmorum</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök dokularındaki <i>HvPR10</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($*P < 0,05$; $**P < 0,01$).	62
Şekil 4.31: <i>F. culmorum</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök dokularındaki <i>HvBAS1</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($**P < 0,01$; $***P < 0,001$).	62
Şekil 4.32: <i>F. culmorum</i> ile enfekte edilen <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Martı'nın kök dokularındaki <i>HvMPK3</i> görelî mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($**P < 0,01$; $***P < 0,001$).	63

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Arpa'nın sınıflandırılması (NRCS, 2017).	5
Tablo 2.2: 2016 yılına ait Dünya ve Türkiye'deki Arpa üretimi verileri (FAO, 2017).	6
Tablo 2.3: <i>Agrobacterium</i> cinsinin taksonomisi (Garrity ve diğ., 2004) - Prokaryotların taksonomisinin ana hatları, Bergey'nin sistematik bakteriyolojinin el kitabından).	7
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan arpa çeşitleri ve özellikleri.	20
Tablo 3.2: Hoagland solüsyonunun içeriği.	21
Tablo 3.3: 1X Murashige ve Skoog ortam bileşenleri.	21
Tablo 3.4: RT-PCR'de kullanılan VIP1 geni için tasarlanan primer dizileri ve özellikleri.	22
Tablo 3.5: PCR'da kullanılan bileşenler.	23
Tablo 3.6: PCR koşulları.	23
Tablo 3.7: Bakteri geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri Luria Bertani (LB) besiyeri.	23
Tablo 3.8: Klonlamada kullanılan ligasyon karışımı.	24
Tablo 3.9: PCR'de kullanılan <i>XRCC4</i> geni için tasarlanan primer dizileri ve özellikleri.	26
Tablo 3.10: <i>F. culmorum</i> 'un geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	29
Tablo 3.11: İlk aşama olarak cDNA sentezinde kullanılan bileşenler.	32
Tablo 3.12: İkinci aşama olarak cDNA sentezinde kullanılan bileşenler.	32
Tablo 3.13: RT-PCR'de kullanılan bileşenler.	33
Tablo 3.14: RT-PCR reaksiyon koşulları.	33
Tablo 3.15: Agaroz jel hazırlığında ve elektroforezinde kullanılan tampon içerikleri.	33
Tablo 3.16: qPCR'de kullanılan genler, tasarlanan primer dizileri ve özellikleri.	34
Tablo 3.17: 2X çalışma solüsyonunun hazırlanması.	35
Tablo 3.18: qPCR'de kullanılan bileşenler.	35

Tablo 3.19: qPCR reaksiyon koşulları.....	35
Tablo 4.1: İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları.	48



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
Kb	: Kilobaz
L	: Litre
Mb	: Megabaz
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nmol	: Nanomol
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

ACT	: Aktin
ANOVA	: Varyans Analizi
BAS1	: 2-Sistein Peroksiredoksin
Bç	: Baz Çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bZIP	: Temel Leucine Fermuarı Alanı
cDNA	: Komplementer DNA
CTD	: C-Terminal Domain
dH ₂ O	: Distile Su
dNTP	: Deoksiribonükleotit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
E value	: Beklenen Değer

EMBL-EBI	: European Bioinformatics Institute
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
HR	: Homolog Rekombinasyon
IM	: Inoculation Medium
KŞ	: Kuraklık Şoku
LB	: Luria Bertani
MMEJ	: Microhomology-Mediated End Joining
MPK3	: Mitojenle Aktive Protein Kinaz 3
MUSCLE	: Multiple Sequence Comparison By Log-Expectation
MS	: Murashige ve Skoog Besiyeri
NaCl	: Sodyum Klorür
NHEJ	: Non-Homologous End Joining
NOT	: TATA'sız Negatif Domen
NCBI	: National Center For Biotechnology Information
NRCS	: National Resources Conservation Service
NLS	: Nuclear Localisation Signal
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pTi	: Tümör İndükleyici Plazmit
PR	: Patogenezle İlişkili
q-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
VIP	: VirE2-Interacting Protein
VIP1	: VirE2-Interacting Protein 1
VIP2	: VirE2-Interacting Protein 2
Vir	: Virülens
VRE	: VIP1 Yanıt Elementleri
XRCC4	: X-Ray Repair Cross Complementing 4

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***Agrobacterium tumefaciens* ENFEKSİYONU İLE İLİŞKİLİ KONAK FAKTÖRLERİN ARPA (*Hordeum vulgare* L.) BİTKİLERİNDE ARAŞTIRILMASI**

Nadia EL SARRAF

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL

Bitkide *Agrobacterium*-aracılı genetik transformasyon hem temel hem de uygulamalı bitki biyolojisi araştırmaları açısından büyük önem taşımaktadır. Model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'da *Agrobacterium* transformasyonu ile ilişkili birçok konak proteinin olduğu ortaya çıkmıştır. “VirE2-Interacting Protein 1” (VIP1) enfeksiyon sırasındaki antagonistik rolü nedeniyle en önemli faktörlerden biridir. VIP1 proteininin, T-DNA'yı konakçı diziye entegrasyonuna rehberlik ederek bitkide genetik transformasyonu teşvik etmesinde ve konakçı genomu stres sinyalizasyonun düzenlenmesinde rolü vardır. Ancak VIP1'in nasıl bu kadar farklı fonksiyonlarda görev alabildiği hâlâ bilinmemektedir.

Bu tezde *Agrobacterium*-aracılı genetik transformasyona dirençli olduğu bilinen arpa bitkisinde VIP1 ve T-DNA'nın genomik entegrasyonunda rol oynayan XRCC4 proteinlerinin moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır. Arpadaki VIP1 ve XRCC4 proteinlerini kodlayan cDNA dizileri belirlenmiş (VIP1: NCBI aksesyon no: MG000155) ve VIP1'in dokuya özgü anlatım seviyeleri normal ve stres koşulları altında incelenmiştir. Dizileme sonuçlarına göre proteinin 157. ve 223. amino asit bakiyeleri arasında korunmuş bZIP domeni bulunmaktadır ve bundan dolayı *HvVIP1* bZIP transkripsiyon faktör ailesinin altgrup I'in bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır. AtVIP1 ile karşılaştırmalı analizde, *HvVIP1* bZIP domen dizisinde 13 sinonim olmayan SNP olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Arabidopsis* ve 8 monokotil bitki ile yapılan filogenetik analizler ve evrimsel uzaklık hesaplamaları *HvVIP1* ve *TaVIP1*'nin en

yakın ortak ataya sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan 3D modelleri, yapısal domen tahminleri ve düzensizlik (“disorder”) tahmin profil testleri *Arabidopsis* ve arpa VIP1 proteinleri arasında bZIP lokasyonları ve domen uzunlukları bakımından son derece küçük farklar olduğunu ortaya koymuştur. HvXRCC4’ün, filogenetik olarak TaXRCC4’e çok yakın olduğu gösterilmiştir.

HvVIP1 arpa yapraklarında, köklerinde, kalluslarda, koleoptillerde ve olgunlaşmamış embriyolarda anlatım yapmaktadır. *HvVIP1* anlatımının çeşitli biyotik (örn. *Agrobacterium tumefaciens* ve *Fusarium culmorum* enfeksiyonu) ve abiyotik (örn. tuzlukluk ve dehidrasyon şoku) stres koşulları altında önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Ek olarak, *HvVIP1*’in zamana bağlı gen anlatımı ile stres bağlantılı (*HvBAS1*, *HvPR1*, *HvPR4* ve *HvPR10* gibi) birçok genin anlatımı arasında güçlü bir ilişki vardır. Arpa filizlerinde, *HvVIP1* anlatımının dehidrasyon şoku stres uygulamasından 4 saat sonra kökte önemli ölçüde arttığı gözlenirken, yaprak dokularında gen anlatımının ancak 8. saatten sonra arttığı belirlenmiştir. Diğer yandan, tuz stresi altındaki bitkilerde *HvVIP1*’in anlatımı oldukça geç (48 ve 60 saat sonra) uyarılmaktadır. Abiyotik strese benzer olarak *Agrobacterium* enfeksiyonu sonrası, transformasyona farklı duyarlılıktaki çeşitlerde (cv. Martı ile hassas cv. Golden Promise) *HvVIP1* geninin anlatımının anlamlı seviyede arttığı belirlenmiştir. Dayanıklı çeşitte (cv. Martı) *HvVIP1* ve PR gen anlatımları hassas çeşide göre daha geç gerçekleşmektedir. *HvVIP1* cv. Martı köklerinde *Fusarium culmorum* ile inokülasyonundan 24 saat sonra önemli ölçüde indüklenmiştir.

Agrobacterium ile enfekte edilen cv. Martı’da mitojen ile aktiveleşen protein kinase *HvMPK3* ile *HvVIP1* ($r = 0.9$) arasında ve *HvVIP1* ile *HvPR1* ($r = 0.98$) arasında zamana bağlı transkript birikimi açısından güçlü bir ilişki bulunmuştur. Çalışmamızda ek olarak *HvVIP1* gen anlatımının *HvPR4* ($r = 0.98$), ve *HvPR10* ($r = 0.97$) genlerinin anlatımları ile de korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bunun yanı sıra *HvVIP1*’deki artış antioksidan sistemin bir bileşeni olan *HvBAS1* geninin anlatımı ile de uyumludur ($r = 0.9$). Sonuçlar *HvVIP1* ile *Arabidopsis*’teki ortolog *AtVIP1* arasında benzerlik olduğunu ve VIP1 transkripsiyon faktörünün korunmuş MPK3 transdüksiyon yolağında rolü olduğunu desteklemektedir. Diğer yandan, arpa hücrelerinde enfeksiyon sonrası oluşan güçlü PR- gen anlatımı bu bitkinin *Agrobacterium*’a dirençliliğinde (“recalcitrance”) rol oynuyor olabilir. Bu çalışmanın önemi, *HvVIP1* gibi bir efektörün arpanın savunma tepkisindeki rolünü değerlendirmek, daha büyük ölçekte ise, özellikle *A. tumefaciens*’in doğal konak aralığı dışında sıralanan tarımsal olarak önemli bitki türlerindeki direncin arkasındaki olası nedenler hakkında daha çok bilgi sahibi olmaktır. Tez çalışmasındaki diğer protein, HvXRCC4, transgen entegrasyonundaki rolü nedeniyle önem taşımaktadır.

Haziran 2018, 119 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Agrobacterium*-aracılı transformasyon, *HvVIP1*, stres tepkisi, arpa.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF HOST FACTORS ASSOCIATED WITH *Agrobacterium tumefaciens* INFECTION IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) PLANTS

Nadia EL SARRAF

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ayşe Filiz GÜREL

Agrobacterium-mediated plant genetic transformation is at the base of both fundamental and applied research in plant biology. A number of host proteins involved in *Agrobacterium* transformation has been revealed in the model organism *Arabidopsis thaliana*. VirE2-Interacting Protein 1 (VIP1) is one of the most important factors due to its antagonistic roles during infection. VIP1 is recognized for its roles in promoting plant genetic transformation by guiding and integrating the T-DNA inside the host genome, and in regulation of stress signaling. However, it is still unknown how VIP1 is involved in such contrasting functions.

In this thesis, we aimed at the molecular characterization of VIP1 protein and the XRCC4 protein, which play a role in genomic integration of T-DNA, in barley plants known to be resistant to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. cDNA sequences coding for VIP1 and XRCC4 proteins in barley were determined (HvVIP1: NCBI accession no. MG000155) and the tissue-specific expression levels of *HvVIP1* were examined under normal and stress conditions. According to the sequencing results, a conserved bZIP domain was found within VIP1 protein's 157th and 223rd amino acid. Accordingly, *HvVIP1* was classified as a member of subgroup I of the bZIP transcription factor family. Comparative analysis with *AtVIP1* showed 13 non-synonymous SNPs in the *HvVIP1* bZIP domain sequence. In addition, phylogenetic

analyses and evolutionary distance calculations with *Arabidopsis* and 8 other monocotyledonous plants have shown that *HvVIP1* and *TaVIP1* have the closest common ancestor. The 3D models, structural dominance predictions and disorder prediction profiling tests revealed that there are insignificant differences in the bZIP domain locations and lengths when comparing *Arabidopsis* and barley VIP1 proteins. Whereas XRCC4 protein has been shown to be the closest to TaXRCC4 according to the phylogenetic analysis.

HvVIP1 gene expression was determined in barley leaves, roots, calli, coleoptile and immature embryos. The expression of *HvVIP1* has been shown to increase significantly under various biotic (e.g. *Agrobacterium tumefaciens* and *Fusarium culmorum* infection) and abiotic (e.g. salinity and shock dehydration) stress conditions. In addition, a time-dependent strong correlation between *HvVIP1* gene and the expression of many stress-related genes (i.e. *HvBAS1*, *HvPR1*, *HvPR4*, and *HvPR10*) was registered. *HvVIP1* expression in barley seedlings undergoing shock dehydration stress increased significantly in the root after 4 hours of stress application, whereas gene expression increased in leaf tissues after 8 hours. On the other hand, the expression of *HvVIP1* in plants undergoing salt stress is stimulated quite late (48 and 60 hours later). The accumulation of *HvVIP1* transcripts was found to be 6 times higher in the roots than in the leaves. Similar to the abiotic stress, after *Agrobacterium* infection an increase in *HvVIP1* expression levels was shown in barley varieties (i.e. cv. Martı, and sensitive cv. Golden Promise) known for their different transformation-susceptibilities. *HvVIP1* has been induced significantly 24 hours after inoculating cv. Martı roots with *Fusarium culmorum*.

In *Agrobacterium*-infected cv. Martı calli, a strong association was found between the Mitogen-Activated Protein Kinase *HvMPK3* and *HvVIP1* ($r = 0.9$) as well as a time-dependent transcript accumulation between *HvVIP1* and *HvPR1* ($r = 0.98$) was registered. In our study, *HvVIP1* gene expression was also found to correlate with the expression of *HvPR4* ($r = 0.98$), and *HvPR10* ($r = 0.97$) genes. In addition, the increase in *HvVIP1* gene expression is compatible with *HvBAS1* gene expression, a component of the antioxidant system ($r = 0.9$).

The results show that there is a similarity between *HvVIP1* and its orthologue from *Arabidopsis thaliana* AtVIP1. Results also support the idea that VIP1's role within the MPK3 signal transduction pathway may be conserved in barley. On the other hand, results show a strong PR gene expression after infection in barley cells which may play a role in *Agrobacterium*-resistance ("recalcitrance") of this plant. The aim of this study is to assess the role of a host effector protein like *HvVIP1* transcription factor in the defense responses in barley plants. On a larger scale, this study aims at providing more information about the possible causes behind the resistance of agriculturally important plant species, particularly those listed outside the natural host range of *A. tumefaciens*. The importance of the other protein in the thesis study, *HvXRCC4*, lies in its role in transgene integration in host genome.

June 2018, 119 pages.

Keywords: *Agrobacterium*-mediated transformation, *HvVIP1*, stress response, barley.

1. GİRİŞ

Bir gram negatif toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens*'in yara bölgesinde gerçekleştirdiği enfeksiyonlar, geniş bir bitki yelpazesinde ama çoğunlukla da dikotiledonlarda taç tümörlerine neden olmaktadır (Van Larebeke ve diğ. 1974). Bitki enfeksiyonu boyunca *Agrobacterium*, genetik olarak ekstra-kromozomal DNA plazmidinin bir parçasını (T-DNA) bitki genomuna dengeli bir şekilde entegre ederek hücreleri transforme etmektedir (Schell ve diğ. 1979). Bu transfeksiyon sırasında bakteriyel organizma içinde meydana gelen moleküler ve genetik değişiklikler, çeşitli yayılarda (Knauf ve Nester, 1982; Gelvin, 2000; Tzfira ve Citovsky, 2006; Lacroix ve Citovsky, 2013) ayrıntılı açıklanmıştır. Bununla birlikte, konakçı faktörlerin rolü hakkında bilgilerimiz kısıtlıdır (Tzfira ve Citovsky, 2006; Lacroix ve Citovsky, 2013). Daha önce model organizma *Arabidopsis thaliana*'da genetik transformasyona katılan bir dizi konakçı protein ortaya çıkarılmıştır (Gelvin, 2003; Pitzschke ve diğ., 2010; Lacroix ve Citovsky, 2013). VIP'ler ya da VirE2-Etkileşimli Proteinler, patojen tarafından kendi yararı için kullanılanlar olarak en ilgi çekici olanlardır (Tzfira ve diğ., 2001; Anand ve diğ., 2007; Bourras diğ., 2015).

VIP1 (VirE2 Etkileşimli Protein 1) konakçının transkripsiyon mekanizmasının nukleus efektörü olarak tanımlanır; bir yandan virülans proteinleri ile etkileşime aracılık ederek T-DNA'yı nukleüs'a doğru yönlendirirken, diğer yandan da konakçı genomuna ekzojen DNA'nın entegrasyonunu sağlar (Birch, 1997; Tzfira ve diğ., 2001; Schroder ve Lanka, 2005; Bourras ve diğ., 2015). Gerçekten de, bitki transfeksiyonu boyunca, bZIP transkripsiyon faktörü VIP1 (Jacoby ve diğ., 2002) bakteriyel virülans proteini VirE2 ile etkileşir ve Nuklear Lokalizasyon Sinyali (NLS) aracılığıyla T-DNA kromatin hedeflemesi ve genom entegrasyonu için T-kompleksini nukleusa doğru yönlendirerek ona kılavuzluk eder (Gelvin, 2003; Pitzschke ve diğ., 2010; Lacroix ve Citovsky, 2013). Bu nedenle VIP1 bitki transformasyonunu "teşvik eden" konakçı faktör olarak kabul edilmiştir (Birch, 1997; Schroder ve Lanka 2005; Bourras ve diğ. 2015). Bununla birlikte, son zamanlarda VIP1, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal transdüksiyon yolağının bir bileşeni olduğu için stres tepkileri ve bitki bağışıklık sinyalizasyonunun düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Djamei ve diğ., 2007; Pitzschke ve diğ., 2009; Zhao ve diğ., 2016). VIP1'in bu ikili işlevi, bitki savunma yanıtı aktivatörünün, daha yüksek transformasyon oranı için nasıl kullanılabileceği sorusunu gündeme getirmiştir

(Pitzschke ve Hirt, 2010). Transfeksiyon sırasında hem konakçı hem de *Agrobacterium*'un iki VIP1 fonksiyonundan biri için yarıştığı ve *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı “bitki duyarlılığının” VIP1'in hangi rolü yerine getireceğinin belirlediği açıklanmıştır. Böylelikle, Karami ve diğ. 2008 'de enfeksiyona yatkınlığın genotiple ilişkili bir konu olduğunu ve aynı bitkide doku ve hücre tipleri arasında değişebileceğini iddia etmektedir (Gelvin, 2000); daha ileri olarak, yatkınlık belirli konakçı proteinlerin anlatım seviyesi ile de ilişkili olabilir (Hwang ve Gelvin, 2004). Teoriler, transfeksiyon boyunca, VIP1 ve bakteriyel virölans proteinleri arasında bir etkileşimin olduğunu muhtemelen T-DNA'yı VIP1 tarafından düzenlenen strese duyarlı bazı genlerin promotörlerine yönlendirdiğini ileri sürmekte dolaylı yoldan da *Agrobacterium*'un bitki stres tepkisini kendi yararları için ele geçirme yeteneği olduğunu göstermektedir (Liu ve diğ., 2010; Lacroix ve Citovsky, 2013b). Sonuç olarak VIP1 transkripsiyon faktörünün bu süreçlerdeki rolünün daha ayrıntılı incelenmesi gereklidir.

Bu tez çalışmasında *Agrobacterium*-aracılı transformasyona karşı dayanıklı bir bitki olan arpada VIP1 transkripsiyon faktörünün yakından incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda *HvVIP1*, genetik yapısal özelliklerini ortaya çıkarmak amacıyla öncelikle klonlanarak karakterize edilmiştir. Ayrıca, VIP1'in işlevleri, çeşitli biyotik (örn. *Agrobacterium* ve *Fusarium* enfeksiyonu) ve abiyotik streslere (örn. tuzluluk ve dehidrasyon) yanıt ve bir transkripsiyon düzenleyici olarak *Hordeum vulgare* L.'de tanımlanmıştır. Arpa dokularında stres koşulları altında VIP1'in anlatım profili, özellikle patojenezle ilişkili (PR) genlerinin bu protein ile doğrudan ilişkisini ortaya koymuştur. VIP1 ortologları ile hem duyarlı (*Arabidopsis thaliana*) hem de transformasyona dirençli (*Hordeum vulgare* L.) bitkiler arasındaki bu fonksiyonel benzeşme, tarımsal açıdan önemli birçok bitki türünün *Agrobacterium*-aracılı transformasyona karşı gösterdiği farklı duyarlılığın nedenleri hakkında daha fazla bilgi sağlamaktadır. Bu çalışmada başka bir konak etkileyici faktör olarak *HvXRCC4* araştırılmıştır. *HvXRCC4*, genetik yapısal özelliklerini ortaya çıkarmak amacıyla klonlanarak karakterize edilmiş ve ileri genetik analizler için bir temel oluşturması açısından filogenetik analizi yapılmıştır. *HvXRCC4* proteininin *AtXRCC4* ortologuna benzer şekilde T-DNA'nın konak genomuna entegrasyonunda etkili olduğu ve böylece dolaylı olarak *Agrobacterium*-aracılı transformasyon etkinliğini artırdığı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİTKİ GENETİK TRANSFORMASYONUNA GENEL BAKIŞ

Bitki genetik mühendisliği yüksek bitkilerde ürün miktar ve kalitesinin artırılmasını ve bitki genlerinin düzenlenmelerinin ve işlevlerinin anlaşılmasını sağlamaktadır (Jähne ve diğ., 1995). Bitki genetik transformasyonu, bitki üretimi için en önemli tekniklerden birisi olup bitki biyolojisinin temel ve uygulama alanlarındaki sorunlarının araştırılmasında da önemli bir araçtır (Jähne ve diğ., 1995; Barampuram ve diğ., 2011). Transgenik bitki üretim sürecinde genellikle birbirinden farklı iki temel teknoloji bir arada kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi, yeni DNA parçasının bitki hücrelerine girmesini sağlayan genetik transformasyona, ikincisi ise transgenik hücre rejenerasyonu için doku kültürü temelli yöntemlere dayanmaktadır (Dandekar ve diğ., 2004).

Transformasyon terimi ilk olarak 1920’li yılların sonunda F. Griffith tarafından kullanılmıştır. İngiliz bilim insanı Griffith, pnömونيye karşı aşı geliştirme çalışmaları yaparken, fareye enjekte edilmiş pnömokok (*Streptococcus pneumonia* sp.) hücrelerinde hastalık yapmayan ırkın hastalık yapan ırka dönüştüğünü gözlemlemiştir. Bu sonuçlara göre, ölü S ırkı hücrelerde bulunan ve yüksek sıcaklık etkisiyle bozulmayan bir maddenin serbest kalarak R ırkı hücrelerin içine girdiğini ve bu hücrelerin özelliklerini değiştirdiğini, onları hastalık yapabilir duruma dönüştürdüğünü tespit etmiştir. Bu olaya transformasyon adını vermiştir ve bu transformasyonun kalıtsal olduğunu keşfetmiştir (DeVelasco ve diğ., 1995). Oxford Tıp Sözlüğünde “transformasyon” terimi bir bireyin hücresinde taşınan genetik materyalin, yabancı (ekzojen) kaynaklı bir DNA’nın genomuna girmesi ve onu değiştirmesini içeren süreçlerin bir bütünü olarak tanımlamaktadır.

Bitki genetik transformasyon yöntemleri çok çeşitlidir ve genel olarak iki ana başlıkta kategorize edilmiştir: (i) fiziksel ya da kimyasal anlamda aracısız (vektörsüz) DNA transferi olan “doğrudan” ve (ii) bitki virüsleri ya da bakteri (vektör) aracılığıyla gerçekleşen “dolaylı” gen transfer yöntemleridir (Barampuram ve diğ., 2011). Fiziksel yöntemlerden “elektroporasyon” ve “biyolistik” yöntemi oldukça popülerdir. Her iki teknik de sırasıyla porlar veya hücre duvarı yoluyla bitki hücresi içerisine gen girişine dayanmaktadır (Rivera ve diğ., 2012). Ancak, bu yöntemlerin bazı olumsuz tarafları vardır. Örneğin, elektroporasyon yönteminde hedef genin frekansı düşüktür ve bu tekniğin belirli hücre tiplerine sınırlı olduğu

bulunmuştur ya da mikroenjeksiyon yönteminin uygulandığı hücre sayısı sınırlıdır. Transformasyon sonrasında ise, biyolistik yönteminde genin yeniden düzenlenmesi riski vardır ve mikroenjeksiyon da bitki rejenerasyonu için yüksek gereksinimlere ihtiyaç duyulmaktadır (Abdul ve diğ., 2004; Barampuram ve diğ., 2011).

Kimyasal temelli transformasyon tekniklerinin uygulanmasında da zorluklar bulunmaktadır. Bu teknikler, belirli hücre tipleriyle sınırlı kalmaktadır. Örneğin, polietilen glikol-aracılı yöntemde verimli transgenik bitkilerin rejenerasyonunda, dietilaminoetil dekstran-aracılı yöntemde ise kararlı transformantların elde edilmesinde başarılı sonuçlar sınırlıdır (Liu ve Vidali, 2011). Bununla birlikte Hendrie ve Russell 2005’de, vektör-aracılı transformasyon tekniklerinin, DNA parçasının birçok hücre tipine kararlı ve verimli bir şekilde aktarılmasındaki başarısından dolayı, doğrudan yöntemlerde karşılaşılan sınırlamaların üstesinden gelebileceği belirtilmiştir. Dolaylı transformasyon yöntemleri, genellikle bitki virüsleri ve/veya bakteri-aracılı biyolojik vektörler kullanılarak daha popüler hale gelmiştir.

Bitki virüsleri tam anlamıyla entegratif olmasalar da genetik mühendisliği için doğal vektörlerdir ve viral enfeksiyonlar çoğunlukla sistemik olduklarından istenilen genleri tüm bitki hücrelerine aktarabilirler. Yeni genetik materyali çoğalttıkları ve genin anlatımını yaptıkları konakçıda sistemik olarak yayıldıklarından, konakçı genoma entegre olmazlar (Hendrie ve Russell, 2005).

Bitki virüslerinin aksine bakteri-aracılı transformasyon sadece entegratif olmakla kalmaz aynı zamanda kalıtsal işlev de üstlenirler (Gelvin, 2000). *Agrobacteria* cinsi bu anlamda enfekte konaklarda parazitik büyüme yeteneğine sahip doğal bitki patojen türlerini içermektedir (Bourras ve diğ., 2015). Bunlardan özellikle *Agrobacterium tumefaciens* söz konusu bitki transformasyonu olduğunda en çok tercih edilmektedir. Enfeksiyon stratejisinin temelinde, T-DNA fragmentinin kalıcı entegrasyon yoluyla konakçı hücrede genetik transformasyona yol açması yatmaktadır (Gelvin, 2000; Bourras ve diğ., 2015).

Son zamanlarda *Agrobacterium*, türler arası DNA transferindeki eşsiz kabiliyeti nedeniyle genetik mühendisliği için vazgeçilmez bir aracı haline gelmiştir (Pitzschke ve diğ., 2010; Bourras ve diğ., 2015). *Agrobacterium*’un doğal konakçı aralığı sadece dikotiledon türleri için

özelleşmemiş, hayvanlar (insanlar vb.) gibi en uzak organizmaları bile kapsayacak şekilde artmış ve genişlemiştir. Yine de tüm bu gelişmelere rağmen doğal dirençli (rekalsitrant) bitkilerin transformasyonu hala sorun teşkil etmektedir (Jouanin ve diğ., 1993; Smith ve diğ., 1995; Abdul ve diğ., 2004). Son yıllarda, dirençli bazı bitkilerin enfeksiyonunun arkasında yatan biyolojik süreçlerin açığa çıkartılmasıyla birlikte hücresel yetkinliklerine katkıda bulunan genetik ve çevresel faktörlerin de tanımlanması bakteri-aracılığıyla transformasyon tekniklerinin gelişmesine yol açmıştır (Smith ve diğ., 1995; Hisano ve Sato, 2016).

Bitki genetik transformasyonundaki gelişmeler hem tarımsal fayda hem de genlerin fonksiyon ve düzenlenmeleri hakkında bilgiler sağlamıştır. Bir organizmanın genetik özelliklerinin genetik materyalde delesyon, entegrasyon ve/veya varyasyonlar yoluyla modifiye edilmesi son yıllarda araştırmacıların en karmaşık moleküler ağları bile anlamasını kolaylaştırmış, çeşitli model organizmalarda kesişen genetik yolların anlaşılmasına izin vermiştir.

2.2. ARPA (*HORDEUM VULGARE L.*)

Arpa (*Hordeum vulgare L.*), pirinç, buğday, mısır ve sorgum gibi çeşitli türlerle birlikte “Poaceae” familyasına ait bir bitkidir (bkz. Tablo 2.1. NRSC, 2017). *Hordeum* cinsi en az dört kıtada otuz iki yerli tür içerir. Arpanın yabani atasal formu olan *H. vulgare spp. spontanem L.*’den köken alıp ehlileştirilmesi 10 bin yıl öncesi “Verimli Hilal” dönemine kadar dayanmaktadır (Badr ve diğ., 2000; Smith, 2004).

Tablo 2.1: Arpa’nın sınıflandırılması (NRCS, 2017).

Alem	Plantae- Plants
Altalem	Tracheobionta- Vascular plants
Şube	Magnoliophyta-Flowering plants
Sınıf	Liliopsida- Monocotyledons
Altsınıf	Commelinidae
Takım	Cyperales
Aile	Poaceae- Grass family
Cins	<i>Hordeum</i> - Arpa
Tür	<i>H. vulgare L.</i>

Arpa çeşitli çevresel koşullara iyi adapte olmuş bir bitkidir. Arpanın; soğuk, kuraklık, alkalinite ve tuzluluk streslerine karşı dirençli olmasından dolayı diğer tahıl ürünlerine kıyasla çok geniş bir coğrafi alanda ve çok farklı iklim koşullarında üretimi yapılabilmektedir (Nevo, 1992). Himalaya, Etiyopya ve Fas gibi ekstrem iklime sahip bölgelerde ana besin kaynağı olarak

kullanılmaktadır (Baik ve Ulrich, 2008). Günümüzde, üretilen arpa gıda olarak %2 düzeyine düşmüş olup daha çok hayvan yemi olarak ve malt sanayisinde kullanılmaktadır (Newman ve Newman, 2006; Dawson ve diğ., 2015). FAO'ye göre Türkiye'de 2016 yılında 6,7 milyon ton arpa üretimi gerçekleşmiştir (Tablo 2.2) (FAO, 2017- <http://faostat.fao.org>).

Tablo 2.2: 2016 yılına ait Dünya ve Türkiye'deki Arpa üretimi verileri (FAO, 2017).

	Ekim Alanı (Ha)	Verim (Hg/Ha)	Üretim (Ton)
Türkiye	2700023	24815	6700000
Dünya	46923218	30108	141277993

Arpa (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*), diploid yapıda olması, yüksek soy-içi üreme derecesi, düşük kromozom sayısı ($2n=14$) ve büyük genom boyutuna (> 5 Gbp) sahip olması nedeniyle genetik alanında kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır. Tetraploid ($2n = 4x = 28$) ve hexaploid ($2n=6x=42$) genomuyla bilinen diğer arpa türleriyle karşılaştırıldığında ehlileştirilmiş arpa üzerinde çalışmak çok daha kolaydır. Ayrıca, melezleşme kolaylığı ve geniş iklim koşul aralıklarında ekiminin yapılması arpanın tahıllar içinde model organizma haline gelmesine katkıda bulunmuştur (Bennett ve Smith, 1976; Saicho ve Takeda, 2011).

Arpada, genetik araştırmaların yanı sıra ürün kalitesinin iyileştirilmesine yönelik çalışmaların yapılması nedeniyle bu büyük genoma sahip olan bitkinin daha iyi anlaşılmasında referans bir veri tabanına ihtiyaç duyulmuştur (Mascher ve diğ., 2017). Bu nedenle, 2012 yılında Uluslararası Arpa Genomu Dizileme Konsorsiyumu arpa genomu için bir taslak dizi yayınlamıştır. Bununla birlikte tekrarlı genomik elementlerin çok fazla olması ve perisentromerik bölgelerde ciddi oranda azalmış mayotik rekombinasyon sıklığı (Künzel ve diğ., 2000) nedeniyle tüm genomun birleştirilmesini, çoğunlukla düşük-kopyalı bölgelerden köken alan kilobaz boyutundaki dizilere sınırlandırmıştır. Arpa'nın (*Hordeum vulgare* L.) yüksek-kaliteli referans genomu, perisentromerik boşluklar boyunca genom dizilerinin elde edilmesi ve megabaz çözünürlüğünde kromatinin uzaysal organizasyonunun araştırılması kromozom konformasyon yakalama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Mascher ve diğ., 2017).

2.3. AGROBACTERIUM CİNSİ

Agrobacterium cinsi toprakta yaşayan, gram-negatif, aerobik bakteri gruplarını kapsamaktadır. Bitkinin kök, yumru veya toprak altı saplarıyla ilişkili olduğu bulunan birkaç tür dışında

genellikle saprofitik bir yaşam sürmektedirler (Mathysse, 2006; Bourras ve diğ., 2015). Çoğu *Agrobacterium* türü bitki hücreleri için hastalık etkenidir ve onların organize olmamış dokuları içerisinde kontrolsüz çoğalmalara neden olmaktadır (Winans, 1992). Bu geniş konakçı aralığına sahip bitki patojenleri birçok dikotiledon ve bazı monokotiledon türlerinde simbiyotik ilişkiye yol açmaktadır (De Cleene ve De Ley, 1976). Aralarında en çok bilinenleri Ti ve Ri tümörijenik plazmidleri ile sırasıyla taç tümörü ve saçak kök hastalıklarına yol açan *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* türleridir (Gelvin, 2009). *A. rubi* ve *A. vitis* gibi daha az çalışılmış türler karniyum tümörüne ve üzümde hastalıklara yol açmaktadır (Escobar ve Dandekar, 2003).

Türler hastalık semptomları ve konak aralıklarına göre ayrılmakla (Gelvin, 2003) beraber cins düzeyinde çeşitliliğin ölçümünde “Biyovar” konsepti en güvenilir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Goodner ve diğ., 2001). Bu nedenle, fenotipik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklere göre türler üç tip biyovar altında kategorize edilmişlerdir (Mathysse, 2006) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: *Agrobacterium* cinsinin taksonomisi (Garrity ve diğ., 2004) - Prokaryotların taksonomisinin ana hatları, Bergey'nin sistematik bakteriyolojinin el kitabından).

Kingdom	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Alphaproteobacteria
Takım	Rhizobiales
Aile	Rhizobiaceae
Cins	<i>Agrobacterium</i>
Tür	<i>A. tumefaciens</i> ; <i>A. atlanticum</i> ; <i>A. ferrugineum</i> ; <i>A. gelatinovorum</i> ; <i>A. larrymoorei</i> ; <i>A. meteor</i> ; <i>A. radiobacter</i> ; <i>A. rhizogenes</i> ; <i>A. rubi</i> ; <i>A. stellulatum</i> ; <i>A. vitis</i>

2.4. AGROBACTERİUM TUMEFACİENS'İN BİYOLOJİSİ

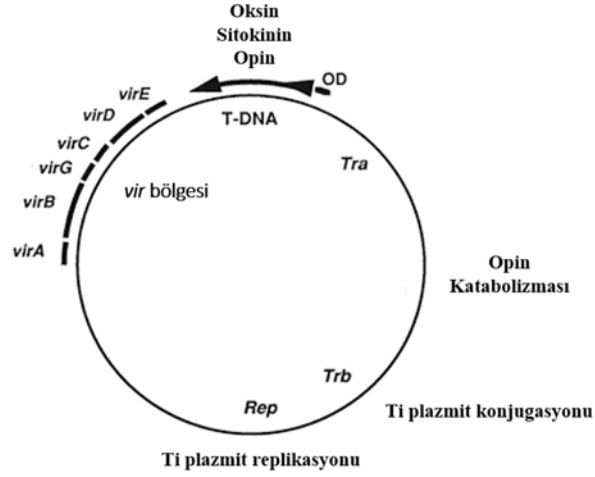
Agrobacterium tumefaciens 20. yüzyılda bitkilerde taç tümörü hastalık ajanı olarak tanımlanmıştır (Smith ve Townsend, 1907; De La Riva ve diğ., 1998). Yıllar içerisinde *Agrobacterium* ökaryotik konakçı genomlarına DNA fragmentini transfer etme ve entegre etmedeki doğal kabiliyetiyle tanımlanır olmuştur. Kompleks genetik yapıya sahip tüm bakteriler gibi *Agrobacterium tumefaciens* 'de bir α -proteobacterium olarak Rhizobiaceae ailesinde *Agrobacterium* cinsinin bir üyesi olarak kabul edilmektedir (bkz. Tablo 2.3) (Woose, 1987).

Agrobacterium ırkları; konak aralığı metabolik karakteristiği, kromozom yapısına ve Rhizobiaceae ailesi içerisindeki diğer cinslerle olan ilişkilerindeki farklılıklara göre üç biyovara ayrılmaktadır (Goodner ve diğ., 2001). *A. tumefaciens*'in en çok çalışılmış ırklarından biri olan C58'in tüm genomu 2001 yılında dizilenmiştir ve yaklaşık olarak 5.67 Mb boyutundadır. Replikonlarının dört ayrı bileşeni olarak: halkasal kromozomunun boyutu yaklaşık olarak 3 Mb, doğrusal kromozomunun boyutu yaklaşık olarak 2,1 Mb, kriptik plazmidinin (pAtc58) boyutu 450 Kb ve tümör indükleyici Ti plazmidinin (pTiC58) boyutu 200 Kb'dir (Allardet-Servent ve diğ., 1993; Christie ve Gordon, 2014). Bu replikonların her biri patojenite ile yakından ilişkili işlevleri kodlamaktadır (Goodner ve diğ., 2001; Christie, 2014). Kodlama yapan genler, transformasyon sürecinin farklı aşamalarını düzenlemede rol oynarlar (Tzfira ve Citovsky, 2002).

Kromozomal *chvA*, *chvB*, *pscA* (*exoC*) ve *att* genleri, tümör oluşumunda erken aşamaları belirleyen bağlanma ve virülans özellikleri sunmaktadır (Sykes ve Matthysse, 1986; Matthysse, 1987; Gelvin, 2003). *att* mutant suşları, özellikle konak hücrelere bağlanmasında yetersiz kalırken (Reuhs ve diğ., 1997), *chvA* ve *chvB* mutant suşları bağlanma eksiklikleri gösterir ve avirülettir ya da virülansla oldukça zayıflatılmış etkiye sahiptir (Gelvin, 2000). Ti kodlu genler, vir bölgesi ve T-DNA kodlu genler aracılığıyla sırasıyla virülans ve enfeksiyona aracılık etmektedir (Tzfira ve Citovsky, 2002; Matthysse, 2006).

2.4.1. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Bitki Transformasyonu

Doğal koşullarda, bakteri, yaralı bitki hücrelerinden fenolik ve şeker bileşikleri algıladığında transfeksiyon başlatılır (Gelvin, 2003). Kimyasal-çekim gerçekleştiğinde Ti plazmidindeki virülans (*vir*) genlerinin anlatımı başlar ve vir proteinleri (*vir* operonları: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*) T-DNA'nın bitki hücrelerine aktarılması için hazırlanarak, bakterinin içinde yer alan bir dizi olaylar serisini yönlendirir (bkz. Şekil 2.1) (Wood ve diğ., 2001; Christie, 2014).



Şekil 2.1: Tümör indükleyici plazmidin yapısal özellikleri (pTi) (Christie, 2014) - Mikrobiyoloji Danışma Ansiklopedisi). (i) enfeksiyona (T-DNA ve vir bölgesi) katkıda bulunan pTi bölgeleri; (ii) tümör ortamında hücre hayatta kalma (opin katabolizma bölgesi); (iii) pTi'nin alıcı *Agrobacterium*'a (tra ve trb bölgeleri) konjugal transferi. Bitkilerdeki oksinler, sitokininler ve opinler için 25 bp'lik diziler (Siyah ok) kodları ile sınırlanan T-DNA bölgesi; OD ("Overdrive" bölgesi), T-DNA sınır dizilerinde VirD2'den bağımsız işlemeyi geliştirir.

Bitkinin yaralanmış alanlarından salgılanan fenolik ve ilişkili bileşikler (Bolton ve diğ., 1986; Pitzschke ve Hirt, 2010) virA sensör proteinini otofosforilasyonla aktive eder ve ardından virG proteinin transfosforilasyonunu gerçekleştirir (Stachel ve Zambryski, 1986; Turk ve diğ., 1994; Gelvin, 2000). Bu virA/virG sensor/iletim sistemi diğer vir operonlarının transkripsiyonlarını aktive eder. virB proteinleri (virB4-11) daha sonra, tip IV sekresyon sistemi (T4SS) olarak adlandırılan bakteriyel membran boyunca trans-envelop taşıyıcı formunda birleşirken virC, virD ve virE proteinleri tek iplikli T-DNA'nın bir nükleoprotein molekülü olan "T-kompleksi"ne işlenmesini ve bitki hücre nükleusuna iletilmesini sağlar (Pitzschke ve Hirt, 2010; Christie, 2014).

T-DNA 25-30 Kb boyutunda olup sol ve sağ sınırlar olarak adlandırılan 25 bp'lik tekrarlanan dizilerle sınırlanmıştır. Bu sınırlar, T-DNA transferi için gerekli olan cis-etkili elemanlardır. Aktarılan T-DNA, yalnızca ökaryotik hücrenin içinde transkribe olan tümör indükleyici plazmid (pTi) üzerinde bulunan ayrı bir gen kümesidir (bkz. Şekil 2.1). T-DNA'nın komşu bölgelerinde kontrol edilemeyen hücre bölünmesini uyarmaktan sorumlu olan oksinler ve sitokininler gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin sentezinde yer alan enzimleri kodlayan (i) onkogenik genler bulunmaktadır. Böylece, hücre büyüme kontrolü üzerinde tam bir kayba yol açarak karakteristik taç tümörü fenotipi oluşmaktadır (Pacurar ve diğ., 2011). Buna karşın, (ii)

opin-kodlayan genler yeni amino asit türevlerinin sentezi için kodlanan bir enzim sentezlemektedir.

Opinler bitkinin kendisi tarafından metabolize edilmezler. Bunun yerine bakterinin ökaryotik alan içerisinde hayatta kalması için karbon ve nitrojen kaynağı olarak iş görürler (Tzfira ve Citovsky, 2006). T-DNA, çeşitli opin sınıflarını kodlayabilir fakat en çok bilinenler oktopinler ve nopalinlerdir. Konak genomuna entegre edildikten sonra, transkribe olan T-DNA, ökaryotlara benzer bir şekilde 3' poliadenillenmiş RNA meydana gelir. Translasyona uğrayan proteinler tümörlerin çoğalmasına yol açarak bitki hücresi büyümesini bozmaktadır (Christie, 2014). İlginç olarak, bu tür tümörlerin proliferasyonu sürekli bir bakteri varlığına gereksinim duymaz (White ve Braun, 1942). Bu durum, T-DNA sınırları içinde kalanların, genetik manipülasyon ve konak transkripsiyon mekanizmasının yeniden programlanması için gerekli olan tek şey olduğunu göstermektedir. Bilim insanları, T-DNA sınırları içerisindeki onkogenleri ilgili bir genle değiştirerek bu plazmidi genetik manipülasyon için güçlü bir araç haline getirmişlerdir. Transforme edilmiş hücreler, daha sonra modifiye edilmiş genetik materyali kendi soyuna aktarabilen verimli bitkilere rejenere olabilmektedir (Hooykaas ve Schilperoort, 1992; Newell, 2000; Goodner ve diğ., 2001).

Daha sonra yıllar içerisinde *Agrobacterium*'un konak aralığı, diğer bakteri türlerinin yanı sıra mantarlar ve hatta bazı memeli hücrelerini de kapsayacak şekilde genişletilmiştir (Lacroix ve diğ., 2006). Ayrıca, laboratuvar koşullarında dirençli bitkiler de artık *Agrobacterium* tarafından transforme edilebilmektedir (Chen ve diğ., 2006; Bourras ve diğ., 2015; Li ve diğ., 2017).

2.5 AGROBACTERİUM-ARACILI TRANSFORMASYON İLE İLGİLİ KONAK FAKTÖRLERİ

Transformasyon sırasında bakteride meydana gelen moleküler ve genetik değişiklikler çok sayıda derlemede ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Knauf ve Nester, 1982; Gelvin, 2000; Tzfira ve Citovsky, 2006; Lacroix ve Citovsky, 2013). Bununla birlikte, transformasyon süreci boyunca konak faktörlerin rolü hakkında nispeten az şey bilinmektedir (Tzfira ve Citovsky, 2006; Lacroix ve Citovsky, 2013). İstemsiz bir şekilde konak bitki, *Agrobacterium* transformasyonuna aktif olarak katılmaktadır. Konak bitkinin rolü Vir protein/T-DNA içeri alınması veya Vir/T-DNA kompleksinin çözülmesi, T-DNA entegrasyonu, tümör gelişimi için gen anlatımının yeniden programlanması gibi çeşitli seviyelerde gerçekleşmektedir (Pitzschke ve Hirt, 2010).

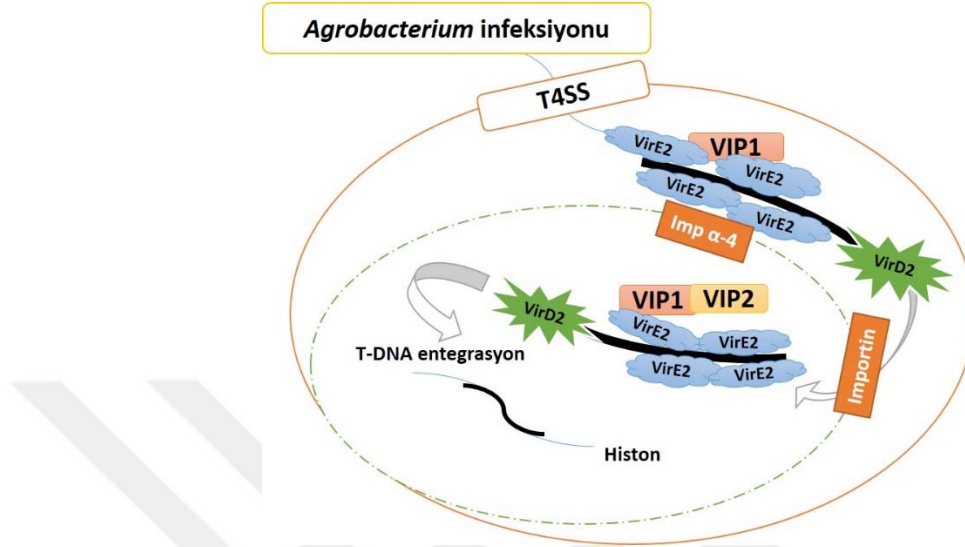
2.5.1. Vir Protein/T-DNA İçe Aktarım Sürecine Aracılık Eden Faktörler

Bağlanma aşamasından sonra, çeşitli Vir faktörleri (VirD2-T-DNA, VirE2, VirE3, VirF, VirD5), başta VirB operonu (VirB1-11) ve VirD4 alt birimi tarafından kodlanan tip IV sekresyon sistemi (T4SS) olarak tanınan bir bakteriyel protein kompleksi aracılığıyla konak sitoplazmasına doğru harekete geçer (Kado, 2000; Christie ve diğ., 2005; Fronzes ve diğ., 2009). Birbirinden bağımsız olarak yer değiştirdikleri düşünülen VirD2 ile öncül T ipliği kompleksi ve VirE2 molekülleri, konak sitoplazması içerisinde T-kompleksi olarak adlandırılan bir dizi sarmal filamentin oluşturulmasını sağlamaktır (Citovsky ve diğ., 1992; Gelvin, 1998; Vergunst ve diğ., 2000). Yine, T-ipliğini kaplayan çeşitli VirE2 proteinleri ile birlikte konak sitoplazmanın içinde olgun bir T-kompleksi oluşturmak üzere birleşmektedir (Bourras ve diğ., 2015) (bkz Şekil 2.2).

Sitozolik boşluk içindeki böylesine bir büyük kompleksin nukleusa doğru sitoplazma boyunca gerçekleşen hareketi birkaç aktif mekanizmayı içermektedir. Çoğunlukla bu süreç, T-kompleksi protein bileşenleri olan VirE2 ve VirD2'nin nukleer hedef tespit yeteneklerine dayanmaktadır (Forbes, 1992; Tzfira, 2005; Lacroix ve Citovsky, 2013). Bu iki virülans proteini bitki-aktif Nukleer Lokalizasyon Sinyal (NLS) motiflerini içerir ve diğer NLS bitki efektörleri ile etkileşime girerek nukleus translokasyonunu gerçekleştirirler. Gerçekte, konak Importins α (nukleer içe aktarım makinesinin NLS bağlayıcı proteinleri), içe aktarım ve dolaşımını teşvik eden, iki bileşenli NLS bölgesi VirD2 ile etkileşime girerek, ilişkili T-ipliğinin nukleus porları aracılığıyla içe aktarılmasını sağlar (Ballas ve Citovsky, 1997). Öte yandan VirE2, T-kompleksi ile bitki importin α -1 (Impa-1) arasında bir köprü görevi gören ana faktörlerden biri olan VIP1'e (VirE2 Etkileşimli Protein) bağlı olarak nukleus-hedef belirlenmesinin gerçekleşmesine neden olmaktadır (Tzfira ve diğ., 2001; 2002; Citovsky ve diğ., 2004).

VirD2 ve VirE2'nin T-kompleksi ile ilgili nukleus içe aktarımındaki rolleri gereksiz gibi görünebilse de, nukleus porları boyunca verimli bir taşınım için her iki faktör de gereklidir (Zambryski, 1992; Tzfira ve diğ., 2000; Ziemienowicz ve diğ., 2001) (Şekil 2.2). İlginç bir şekilde, hücresel mikrotübül ağı ve konak moleküler motorları, Salman ve diğ., 2005 tarafından açıklandığı gibi sitoplazma boyunca T-kompleks hareketi ile de ilişkili bulunmuştur. *Arabidopsis thaliana*'da VIP1'in dynein-benzeri bir protein (moleküler motor) ile etkileşimi,

enfeksiyon sürecinde hücre iskeleti elementlerinin katılımını gösteren kuvvetli bir kanıt olmuştur (Salman ve diğ., 2005).



Şekil 2.2: Bitki hücresinde T-DNA/Vir protein kompleksinin oluşması. Bakteriyel T4SS ile T-DNA ve Vir proteinleri hücrenin sitoplazmik boşluğuna taşınır ve burada T-kompleksini (virE2-VirD2-T-DNA) oluştururlar. T-DNA daha sonra konak hücre nükleusuna yönlendirilir ve nükleusa girer. Farklı bir rekombinasyon süreci sergileyerek konak kromozomlarına entegre edilir.

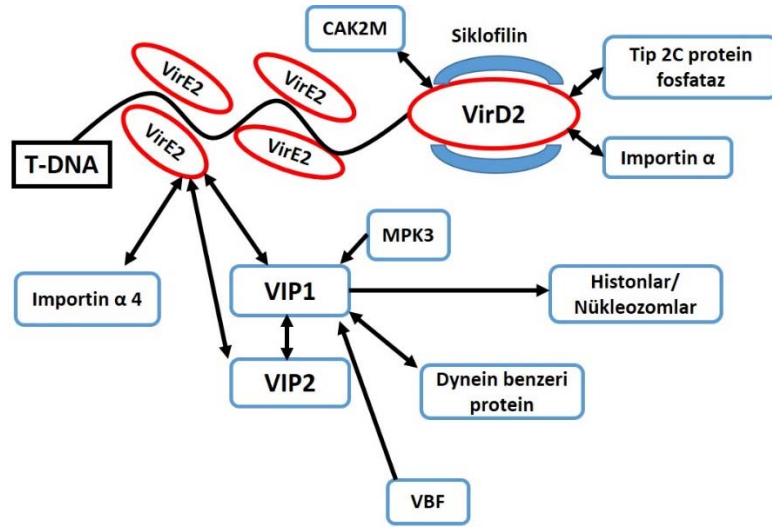
2.5.2. T-DNA Kromatin Hedeflemesine Aracılık Eden Konak Faktörleri

VirD2 ve VirE2, konak hücresinin nükleusunda uygun T-kompleks kromatin hedeflemesine aracılık eden konak hücrenin transkripsiyonel sistemine ait çeşitli proteinler ile etkileşir (Bourras ve diğ., 2015) (Şekil 2.3). Konak siklin-bağımlı kinaz aktive edici kinazların (CAK) T-kompleksinin RNA polimeraz II (RNAP II) ile ilişkilendirilerek gen düzenleyici bölgeye doğru yönlendirildiği düşünülmektedir. Hücre sitozolik boşluğunda, CAK2M-VirD2 ile etkileşime giren kinaz, bipartit NLS'nin yakınında bulunan bir serin bakiyesinin fosforile edilmesiyle VirD2 nükleus alınımını aktive etmektedir (Gelvin, 2000; Bako ve diğ., 2003; Tao ve diğ., 2004).

Serin bakiyesindeki herhangi bir değişiklik veya herhangi bir serin bakiyesinin defosforillenmesi VirD2'nin sitoplazmik lokalizasyonu ile sonuçlanır ve böylece VirD2'nin nükleus içine alınımı negatif yönde etkilenmiş olur (Tao ve diğ., 2004). Bu defosforillenme eylemine muhtemelen tip 2C Serin/ Treonin protein fosfataz yol açmaktadır.

Nukleusa girdikten sonra, CAK proteinleri (T-kompleks ile ilişkili) genlerin kor promotörlerinin bağlandığı bölge olan RNAP II'nin büyük alt ünitesi C-terminal domenini fosforile ederek etkileşime geçmektedir. RNAP II daha sonra transkripsiyonun başlaması için TBP'leri (TATA-Binding Proteins) gen düzenleyici bölgelere doğru çekmektedir (Umeda ve diğ., 2005; Bako ve diğ., 2003; Mosley ve diğ., 2009). Elde edilen veriler ışığında, bir VirD2-CAK- RNAP II sisteminin transkripsiyonel aktif kromatine doğru T-kompleks hedeflemesinde rol oynadığını, transkripsiyonun başlaması için CAK ve RNAP II büyük alt birimi arasındaki spesifik etkileşimlerin gerekli olduğu ileri sürülmektedir. (Alonso ve diğ., 2003; Lacroix ve Citovsky, 2013; Bourras ve diğ., 2015).

Bitkilerde T-kompleksi, T-DNA kromatin bağlanma modeli olarak öne sürüldüğü şekliyle alternatif yollar aracılığıyla kromatine de bağlanabilir (Bourras ve diğ., 2015). VirE2-VIP1 arasındaki etkileşim, “VirE2-VIP1-nükleozom” yolu olarak adlandırılan kromatine doğru bir yol oluşturur. Bitki bZIP transkripsiyon faktörü olan VIP1'in T-kompleks ve histonları arasındaki etkileşime aracılık ettiği düşünülmektedir (Tzfira ve diğ., 2001; Li ve diğ., 2005; Loyter ve diğ., 2005). Ayrıca *VIP1*'in aşırı anlatım yapıp transformasyon verimini arttırmadığı durumlarda, VIP'in susturulması ya da VIP'deki herhangi bir baz değişimi kalıcı transformasyonda hasara yol açmaktadır. Tüm bu bilgiler, VIP1-VirE2 sisteminin hipotetik T-DNA entegrasyon süreci için başka bir yolak olduğu hipotezini güçlü bir şekilde desteklemektedir (Li ve diğ., 2005; Tzfira ve diğ., 2001, 2002) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Bakteriyel ve konak hücre proteinleri arasındaki etkileşim. Konakçı faktörler mavi renkte belirtilmiştir; kırmızı daire içine alınmış proteinler T-ipliği ile doğrudan ilişkili olan bakteri efektörleridir.

Kromatin hedeflemesi için, VIP1 bağımlı olsun ya da olmasın hangi yolak düzenlenmişse, T-kompleksinin destabilizasyonu ve bileşenlerinin bozulması, tek iplikli T-DNA salınımı ve genom entegrasyonu için bir zorunluluktur. İlginç bir şekilde VIP1, “F-box” proteini substratı olarak T-kompleks bozulmasında rol oynamaktadır. Entegrasyon öncesinde bakteriyel VirF proteini (“F-box” protein alt birimi ve SCF kompleksinin bileşeni) VIP1’i tanır ve onunla etkileşir; böylece ubiquitin-proteazom yolu boyunca seçici protein degradasyonunda tüm T-kompleksinin proteolizinin başlatılması sağlanmaktadır (Lacroix ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2005; Loyter ve diğ., 2005; Schrammeijer ve diğ., 2001; Tzfira ve diğ., 2004). Ek olarak, diğer VIP1 bağımlı VirE2’nin kararsızlığı “F-box” proteini VBF aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.

VBF, *Agrobacterium* enfeksiyonu üzerine indüklenen bir VIP1-bağlayıcı-“F-box” konak proteindir. VirF gibi, VBF, VIP1 ve onun bağlantılı olduğu VirE2 ile etkileşerek VIP1-bağımlı VirE2 kararsızlığına yol açar, dolayısıyla bu süreç tüm T-kompleksini etkilemektedir (Zaltsman ve diğ., 2010; Bourras ve diğ., 2015). Molekül üzerini örten proteinlerinden kurtulduktan sonra, ssT-DNA, tercihli olarak kırık bölgeleri hedefleyecek ve alışlagelmişin dışında bir rekombinasyon süreci sergileyerek bitki genomuna entegre olmaktadır (Mayerhofer ve diğ. 1991; Tzfira ve diğ. 2004). Çift iplik kırığı (DSB) aracılı T-DNA entegrasyonu tam olarak anlaşılamamıştır (Bourras ve diğ., 2015). Ökaryotlarda bulunan üç farklı DBS onarım mekanizması mevcuttur: “Homolog Rekombinasyon (HR)”, “Nonhomologous End Joining

(NHEJ)", ve "Microhomology-mediated End Joining (MMEJ)" (Jackson 2002; McVey ve Lee 2008). MMEJ mekanizması, çeşitli HR ve NHEJ bileşenlerini içerir ve her iki mekanizmanın mevcut bileşenlerini kullanarak HR ve NHEJ kritik hatasından sonra işlev görebilir (McVey ve Lee 2008). Bourras ve diğ., (2015), MMEJ aracılı T-DNA entegrasyonunun muhtemelen T-DNA dizisi ve T-DNA preinsertion siteleri arasındaki kısa homolojilere dayanan daha muhtemel mekanizma olduğunu açıklamıştır (Bourras ve diğ., 2012; Brunaud ve diğ., 2002).

Bu veriler, MMEJ-bileşenli bir protein olan KU80 ile yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (Jeggo ve diğ., 1999). KU80 mutantları T-DNA entegrasyonunda yetersizdir, fakat geçici T-DNA anlatımında değildir. Oysa, *KU80* aşırı anlatımı *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı artan duyarlılığa ve DNA hasarlı ajanlara karşı artan dirence neden olmaktadır. T-DNA entegrasyonunun desteklenmesinde diğer tamir mekanizmalarının proteinleri de yer almaktadır. NHEJ'in bileşeni olan *AtXRCC4* üzerinde yapılan çalışmalar, T-DNA entegrasyonu lehine genetik onarımı geciktirmek amacıyla *AtXRCC4*'ün bakteri efektörleri tarafından kötüye kullanılabileceğini göstermektedir (Vaghchhipawala ve diğ., 2012).

Diğer bir VirE2 etkileşimli protein olan VIP2, T-DNA entegrasyonuna katkıda bulunmakta ve VIP1-VirE2 entegrasyon sisteminin bir alternatifi olarak sunulmaktadır. VIP2, TATA'sız Negatif (NOT) domen-içeren proteinlere ait ve en azından mayada transkripsiyonel düzenlenmeye dahil olduğu düşünülen bir transkripsiyon faktörüdür (Collart, 2003; Collart ve Timmers, 2004). *Agrobacterium* enfeksiyonunda hem *in vitro* hem de *in planta* olarak gerçekleştirilen VIP2-VirE2 etkileşimleri, transfeksiyon boyunca VIP2 tutulumuna işaret etmektedir (Anand ve diğ., 2007). Yabani tip *Arabidopsis* ve *A. thaliana*'da VIP2 mutantının transkripsiyonel analizleri, VIP2'nin, histonların veya histonla ilişkili proteinlerin transkripsiyonel düzenlemesinde rol oynadığını göstermiştir (Anand ve diğ., 2007). Bununla birlikte, VIP2'nin T-kompleksinin kromatine köprü yapıp yapmama yeteneğinin olup olmadığı konusu netlik kazanmamıştır (Şekil 2.3).

2.6. VIP1'İN GENETİK TRANSFORMASYONA KATKISI

2.6.1. VIP1 Konak Faktörünün Yapısal ve İşlevsel Özellikleri

VIP1, ökaryotlarda transkripsiyon düzenleyicilerin en büyük ailelerinden biri olan bazik lörin fermuar grubuna ait, iyi karakterize edilmiş bir transkripsiyon faktörüdür (Jacoby ve diğ., 2002; Ali ve diğ., 2016). Tüm aile üyeleri evrimsel olarak korunmuş olup bazik ve dimerizasyon bölgeleri içeren bazik bir fermuar domeni (bZIP) içerirler (Landschulz ve diğ., 1988; Van der Krol ve Chua, 1991). Her ikisi de, bZIP proteinin “makas-tutma” modelini oluşturan bitişik bir α -helix/sarmalı üzerinde bulunmaktadır (Vinson ve diğ., 1989; Pitzschke ve diğ., 2009). bZIP transkripsiyon faktörleri, yaklaşık 16 amino asitlik bakiyelere sahip bazik gen bölgeleri boyunca gen promotörleri üzerinde belirli *cis* elementlerini bağlayarak hedef genlerini düzenlemektedir (Jacoby ve diğ., 2002). Tercihen, bir ACGT motif (yani G-kutusu, C-kutusu ve/veya A-kutusu) ile bir DNA dizisini tanırlar ve sabit DNA-bağlayıcı motifler vasıtasıyla bağlanmaktadır (Menkens ve diğ., 1995; Jacoby ve diğ., 2002; Ali ve diğ., 2016).

Bazik bölgeler ayrıca nükleo-sitoplazmik protein trafiğini düzenleyen ve diğler NLS-tutma proteinlerini tanıyarak bunlarla etkileşimde bulunan transkripsiyon faktörünün NLS bölgesini de içermektedir (Jacoby ve diğ., 2002; Meier ve diğ., 2011). Diğler taraftan, bZIP domeninin dimerizasyon bölgesi, çeşitli transkripsiyon faktörleri ile homo veya heterodimerler yapan bir yedili lörin tekrarından oluşmaktadır (Jacoby ve diğ., 2002; Schlögl ve diğ., 2004). Jacoby ve diğ., 2002’de *Arabidopsis thaliana*’nın bZIP faktörlerini 75 üye olarak (AtbZIP1-AtbZIP75) sınıflandırılmış ve temel bölge dizisi benzerliklerine göre on gruba (A-S) dağılmıştır. *AtVIP1* veya *AtbZIP51*, üyeleri bazik domende karakteristik bir lizin bakiyesini paylaşan ve yüksek korunmuş arjininin (N-x7-R to N-x7-K) yerini alan olağan dışı bir grup olan grup I’e aittir. VIP1’deki K212 pozisyonunda amino asit değışiminin palindromik olmayan elementlere bir bağlanma önceliğı sağlaması beklenmektedir (Aukerman ve diğ., 1991). Pitzschke ve diğ., 2009 tarafından tarif edildiğı gibi VIP1 tutarlı bir şekilde, VIP1 Yanıt Elementleri “VRE” olarak adlandırılan herhangi bir palindromik elementten yoksun bir DNA motifini (ACNGCT) hedeflemektedir. VRE’lerin strese duyarlı genlerin destekleyicilerinde yoğunlaştığı düşünülmektedir. Bu durum, VIP1’in stres uyaranlarını algıladığında bitkilerde savunma yanıtını aktive etmede rol oynadığını düşündürmektedir (Pitzschke ve Hirt, 2010; Tsugama ve diğ., 2012, Tsugama ve diğ., 2014).

2.6.2. Transformasyon ve Stres Düzenlemesinde VIP1'in İkili Rolü

bZIP transkripsiyon faktörleri, merkezi gelişim ve fizyolojik süreçlerin ana düzenleyicileridir. Diğer birçok biyolojik süreçler arasında; tohum olgunlaşması, morfogenez ve çiçek gelişiminde de önemli rol oynarlar. Daha da önemlisi, bu transkripsiyon faktörleri, ışık sinyalizasyonunda olduğu kadar biyotik ve abiyotik stres yanıtı düzenlemesinde de yer almaktadır (Alves ve diğ., 2013; Ali ve diğ., 2016). Djamei ve diğ., (2007)'de VIP1'in daimi olarak, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal transdüksiyon yolağının bir bileşeni olduğunu açıklanmıştır ve stres uyaranlarını algıladığında, protein kinaz MPK3, sitozolik VIP1'i 79. serinde fosforile ederek, S79'da aktivasyonunu ve molekülün nükleer yeniden lokalizasyonunu uyarmaktadır (Pitzschke ve diğ., 2009; Lacroix ve Citovsky, 2013a). Böylece, dolaylı yoldan aracılık ederek, ilişkili T-kompleksinin (VIP1-VirE2-T-DNA-VirD2), stres-bağımlı bir şekilde nukleusa geçişini sağlamaktadır (Djamei ve diğ., 2007; Pitzschke ve Hirt, 2010).

Hücre nukleusu içine girdikten sonra, transkripsiyon faktörü, hedef genleri VRE bağımlı bir şekilde düzenlemeyi amaçlamaktadır. Strese cevap veren genlerin promotörlerinde yoğunlaşan VRE motifleri, (i) stres yanıtı ve bitki bağışıklığı sinyalizasyonunda (Pitzschke ve Hirt, 2010; Tsugama ve diğ., 2012; Tsugama ve diğ., 2014); ve aynı zamanda (ii) T-DNA kromatin hedeflemesinde, T-kompleksini, ss-TDNA entegrasyonunun “tercihen” gerçekleşeceği VIP1 ile düzenlenen genlerin promotör bölgelerine yönlendirerek (Pitzschke ve diğ., 2009; Tsugama ve diğ., 2012; Lacroix ve Citovsky, 2013; Tsugama ve diğ., 2014) çifte görev gerçekleştirmektedir (Pitzschke ve diğ., 2009; Lacroix ve Citovsky, 2013; Tsugama ve diğ., 2012, Tsugama ve diğ., 2014).

Transfeksiyon boyunca VIP1'in bu ikili rolü, bitki savunma mekanizmasının bir parçası olarak ilk işlevinin, infektiviteyi arttırmak için *Agrobacterium* tarafından bozulduğu ileri sürülmektedir (Djamei ve diğ., 2007). Bu veriler, *Arabidopsis* nukleuslarında VIP1 ve histon H2A varyantı (H2A-1) arasında saptanan bir etkileşim ile desteklenmektedir (Li ve diğ., 2005; Loyter ve diğ., 2005). Ayrıca, VIP1'in kromatin bileşeni olan dört histona (H2A, H2B, H3, ve H4) bağlanması Lacroix ve diğ., (2008) tarafından açıklandığı gibi T-DNA kromatin hedeflemesi için Bourras ve diğ., (2015)'de önerildiği gibi “VirE2-VIP1-nükleozom” yolunun çağrıldığını akla getirmektedir.

2.6.3. VIP1 Tarafından Düzenlenen Genler

VIP1, biyotik ve abiyotik ortamlarla bitki etkileşimlerinin bazı kritik yönlerinde görev alan çok fonksiyonlu bir proteindir (Lacroix ve Citovsky, 2013b). bZIP transkripsiyon faktörünün *Agrobacterium* yanıtlarında (Tzfira ve diğ., 2001; Tzfira ve diğ., 2002), patojen yanıtlarında (Djamei ve diğ., 2007), düşük kükürt yanıtlarında (Wu ve diğ., 2010), osmosensör yanıtlarında (Tsugama ve diğ., 2012; 2014) ve *Arabidopsis thaliana*'daki (Tsugama ve diğ., 2016) dokunma yanıtlarında rol oynadığı bilinmektedir. Stresle aktive edilen VIP1'in aşağı yönündeki (downstream) moleküler olaylar, MPK3 kaskadında bir transkripsiyon düzenleyici olarak rol oynamış ve VIP1 Yanıt Elementleri için VRE olarak adlandırılan promotör bölgesinde yer alan DNA motifine bağlanarak gen transkripsiyonel indüksiyonuna aracılık etmektedir (Pitzschke ve diğ., 2009). Tsugama ve diğ. (2014), VRE motifleri görülen genleri sıralayıp onları strese yanıt veren genlerin promotörleri içinde transkripsiyon başlangıç bölgesinin yukarı yönünde (upstream, örneğin 500 bç veya 1000 bç yukarı yönünde) VRE konumlarına ve kopya sayısına göre sınıflandırmaktadır.

Arabidopsis thaliana'da tanımlanan ilk VRE tarafından düzenlenen genler tioredoksin *Trxh8* (erişim numarası: At1g69880) ve *MYB44* (erişim numarası: At5g67300) transkripsiyon faktörüdür (Pitzschke ve diğ., 2009). *Trxh8* anlatımı, patojen ilişkili moleküler paternler, yaralama ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli streslere yanıt olarak MPK3'ün aktivasyonu ile ilişkilidir. *Trxh8* transkripsiyon faktörü, promotör bölgesi üzerindeki 6 VRE kopyasını barındırırken abiyotik stres toleransı veren bir nukleus stres duyarlı gen olan *MYB44*, 3 VRE kopyası içerir. *MYB44*'ün VIP1 ile bağlantılı olduğu Kromatin İmmünopresipitasyon deneyleriyle (ChIP) *in vivo* olarak gösterilmiştir (Pitzschke ve diğ., 2009). Bundan dolayı, *Arabidopsis thaliana*'da osmosensör sinyal düzenlemesi boyunca bir VIP1 rolü olduğu düşünülmektedir (Tsugama ve diğ., 2012). Diğerleri arasında, dokunmaya duyarlı genler *TCH2* ve *TCH4* (Lee ve diğ., 2005), *EXLA2* ve *XTH23* (Pitzschke ve diğ., 2009; Tsugama ve diğ., 2014), *PDHI* (hipoosmotik strese duyarlı bir gen) (Nakashima ve diğ., 1998) ve *CYP707A1/3* genleri VRE elementleri için kabul edilmektedir.

VIP1 ile düzenlenmiş diğer genler, özellikle patojen türevli sağlayıcılar tarafından indüksiyonu yapılan gen anlatım sürecine dahil olmakta ve anlatım yapmaktadır. Promotör bölgesinde bir adet VRE motifi içeren (Tsugama ve diğ., 2014) *PR1* (patojenite ile ilişkili gen), VRE bağımlı

bir maddede biyotroflara karşı direnç kazandırmaktadır (Pitzschke ve diğ., 2009; Tsugama ve diğ., 2014).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Çalışmada kullanılan arpa çeşitlerine (*Hordeum vulgare* L. cvs. Martı ve Golden Promise) ait tohumlar Trakya Tarımsal Araştırma Merkezi ve USDA Gen Bankası (ABD)'nden sağlanmıştır. Arpa çeşitlerinin özellikleri Tablo 3.1'de detaylı olarak belirtilmektedir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan arpa çeşitleri ve özellikleri.

Arpa Çeşidi	Özellikler
Martı	2009 yılında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil edilmiştir. 6 sıralı, yemlik, külleme ve pas hastalıklarına karşı toleranslı, arpa yaprak çizgili hastalığına ve arpa yaprak leke hastalıklarına karşı toleranslı, sap ve başak kırıcılığına karşı dayanıklıdır (http://arastirma.tarim.gov.tr/ttae7).
Golden Promise	2 sıralı, kısa boylu, verimi yüksek, maltlık arpadır, Marythrope çeşidinden radyasyon uygulanarak elde edilmiş mutandır, patojene karşı duyarlı bir çeşit (USDA, 2017).

Arpa çeşitlerine ait tohumlar %25 hipoklorit solüsyonunda bekletilip daha sonra steril distile suda 3 kere yıkanmıştır. Tohumlar, bitki büyütme kabiniinde kontrollü koşullar altında (25°C gün/gece, 40–50% görel nem oranı ve 8 s ışık/16 s karanlık fotoperiyodunda ışık yoğunluğu 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) düzenli olarak yenilenen Hoagland solüsyonunda (bkz. Tablo 3.2) -3 yapraklı evreye- kadar çimlendirilmiştir.

Tablo 3.2: Hoagland solüsyonunun içeriği.

Elementler	Moleküler ağırlık (g/mol)	Stok Konsantrasyonu (gr/L)	Final Konsantrasyonu (mL/L)
Ca(NO₃)₂·4H₂O	236.1	236.1	7
KNO₃	101.1	101.1	5
KH₂PO₄	136.1	136.1	2
MgSO₄·7H₂O	246.5	246.5	2
Iz Elementler			1
H ₃ BO ₃	61.8	2.8	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.9	1.8	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.6	0.2	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.7	0.1	
NaMoO ₄	205.9	0.025	
FeEDTA*			1
EDTA.2Na	338.2	10.4	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.0	7.8	
KOH	56.1	56.1	

*1 L KOH hazırlandı ve H₂SO₄ ile pH 5.5'e ayarlandı. Tabloda belirtilen miktarda FeSO₄·7H₂O ve EDTA.2Na eklendi (Hoagland ve Arnon, 1950).

Embriyonik kallus kültürü, arpa tohumlarının 10 dakika boyunca %25 hipoklorit çözeltisi ile dezenfekte edilip daha sonra 3 kez (her biri 10 dakika) sterilize su ile yıkanarak başlatılmıştır. Olgunlaşmamış embriyoların enine kesitleri (1-2 mm) daha sonra 2.5 mg/L 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) içeren Murashige ve Skoog (MS) bazlı embriyogenik kallus besiyerinde (Tablo 3.3) kültürlendi. 8-12 hafta boyunca $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de karanlıkta bırakılan kültürler her 2 haftada bir taze MS ortamına aktarıldı.

Tablo 3.3: 1X Murashige ve Skoog ortam bileşenleri.

Bileşenler	1 L tamamlamak için eklenen miktar
Sükroz	30 g
MS Tuzları (#MSP01-1LT)	4.4 g
Agar	Up to 1 L

N.B. 5,7<pH<5,8; otoklav (121°C; 1/2 atmosfer basınç altında, 15 dk); MS vitaminler (0.1%)

3.2. ARPA'DA VIRE2 İLE ETKİLEŞEN VIP1 PROTEİNİNİN TANIMLANMASI

3.2.1. Arpa Genomunda VIP1'İN Araştırılması

Monokotiledon *Hordeum vulgare* L.'de VirE2 Etkileşen Protein 1 ("VirE2-Interacting Protein 1" VIP1)'in kodlama dizisinin tamamını (cds) bulmak için ön araştırma yapıldı. BLAST analizi

bir VIP1 kodlama dizisinin tamamının *Triticum aestivum* L.'de bulunduğunu gösterdi. *Triticum aestivum* L. VIP1 geninin kodlama dizisinin tamamı (KF752431.1) ile arpanın kodlayan bölgeleri arasında BLAST analizi yapıldı. Elde edilen veriler analiz edildiğinde, *Haruna nijo* çeşidinde iki klon (AK365082.1; AK368441.1) saptanmıştır (NCBI- Matsumoto ve diğ., 2011).

Hordeum vulgare L. klon NIASHv2030M06 (aksesyon numarası: AK365082.1) ile *TaVIP1* arasında %93 benzerlik olduğu görülmüştür (e değeri:0.0).

3.2.2. *HvVIP1*'in Çoğaltılması ve Klonlanması

HvVIP1 genin çoğaltılması tek aşamalı RT-PCR'la yapıldı. Tablo 3.4'te, kullanılan primerlerin dizileri verilmiştir. Primer setleri Integrated DNA yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır (Integrated DNA Technologies- <https://eu.idtdna.com>).

Tablo 3.4: RT-PCR'de kullanılan VIP1 geni için tasarlanan primer dizileri ve özellikleri.

Amaç	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Amplikon (bp)
Dizileme	5' TTGACCGGAGCTTGACTG 3' 5' ACCGAACTGTGATCGGTATG 3'	59	1031
	5' TTGACCGGAGCTTGACTG 3' 5' GGAGTTTGAGCTCTCTGTTCTC 3'	55	699
	5' TACCGGACTACGCCAAGA 3' 5' ACCGAACTGTGATCGGTATG 3'	55	590
	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' 5' GTCATAGCTGTTTCCTG 3'	45	-
Koloni PCR (M13)	5' TACCGGACTACGCCAAGA 3' 5' GGAGTTTGAGCTCTCTGTTCTC 3'	59	258

HvVIP1 cDNA dizisinin çoğaltımı, ticari kit GoTaq Flexi DNA Polimeraz (#M8305, Promega) talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiştir. Tablo 3.5'te belirtilen bileşenlerle PCR yapılmış olup (Bio-Rad, T100™ Thermal cycler) PCR koşulları Tablo 3.6'da gösterilmektedir.

Tablo 3.5: PCR’da kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
Tampon, 5 X	5	1 X
MgCl ₂ , 25 mM	2	2 mM
dNTP karışımı, 10 mM	0.5	0.2 mM
Primer (ileri), 10 µM	0.8	0.32 µM
Primer (geri), 10 µM	0.8	0.32 µM
Taq polimeraz	0.2	0.5 U
cDNA	5-10	-
Nükleaz içermeyen su	-	-
Toplam	25	

Tablo 3.6: PCR koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk.	1
Denatürasyon	95	45 sn.	
Bağlanma	45-60	30 sn.	34
Uzama	72	1-1.30 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

PCR sonucu çoğaltılan gen ürünleri, üretici firmanın prosedürüne göre (InsTAclone Kit Thermo scientific, #K1213) klonlama vektörüne (pTZ57R/T) klonlandı. *Escherichia coli* JM107 ırkı bir gece önceden Luria Bertani (LB) besiyerinde (Tablo 3.7) 37°C sıcaklığında 200 rpm’de çalkalanarak sıvı kültürde üretildi. İlgili genlere ait PCR ürünleri kullanılarak Tablo 3.8’de belirtilen bileşenlerle ligasyon karışımı hazırlandı. Karışım kısa bir süre votekslendi ve 3-5 sn. santrifüj edildikten sonra 3 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Tablo 3.7: Bakteri geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri Luria Bertani (LB) besiyeri.

Bileşenler	Miktar (g/L)
Trypton	10
NaCl	10
Maya özü	5

Tablo 3.8: Klonlamada kullanılan ligasyon karışımı.

Bileşenler	Miktar (µl)
Vektör, pTZ57R/T	1,5
Ligasyon Tamponu, 5 X	3
PCR ürünü	3
T4 DNA Ligaz	0.5
Nükleaz içermeyen su	7
Toplam	15

750 µl besiyerinde gece boyu üretilen JM107 hücrelerinden 150 µl eklenip hücreler nazıkçe süspanse edildikten sonra 37°C ve 180 rpm’de 1 saat üremeye bırakıldı. Bakteri hücreleri 6000 rpm’de 2 dk. çöktürölüp üst sıvı atılmıştır. Hücreler, eşit hacimde TA ve TB solüsyonları içeren, 150 µl T karışım solüsyonunda süspanse edilip 5 dk (InsTAclone Kit Thermo scientific, #K1213). boyunca buzda bekletilmiştir. Ardından, 5000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilip üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Hücreler 100 µl T karışım solüsyonunda tekrar süspanse edilip 5 dk. boyunca buzda bekletilmiştir. Ardından 5 µl ligasyon karışımı eklenilerek 10 dk. boyunca buzda bekletilmiştir. Hazırlanmış olan hücrelerden 50 µl alınıp önceden inkübatörde ısıtılmış olan LBA besiyerlerine (50 mg/L ampisilin, X-Gal ve IPTG eklenmiş) ekilerek 37 °C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Gece boyu LBA besiyerinde inkübe edilen hücrelerden 4 tane beyaz koloni seçilerek 10 µl steril dH₂O’da çözündürülmüştür. Kolonilerin ilgili PCR ürünü alıp almadığını belirlemek için steril suda çözündürülen hücrelerden 2 µl alınarak koloni PCR gerçekleştirilmiştir (M13 primer kullanarak- bkznz. Tablo 3.6). Ardından PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Bu şekilde pozitif kolonilerin (beklenen boyutta DNA fragmenti taşıyan) tespit edilmesi sağlanmıştır.

3.2.3. VIP1-Taşıyan Plazmitlerin İzolasyonu

Klonlama sonrasında, pozitif kolonilerden plazmid izolasyonu yapılması amacıyla, suda çözündürülen koloniler 500 µl LB besiyerine (50 mg/L ampisilin içeren) eklenilip 6 saat boyunca 37 °C’de 180 rpm’de çalkalanmıştır. Süre sonunda bu hücrelerden 150 µl alınarak 50 mg/L ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine eklenip 37 °C, 180 rpm’de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Plazmid izolasyonu, tedarikçi firmanın (Sigma, PLN70) prosedürüne uyularak gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda tüm işlemler oda sıcaklığında ve tüm santrifüj işlemleri 14000 rpm’de yapılmıştır. Öncelikle LB besiyerinde üretilen hücreler santrifüjle 1 dk. çöktürölüp üst sıvılar atılmıştır. Ardından, pelletler 200 µl “resüspanasyon solüsyonu” (RNaz eklenmiş) ile

           1,5 ml'lik mikro tüplere alınmıştır. Tüplere 200   l “lizis solüsyonu” eklenip tüpler nazikçe ters yüz edildikten sonra 5 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından, tüplere 350   l “nötralizasyon solüsyonu” eklenip yine tüpler 4-6 kez nazikçe ters   virilerek karıştırılmıştır. Ardından, tüpler 10 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki ba lama kolonlarına 500   l “kolon hazırlama solüsyonu” eklenip 1 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki alt sıvılar atılarak ba lama kolonlarına lizat eklenilerek tüpler 1 dk. boyunca santrifüje edilmiştir. Ardından tekrar alt sıvılar atılmıştır. Kolonlara 750   l “yıkama solüsyonu” eklenip 1 dk. boyunca santrifüj edildikten sonra alt sıvılar atılmıştır. Kolonların kurutulması amacıyla 1 dk. boyunca santrifüj yapılmıştır. Kolonlar yeni tüplere aktarılıp 30   l “elüsyon solüsyonu” eklendikten sonra 1 dk. boyunca santrifüj yapılarak plazmid DNA'ları elde edilmiştir. İzole edilen plazmidlerin miktarları spektrofotometre cihazı ile          belirlenmiştir. Ardından, plazmid DNA'ları 100 ng olacak   kilde sulandırılıp dizileme hizmet alımı için tedarikçi firmaya gönderilmiştir. *Hordeum vulgare* cv. Martı *HvVIP1*'in kodlama dizisinin tamamı dizileme sonuçlarının analizleri sonrasında NCBI'a gönderilmiştir (info@ncbi.nlm.nih.gov). Databankasına gönderme işlemi “Sequin” yazılımı (Sequin Application version 15.50) kullanılarak yapılmıştır. Dizi daha sonra   evrimi  i olarak gönderilmiştir.

3.2.4. Dizi Analizleri

Filogenetik a    MEGA4 yazılımında Maksimum Likelihood//Komşu-Birleştirme (NJ) yöntemi kullanılarak kurulmuştur (<http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>). Evrimsel uzaklıklar Gonnet matriks metodu ile hesaplanmış ve site başına amino asit s  stit  syonlarının sayısını tahmin etmek için kullanılmıştır. Her düğüm için bootstrap değeri 1.000 olarak seçilmiştir.    itli homolog bitki türleri arasındaki evrimsel ilişkiler (yakınlık), bZIP bölge dizilimlerinin benzerliklerine dayanılarak değerlendirilmiştir. Daha sonra Moleküler Evrimsel Genetik Analiz yazılımının (MEGA) JTT matriks tabanlı modeline dayanarak moleküler filogenetik analiz yöntemi uygulanmıştır. Analiz,    itli ilgili ve ilgili olmayan türlerden 10 farklı amino asit dizisini içermektedir. Filogenik a         e göre   zili , dal uzunlukları ise bölge başına yer değiştirme sayısına göre     lm  t  r.

3.3. ARPA'DA XRCC4 PROTEİNİN TANIMLANMASI

X-ray repair cross-complementing 4, (XRCC4), *Triticum aestivum* L. içerisinde tanımlanıp JF969275 aksesyon numarası ile Wang ve di ., 2011 kayıt edilmiştir. *Hordeum vulgare* L. ile

yapılan BLAST analizi *XRCC4* dizisi (cv. Haruna Nijo, erişim numarası AK358119.1) ile eşleşmektedir (Matsumoto ve diğ., 2011). *XRCC4*'de olası kodlama yapan dizilerin tamamı karakterizasyonda ve daha sonra Martı çeşidinde klonlanmak üzere primer setleri tasarımı için bir platform olarak kullanılmıştır. *HvXRCC4* tam dizisi, yukarıda hâli hazırda sunulmuş olan ilgili bölüm 3.2'de, VIP1 karakterizasyonu için tarif edilen adımlar takip edilerek elde edilmiştir. *XRCC4* primer setleri IDT yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.9: PCR'de kullanılan *XRCC4* geni için tasarlanan primer dizileri ve özellikleri.

Amaç	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Amplik on (bp)
Dizileme	5' GCCGTCGATTTCTCTCG 3'	55	485
	5' GCGTCTTCCTAACCAACCTCTT 3'		
	5' GGCTGAGTGAAGAGGTTGTTAG 3'	55	508
	5' CTAGCACACTGGAGGAAAGAAA 3'		
Koloni PCR (M13)	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' 5' GTCATAGCTGTTTCCTG 3'	45	-

3.4. *HvVIP1*'İN DOKU-SPESİFİK GEN ANLATIMI

VIP1 gen anlatımı, normal koşullar altında bu gibi transkripsiyon faktörlerinin anlatım profilini anlamak amacıyla farklı arpa dokularında incelenmiştir. Buna göre arpa yaprakları, kökleri, olgunlaşmamış embriyolar, kalluslar ve koleoptillerden örnek alınarak deneyler cv. Martı'da gerçekleştirilmiştir. Yapraklar ve kökler, Bölüm 3.1'de belirtilen koşullar altında büyütme kabininde yetişen 3-yapraklı aşamadaki genç bitkilerden toplanmıştır. Tohumlardan olgunlaşmamış embriyolar toplanıp, kalluslar 4 haftalıkken, koleoptiller ise 3-4 günlük çimlenme sonrasındaki tohumlardan örneklenmiştir.

3.5. BİYOTİK VE ABİYOTİK STRES ALTINDA *HvVIP1* GEN ANLATIMI

3.5.1. Kuraklık Şoku Stresi

Martı çeşidindeki kuraklık şoku (KŞ), çimlenmeden önce perlit içeren şişeciklerde %0.6 NaOCl içinde yüzey sterilize edici tohumlarla başlatılmıştır. Benzer gelişim evrelerinin fideleri (Zadocks skalası 12; 70-90 cm), yarı sulandırılmış Hoagland çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1950) ile doldurulmuş 5 litrelik kaplara aktararak kontrollü koşullar altında (25°C, %40-50 bağıl nem, ve 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ile 8 saat aydınlık /16 saat karanlık fotoperiyod)

yetiştirilmiştir. KŞ 3 yapraklı aşamadaki genç bitkilere uygulanmıştır. Bitkiler konteynırlardan çıkarıldıktan ve bitki büyüme odası içinde filtre kağıtları üzerine yerleştirilirken sonra, kontrol bitkileri de aynı koşullar altında taze hidroponik çözeltilere tabi tutulmuştur. Tamamıyla 3 bitkiden büyütülen yaprak parçaları, 0.5, 1, 4 ve 8 saat ışık periyodunda işlem gören hem kontrol hem de KŞ'lu bitkilerden hasat edilmiştir. Yapraklar doğrudan sıvı nitrojen içinde dondurularak -80 °C'de saklanmıştır. 0 saat bitkilerin konteynırdan çıkarıldığı zaman noktasını temsil eder (Gürel ve diğ., 2016).

3.5.2. Tuzluluk Stresi

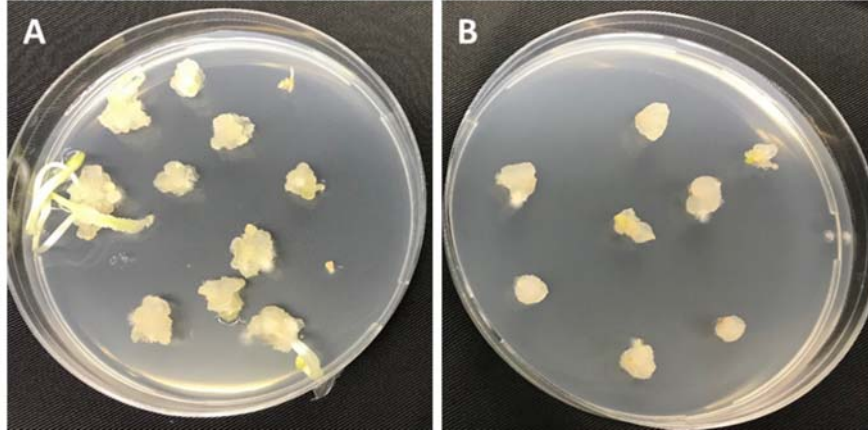
Bitki tohumları çimlendirildikten sonra (Bknz. Paragraf 3.1) perlit içeren saksılara (6 cm × 6 cm × 8 cm) aktarılarak 3 yapraklı aşamaya gelinceye kadar (yaklaşık 3 hafta) düzenli şekilde içeriği 0.5X Hoagland solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) ile sulanmıştır. 3 yapraklı aşamaya gelen arpa bitkilerine tuz stresinin uygulanması için bitkiler 0.5X Hoagland solüsyonu içeren hidroponik sistemlere aktarılmıştır. Hidroponik sisteme final konsantrasyonu 160 mM olacak şekilde uygun miktarda NaCl eklenmiştir (160 mM NaCl'nin kökteki uzamayı kısıtlayan kritik bir konsantrasyon olduğu rapor edilmiş (Uçarlı, 2016)). Bitkiler 0, 2, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat hidroponik sistemde tutularak tuz stresi uygulanmıştır. Her bir zaman noktası için, 3 bitkiden yeni yaprak ve kök örneği (100 mg) alınıp -80°C'ye 'ye kaldırılmıştır.

3.5.3. *Agrobacterium tumefaciens* Enfeksiyonu

Agrobacterium suşu olarak hipervirülens AGL-1 kullanılmıştır. Suş karbenisilin ve Rifampisin için antibiyotik direnci taşımaktadır. *Agrobacterium tumefaciens* suşu AGL-1 kolonileri, 20 mg/L rifampisin ve 200 mg/L karbenisilin ile desteklenmiş LB besiyeri (10 g/L tripton, 10g/L maya özütü, 5 g/L NaCl, pH 7.0)'nde elde edilmiştir. Koloniler 28°C'de 180 rpm'lik çalkalama hızında iki gün boyunca üretilmiş. AGL-1 kolonileri log fazına ulaştığında ($0.8 < OD_{600} < 1$) 6000 rpm'de 15 dakika boyunca 4°C'de santrifüjleme sonrası toplanmıştır. *Agrobacterium* hücreleri daha sonra $OD_{600} = 1$ nihai optik yoğunluğunda büyüdükleri (Joyce ve diğ., 2010), 10 mM MES [2- (N-morfolin) -etan sülfonik asit], 200 uM asetosiringon, 10 g/L glikoz, 1 g/L asit pluronik ve 2 mM CaCl₂ içeren yarı-kuvvetli sıvı MS (Murashige ve Skoog) inokülasyon besiyeri (IM/Inoculation Medium) içinde yeniden süspanse edilmiştir.

Martı cv. (patojen-dirençli) ve Golden Promise cv. (patojen-duyarlı) (Şekil 3.2) çeşitlerinden elde edilen dört haftalık taze embriyo kökenli kallusları karanlıkta ve oda ısısında 30 dakika

inokülasyona bırakıldı (Şekil 3.3). Daha sonra kalluslar steril kağıtta kurutularak yardımcı bir kültür ortamına (“co-cultivation”) aktarıldı (MS, 2mg/L dicamba, 500µM Asetosiringon, ve 800 mg/L taze hazırlanmış L-sistein). Enfekte olan kalluslar bu yardımcı kültür ortamında 6, 12, 24, 48 saat aralıklarla karanlıkta bekletildi. 0 olarak belirtilen zaman noktası herhangi bir uygulama yapılmadan önceki zamanı ifade etmektedir. Moleküler analizlere geçilmeden önce, yukarıda belirtilen farklı zaman aralıklarında hasat edilen enfekte kalluslar ezildi ve -80°C’de saklandı. Mock uygulaması, içinde bakteri suşu içermeyen inokülasyon ortamıdır. Her test için kontrol görevi görür.



Şekil 3.1: Her iki çeşitindeki embriyogenik kalluslar (8 haftalık). (A) Martı ve (B) Golden Promise, *Agrobacterium* AGL-1 suşu ile enfekte edilmeden önce, karanlıkta 2.5 mg/L Dicamba ile desteklenmiş MS besiyerinde yetiştirilmiştir.



Şekil 3.2: Embriyogenik kalluslar (4 haftalık) ko-kültivasyon ortamına alınmadan önce kaplarda bulunan 10 mL aşılama ortamına (IM) 30 dakika boyunca daldırılarak karanlıkta oda sıcaklığında tutulmuştur.

3.5.4. *Fusarium culmorum* Enfeksiyonu

Arpada patojenik bir izolat olan *F. culmorum* (F16), biyotik stres altında VIP1'in anlatımını araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada, virülansı yüksek olan *F. culmorum* F16 izolatı (Aksesyon: 16-5-3) (Tunalı ve diğ., 2006; Gürel ve diğ., 2010; Çepni ve diğ., 2013) kullanılmıştır.

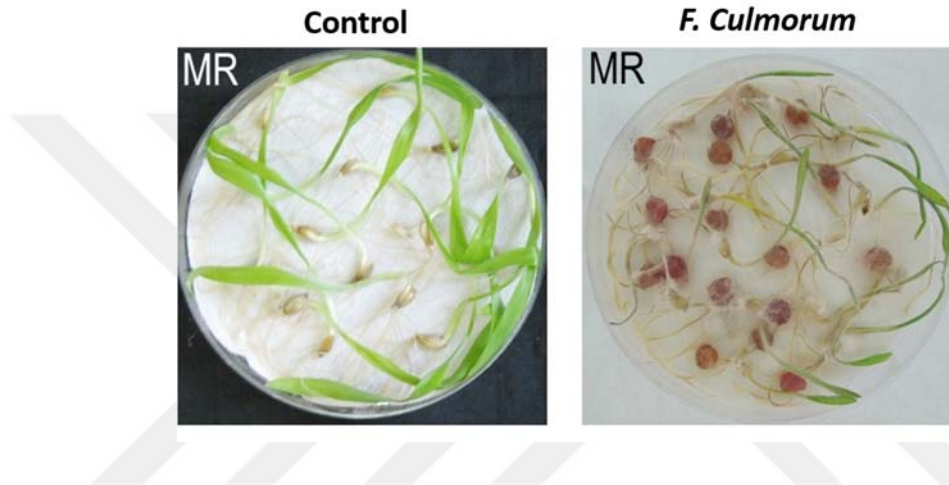
Mantar büyümesi ve gelişimi, Tufan ve diğ., 2016b'deki protokolün ile gerçekleştirilmiştir. Kısaca, F16, Patates Dekstroz Agar ortamı (PDA) (Tablo 3.10) içeren Petri kapları üzerinde kültürlenerek 7 gün boyunca kontrollü koşullar altında 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsü boyunca arpa kök enfeksiyonu gerçekleşmeden önce 50% bağıl nem ve 25 °C'ye ayarlanmış etüvde (Wise Cube, Daihan Scientific, Kore) inkübe edilmiştir.

Tablo 3.10: *F. culmorum*'un geliştirilmesinde kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

Besiyeri	Bileşenler	Miktar (g/L)
Patates Dekstroz Agar (PDA)	Patates Dekstroz Agar Özütü	39

Arpa bitki köklerine mantar enfeksiyonu uygulamadan önce, Martı tohumları 5 dakika boyunca sterilize edici çözelti (% 0.64 sodyum hipoklorit) ile dezenfekte edilmiş ve üç kez de steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Tohumlar daha sonra steril deiyonize su ile ıslatılmış filtre kağıtları içeren Petri kaplarına (9 cm) yerleştirilerek çimlenmek üzere 2 gün boyunca karanlıkta

bekletilmiştir. Yarı çimlendirilmiş tohumlar daha sonra steril deiyonize su ile doyurulmuş ve 25°C'de gece boyunca karanlıkta tutulan filtre kağıtları yerleştirilmiş daha geniş petri kaplarına (14 cm) aktarılmıştır. Enfeksiyon, F16'nın 5-6 mm çapındaki PDA besiyeri diskleri ana kök üzerinde, kök ile doğrudan temas halinde olan miselyum ile tohumun (3 günlük bitki fideleri) yaklaşık 1 cm altında baş aşağı yerleştirildiğinde elde edilmiştir. Kontrol işlemlerinde, steril PDA besiyer diskleri köklere yerleştirilirken, enfekte grupta F16 PDA diskleri Şekil 3.4'te gösterildiği gibi arpa kökleri üzerine serilmiştir (Tufan ve diğ., 2016b).



Şekil 3.3: Kontrol ve *F. culmorum* (F16) ile enfekte Martı kökleri (MR) (Tufan ve diğ., 2016b).

Örnekler birkaç zaman noktasından sonra (yani 12, 24, 48, 72 ve 96 saat) her iki gruptan (kontrol ve enfekte) olmak üzere toplanmıştır. Deney, kontrollü büyüme odasında (Angelantoni EHC, Massa Martana, PG, İtalya), 25 °C'de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda, % 40 bağıl nemde ve 16/8 saat gündüz/gece döngüsünde gerçekleştirilmiştir (Tufan ve diğ., 2016b).

3.6. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

Çeşitli biyotik ve abiyotik stresler altındaki arpa çeşitlerinde *HvVIP1* anlatım profili ve ilişkili patogenez genleri ile ilişkisi RT-PCR ve kantitatif Real time PCR (qPCR) teknikleri ile tanımlanmıştır. Bunun için enfeksiyon yapılmadan hemen önce ve enfeksiyondan sonra farklı saatlerde bitkilerin köklerinden ve yapraklardan örnekleme yapılmıştır. Dokular ani olarak sıvı azotla dondurulup -70 °C'de muhafaza edilmiştir. Her bir örneklemede 5 bitki kullanılmıştır. Deneylerde iki teknik ve iki biyolojik tekrar yapılmıştır. Analizlerde, referans gen olarak aktin (*HvACT*) kullanılmıştır.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Bitki kökleri, sıvı azotla toz haline getirilene kadar iyice parçalanarak örnekler 100 mg olacak şekilde 1,5 ml'lik mikro tüplerde tartılmıştır. Ardından, tüplerin üzerine 500 µl Trizol solüsyonu (Ambion®) eklenip, iyice karıştırılarak 5 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler, kısa bir süre santrifüj edildikten sonra, tüplere 100 µl kloroform eklenilerek 15 sn. boyunca vorteksle karıştırılıp 3 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 40 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. RNA'nın olduğu en üst faz (250 µl) yeni mikro tüplere aktararak tüplere 250 µl izopropanol eklenmiştir. Nazikçe karıştırılan tüpler 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilip ardından 40 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra üst sıvılar atılarak pelletlerin üzerine, DEPC uygulanmış su (DEPC-dH₂O) kullanılarak hazırlanan % 75'lik etanol eklenmiştir.

Tüpler 5 dk. boyunca santrifüj edilerek ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır. Etanolle yıkama işlemi 3 kez gerçekleştirilerek pellet yaklaşık 10 dk. boyunca kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra RNA'ların üzerine 56 µl DEPC-dH₂O eklenmiştir. Örnekler, RNA pelletlerinin çözünmesi için 56 °C'de 10 dk. inkübe edilip bu süre sonunda buza alınmıştır. İzolasyonda tüm santrifüj işlemleri 4°C ve 4000 rpm'de gerçekleştirilmiştir. RNA'ların miktar ve saflıklarının belirlenmesinde spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c) cihazı kullanılmıştır. Bunun için cihaza 1,5 µl RNA örnekleri yüklenip RNA'ların 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmüştür. RNA'ların saflıkları ise 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarındaki absorbans oranları ile belirlenmiştir. RNA'ların sağlamlığının belirlenmesi için ise, RNA'lar %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

İzole edilen total RNA örneklerinde, olası genomik DNA kontaminasyonunun önlenmesi için RNA'lara üretici firmanın protokolü izlenerek (Fermentas, EN0525) DNaz I uygulaması yapılmıştır. DNaz I uygulaması sonrasında RNA'ların sağlamlığı %1'lik agaroz jel elektroforeziyle tekrar kontrol edilip ardından RNA'lar moleküler analizlerde kullanmak üzere küçük hacimlere bölünmüştür.

3.6.2. RNA Örneklerinden cDNA Sentezi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (PCR) için, DNaz I uygulanmış RNA örneklerinin cDNA sentezleri (Invitrogen, 11904-018) gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, Tablo 3.11’de belirtilen miktar ve konsantrasyonlarda reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Ardından bu RNA/primer karışımı 65 °C’de 5 dk. boyunca inkübe edilip süre sonunda buzda 1 dk. boyunca bekletilmiştir. Ardından ikinci bir aşama olarak, ayrı bir tüpte Tablo 3.12’de belirtilen reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Her bir RNA/primer karışımına bu reaksiyon karışımı eklenip nazikçe karıştırılarak kısa bir süre santrifüj edilmiştir. Örnekler, 42°C’de 2 dk. boyunca inkübe edilip ardından her bir tüpe 1 µl ters transkriptaz enzimi (SuperScript™ RT: 50U/µl) eklenerek 42°C’de 50 dk. boyunca inkübe edilmiştir. Reaksiyon 70°C’de 15 dk. boyunca tutularak sonlandırılmıştır. Ardından örnekler buza alınarak cDNA örnekleri 1/8 oranında sulandırılarak -20°C’ye kaldırılmıştır.

Tablo 3.11: İlk aşama olarak cDNA sentezinde kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
Oligo (dT)12-18	1	0,025 µg/µl
dNTP karışımı, 10 mM	1	0,5 mM
Total RNA, 500 ng/µl	8	200 ng/µl
Toplam	10	

Tablo 3.12: İkinci aşama olarak cDNA sentezinde kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
Tampon, 10 X	2	1 X
MgCl ₂ , 25 mM	4	5 mM
DTT, 100 mM	2	10 mM
RNaseOUT, 40 U/µl	1	2 U/µl
Toplam	9	

3.6.3. Gen Anlatımlarının Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile Belirlenmesi

HvVIP1, *HvXRCC4* ve *HvACT* anlatım analizlerinde, tek aşamalı RT-PCR’la yapılmıştır. Tablo 3.4 ve 3.8’de analizde kullanılan primerlerin dizileri verilmiştir. RT-PCR’de kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.13’te, reaksiyon koşulları ise Tablo 3.14’te gösterilmektedir.

Tablo 3.13: RT-PCR’de kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
Master mix, 2 X	12,5	1 X
Pimer (ileri), 10 µM	2	0,8 µM
Pimer (geri), 10 µM	2	0,8 µM
RNA, 300 ng	2	24 ng/µl
AMV ters transkriptaz	0,5	0,1 U/µl
Nükleaz içermeyen su	6	-
Toplam	25	

Tablo 3.14: RT-PCR reaksiyon koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
cDNA’ya çevirme	45	45 dk.	1
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	1
Denatürasyon	95	45 sn.	
Bağlanma	55-60	30 sn.	34
Uzama	72	1dk.	
Son uzama	72	5-10 dk.	1

RT-PCR ürünleri ve PCR ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforeziyle analiz edilmiştir. Agaroz jel hazırlamak amacıyla %1’lik agaroz tartılıp 1X TAE tamponunda (Tablo 3.15) çözülmüştür. Örneklerin karşılaştırılabilmesi için ürün boyutlarına uygun olan, boyutu bilinen standart bir DNA ladder kullanılmıştır (Fermentas; SM0241, SM0311). Tüm örnekler 70 V’da 50 dk. boyunca yürütülmüştür. Elektroforez sonrasında örnekler, UV ışık altında jel görüntüleme cihazında (Avegene, AG-LA200R) görüntülenerek ardından fotoğrafları çekilmiştir.

Tablo 3.15: Agaroz jel hazırlığında ve elektroforezinde kullanılan tampon içerikleri.

Tampon	İçerik
Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu	42 g. Tris bazi, 57,1 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
6 X elektroforez yükleme tamponu	% 0,25 Bromo fenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol, % 40 sukroz

3.6.4. qPCR ile Gen Anlatımı Analizleri

Gen anlatımında kullanılacak genlere özgü primer çiftleri IDT (Integrated DNA Technologies) programı aracılığıyla tasarlanmıştır (<https://eu.idtdna.com>). qPCR’de kullanılacak primerlerin tasarlanmasında, primer uzunluğu, erime sıcaklığı, %GC içeriği ve gen ürünlerinin uzunluğu dikkate alınmıştır. Primerlerin primer-dimer etkileşimlerine (self-dimer, hetero-dimer)

girmediği ve sa tokası yapısı oluşturup oluşturmadığı OligoAnalyzer 3.1 yazılımı ile kontrol edilmiştir (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Sentezlettirilen primerler 100 µM olacak şekilde nükleaz-içermeyen suyla zndrlerek -20°C’de muhafaza edilmiştir. Gen anlatımı analizlerinin gerçekleştirilmesinden önce sentezlettirilen primerlerin optimal bağlanma sıcaklıkları gradient PCR yapılarak (Bio-Rad, T100™ Thermal cycler) belirlenmiştir.

Analiz edilen genlerin NCBI erişim numaraları ile primer dizileri ve zellikleri Tablo 3.16’da gösterilmektedir.

Tablo 3.16: qPCR’de kullanılan genler, tasarlanan primer dizileri ve zellikleri

Gen Adı	Erişim No	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Ampliko n (b)
<i>HvVIP1</i>	AK365082	5’-GAGAGCTCAAACCTCCGGTTG -3’ 5’-GAACTTGACCTGCCGCTATC -3’	60	114
<i>HvPR1</i>	X74939	5’-CGCCGGGAATGTTGTTGGAC-3’ 5’-ACGAGCGTGCATGAATCCCA-3’	60	126
<i>HvPR4</i>	Y10814	5’-GCCAAGATCGACACCAACGG-3’ 5’-CAGTCCGAGCTGCTCACTCA-3’	60	150
<i>HvPR10</i>	AY220734	5’-GCGGCTAGGGTGTTC AAGAC-3’ 5’-CCTGAGCTTCGCCACACAAG-3’	60	123
<i>HvMPK3</i>	AK376245	5’ -GGTCACCGCCAAGTACAA -3’ 5’ -AAGGCGTTGGCGATCTT -3’	59	123
<i>HvBAS1</i>	Z34917	5’-CGTCACCAAATCGATCTCAAA-3’ 5’-TCCACACTACGGCCAATACC-3’	60	141
<i>HvACT</i>	AK362208	5’-CGTGTTGGATTCTGGTGATG -3’ 5’-AGCCAC ATATGCGAGCTTCT -3’	60	208

Stres duyarlı ve savunma-ililişkili genlerin (*HvVIP1*, *HvMPK3*, *HvBAS1*, *HvPR1*, *HvPR4*, ve *HvPR10*) anlatım analizleri qPCR ile yapılmıştır. qPCR için öncelikle “2X alışma solüsyonu” hazırlanmıştır (Tablo 3.17). Ardından, ilgili cDNA ve primerler kullanılarak hazırlanan bileşenler (Tablo 3.18) 96 kuyucuklu plakaya konulup plakanın üzeri şeffaf filmle kapatılmıştır. Plaka, 1500 rpm’de 30 sn. boyunca santifj edildikten sonra Roche Light Cycler 480 cihazına yerleştirilmiştir. Örnekler, Tablo 3.19’da belirtilen reaksiyon koşullarında analiz edildi.

Tablo 3.17: 2X çalışma solüsyonunun hazırlanması.

Bileşenler	Miktar (µL)	Son Konsantrasyon
EBB Tamponu (2X)	0,5	1 X
dNTP karışımı, 10 mM	0,2	0,2 mM dNTP
Taq polimeraz	0,1	0,05 U/µl
Evagreen boyası, 20 X	0,5	1X
Nükleaz içermeyen su	3,7	-
Toplam	5	

Tablo 3.18: qPCR’de kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktar (µL)	Son Konsantrasyon
2 X çalışma solüsyonu	5	2X
Pimer (ileri), 10 µM	0,25	0,25 µM
Pimer (geri), 10 µM	0,25	0,25µM
cDNA, 25 ng	4	10 ng/µl
Nükleaz içermeyen su	0,5	-
Toplam	10	

Tablo 3.19: qPCR reaksiyon koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk.	1
Denatürasyon	95	10 sn.	
Bağlanma	60	10 sn.	40
Uzama	72	10 sn.	

En son aşama olarak, istenen hedef bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığını anlayabilmek için elde edilen floresansın erime eğrisi analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi için örnekler 95°C’de 5 sn., 65°C’de 1 dk. ve 97°C’de 1 dk. boyunca tutulmuştur.

qPCR verileri Roche LightCycler 480 yazılımı aracılığıyla elde edilerek Microsoft Word Excel programına aktararak mutlak kantifikasyon için standart eğri yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu yöntemle ilgili dizisinin kopya sayısı hesaplanmaktadır. Hedef genlerin görece mRNA seviyelerinin belirlenmesi için ortalama hedef gen kopya sayısı ortalama referans gen (*HvACT*) kopya sayısına oranlanmıştır (normalizasyon).

3.6.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak test edilmiştir. Analizler, GraphPad Prism istatistik programında tek yönlü ANOVA ve LSD testi (En küçük Anlamli Fark) kullanılarak yapılmıştır. Arpa'nın strese karşı analizinde farklı yıldızlarla gösterilen sütunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($P < 0,05$). Moleküler analizlerde, zamana bağlı karşılaştırmalar her çeşit için 0. saate (kontrol) göre yapılarak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar yine * (yıldız) işareti ile gösterilmiştir. Martı ve Golden Promise arpa çeşitleri arasında analiz edilen zaman aralıklarındaki istatistiksel farklılıkların belirlenmesinde GraphPad Prism (sürüm 5.01) programında iki yönlü ANOVA Bonferroni testi kullanılmıştır (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4. BULGULAR

4.1. ARPADA HVVIP1 TANIMLANMASI

4.1.1. *HvVIP1* Dizi Analizi

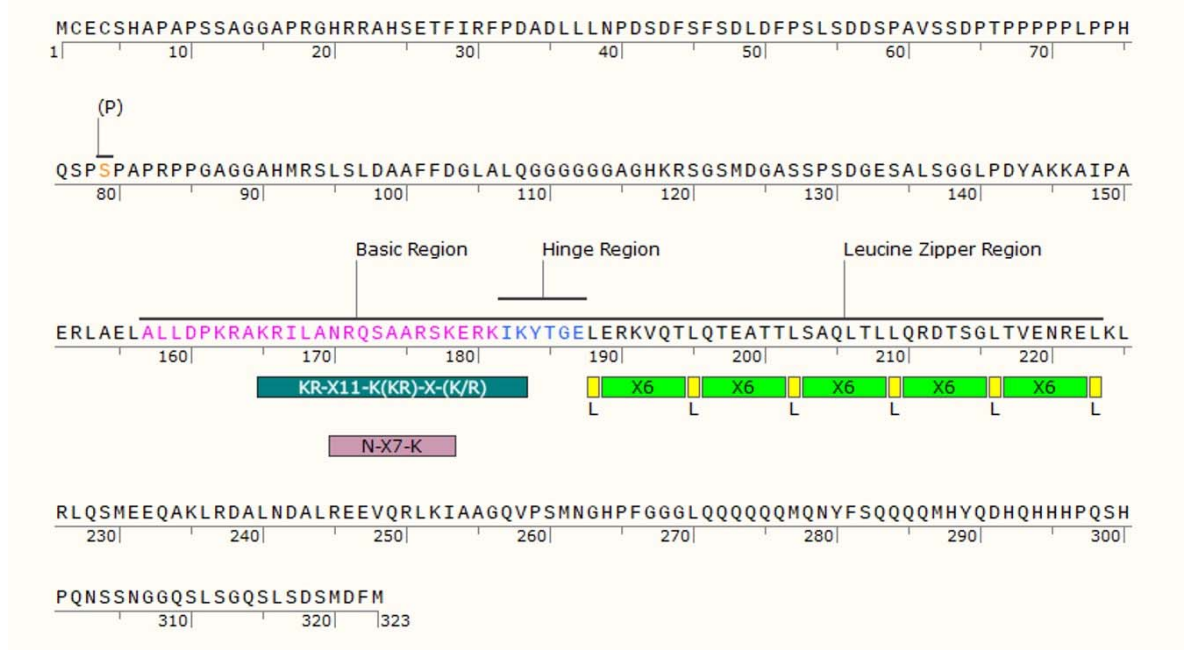
Martı çeşidinde *HvVIP1*'in 972 bç boyutunda cDNA fragmentinin dizi analizi sonuçları bu fragmentin 323 amino asit uzunluğunda protein kodlayan bir açık okuma çerçevesine sahip olduğunu göstermiştir. *Hordeum vulgare* cv. Haruna Nijo'da tahmini VIP1 klonu (Erişim No. AK365082.1) ile yapılan BLAST analizi sonucunda sırasıyla 115., 204., 872. ve 896. bç pozisyonlarında bulunan dört adet sinonim olmayan SNP tanımlanmıştır (Şekil 4.1- Ek 1).

ATG	GACCCGCGCTTCCCGCCGCGGCGCCGTCCTCTGCTGGCGGTGCGCC	50
	GCGCGGCCACCGGCGGGCCCACTCCGAGACCTTCATCCGGTTCCCCGACG	100
	CGGACCTGCTGCTCA	150
	TTCCCTCCCTCTCCGACGACTCCCCGCGGTCTCCTCCGATCCCACCCC	200
	GCCG	250
	CGCCCGGTGCGGGGGGCGCGCATATGAGGAGCCTCTCGCTCGACGCCGCC	300
	TTCTTCGACGGCCTCGCGCTGCAGGGAGGAGGCGGAGGCGGGGCTGGGCA	350
	TAAGAGGAGCGGCTCCATGGATGGAGCGAGCTCGCCGTCCGACGGCGAGT	400
	CTGCGCTGTCCGGTGGGCTACCGGACTACGCCAAGAAGGCCATTCCCGCG	450
	GAGAGGCTCGCTGAGCTCGCGCTCCTCGACCCCAAGCGCGCTAAGAGGAT	500
	TTTGGCCAACAGGCAGTCGGCCGCGAGGTCCAAGGAGAGGAAGATCAAGT	550
	ACACCGGCGAGCTGGAGAGGAAGGTGCAGACGCTGCAGACAGAGGCGACC	600
	ACGCTCTCTGCACAGCTCACGCTTCTTCAGAGGGATACTTCCGGTTTAA	650
	TGTTGAGAACAGAGAGCTCAAACCTCCGGTTGCAGTCCATGGAAGAACAAG	700
	CCAAACTTCGAGATGCTCTGAATGATGCCTTGAGAGAAGAAGTCCAGCGG	750
	CTTAAGATAGCGGCAGGTCAAGTTCCAAGCATGAATGGACACCCCTTCGG	800
	TGGAGGGCTACAGCAGCAGCAGCAGCAATGCAGAACTATTTCTCGCAGC	850
	AGCAGCAGATGCACTACCAAG	900
	CCTCAGAATTCTTCGAACGGAGGCCAGTCGCTCAGTGGCCAGTCTCTAAG	950
	CGACTCCATGGATTTTCATG	972

Şekil 4.1: *H. vulgare* cv. Martı'da *HvVIP1*'in 972 bç'lik tam uzunluktaki cDNA dizisi. Yeşil renkte vurgulanan dizinin başında ve sonunda işaretlenmiş kısımlar Başlat ve Dur kodonlarıdır; 115., 204., 872., 896. bç pozisyonlarındaki dört SNP ise sarı renk ile vurgulanmaktadır.

HvVIP1'in 323 amino asit bakiyesinden oluşan kısmi protein dizisinde bZIP domeni 157. ve 223. bakiyeler arasında belirtilmektedir. bZIP domeninin bazik bölgesinin, 157. ve 187. amino asitler arasında yer aldığı tahmin edilmektedir. Bu bazik bölge, bir nüklear lokalizasyon sinyali (NLS) dizisi ile birlikte korunmuş bir DNA bağlanma motifi içermektedir. NLS konsensüsü, iki kısa bazik amino asit bölgesinden (iki parçalı) oluşmaktadır ve *HvVIP1* protein dizinde ¹⁶⁵KRILANRQSAARSKERKIK¹⁸³ şeklinde gösterilmektedir (Şekil 4.2). Korunmuş

¹⁷⁰NRQSAARSK¹⁷⁸ motifinin 178. pozisyonunun sonunda işaretlenmiş olan karakteristik lösin (K) bakiyesinin bZIP protein ailesi Grup I üyelerinde yaygın bulunan Arjinin (R) aminositi ile yer değiştirdiği tanımlanmıştır. Bazik bölgenin sonunda bulunan bağlantı bölgesi genellikle 6 amino asit bakiyesi içerir. Lösin-Fermuar bölgesi, proteinin C-terminal ucuna yakın bulunan korunmuş bir lösin heptad modülü ile işaretlenmiştir. Bu bölge bZIP domeninin sonunu işaret eden 188. ve 223. bakiyeleri arasında bulunmaktadır (Şekil 4.2) (Jacoby ve diğ., 2002); (Pitzschke ve diğ., 2009).

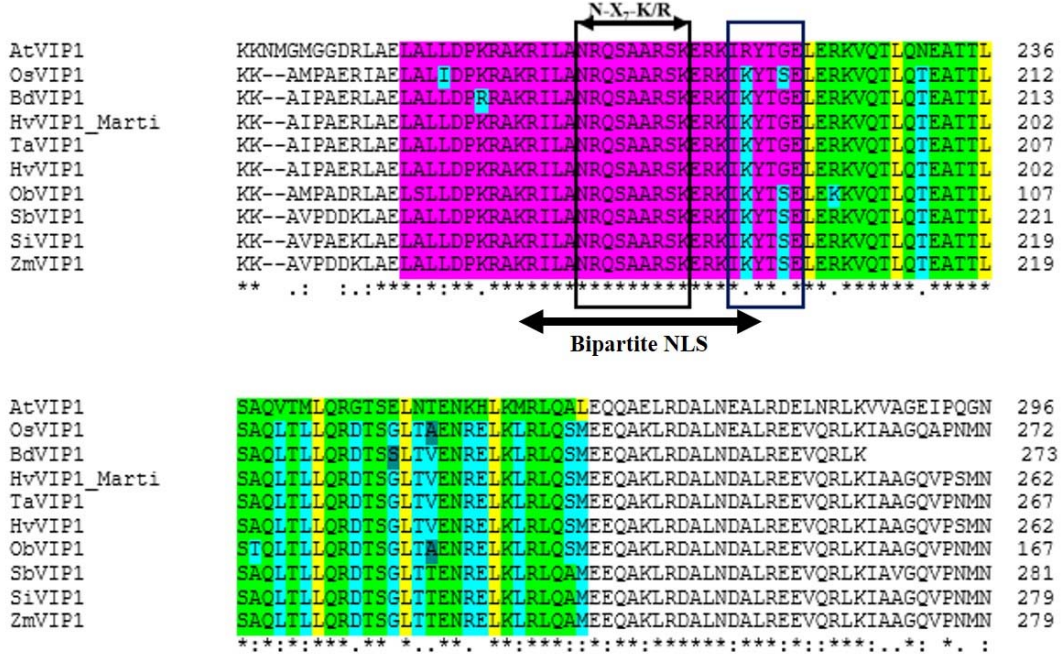


Şekil 4.2: HvVIP1 proteininin dizisi. bZIP alanı, 157. amino asitte başlar ve 223. bakiyede sona erer. Bazik bölge içinde (i) 165 ve 183. bakiyeler arasında bipartit NLS (KR-X11-K (KR) -X- (K/R)); (ii) 170 ve 178. bakiyeler arasında N-X7-R/K olarak bilinen DNA bağlama bölgesi; (iii) bazik bölgenin sonunu işaret eden 6 amino asitin (açık mavi) bağlantı bölgesi yer alır. Yaklaşık beş heptad lösin tekrarından oluşan Lösin Fermuar bölgesi 187. bakiyede başlar ve 223. bakiyede sona erer. Korunmuş Lösin bakiyeleri (L) sarı renkle işaretlenmiştir ve altı amino asitlik (X6) enterkalasyon yeşil renkte vurgulanmıştır. 79. pozisyonundaki serin bakiyesi (S), HvVIP1 proteininin fosforil aktivasyonunu işaret etmektedir.

4.1.2. VIP1-Benzeri Proteinlerin Moleküler Filogenisi

VIP1 proteinlerinin çoklu dizi karşılaştırmaları, MUSCLE yazılımı (clustalW algoritması) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler on farklı monokotil ve dikotil bitkiden alınan on tane VIP1 kodlayan amino asit dizisi (bkz. Ek Belge 2) ile yapılmıştır. Bu türler aşağıda listelenmektedir: *Oryza sativa* (OsVIP1, erişim No. XP_015618202.1), *Brachypodium*

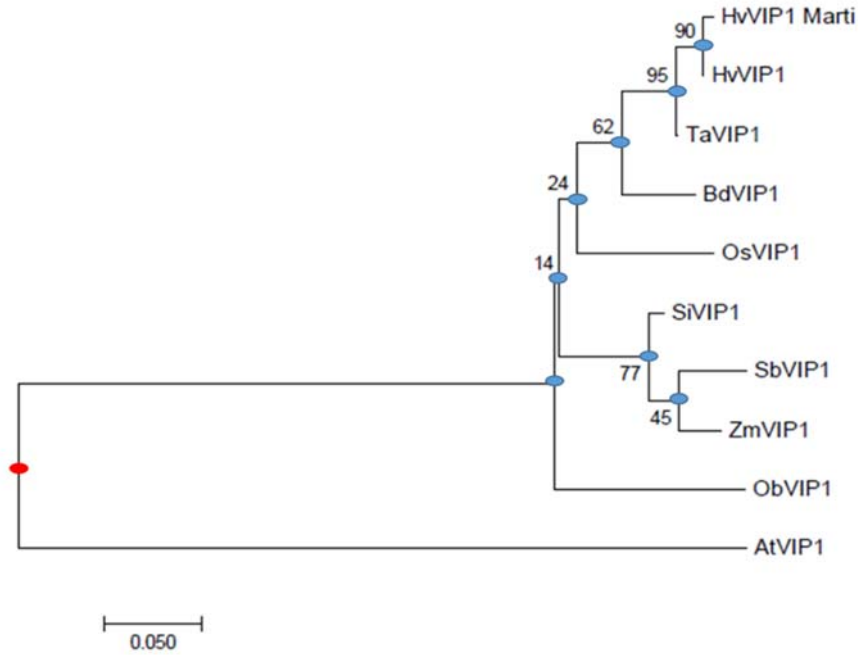
distachyon (BdVIP1, erişim No. XP_003577804.1), *Hordeum vulgare* (HvVIP1 klonları, erişim No. BAJ96285.1, ve HvVIP1_Martı), *Triticum aestivum* (TaVIP1, erişim No. AHY03428.1), *Oryza brachyantha* (ObVIP1, erişim No. XP_015698033.1), *Sorghum bicolor* (SbVIP1, erişim No. XP_002449035.1), *Setaria italica* (SiVIP1, erişim No. XP_004978752.1), *Zea mays* (ZmVIP1, erişim No. NP_001141497.1), ve *Arabidopsis thaliana* (AtVIP1, erişim No. NM_103495.4). Dizi karşılaştırmaları, cv. Martı'daki HvVIP1'in, 35 bölgede delesyonlar (Ek 4) ve *Arabidopsis* AtVIP1 ile karşılaştırıldığında sinonim olmayan SNP'ler (örn., BZIP alanı içinde 13) içerdiğini göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Çeşitli homolog bitki proteinlerinin (ClustalW 2.0) VIP1 bZIP domenlerinin dizi karşılaştırmaları. HvVIP1'in bZIP domeni clustalW algoritması-EMBL-EBI/MUSCLE kullanılarak *Oryza sativa* (OsVIP1), *Brachypodium distachyon* (BdVIP1), *Hordeum vulgare* [tahmini klon HvVIP1 (erişim numarası: BAJ96285.1) ve bizim tahmini HvVIP1_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır] *Triticum aestivum* (TaVIP1), *Oryza brachyantha* (ObVIP1), *Sorghum bicolor* (SbVIP1), *Setaria italica* (SiVIP1) ve *Zea mays* (ZmVIP1)'deki homologlarının benzer motifleri ile karşılaştırılmıştır. Burada (i) bazık bölge mor renkte vurgulanmıştır, (ii) bazık bölge içindeki bipartit (iki parçalı) NLS hemen dizinin altında siyah renkli yatay bir çubuk ile gösterilmiştir, (iii) bazık bölge içerisindeki korunmuş N-X7-K/R motifi dizinin üzerindeki siyah renkli yatay bir çubuk ile gösterilmiştir, (iv) Lysin-Fermuar bölgesi (yedi lysin heptadı) sarı/yeşil ile vurgulanmıştır, (v) bZIP domeni içindeki SNP'ler tek tek işaretlenmiş ve AtVIP1'e göre tanımlanmıştır. Tamamen korunmuş bakiyeleri (*), daha az korunmuş bakiyeler ise (:) ve (.) ile gösterilmiştir.

İlgili VIP1 dizilerinin protein düzeyindeki moleküler filogenisi Şekil 4.4'te gösterilmiştir. İç nodlar (mavi daireler), örneklenen HvVIP1 için varsayılan ataları temsil ederken, nihai ortak ata kırmızı bir daire olarak temsil edilmektedir. Yatay eksen, genetik değişimi gösterirken her nod yanındaki sayılar filogenetik uzaklığı göstermektedir. Bu sayılar (0'dan 100'e kadar) 'bootstrapping' yaklaşımıyla hesaplanmıştır. Yüksek değer, nod kümesinin sağındaki dizilerin benzerliklerinin diğerlerine göre fazla olduğunu ifade etmektedir.

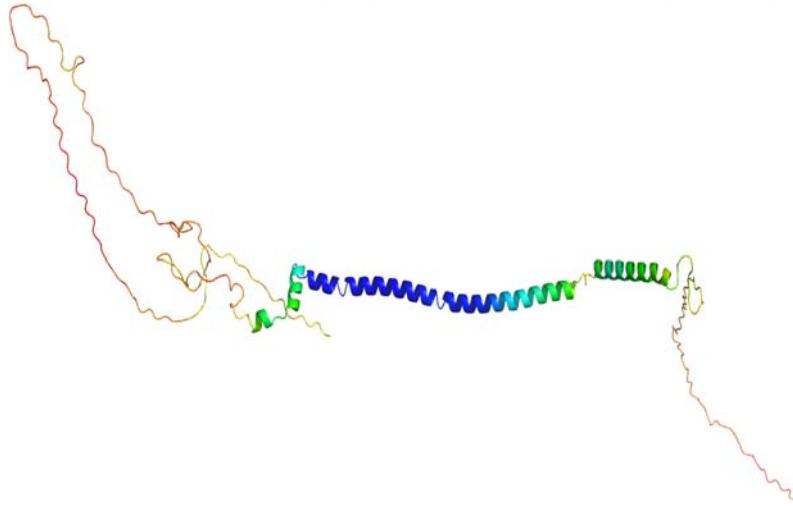
Sonuçlar, diğer türlere kıyasla Martı arpa çeşidinin ve buğdayın (*Triticum aestivum*) en yakın ortak ataya sahip olduğunu göstermektedir. Bu iki türün yer aldığı filogenik ağaç kümelenmesinde oran %95 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar her iki türün de pirinç, mısır ve sorgumdan uzak bir ataya sahip olduklarını göstermektedir. *Arabidopsis thaliana*, diğer tüm monokotil türlerden uzak kümelenme gösteren tek grup olmuştur.



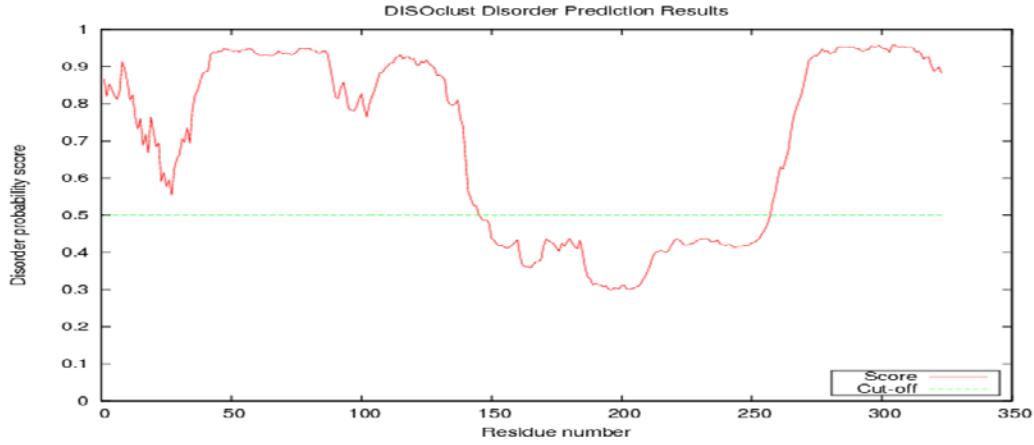
Şekil 4.4: VIP1 benzeri proteinlerin maksimum likelihood yöntemi ile moleküler filogenetik analizi. *Oryza sativa* (OsVIP1), *Brachypodium distachyon* (BdVIP1), *Hordeum vulgare* [tahmini klon HvVIP (erişim numarası: BAJ96285.1) ve bizim tahmini HvVIP1_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır], *Triticum aestivum* (TaVIP1), *Oryza brachyantha* (ObVIP1), *Sorghum bicolor* (SbVIP1), *Setaria italica* (SiVIP1), *Zea mays* (ZmVIP1) ve *Arabidopsis thaliana* (AtVIP1)'de VIP1'e ait amino asit dizileri karşılaştırılmıştır. Mavi düğümler varsayılan ataları; Kırmızı düğüm ise tarihsel nihai ortak atayı temsil eder.

4.1.3. VIP1 Proteinin Yapısal Özellikleri

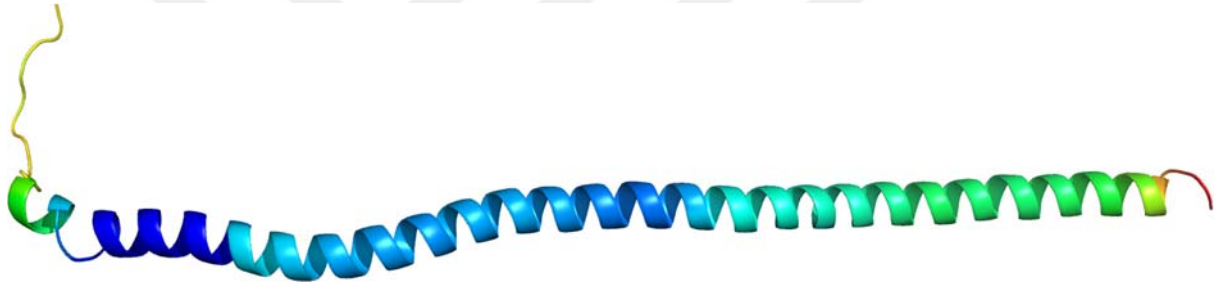
Arabidopsis thaliana (NP_564486.1), *Oryza sativa*'dan (XP_015618202.1) (veri gösterilmemiştir) ve *Hordeum vulgare*'den (BAJ96285.1) elde edilen VIP1-benzeri proteinlerin tam uzunluktaki dizileri IntFOLD sunucusuna (McGuffin ve diğ., 2015) yüklenerek kalite değerlendirmeleri, kalıp yapıları, fonksiyonel bilgiler, yapısal domen tahminleri ve bozukluk tahmin profilleri (Maghrabi ve diğ., 2016) ile ilgili bilgilerle birlikte 3D modelleri elde edilmiştir (Şekil 4.5). Diziler domen bilgisi elde etmek için Pfam veri tabanında analiz edilmiştir (Finn ve diğ., 2015). Daha sonra, DISOclust (McGuffin, 2008) kullanılarak tahmin edilen sıralı bölgelerin alt-dizileri alınmış ve daha yüksek kalitede 3D modeller elde etmek için IntFOLD sunucusuna gönderilmiştir. Tam uzunluğa sahip *H. vulgare* VIP1 tahmini proteininin (erişim No. BAJ96285.1) içsel bozukluk tahmin profili (McGuffin, 2008) (Şekil 4.6), HvVIP1'in kısmen düzensiz olduğunu ve 146 ila 257. aa bakiyeleri arasında karşılık gelen düzenli bir bölgeye sahip olduğunu (bkz. Şekil 4.7'de bZIP bölgesinde gösterildiği gibi) göstermiştir.



Şekil 4.5: IntFOLD sunucusundan elde edilen tam uzunlukta *Hordeum* dizisini kullanan 3D model (McGuffin ve diğ., 2015). bZIP transkripsiyon faktörü domaini, Pfam'a göre 160-221. aa'ler arasındadır. DISOclust'a göre sıralı bölge ise 146-257. aa'ler arasındadır.



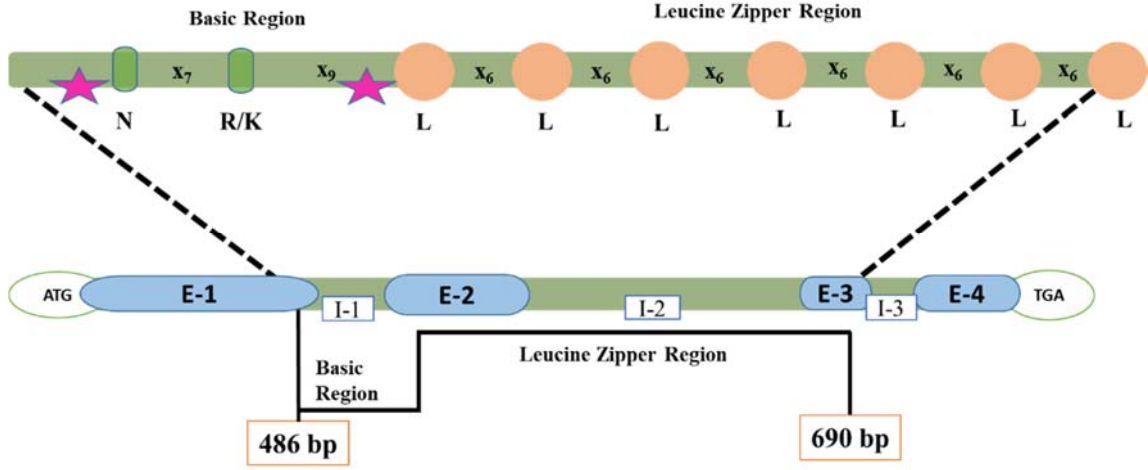
Şekil 4.6: DISOclust'tan tam uzunluktaki *Hordeum* dizisinin intrinsek bozuk tahmin profili McGuffin (2008).



Şekil 4.7: IntFOLD sunucusundan elde edilen *Hordeum vulgare*'nin 146-257. aa'ler arası bölgesinin 3D modeli (McGuffin ve diğ., 2015).

4.1.4. *HvVIP1* Gen Modeli

Arpa genom veritabanında (morexGenes, Erişim No: MLOC_71198) tam uzunlukta klonlanmış VIP1 ile Martı çeşidinin cDNA'sı arasında ClustalW2 programı kullanılarak (EMBL-EBI/MUSCLE) BLAST analizi yapılmıştır. Sonuçlar, *HvVIP1*'in 4. kromozom üzerinde yer aldığını ve 3620 bç'ye (UTR'ler hariç) sahip olduğunu göstermektedir. Analizler, *HvVIP1* geninin sırasıyla 495 bç, 132bç, 87 bç ve 258 bç boyutlarında 4 ekson ve bunlar arasında sırasıyla 215 bç, 1691 bç ve 148 bç boyutlu 3 intron içerdiğini göstermektedir (bkz. Ek 3).



Şekil 4.8: HvVIP1'in tahmini gen modeli. bZIP alanı bazik bölge, Ekson 1 ve 2 (E-1 ve E-2) arasında uzanır. Bazik bölge içinde bipartit (iki parçalı) NLS (yıldızlar arası) ve korunmuş DNA bağlanma motifi (N-X7-R/K) bulunmaktadır. Lösin Fermuar domeni ise ekson 2 ve 3 (E-2 ve E-3) üzerinde bulunur.

4.1.5. HvVIP1 Tam Uzunluktaki Kodlama Dizisi

Tam uzunluktaki kodlama dizisi (972 bp), çevrimiçi olarak NCBI web sitesinde "*Hordeum vulgare* VirE2-interacting protein 1 (VIP1) mRNA, complete cds" başlığı ve MG000155 erişim numarası ile <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG000155.1> linkinde yayınlanmıştır (Şekil 4.9).

Hordeum vulgare VirE2-interacting protein 1 (VIP1) mRNA, complete cds

GenBank: MG000155.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS MG000155 972 bp mRNA linear PLN 05-MAR-2018
 DEFINITION Hordeum vulgare VirE2-interacting protein 1 (VIP1) mRNA, complete cds.
 ACCESSION MG000155
 VERSION MG000155.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Hordeum vulgare
 ORGANISM [Hordeum vulgare](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticeae; Triticeae; Hordeinae; Hordeum.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 972)
 AUTHORS El Sarraf,N., McGuffin,L. and Gurel,F.
 TITLE Structural Analysis and Differential Expression of VirE2 Interacting #Protein 1 in Barley#
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 972)
 AUTHORS El Sarraf,N., McGuffin,L. and Gurel,F.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-SEP-2017) Molecular Biology and Genetics, Istanbul University, Faculty of Science, Vezneciler, Istanbul 34134, Turkey
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing; Thermo Fisher, Applied Biosystems/ Model 3500 XL

Şekil 4.9: NCBI veritabanı içinde tanımlanan *HvVIP1* tam uzunluktaki kodlama dizisi.

4.2. ARPADA HVXRCC4 TANIMLANMASI

4.2.1. *HvXRCC4* Dizi Analizi

Martı çeşidinde *HvXRCC4*'un 843 bç boyutunda cDNA fragmentinin dizi analizi sonuçları bu fragmentin 280 amino asit uzunluğunda protein kodlayan bir açık okuma çerçevesine sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10; Şekil 4.11). *Hordeum vulgare* cv. Haruna Nijo'da tahmini XRCC4 klonu (Erişim No. AK358119.1) ile yapılan blast analizi sonucunda sırasıyla 682., 729., 769. ve 774. bç pozisyonlarında bulunan dört adet sinonim olmayan SNP tanımlanmıştır (Şekil 4.10- Ek 4).

ATGGCAACCGCGGCGGCGGCGGCCGAGGCACAGCTGCGCGAAGCTCTCGGT	50
GGCGGTGGAGGACCCCAAGGCGCCGGGCGGCGGCATATTCGTGAAGG	100
CCACGTGGCTCCCCACCCGCTTCTCCCTCGCCGTCACCGACGGCGCCGGC	150
GCCTGGGTGCGCCGACGCCTCCGACGCCGAGGTGCGCCTCCGGGCCGAGCA	200
GTGGGACCAGCCCGTCTCCGAGTACCTCGCCCTCGCCGAGCGCTACCTCG	250
CCTTCCACCAGCCCTCCTCCACCTACTCCTTCCACGAGGCTGGTGCCGGC	300
CGGAGGTTGTGTCATGGACATTTGAAAAACAAGGTACCAAGCTGGAATGGCG	350
TTGGAAACTGCAGCCGGCACCCACCCACAACAACTATAGCTGAGGTCT	400
TGGATTTTCTTATGGATGCAAATATACGGCTGAGTGAAGAGGTTGTTAGG	450
AAGACGCAATCATTTGAGAAGCTCAAACAAGAAGCTGAGAATTGCTTGCA	500
ACAGAGTGACAGATTTAACAACGAGAAGGCTGAGTTTGAGCAAGCTTCCT	550
TTACAAAGTTCGTGGCCGTTCTGAACTCGAAGAAGGCCAAGCTGAGACAG	600
CTCAAGGACAAGATCGCGGCGCTCGAGTCCGCGGACAAGGCCCGAAGGA	650
GGAGGAGGAGGAGGAAGGAGGCTCCTCCGACGGGACGGAGCCTATCATGG	700
AAGGGAGCGACGAGGACGACCGCGTGAAAGGACGAGCCCTCCGAGACGGGC	750
GGCGGCGGCGACACCCACCGCTCTCCGACAAGTCCGCCGCCGCGCGGC	800
CACCTCCTGGGGCCGGAGAAGACGCAGGAGGACGAGGAAGTGA	843

Şekil 4.10: *H. vulgare* cv. Martı’da *HvXRCC4*’un 843 bç’lik tam uzunluktaki cDNA dizisi; 682., 729., 769., 774. bç pozisyonlarındaki dört SNP ise sarı renk ile vurgulanmaktadır.

MATAAAAPRHSCAKLSVAVEDPKAPGGGGIFVKATWLPTRFSLAVTDGAG	1	10	20	30	40	50
AWVADASDAEVRRLRAEQWDQPVSEYLALAERYLAFHQPSSTYSFHEAGAG	60	70	80	90	100	
RRLSWTFEKQGTKLEWRWKLQPAPHPQQTIAEVLDFLMDANIRLSEEVVR	110	120	130	140	150	
KTQSFEKCLKQEAENCLQQSDRFNNEKAEFEQASFTKFVAVLNSKKAKLRQ	160	170	180	190	200	
LKDKIAALESADKAPKEEEEEEGSSDGTEPIMEGSDEDDRVKDEPSETG	210	220	230	240	250	
GGGDTHRSSDKSAAAAATSWGRRRRRTRK	260	270	280			

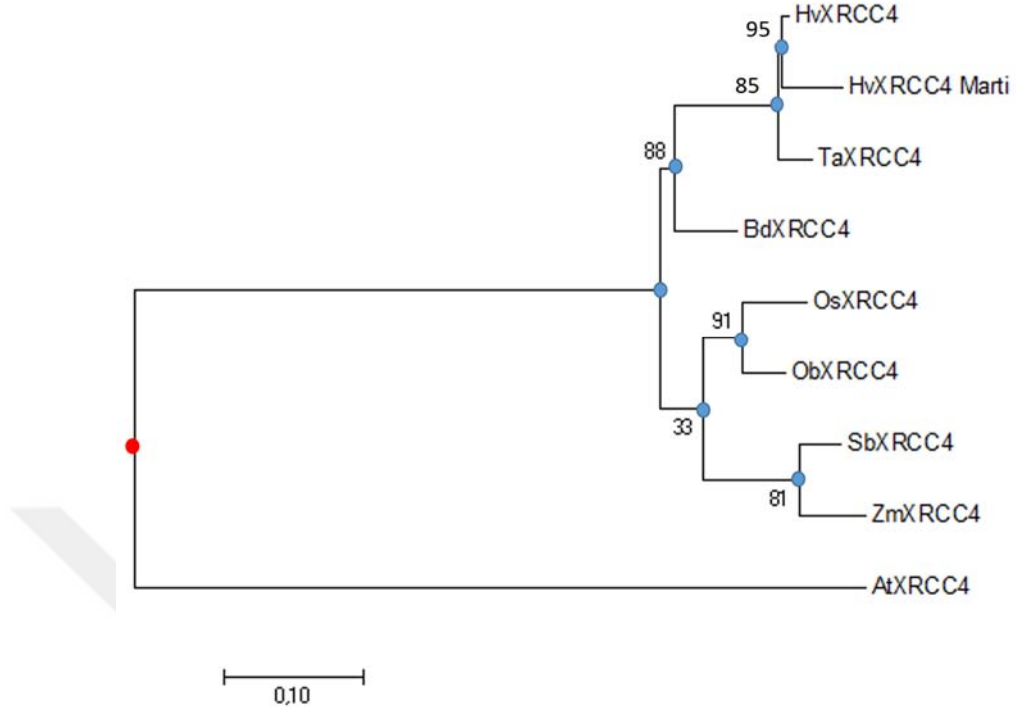
Şekil 4.11: *HvXRCC4* proteininin dizisi.

4.2.2. XRCC4-Benzeri Proteinlerin Moleküler Filogenisi

XRCC4 proteinlerinin çoklu dizi karşılaştırmaları, MUSCLE yazılımı (clustalW algoritması) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler 8 farklı monokotil ve dikotil bitkiden alınan 9 tane XRCC4 kodlayan amino asit dizisi (bkz. Ek Belge 2) ile yapılmıştır. Bu türler aşağıda listelenmektedir: *Oryza sativa* (OsXRCC4, erişim No. XP_015631232.1), *Brachypodium distachyon* (BdXRCC4, erişim No. XP_003559906.2), *Hordeum vulgare* [tahmini XRCC4 (erişim numarası: BAJ89333.1) ve bizim tahmini HvXRCC4_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır], *Triticum aestivum* (TaXRCC4, erişim No. AEJ83861.1), *Oryza brachyantha* (ObXRCC4, erişim No. XP_006650563.1), *Sorghum bicolor* (SbXRCC4, erişim No. XP_002466484.1), *Zea mays* (ZmXRCC4, erişim No. ACG28073.1), ve *Arabidopsis thaliana* (AtXRCC4, erişim No. NP_001154639.1). *Arabidopsis* AtXRCC4 proteinin dizisi ile karşılaştırıldığında Martı'daki XRCC4'un, 14 bölgede delesyonlar içerdiğini göstermektedir. Dizi karşılaştırmaları Ek 4'te göstermektedir.

Ayrıca 9 aminoasit dizisi içeren XRCC4 benzeri proteinler arasındaki evrimsel ilişki MEGA7 yazılımında Whelan ve Goldman + Freq modeli temel alınarak Maximum Likelihood metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Bu proteinler arasındaki moleküler filogeni Şekil 4.12'de gösterilmiştir. İç nodlar (mavi daireler), örneklenen HvXRCC4 için varsayılan ataları temsil ederken, nihai ortak ata kırmızı bir daire olarak temsil edilmektedir. Yatay eksen, genetik değişimi gösterirken her nod yanındaki sayılar filogenetik uzaklığı göstermektedir. Bu sayılar (0'dan 100'e kadar) 'bootstrapping' yaklaşımıyla hesaplanmıştır. Yüksek değer, nod kümesinin sağındaki dizilerin benzerliklerinin diğerlerine göre fazla olduğunu ifade etmektedir.

Sonuçlar, diğer türlere kıyasla Martı arpa çeşidinin ve buğdayın (*Triticum aestivum*) en yakın ortak ataya sahip olduğunu göstermektedir. Bu iki türün yer aldığı filogenik ağaç kümelenmesinde oran %85 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar her iki türün de pirinç, mısır ve sorgumdan uzak bir ataya sahip olduklarını göstermektedir. *Arabidopsis thaliana*, diğer tüm monokotil türlerden uzak kümelenme gösteren tek grup olmuştur.



Şekil 4.12: XRCC4 benzeri proteinlerin maksimum likelihood yöntemi ile moleküler filogenetik analizi. *Oryza sativa* (OsXRCC4), *Brachypodium distachyon* (BdXRCC4), *Hordeum vulgare* [tahmini XRCC4 (erişim numarası: BAJ89333.1) ve bizim tahmini HvXRCC4_Martı protein dizisinin herikisi de kullanılmıştır], *Triticum aestivum* (TaXRCC4), *Oryza brachyantha* (ObXRCC4), *Sorghum bicolor* (SbXRCC4), *Zea mays* (ZmXRCC4) ve *Arabidopsis thaliana* (AtXRCC4)'da XRCC4'e ait amino asit dizileri karşılaştırılmıştır. Mavi düğümler varsayılan ataları; Kırmızı düğüm ise tarihsel nihai ortak atayı temsil eder.

4.3. HVVIP1 ANLATIMININ ANALİZİ

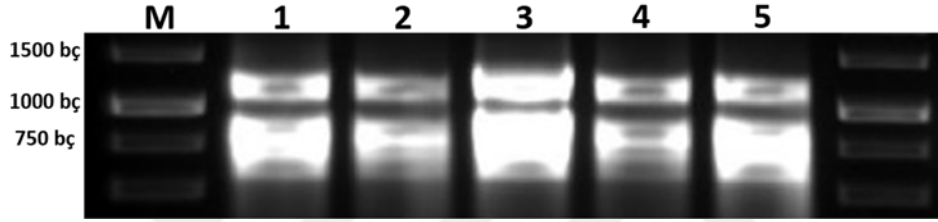
4.3.1. Arpa'da Doku-Spesifik HvVIP1 Anlatım Analizi

Çeşitli arpa dokularında *HvVIP1* gen anlatımı stres içermeyen koşullar altında araştırılmıştır. Bunun için bitkinin 3 yapraklı aşamasında yaprak ve kök örnekleri toplanmış, 7-10 günlük çimlendirilmiş tohumlardan koleoptiller alınmış, tohumlar steril edilerek bunlardan olgunlaşmamış embriyolar çıkarılmış ve MS ortamında 4 hafta süreyle yetiştirilmiş kallus örnekleri kullanılmıştır. Martı çeşidin farklı dokularından ve kalluslardan total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA miktarları Martı çeşidinde 377-2016 ng/μl arasında değişmekteydi (Tablo 4.1). RNA'ların miktar ve saflıklarının belirlenmesinde spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c) cihazı kullanıldı. Cihaza 1,5 μl RNA örnekleri yüklendi ve

RNA'ların 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü (Tablo 4.1). Total RNA'ların kalitesi %1 agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.13).

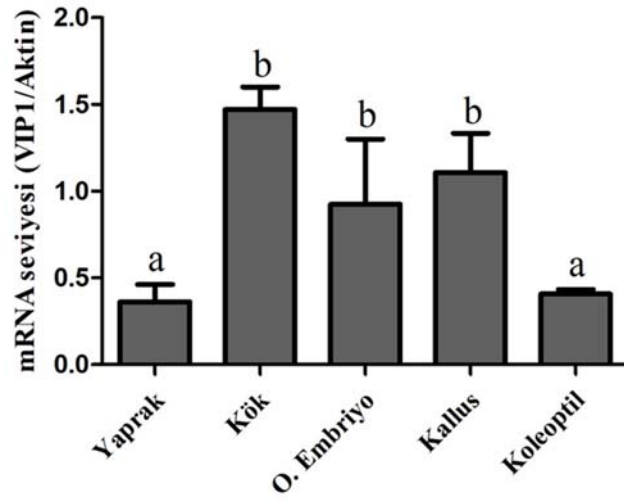
Tablo 4.1: İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları.

Doku	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280	260/230
Kök	2016	2.27	2.12
Yaprak	460	2.51	2.13
Kallus	612	2.17	2.01
Olgunlanmamış embriyo	377	2.10	1.77
Koleoptl	1996	2.31	2.26



Şekil 4.13: *Hordeum vulgare* L. cv. Martı ya ait total RNA'ların % 1'lik agaroz jeldeki görünümü. (M) 1 kb'lik markır; (1-5) Martı: Yapraklar, koleoptiller, kökler, Olgunlanmamış Embriyolar, ve kalluslar.

Test edilen tüm arpa dokularında ve kalluslarda HvVIP1'in yapısal olarak anlatımının yapıldığı bulunmuştur (Şekil 4.14), bu "house-keeping" genlerinin durgun anlatım profilini hatırlatmaktadır.



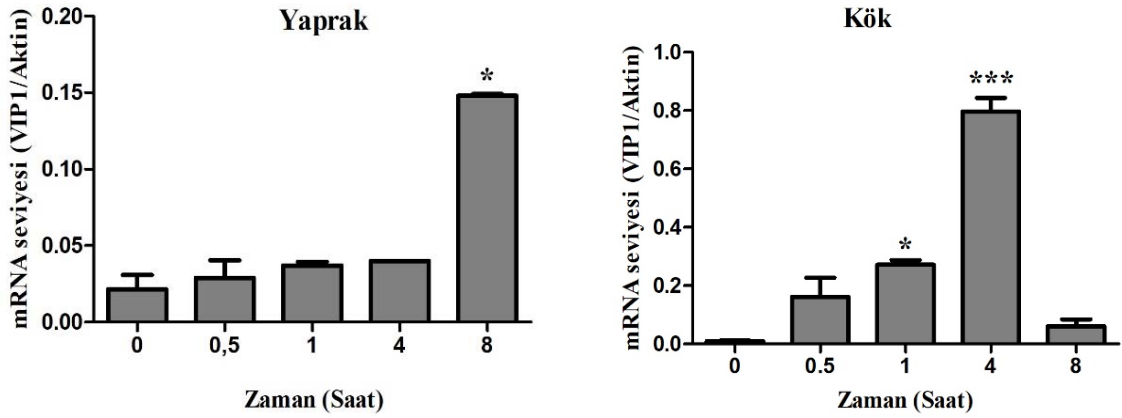
Şekil 4.13: *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın yaprak, kök, olgunlanmamış embriyo, kallus ve koleoptil dokularındaki *HvVIP1* mRNA seviyelerinin karşılaştırılması.

4.3.2. Abiyotik Stres Koşulları Altında Gen Anlatım Analizi

HvVIP1'in stres düzenleyici rolünü yansıtan gen anlatım profilini araştırmak amacıyla genç arpa bitkilerine iki abiyotik stres (Dehidrasyon Şoku ve Tuzluluk) uygulanmıştır.

4.3.2.1. Dehidrasyon Şoku Altındaki *HvVIP1* Geninin Anlatım Analizi

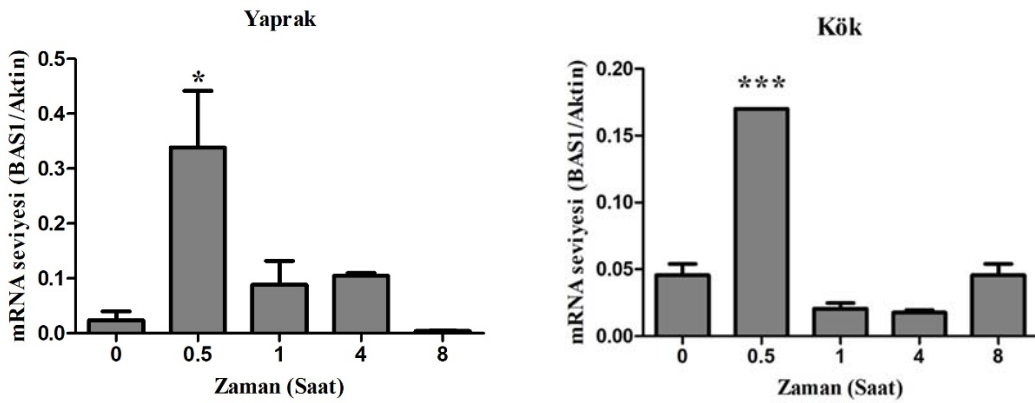
HvVIP1 anlatım profilini incelemek amacıyla 30 dk, 1 sa, 4 sa ve 8 sa.'lik zaman aralıklarında dehidrasyon stresi uygulanmış genç bitkilerden yaprak ve kök dokuları toplanmıştır. Sonuçlar, *HvVIP1*'in, dehidrasyon şok uygulamasının 8. saatindeki arpa yapraklarında ($*P < 0.05$) belirgin bir şekilde anlatım yaptığını ve kuraklık stresine yanıt verdiğini göstermiştir (Şekil 4.15). Bununla birlikte sonuçlar köklerin kuraklık durumunu yapraklardan daha anlamlı bir şekilde algıladığına işaret etmektedir. Köklerde, *HvVIP1*'in strese bağlı anlatımın 1 saat önce başladığı belirlenmiştir. *HvVIP1*'in anlatımı, stres uygulamasının 4. saatinde en yüksek seviyeye ulaşana kadar kontrole (0. sa) göre yaklaşık 8 kat artarak belirgin bir şekilde devam etmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14: Kuraklık stresi etkisindeki *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki *HvVIP1* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

***HvVIP1* ve *HvBAS1* Bağını ilişkisi**

HvBAS1, her iki dokuda önemli ölçüde indüklendiği için kuraklık stresine hassas bulunmuştur (Şekil 4.15). *HvBAS1* hem yaprak hem de kök dokularında kuraklık şoku uygulamasından 30 dk. sonra belirgin bir şekilde anlatım edilmiştir. Kökler, kontrol (0. sa) ile karşılaştırıldığında indüklenme açısından *HvBAS1* stresi yaklaşık 4 kat daha fazla algılamaktadır (Şekil 4.16).



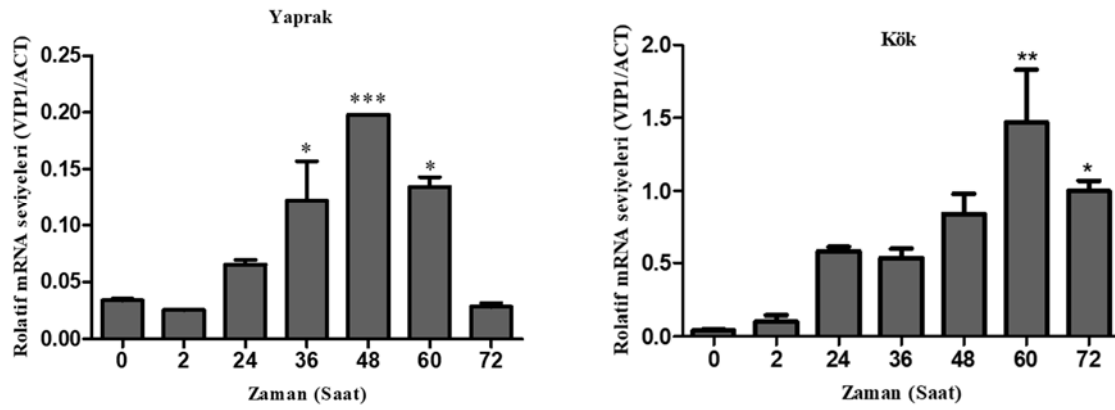
Şekil 4.15: Kuraklık stresi etkisindeki *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki *HvBAS1* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

Hem *HvVIP1* hem de *HvBAS1* kuraklık koşullarında indüklenir, ancak bu iki transkripsiyon faktörü arasında doğrudan bir ilişki kaydedilmemiştir. Pearson testleri sonucunda yaprak ve

köklerde katsayılar $r = 0.4$ olarak bulunmuş ve bu genler arasında bağıntılı-olmayan bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

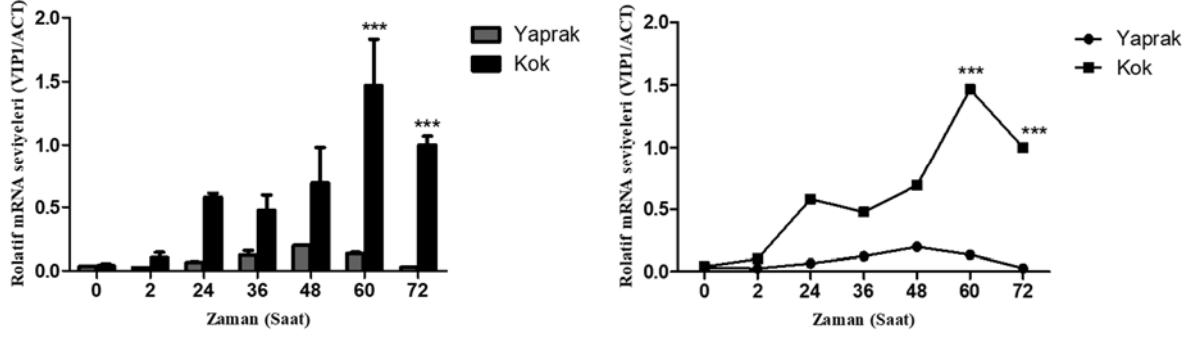
4.3.2.2. Tuzluluk Stresi Altındaki *HvVIP1* Geninin Anlatım Profili

Arpa yaprakları ve köklerinde tuzluluk stresi altında *HvVIP1* anlatımı araştırılmıştır. Üç yapraklı genç bitkiler, 160 mM NaCl ile takviye edilmiş bir hidroponik sistemde farklı süreler ile (2 sa., 24 sa., 36 sa., 48 sa., 60 sa. ve 72 sa.) dinlenmeye bırakılmıştır. Analiz, her iki dokuda da tuz stresi uygulamasından sonra *VIP1*'in önemli ölçüde indüklendiğini göstermektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.16: Tuz stresi etkisindeki *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki *HvVIP1* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

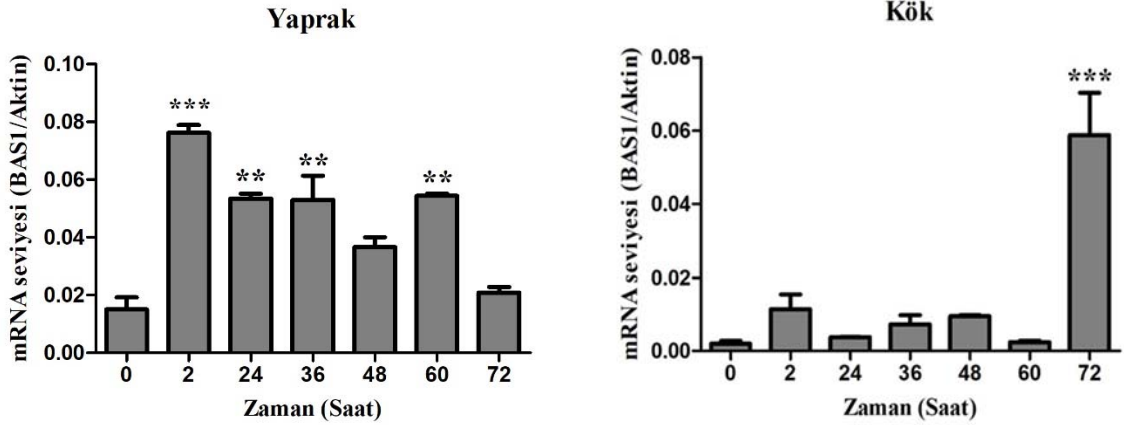
Ayrıca, sonuçlar her iki dokuyu karşılaştırırken, 60 saatlik tuz stres uygulamasından sonra, *HvVIP1* anlatım düzeylerinin, Şekil 4.18'de gösterildiği gibi, köklerde 15 kat fazla ifade edildiğini (***) $P < 0.001$ göstermektedir. Sonuçlar, her iki dokuda *HvVIP1* anlatım seviyelerini karşılaştıran iki yönlü bir ANOVA testi ile elde edilmiştir.



Şekil 4.17: Tuz stresi etkisindeki *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök ve yaprak dokularındaki *HvVIP1* görel mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (** $P < 0,001$).

HvVIP1 ve *HvBAS1* Arasındaki Bağıntılı İlişki

HvBAS1, Şekil 4.19'da gösterildiği gibi tuz stresi uygulanmış kök ve yaprak dokularının her ikisinde de indüklenmiştir. *HvBAS1*'in anlatımı tuzluluk etkisi altında kuraklığa göre çok daha düşüktür. İndüklenme yapraklarda uygulamadan 2 saat sonra başlayıp yaklaşık 2 gün süreyle belirgin bir şekilde devam etmektedir. Köklerde ise genin anlatımı 72. saatte belirgin bir şekilde indüklenmiştir.



Şekil 4.18: Tuz stresi etkisindeki *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın yaprak ve kök dokularındaki *HvBAS1* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Tuzluluk stresine maruz kalan arpa dokularında *HvVIP1* ve *HvBAS1* bağıntı ilişkileri de test edilmiştir. Bununla birlikte, anlatım profilleri arasında herhangi bir bağıntı ilişkisi tespit

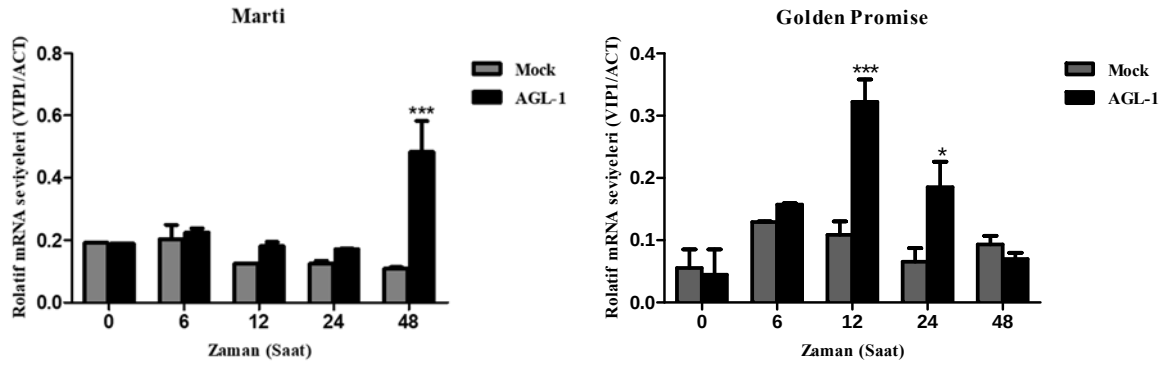
edilmemiştir. Yapraklarda $r = 0,08$ ve köklerde $r = 0,4$ olan Pearson korelasyon katsayısı açık bir şekilde test edilen genler arasında neredeyse doğrusal hiçbir ilişki olmadığı anlamına gelmektedir.

4.3.3. Biyotik Stres Altında Gen Anlatım Analizi

Sırasıyla her iki bitki patojeni *Agrobacterium tumefaciens* ve *Fusarium culmorum*'un arpa kallus ve kökleri üzerindeki etkisi, biyotik stres süresince VIP1 protein fonksiyonu ve bitki savunma mekanizmalarına katkısı bağlamında incelenmiştir. Ayrıca, *HvPR1*, *HvPR4*, *HvPR10*, *HvBAS1* ve *HvMPK3* gibi bir dizi gen de anlatım profili açısından kontrol edilmiştir. *HvVIP1*'in aynı anda, patojenez ile ilgili genleri ve *MYB* benzeri genleri (BAS1) hedef alan MPK3 sinyal iletim yolağının altında (“downstream”) çalıştığı ve aktive edildiği düşünülmektedir.

4.3.3.1. *Agrobacterium tumefaciens* Enfeksiyonu Altında *HvVIP1* Gen Anlatımı

Arpa kallusları her iki çeşitte (cv. Martı ve cv. G. Promise) kullanılarak üretilmiştir. Moleküler analizlerden önce, patojene karşı görece dirençli olan Martı ve daha duyarlı olan Golden Promise, *Agrobacterium tumefaciens* suşu AGL-1 ile enfekte edilmiş ve farklı süreler boyunca (6, 12, 24 ve 48 saat) ko-kültivasyon ortamında bakteri ile dinlenmeye bırakılmıştır. Sonuçlar, *Agrobacterium* enfeksiyonu altında her iki çeşitte de VIP1'in indüklendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, Golden Promise'de *HvVIP1* indüksiyonu, patojenlere karşı daha dirençli olan Martı çeşidinden daha erken ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.20).



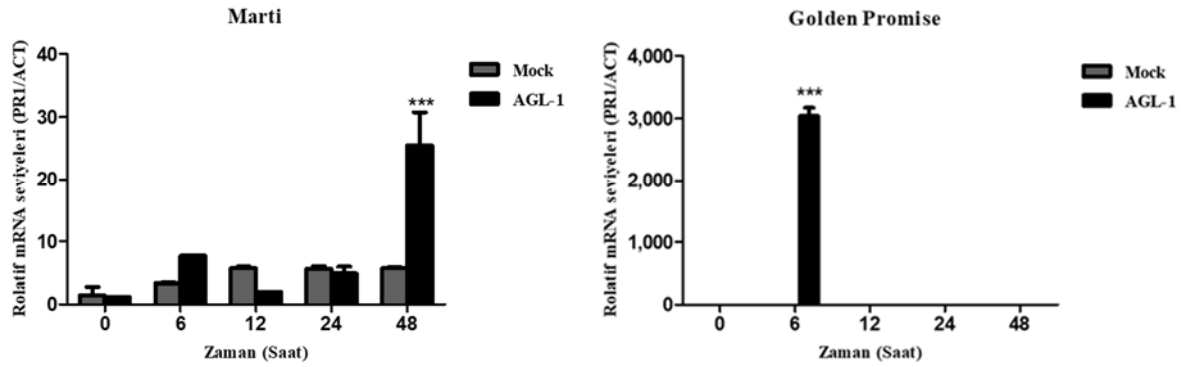
Şekil 4.19: *A. tumefaciens* (AGL-1 suşu) ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cvs. Marti ve Golden Promise'in kallus dokularındaki *HvVIP1* görel mRNA seviyelerinin ilgili zamanlara göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

HvVIP1 transkripsiyon faktörü, hedef genlerini VRE-bağımlı bir şekilde düzenler. Tsugama ve diğ., 2014'de transkripsiyon başlangıç bölgelerinde VRE elementleri olan genleri listelemişlerdir. HvVIP1 hedefli genler listesinde, diğerlerinin yanı sıra patogeneze ilişkili gen ailesi (PRs), WRKY ve MYB ailelerinden birçok transkripsiyon faktörü bulunmuştur.

Bu çalışma kapsamında VRE motifleri aracılığıyla bazı genlerin HvVIP1 tarafından hedeflenip hedeflenmediği araştırıldı. Patogeneze ilişkili genlerden *HvPR1*, *HvPR4*, *HvPR10* ve *HvBAS1* seçildi. Özellikle *Arabidopsis*'de *AtPR1*'in promotör bölgesinde VIP1 tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak indüklendiği düşünülen bir VRE motifini tespit edilmiştir.

***HvPR1* Geninin Anlatım Analizi**

Arpa kalluslarının AGL-1 suşu ile enfeksiyonu sonrasında *HvPR1* indüklenmiş görünmektedir. Sonuçlar *HvPR1*'in, dirençli çeşit Marti'da patojen enfeksiyonuna karşı geç yanıt verdiğine ve burada da bakteriyle inokülasyondan 48 saat sonra önemli ölçüde indüklendiğine işaret etmektedir. *HvPR1* anlatımı, kontrole kıyasla yaklaşık 25 kat artmıştır (Şekil 4.21). Bununla birlikte, Golden Promise patojenlere karşı daha hassas görünmektedir ve *HvPR1* erken yanıtı, bakteri aşılmasından sadece 6 saat sonra kontrole göre 3000 kat artış ile tespit edilmiştir (Şekil 4.21). Bu deneyde, 0, 12, 24 ve 48. saatlerdeki transkript birikimi sırasıyla 0.1, 5, 5 ve 7'dir.

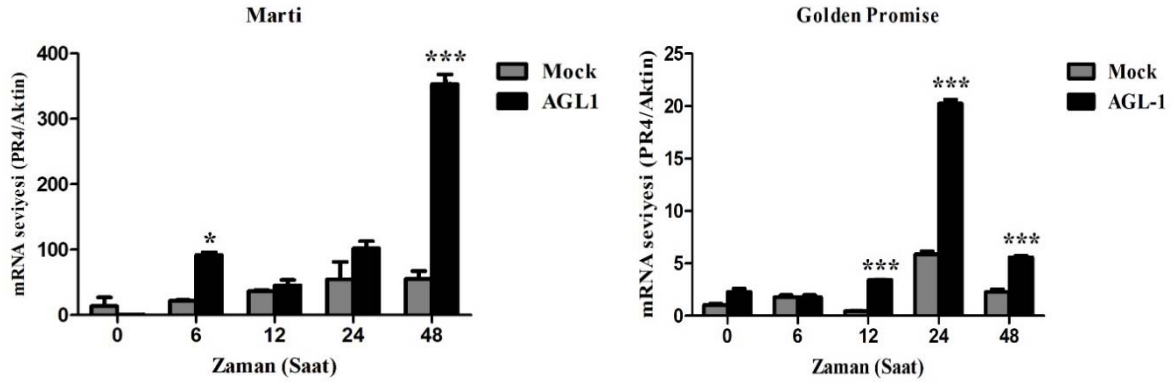


Şekil 4.20: *A. tumefaciens* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki *HvPRI* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (** $P < 0,001$).

Martı kalluslarında *HvVIP1* ve *HvPRI* arasında anlamlı bir korelasyon (** $P < 0.05$) tespit edilmiştir. Pearson testi kullanılarak verilerin analiz edilmesiyle korelasyon katsayısı $r = 0.98$, olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, Golden Promise kalluslarında *HvVIP1* ve *HvPRI* arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır.

***HvPR4* Geninin Anlatım Analizi**

HvPR4 arpa kalluslarının *Agrobacterium* ile enfeksiyonu sonrasında indüklenmiş görünmektedir. Sonuçlar *HvPR4*'ün, dirençli çeşit Martı'da *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı geç yanıt verdiği ve bunun da 48. saatte önemli ölçüde indüklendiğine işaret etmektedir. *HvPR4* anlatımı kontrole kıyasla yaklaşık 300 kat artmıştır (Şekil 4.22). Bununla birlikte, Golden Promise patojenlere karşı daha hassas görünmektedir ve *HvPR4* erken yanıt bakterinin enfeksiyonundan sadece 12 saat sonra saptanmaktadır (Şekil 4.22).

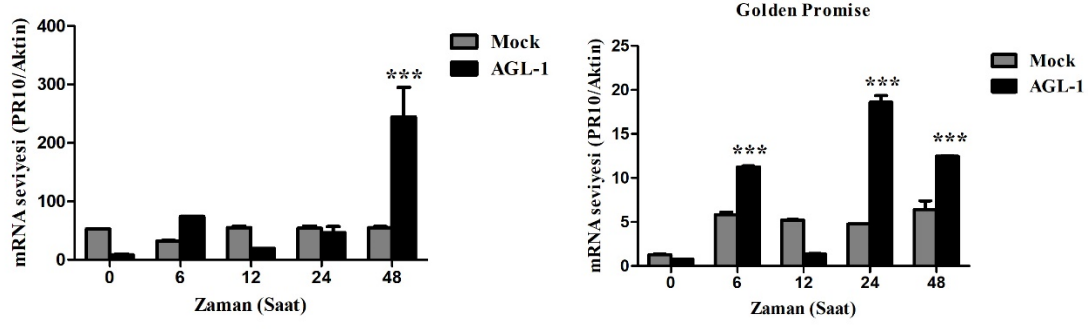


Şekil 4:21: *A. tumefaciens* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cvs. Marti ve Golden Promise'in kallus dokularındaki *HvPR4* mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

Marti kallus dokularında *HvVIP1* ve *HvPR4* arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Her iki test edilen genin anlatım arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu belirten bir Pearson katsayısı $r = 0.98$ bulunmuştur. Ancak, *HvPR4*'ün *HvVIP1*'den bağımsız olarak ifade edildiği Golden Promise'de durum böyle değildir. Hesaplanan korelasyon katsayısı Golden Promise'de $r = 0.12$ değeri ile test edilen genler arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir.

***HvPR10* Geninin Anlatım Analizi**

Arpa kalluslarının AGL-1 suşu ile enfeksiyonunu takiben (post enfeksiyöz) *HvPR10* indüklenmiş görünmektedir. Sonuçlar *HvPR10*'un, dirençli Marti'da patojen enfeksiyonuna karşı geç reaksiyon verdiği ve enfeksiyondan 48 saat sonra önemli ölçüde indüklendiğine işaret etmektedir. *HvPR10* anlatımının kontrole kıyasla yaklaşık 250 kat arttığı görülmektedir (Şekil 4.23). Bununla birlikte, Golden Promise patojenlere karşı daha hassas görünmekte ve *HvPR10*'un anlatımının bakteri enfeksiyonundan sadece 6 saat sonra kontrole göre 10 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23).

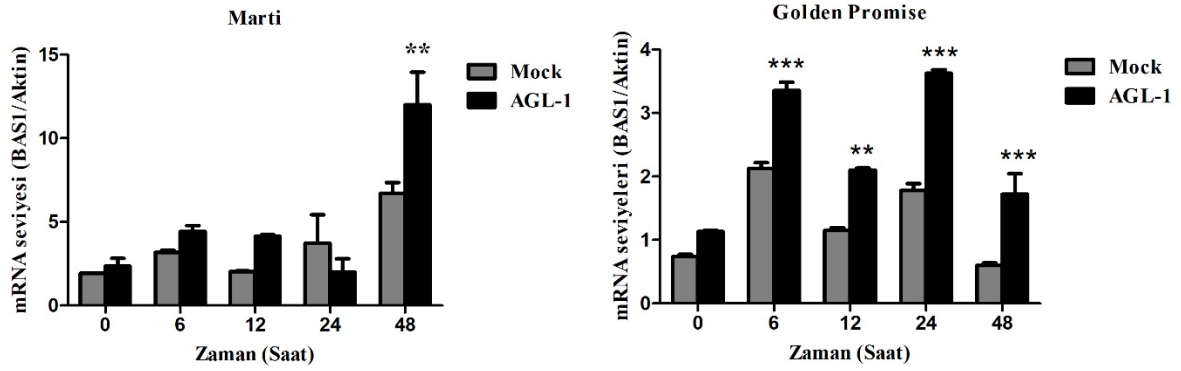


Şekil 4.22: *A. tumefaciens* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cvs. Martı ve Golden Promise'in kallus dokularındaki *HvPR10* görel mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (***) $P < 0,001$).

Martı kalluslarında *HvVIP1* ve *HvPR10* arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir, Pearson testi kullanılarak verilerin analiz edilmesiyle korelasyon katsayısı $r = 0.97$ olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, Golden Promise kalluslarında bakteri enfeksiyonunu takiben (post enfeksiyöz) *HvVIP1* ve *HvPR10* arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamaktadır.

***HvBAS1* Geninin Anlatım Analizi**

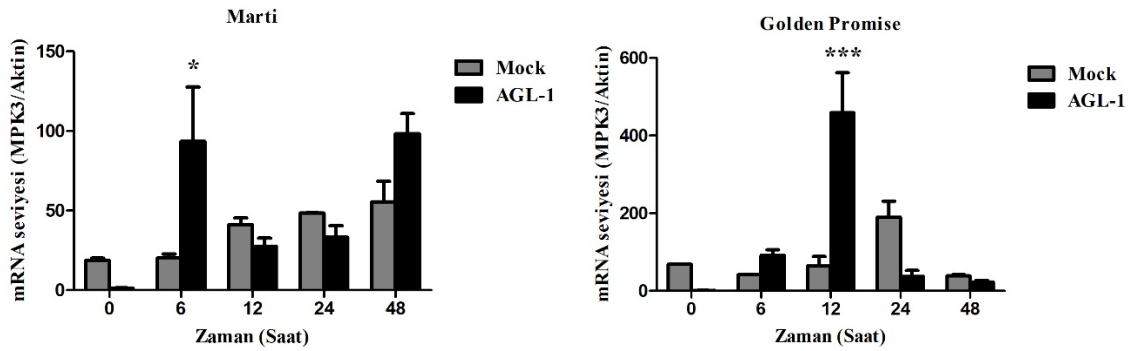
HvBAS1, her iki arpa çeşidinde de indüklenmektedir (Şekil 4.24). Martı kalluslarında, BAS1, AGL-1 suşları ile 48 saat inokülasyondan sonra önemli ölçüde indüklenme olmasına rağmen Golden Promise çeşit kalluslarında, *HvBAS1* gen anlatımı, inokülasyondan sadece 6 saat sonra indüklendiğinden bakteriye daha duyarlı olduğu görünmektedir. *VIP1* ve *BAS1* genlerinin anlatımı arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu belirten bir Pearson katsayısı $r = 0.9$ bulunmaktayken Golden Promise'de Pearson katsayısı düşüktür ($r = 0.3$). Bu durum Golden Promise 'de iki gen arasında zayıf bir korelasyon olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.23: *A. tumefaciens* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cvs. Marti ve Golden Promise'in kallus dokularındaki *HvBAS1* mRNA seviyelerinin ilgili zamana göre karşılaştırılması (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

HvMPK3 Tarafından HvVIP1 İndüklenmesi

Arpa çeşitlerinde bakteri enfeksiyonundan sonra MPK3'ün önemli ölçüde anlatım yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.25). Golden Promise kalluslarında MPK3'ün 12. saatte 500 kat daha fazla indüklendiği enfeksiyona daha fazla yatkın olduğunu göstermiştir. Martıda ise enfeksiyondan 6 saat sonra *HvMPK3*'ün önemli ölçüde anlatım yaptığı saptanmıştır (Şekil 4.25).

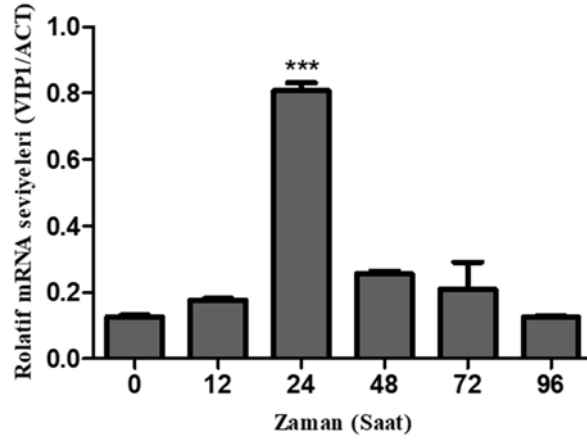


Şekil 4.24: *A. tumefaciens* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cvs. Marti ve Golden Promise'in kallus dokularındaki *HvMPK3* mRNA seviyelerinin zamana göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

Martı kalluslarında test edilen MPK3 ve VIP1 arasında korelasyon yüksektir ($r = 0,9$) ve bu sonuç iki genin anlatımı arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermektedir. Golden Promise kalluslarında, MPK3 ve VIP1 arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

4.3.3.2. *Fusarium culmorum* Enfeksiyonunda *HvVIP1* Gen Anlatımı

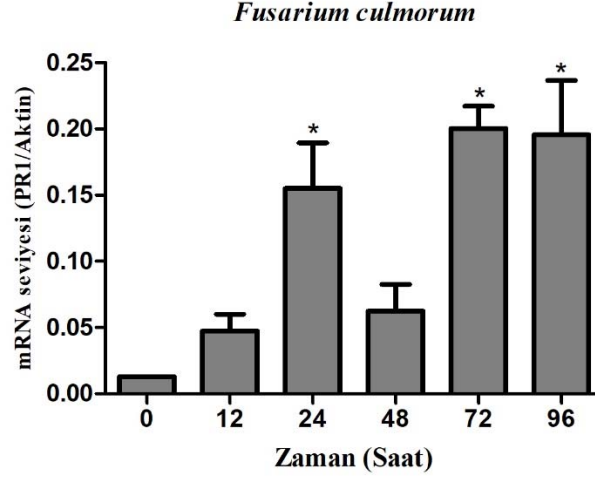
F. culmorum F16 suşu ile farklı süreler boyunca (12 sa, 24 sa, 48 sa, 72 sa. ve 96 sa.) enfekte edilen kök dokularından elde edilen sonuçlar *HvVIP1*'in 24 saatlik patojen enfeksiyonundan sonra önemli ölçüde indüklendiğini göstermektedir (Şekil 4.26). Bununla birlikte, *HvVIP1*'deki bu anlamlı indüklenmenin ($***P < 0.001$) uzun sürmediği ve en yüksek seviyeye ulaştığı 24. saatten sonra kontrol grubu (0 saat) seviyelerine geri çekildiği belirlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.25: *F. culmorum* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök dokularındaki *HvVIP1*'nin görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($***P < 0,001$).

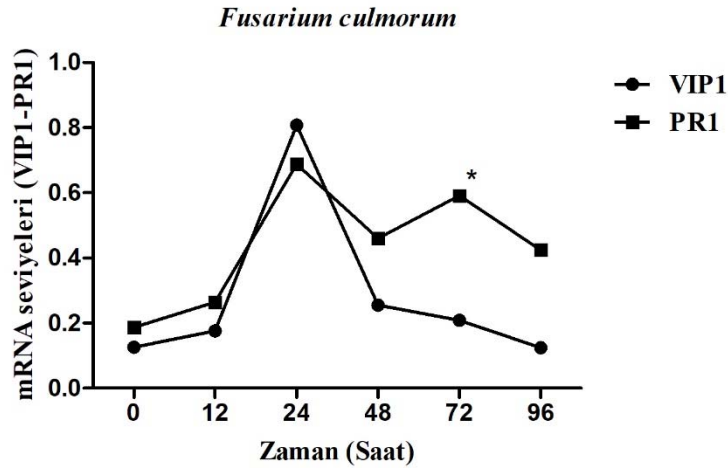
HvPR1 Geninin Anlatım Analizi

HvPR1 gen anlatımının arpa kök dokularında *Fusarium culmorum* enfeksiyonundan 24 saat sonra önemli ölçüde ($*P < 0,05$) indüklendiği ve 96 saatlik stres uygulamasının sonuna kadar devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.26: *F. culmorum* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök dokularında *HvPR1*'nin görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P < 0,05$).

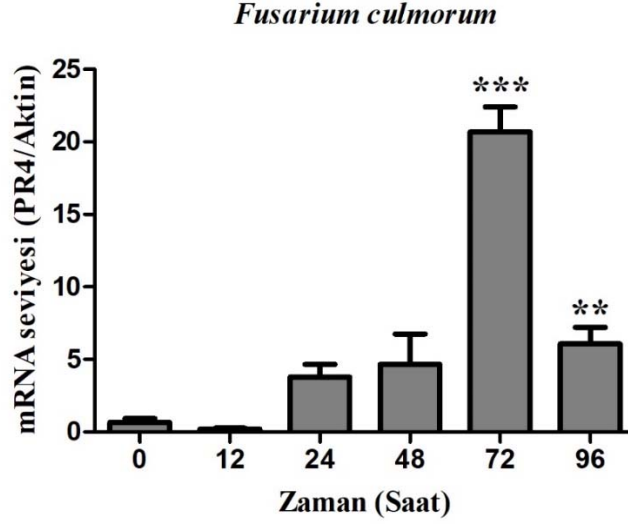
F. culmorum ile enfekte olmuş köklerde *HvVIP1* ve *HvPR1* genlerinin benzer yanıtlar verdiği görülmektedir. Şekil 4.28'de gösterildiği gibi, her iki gen de enfeksiyondan 24 saat sonra indüklenmektedir. *HvVIP1* ve *HvPR1* arasındaki korelasyon Pearson testi ile saptanmış ve $r = 0,88$ bulunmuştur. Bu sonuçlar *Fusarium culmorum* enfeksiyonu altındaki arpa köklerinde her iki genin anlatımı arasında ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.27: *F. culmorum* ile aşılamadan sonra Martı köklerinde *HvVIP1* ve *HvPR1* anlatım profilleri arasındaki karşılaştırmalı analiz.

HvPR4 Geninin Anlatım Analizi

HvPR4 geni *Fusarium* stresi altında enfeksiyondan 72 saat sonra ($***P < 0,001$) kök dokularda indüklenmektedir (Şekil 4.29).

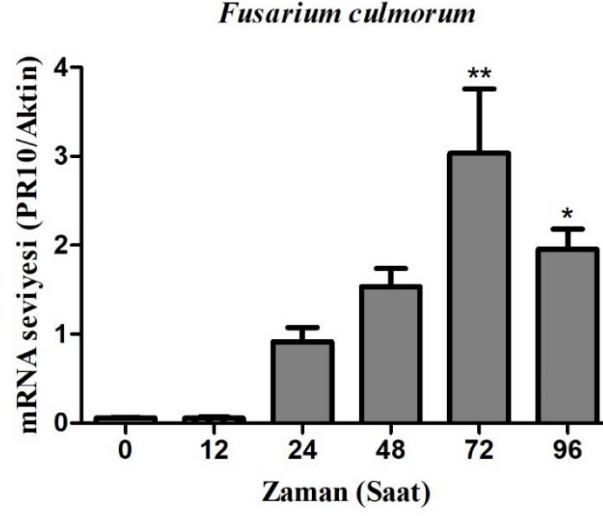


Şekil 4.28: *F. culmorum* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök dokularındaki *HvPR4*'ün görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($**P < 0.01$; $***P < 0,001$).

Martı kalluslarının köklerinde *F. culmorum* enfeksiyonu akabinde *HvVIP1* ve *HvPR4* arasında anlamlı bir ilişki saptanmamaktadır.

HvPR10 Geninin Anlatım Analizi

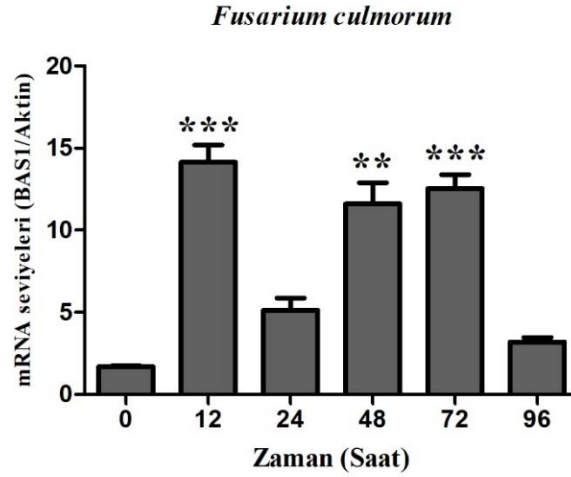
HvPR10, *Fusarium culmorum* enfeksiyondan 72 saat sonra önemli ölçüde indüklenmiştir ($**P < 0,01$) (Şekil 4.30). Bununla birlikte, Martı kallus köklerinde *F. culmorum* enfeksiyonu sonrasında (post enfeksiyöz) *HvVIP1* ve *HvPR10* arasında ilişki saptanmamaktadır.



Şekil 4.29: *F. culmorum* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök dokularındaki *HvPR10* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

***HvBAS1* Geninin Anlatım Analizi**

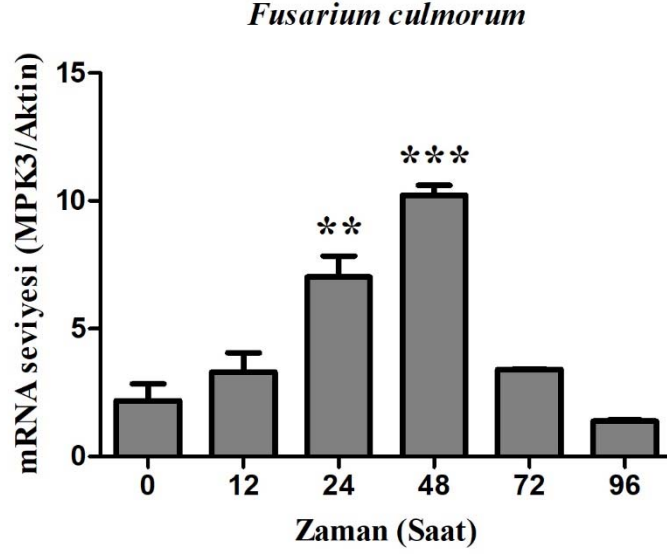
HvBAS1, Martı köklerine *Fusarium* enfeksiyonu uyguladıktan sadece 12 saat sonra indüklenmekte ve genin anlatımı 72. saate kadar devam etmektedir (Şekil 4.31). *VIP1* ve *BAS1* arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır.



Şekil 4.30: *F. culmorum* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök dokularındaki *HvBAS1* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

***HvMPK3* Geninin Anlatım Analizi**

HvMPK3, 24 saatlik enfeksiyondan sonra fungal stres altında önemli ölçüde indüklenmektedir. Genin anlatımı 48. saatte en yüksek seviyeye ulaşmaktadır (Şekil 4.32). Fungal enfeksiyonda *MPK3* ve *HvVIP1* arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Ancak, her iki genin anlatımlarının arttığı saat aralıkları benzerdir (24. sa).



Şekil 4.31: *F. culmorum* ile enfekte edilen *Hordeum vulgare* L. cv. Martı'nın kök dokularındaki *HvMPK3* görel mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Monokotiledon tahıllarda genetik transformasyon yöntemlerini geliştirmek için yıllardır sürdürülen sayısız girişime rağmen bugün hala zorluklarla karşılaşmaktadır. Bununla birlikte, bitkilerdeki enfeksiyon aşamasının biyolojisini anlamaya yönelik gelişmeler monokotiledon transformasyon sistemlerinin geliştirilmesine önemli ölçüde katkı sağlamıştır (Smith ve Hood, 1995). Bu gelişmeler ışığında, *Agrobacterium* aracılığıyla bitki transformasyonu uygulamaları; biyotik ve abiyotik strese toleransın artması ve dolayısıyla tahıl veriminde ve besin içeriğinde artış, zararlılara dirençte ve biyofarmasötik ürünlerinde artış ile sonuçlanmıştır (Barlett ve diğ., 2008). Biyolojik bir vektör olan *Agrobacterium tumefaciens*, ekonomi açısından önemli birçok monokotiledon ve dikotiledon türünün transformasyonunda da standart doku kültürü ve bitki transformasyon teknikleri uygulanarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen, doğada kendiliğinden oluşan patojen ve onun dikotiledon konağı arasındaki *Agrobacterium* aracılığı ile gerçekleşen bitki transformasyon sürecinde konak faktörlerin rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bakteri enfeksiyonunun ardındaki mekanizmalar daha önce gösterilmiş olmakla birlikte enfeksiyon öncesi ve sonrası aşamalarda konakçı faktörün rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu kapsamda, *A. tumefaciens*'in doğal konağı olan *Arabidopsis thaliana* model organizma olarak kullanılmış ve konakçı proteinlerinin rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında VIP1 tüm kodlama dizisi, *H. vulgare* cv. Martı çeşidinden (HvVIP1) elde edildi. Transkripsiyon faktörünün 972 bç'lik tüm kod dizisine ve 323 amino asitlik bir protein dizisine sahip olduğunu gösterildi. Farklı monokotiledon ve dikotiledonlardaki VIP1 ortologları ile yapılan karşılaştırmalı analizler, farklı VIP1 benzer proteinler arasında yapısal benzerlikler olduğu gösterdi. Bunun yanı sıra, cv. Martı HvVIP1 ortoloğu AtVIP1 proteini ile karşılaştırıldığında 41 bölgede delesyon gözlenirken (Ek 3), 13'ü bZIP bölgesinde yerleşmiş sinonim olmayan SNP'ler içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Ayrıca, farklı türlerden seçilmiş VIP1 benzer proteinler arasındaki evrimsel ilişki incelendiğinde, diğer türlere kıyasla HvVIP1 ve TaVIP1 (*Triticum aestivum* L.)'lerinin en yakın ortak ataya sahip olduğu tespit edildi. Filogenetik ağaçta her iki türün %95 oranında güven aralığı ile birlikte kümелendiği görülmektedir (Şekil 4.4). Bununla birlikte, her iki genin evrimleşme süreci diğer tahıllardaki (mısır, pirinç ve sorgum) ortologlarından evrimsel olarak daha sonra geliştiği görülmektedir.

HvVIP1'in, diğer tanımlanmış bZIP proteinlerinde olduğu gibi C terminal (CTD- C Terminal Domain) bölgesine doğru konumlanmış ve 157. ile 223. bakiyeleri arasına yerleşmiş bir bZIP domeni (Basic Leucine Zipper Domain) içerdiğini göstermektedir. Bu sonuçlar daha sonra biyoinformatik analizlerle onaylanarak HvVIP1 protein dizisi Pfam veri tabanı (Finn ve diğ., 2015) ve IntFOLD veri tabanına (McGuffin ve diğ., 2015) yüklenmiştir. Bu veri tabanları, belirli güven aralığı (Maghrabi ve diğ., 2016) ile proteinin kalıp yapısını, fonksiyonel bilgisini, yapısal domen tahminlerini ve hastalık tahmin profillerini de içeren '3D protein yapısal modelini' belirlemede oldukça faydalıdır.

Karşılaştırmalı analizlerle elde edilen sonuçlar, HvVIP1 proteininin bZIP domeninin 160. ve 221. amino asit bakiyeleri arasında olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.5). Ayrıca, bZIP domeni her biri farklı işleve sahip olan bazik bölge (BR- basic region) ve lösin fermuar bölgesi (LZ- Leucine Zipper) olarak bilinen iki yapısal özelliği açısından da incelenmiştir. Bazik bölge iki unsuru içermektedir: birincisi, hedef genin promotör bölgesinde transkripsiyon faktörünü tanıyabileceği ve belirli *cis* elementine bağlanabileceği değişmeyen bir DNA bağlanma motifi, ikincisi ise nükleo-sitozolik taşıma yeteneğine sahip proteini veren kısa bir peptid parçası olan Nüklear Lokalizasyon Sinyali'dir (Pitzschke ve diğ., 2009). Şekil 4.2'de görüldüğü üzere 157. ve 187. amino asit bakiyeleri arasında yerleşmiş olan HvVIP1 proteininin bazik bölgeleri bu her iki unsuru da göstermektedir.

¹⁷⁰NRQSAARSK¹⁷⁸ sabit DNA bağlanma motifi, Arjinin (R) amino asitin yerini alan 178. bakiyedeki bir Lizin (K) tarafından işaretlenmektedir. Bu tür yer değişimleri karakteristik olmakla birlikte bZIP protein ailesinin ender Grup I'in tüm üyeleri arasında paylaşılr. Böylelikle, hedef gen regülatör bölgesinde palindromik olmayan bölgeleri algılama ve bağlanma yeteneği kazanırlar (Jacoby ve diğ., 2002; Ali ve diğ., 2016). Bu palindromik olmayan bölgeler daha sonraları Pitzschke ve diğ., 2009'da tanımlanmış ve VIP1 Yanıt Elementleri (VREs) olarak adlandırılmıştır.

HvVIP1 protein dizisindeki NLS bipartit ¹⁶⁵KRILANRQSAARSKERKIK¹⁸³, NLS bipartit model (KR-X₁₁-K(KR)-X-(K/R)) ile benzeşiyor görünmektedir (burada X ile herhangi bir amino asit bakiyesi, K ile Lizin ve son olarak R ile Arjinin temsil edilmektedir). Peptid sinyal türü, tüm proteomlar içerisindeki en yaygın NLS sınıflarından biri olan sınıf 6'ya (cNLS) aittir (Cokol ve diğ.,2000; Chang ve diğ., 2013). Lösin fermuar domeni başlagıcından hemen önce yerleşmiş olan son altı amino aside kapsayan bazik bölge içinde bir bağlantı bölgesi tespit

edilmiştir. Bu bağlantı bölgesi, genellikle transkripsiyon faktörünün bağlanma özgülüğü üzerindeki ekleyici etkisiyle bilinmektedir (Niu ve diğ., 1999). Lösin-fermuar bölgesi ile ilgili gözlemler, beş tekrarlı yedili amino asit bakiyelerinde her yedi bölgede bir lösin işareti taşıyan oldukça korunmuş bir protein birimini ortaya koymaktadır. Bu yedili tekrarlar, süper sarmal protein (coil-coiled) yapısını oluşturmak için birbirleri etrafında kıvrılma yeteneğine sahip sürekli bir alfa heliks oluşturmak için bir araya gelen diğer bZIP protein ailesinin üyeleriyle benzer veya farklı iş birliğinden sorumludur (Jacoby ve diğ., 2002; Ali ve diğ., 2016). Bu tür moleküler düzenlemeler, dimerlerin bazik bölgesini (VREs bölgelerinde) *cis acting* elementine bağlandıkları promotör bölgesine en yakın mesafeye getirir ve böylece DNA majör oluk bölgesine girmelerine olanak sağlar. HvVIP1 protein dizisi, 173. pozisyonda korunmuş bir Serin ve 176. pozisyonda ise korunmuş bir Arjinin bakiyesinin bulunduğunu göstermektedir. Niu ve diğ., (1999)'a göre, bu tür korunmuş modeller HvVIP1'i çok iyi bilinen bir bitki bZIP protein sınıfı olan ve özellikle palindromik CCACGTGG dizisine bağlanma özgünlüğüne sahip G-kutusu bağlanma faktörü (GBFs, G-box binding factors) içerisinde sınıflandırmaktadır. Bu tür korunmuş paternler HvVIP1'i, bir bitki bZIP protein sınıfı olarak bilinen ve özellikle palindromik CCACGTGG dizisine bağlanma özgünlüğüne sahip G-kutusu bağlanma faktörü (GBFs, G-box binding factors) içerisinde sınıflandırmaktadır. Tüm bitki seviyesinde, GBF'lerin, ışık ya da hormonlar gibi ana ipuçlarına yanıt olarak gelişimsel ve fizyolojik süreçlere dahil olduğu Menkens ve diğ., (1995); Siberil ve diğ., (2001)'de belirtilmiş bundan dolayı, gelişim süreçlerinde ve VIP1'in bitki stres regülasyonundaki potansiyel rolü gösterilmiştir. Yıllar içerisinde, *Arabidopsis thaliana*'da 127, soya fasulyesinde (*Glycine max* L.) 266, pirinçte (*Oryza sativa* L.) 140, buğdayda 102 (*Triticum aestivum* L.) ve mısırdaki 218 (*Zea mays*) yaklaşık 127 bZIP tespit edilmiştir. Son zamanlarda, Pourabed ve diğ., (2014) *Hordeum vulgare* genomundan 89 gen tarafından kodlanan 141 bZIP proteinini tanımlamıştır.

Bu çalışmada, stres ve stres içermeyen koşullar altındaki arpa dokularında, bZIP transkripsiyon faktörü olan *HvVIP1*'in anlatım şablonu incelendi. Doku-spesifik incelemeler, *HvVIP1*'in, yapraklar, kökler, olgunlaşmamış embriyolar, kalluslar ve koleoptillerde kararlı bir şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Bu anlatım şablonu, birçok bitki işleminde doğal olarak yer alan ve çimlenme, fotomorfojenez, çiçek oluşumu, çiçek gelişimi ve tohumun olgunlaşması gibi çeşitli fenomenleri düzenleyen bZIP aile üyelerinin doğasıyla ilgili daha önceki bulguları doğrulamaktadır (Ali ve diğ., 2016). Ayrıca, model organizma *A. thaliana*'da *AtVIP1* ortolog ile yapılan çalışmalar da bizim sonuçlarımızı teyit eder niteliktedir, bu da transkripsiyon

faktörünün çeşitli bitki yapılarında ve arpada çeşitli gelişim aşamalarında anlatımının yapıldığını göstermektedir. Her ne kadar HvVIP1'in rolü tam olarak anlaşılmamış olsa da, transkripsiyon faktörünün bZIP proteinlerinden Grup I'nın karşılık gelen üyeleriyle benzer rolleri üstlendiği düşünülmektedir. Bunlar genellikle bitki floeminde bitkinin boyunun kontrol edilmesinde ve bazıları bir yapısal bitki hücre duvarı proteinini kodlamada anlatım yapmaktadır (Jacoby ve diğ., 2002). Bu nedenle, *HvVIP1*'in fonksiyonu muhtemelen karakteristik ortolog *AtVIP1*'e benzerdir. Özellikle bu bZIP transkripsiyon faktörleri korunmuş bitki elementleridir. Daha önce VIP1-benzeri proteine hiçbir yapısal belirleyici rol atanmamıştır, bu nedenle, HvVIP1'i arpa bitkilerinde çeşitli gelişimsel uyarılara yanıt veren bir transkripsiyon düzenleyicisi olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, çeşitli biyotik ve abiyotik stres altındaki HvVIP1 davranışı, sinyalleme ve stres yanıtlamadaki rolünün anlaşılması amacıyla da incelenmiştir. Arpa bitkiciklerine uygulanan şok dehidrasyon stresi kısaca, filtre kâğıtlarına kurumaya bırakılan üç yapraklı fidelere büyütme odasındaki kontrol grubu bitkiciklerle birkaç saat boyunca aynı büyüme koşullarına maruz bırakmak olarak tanımlanabilir. Kök ve yaprak örnekleri sırasıyla 30 dakika, 1, 4 ve 8 saat sonra toplanılarak *HvVIP1* anlatım profili incelenmiştir (Şekil 4.14). *HvVIP1*, her iki dokuda da, bu strese daha duyarlı olan kökler ile önemli ölçüde indüklenmiştir. Köklerde, *HvVIP1*, stres uygulamasından 4 saat sonra kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında 8 kat daha fazla aşırı bir anlatım oranı ile anlamlı şekilde indüklenmiştir. Yapraklarda *HvVIP1*, stres uygulamasından 8 saat sonra önemli ölçüde indüklenmiş ve kontrol örneklerine kıyasla indüksiyon oranı 7 kat daha fazla olmuştur. Aynı ifade şablonu, tuzluluk stresine maruz kalan arpa dokularında da dikkat çekici olmuştur. *HvVIP1*, hem arpa köklerinde hem de yapraklarda sadece 24 saatlik tuz stres uygulamasından sonra indüklenmiştir. Hoagland beslenme solüsyonu ile desteklenen hidroponik sistemde yetişen üç yapraklı bitkilere 160mM'lık konsantrasyonda NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. Bitki yaprağı ve kök dokuları, tuz stresinden 2, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat sonra toplanılmıştır. *HvVIP1* transkripsiyon faktörünün yaprak ve köklerde önemli indüksiyonu sırasıyla 60 ve 72 saat sonra kaydedilmiştir. Arpa kökündeki anlatım oranı kontrol grubuna (0 saat örnekleri) kıyasla yaklaşık 15 kat daha fazla olduğu için, stresi yapraklardan daha anlamlı olarak algılar; yapraklarda ise transkripsiyon oranı kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat artmıştır.

Yukarıda belirtilen sonuçlara göre, HvVIP1, Arpa'nın abiyotik strese tepkisinde rol oynamaktadır. Kuraklık ve tuzluluk stresi uygulamasından sonra önemli ölçüde anlatımı, proteini fonksiyonel bir düzenleyici unsur olarak tanımlamakla birlikte stres ve hormonların

sinyallemesinde önemli roller üstlendiği bilinen bZIP transkripsiyon faktörü aile üyelerinin doğasıyla ilgili daha önceki bulguları da doğrular niteliktedir (Ali ve diğ., 2016). Transkripsiyon faktörünün, hedef genlerini tanımlayarak abiyotik strese cevaben bitki metabolizmasını yeniden programlayabilme kabiliyetinin araştırılması gereklidir. *Arabidopsis thaliana*'da, *AtVIP1*, promotör bölgesi cis düzenleyici elementleri VIP1 Tepki Elemanı olarak adlandırılan veya VRE motifi olarak adlandırılan belirli strese duyarlı genlerin transkripsiyon düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Pitzschke ve diğ., 2009). Tsugama ve diğ., (2014) VRE-içeren genleri listelemiş ve sahip oldukları VRE motifi sayısına göre 1'den 9'a kadar sınıflandırmıştır. Bunlar arasında, MYB, WRKY, PR gen ailesi üyeleri ve bazı ozmosensör genler listelenmiştir. Hem tuzluluk hem de kuraklık stresi altındaki arpa dokularında önemli ölçüde indüklenen MYB-benzeri protein ailesinden *HvBAS1*'in (Gurel ve diğ., 2016) potansiyel bir *HvVIP1* hedef geni olup olmadığı bu tezde araştırılmıştır. Ancak, her iki element arasındaki korelasyon, cv. Martı yapraklarında ve abiyotik strese maruz kalan köklerde *HvVIP1* ve *HvBAS1* arasında pozitif bir korelasyon olmadığını (PCC $r = 0,4$) ortaya çıkarmıştır. Elde edilen veriler, arpa abiyotik stres uygulaması sonrasında *HvBAS1*'in bir *VIP1* hedef geni olarak tayin edilmesi için yeterli kanıt sağlamamaktadır. Ne var ki, bu, abiyotik stres sinyal iletim transdüksiyon yolağındaki diğer olası hedef genler hakkında derinlemesine bir araştırma yapılmasını gerektirir. Biyotik stres uygulaması açısından, *Fusarium culmorum* F16 suşları cv. Martı köklerini enfekte etmek için kullanılmıştır. Enfekte dokular birkaç saat sonra toplanılıp (0, 12, 24, 48, 72, 96 saat) daha sonra *HvVIP1* ifade modeli için araştırılmıştır (Şekil 4.25). Patojen saldırısından 12 saat sonra, *HvVIP1* indüklenmiş, ancak transkripsiyon faktörünün anlamlı şekilde aşırı anlatımı, patojen saldırısından 24 saat sonra kaydedilmiştir. Sonuçlar kontrol numunelerine (0 saat) kıyasla karşılaştırıldığında, indüksiyon oranı, patojen atağı sonrası 24. saatte yaklaşık 8 kat olmuştur. *Agrobacterium tumefaciens* ile yapılan çalışmalarda hassas Golden Promise ve dirençli Martı kalluslarında *HvVIP1*'in anlatımı incelenmiştir. Anlatım, Golden Promise kalluslarında inokülasyondan 12 saat kadar erken bir zamanda kaydedilmişken, Martı çeşidinde aşılamaadan tam olarak 2 gün sonra (48 saat) kaydedilmiştir. Golden Promise bitkileri patojenlere karşı duyarlılıkları ile bilinir ve bu çalışmada iki genotipin karşılaştırması amacı için kullanılmıştır. Her iki çeşitte de *HvVIP1* duyarlılık deseni, bir savunma sinyal iletim yolunda proteinin işlevselliğinin doğası hakkında bir başka kanıt sağlamıştır (Djamei ve diğ., 2007; Alves ve diğ., 2013).

Pitzschke ve diğ., (2009), *Arabidopsis*'te üç VIP1 hedef genini (*PR1*, *MYB44*, *Trxh8*) tanımlamışlardır, bu da transkripsiyon faktörünün aşağı akış yönünde MPK3 sinyal iletim yolağını çalıştırdığını göstermektedir (Djamei ve diğ., 2007). Bu onaylanmış verilere dayanarak, çeşitli biyotik streslere maruz kalan arpa bitkilerinde tez kapsamında bazı HvVIP1 hedef genlerini tanımlamaya çalışıldı. Bu nedenle stres kaynaklı dokularda aşağıdaki genlerin anlatım profillerini incelendi: *HvBAS1*, *HvPR1*, *HvPR4*, *HvPR10*. Daha sonra, Pearson Korelasyon Katsayılarının hesaplanmasına dayanarak *HvVIP1* ile bağıntısallığını test edildi.

Literatürde daha önce bu alanda yapılmış diğer çalışmalara göre, patogeneze ile ilişkili *PR1* geni, *Arabidopsis*'te VRE'ye bağlı bir şekilde düzenlenen bir VIP1'dir ve promotör bölgesinde bir adet VRE motifine sahiptir (Tsugama ve diğ., 2014). *HvPR1*'in anlatım profili, patojen atakları (mantar veya bakteri) geçiren genç arpa bitkilerinde test edilmiştir. Sonuçlar, *HvPR1*'in 12 saat sonra arpa köklerinde önemli ölçüde indüklendiğini ve *Fusarium* enfeksiyonu uygulamasının tamamı boyunca tam olarak 4 gün (96 saat) olana kadar stabil olarak kaldığını göstermiştir. *HvPR1* ayrıca *Agrobacterium* inokülasyonundan sonra kallus dokularında da güçlü bir şekilde indüklenmiştir. Golden Promise'de anlatım, kontrol grubuna (0 saat) kıyasla aşılama olmadan sadece 6 saat sonra 3000 kata kadar aşırı ekspresyon oranı ile önemli ölçüde indüklenmiştir. Bakteriyel strese karşı *HvVIP1* yanıtı, Martı kalluslarında inokülasyondan tam olarak 2 gün (48 saat) sonra kontrol grubuna kıyasla 13 katlık bir indüksiyon oranı ile kaydedilmiştir.

Agrobacterium ile inoküle edilen Martı kalluslarında *HvVIP1* ve *HvPR1* arasında güçlü bir yukarı yönlü korelasyon ilişkisiyle (PCC $r = 0,9$) birlikte *Fusarium* ile enfekte arpa kökleri içinde PCC $r = 0,7$ değeri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Tsugama ve diğ., (2014)'ün sonuçlarını doğrular nitelikte olup dahası sonuçlarımız, bitkilerde bZIP proteinlerinin korunmuş işlevselliğinin bir başka kanıtıdır. Sonrasında, *HvVIP1*, biyotik stres doğasına bakılmaksızın arpa bitkilerinde patojen saldırılarına karşı strese duyarlı genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak düşünülebilir. PR proteinleri, patojenlere karşı bitki savunma yanıtlarının bağlantılı bileşenlerinden oluşan çeşitli bir gruptur (Zhu ve diğ., 2006; Sudisha ve diğ., 2012). Bazı çalışmalar PR proteinlerinin in vitro bakteriyel ve fungal büyümeyi engellediğini ve bu proteinleri aşırı anlatım yapan bitkilerin çeşitli patojenik mantarlara karşı artan bir toleransa sahip olduklarını ve bitki savunmasında rol oynadıklarını göstermektedir (Van Loon, 1999). Bu nedenle, *HvPR1*, *HvPR4* ve *HvPR10* anlatım profillerine ek olarak,

hem bakteriyel hem de mantar enfeksiyonu geçiren arpa dokularında *HvVIP1* ile aralarındaki ilişki incelenmiştir.

Djamei ve diğ., (2007), *Arabidopsis thaliana*'da protein kinaz MPK3'ün stres uyarılarını algıladığında VIP1'i fosforillediğini belirtmiştir. VIP1, MPK3 ile fosforillenmesi üzerine sitoplazmadan nukleusa konum değiştirir ve patogenez ile ilişkili gen PR1'in anlatımını düzenler. VIP1'in MAPK-bağımlı fosforilizasyonu, VIP1-aracılı Agrobakteri T-DNA'sının transferi için gereklidir, yani Agrobakteri, MAPK-hedefli VIP1 savunma sinyal yolağını, T-DNA kompleksinin bir Truva Atı şeklinde nukleusa sevki için suistimal eder. Bu nedenle MPK3 ve VIP1'in stres altındaki arpa dokularındaki ilişkisini anlamayı hedeflendi. *HvMPK3* anlatım profili, beklendiği üzere, hem duyarlı hem de dirençli kültürlerin *A. tumefaciens* uygulanmış kallus dokularında güçlü anlatıma işaret etmektedir. Martı dokularında *HvMPK3*, 0. saat örnekleriyle karşılaştırıldığında 3 kat aşırı anlatım (*P < 0,05) gösterirken, duyarlı kültür Golden Promise'te enfeksiyondan 12 saat sonra artış (8 kat) görülmüştür (Şekil 4.24). *Fusarium* ile enfekte edilen Martı köklerinde *HvMPK3*'ün anlamlı ölçüdeki aşırı anlatımı enfeksiyondan bir gün (24 saat) sonra kaydedilmiştir. *HvMPK3* ve *HvVIP1*, çalışılan Martı kalluslarında hesaplanan Pearson Korelasyon Katsayısı $r = 0,9$ ile güçlü bir korelasyon göstererek *Arabidopsis thaliana*'dan daha önce elde edilen verileri doğrulamıştır.

Elde edilen ve ayrıca daha önceki bulgularla da harmanlanan tüm sonuçların ışığında, arpa bitkilerinin *Agrobacterium*-aracılı transformasyona direncinin arkasındaki muhtemel sebepleri açıklığa kavuşturmaya yönelebilir. VIP1'in ortologlarının hem duyarlı *Arabidopsis* (Agrobakteri aracılı transformasyonun doğal konakçısı)'te hem de dirençli tahıl ürünü arpadaki yapısal benzerlikleri ve işlevsel benzeşimleri hipotezimizin temel dayanağını oluşturmaktadır.

Bazı bitkilerdeki (arpa gibi) dirençliliğin moleküler mekanizma yoksunluğundan kaynaklanmayabileceği, yani VIP1 gibi korunmuş bZIP proteinlerinin iki hücre tipinde de aynı şekilde işlev göstereceği ve bu transkripsiyon faktörünün büyük olasılıkla, aynı *Arabidopsis*'in sitozolü içinde olduğu gibi, arpa hücrelerine girdiğinde de bakteriyel efektörlere yardımcı görev üstleneceği sonucuna vardık. Bu nedenle böyle bitkilerdeki dirençliliğin muhtemelen kimyasal ve yapısal engellerden kaynaklı olduğu; transfeksiyonun ilk aşamalarında varsayılan durumların (kimyasal-çekim, hücre-hücre tanıma ve eklenme) yer aldığı kastedilmektedir. Bu teori, bitkilerdeki Agrobakteri enfeksiyonuna yatkınlığın çeşitli çevresel, fiziksel ve aynı zamanda genotip ilişkili faktörlerin sonucu olduğunu belirten Karami ve diğ., 2008 tarafından

desteklenmektedir ve hatta bu yatkınlık aynı bitkideki dokular ve hücre tipleri arasında da çeşitlilik gösterebilir (Gelvin, 2000). Bunun yanında, Tzfira ve Citovsky, (2002), mısır (*Zea mays* L.) bitkisi ve Agrobakteri arasındaki kimyasal çekim sürecinin yoksunluğunun büyük tarımsal öneme sahip bu bitkide direnç yolu açtığını belirtmiştir. Yazarlar, bitkinin normalde Agrobakteri virülans düzeneğinin transkripsiyonel etkinleşmesi için gerekli eksüdatının aynı zamanda baskılayıcı faktör olabileceğini açıklamıştır (Niu ve diğ., 2000; Shrawat ve diğ., 2006; Pitzschke ve Hirt, 2010). Mısır köklerindeki organik eksüdat bakteriyeye ait vir geninin anlatımının indüklenmesini baskılayarak enfeksiyonun yetersiz kalmasına neden olmuştur. Ayrıca bazı bitki hücresi yüzey moleküllerinin eksikliği de Agrobakterilerin bağlanmasına (hücre-hücre bağlanması) engel oluşturmuş olabilir (Gelvin, 2000). Bu henüz tanımlanmamış yüzey proteinlerinin transformasyonu teşvik ettiğine yönelik çıkarım Agrobakteri kök transformasyonuna dirençli olan bu *Arabidopsis* ekotiplerinin germ hattı transformasyonuna nasıl yatkın olduğunu açıklayan Mysore ve diğ., (2000) makalesinde vurgulanmaktadır (Tzfira ve Citovsky, 2002; Pitzschke ve Hirt, 2010).

VIP1 stressiz koşullarda düşük seviyede olmakla birlikte, özellikle stres altında anlatımı aktifleştikten proteinin bitki stres yanıtıyla ilişkisi olduğu tahmin edilmektedir (Lacroix ve Citovsky, 2013; Pitzschke ve diğ., 2009; Tsugama ve diğ., 2012, 2014; Bourras ve diğ., 2015). Bulgularımıza göre, *Arabidopsis*'te hâlihazırda tanımlanmış olan MPK3-VIP1-PR1 sinyal yolağı arpa hücrelerinde de korunmuştur. Ancak tez çalışmada patojen-ilişkili gen ailesine ait yeni potansiyel hedef genler de tanımlanmıştır. Gelecek çalışmalarda *HvPR4* ve *HvPR10* genleri daha detaylı bir biçimde incelenmelidir.

Bu tez çalışmada XRCC4 tüm kodlama dizisi, *H. vulgare* cv. Martı çeşidinden (HvXRCC4) elde edildi. Transkripsiyon faktörünün 843 bç'lik tüm kod dizisine (Şekil 4.10) ve 280 amino asitlik bir protein dizisine sahip olduğunu gösterildi (Şekil 4.11). Farklı monokotiledon ve dikotiledonlardaki XRCC4 ortologları ile yapılan karşılaştırmalı analizler, farklı XRCC4 benzer proteinler arasında benzerlikler olduğu gösterdi. Bunun yanı sıra, cv. Martı HvXRCC4 ortoloğu cv. Haruna Nijo VIP1 proteini ile karşılaştırıldığında 4 SNP'ler içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Ayrıca, farklı türlerden seçilmiş XRCC4 benzer proteinler arasındaki evrimsel ilişki incelendiğinde, diğer türlere kıyasla HvXRCC4 ve TaXRCC4 (*Triticum aestivum* L.)'lerinin en yakın ortak ataya sahip olduğu tespit edildi. Filogenetik ağaçta her iki türün %85 oranında güven aralığı ile birlikte kümелendiği görülmektedir (Şekil 4.12). Bununla

birlikte, her iki genin evrimleşme süreci diğer tahıllardaki (mısır, pirinç ve sorgum) ortologlarından evrimsel olarak daha sonra geliştiği görülmektedir.

Bu çalışma, bitki savunma mekanizması duyarlılığındaki ana etkileyici faktörün rolünü vurgulamak, özellikle *A. tumefaciens*'in doğal konakçısı olan ve zirai değeri yüksek olan birçok bitki türünün göstermiş olduğu göreceli direncin arkasında yatan olası nedenleri ortaya koymak açısından önem taşımaktadır. Bulgularımız doğrultusunda, bu çalışma arpa transformasyonunun anlaşılmasına katkı sağlayabilir, ancak tarımsal önem taşıyan bitkilerin transfeksiyon süreciyle ilgili hâlâ öğrenilmesi gereken pek çok şey mevcuttur.



KAYNAKLAR

- Abdul, R., Ma, Z., Wang, H., 2004, Genetic Transformation of Wheat (*Triticum aestivum* L.): A Review, *Molecular Plant Breeding*, 2(4), 457-464.
- Ali, Z., Sarwat, S.S., Karim, I., Faridi, R., Jaskani, M.J., Khan, A.A., 2016, Functions Of Plant's bZIP Transcription Factors, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53 (2), 303-314.
- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., karayan, L., Ramuz, M., 1993, Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome, *Journal of Bacteriology*, 7869-7874.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R., 2003, Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, 301, 653-657.
- Alves, M.S., Dadalto, S.P., Gonçalves, A.B., De Souza, G.B., Barros, V.A., Fietto, L.G., 2013, Plant bZIP Transcription Factors Responsive to Pathogens: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 7815-7828.
- Anand, A., Krichevsky, A., Schornack, S., Lahaye, T., Tzfira, T., Tanga, Y., Citovsky, V., Mysore, K.S., 2007, *Arabidopsis* VirE2 interacting protein 2 is required for *Agrobacterium* T-DNA integration in plants, *Plant Cell*, 19, 1695-1708.
- Aukerman, M.J., Schmidt, R.J., Burr, B., Burr, F.A., 1991, An arginine to lysine substitution in the bZIP domain of an opaque-2 mutant in maize abolishes specific DNA binding, *Genes and Development*, 5, 310-320.
- Avivi, Y., Morad, V., Ben-Meir, H., Zhao, J., Kashkush, K., Tzfira, T., Citovsky, V., Grafi, G., 2004, Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality, *Developmental Dynamics*, 230, 12-22.
- Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F., 2000, On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510.
- Baik, B.K., Ullrich, S.E., 2008, Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest, *Journal of Cereal Science*, 48, 233-242.
- Bako, L., Umeda, M., Tiburcio, A.F., Schell, J., Koncz, C., 2003, The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10108-10113.

- Ballas, N., Citovsky, V., 1997, Nuclear localization signal binding proteins from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10723-10728.
- Barampuram, S., Zhang, Z.J., 2011, Recent Advances in Plant Transformation, *Methods in Molecular Biology*, 701, 1-35.
- Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W., Harwood, W.A., 2008, High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation, *Plant Methods*, 4(22), 1-12.
- Bennett, M.D., Smith, J.B., 1976, Nuclear DNA amounts in angiosperms, *Philosophical Transaction of the Royal Society Lond B Biological Sciences*, 274, 227-274.
- Bhattacharjee, S., Lee, L., Oltmanns, Y., Cao, H., Veena, H., Cuperus, J., Gelvin, S.B., 2008, IMPa-4, an *Arabidopsis* importin a isoform, is preferentially involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation, *Plant Cell*, 20, 2661-2680.
- Birch., R.G., 1997, Plant Transformation: Problems and Strategies for Practical Application, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 297-326.
- Bolton, G.W., Nester, E.W., Gordon, M.P., 1986, Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence, *Science*, 232(4753), 983-985.
- Bourras, S., Rouxel, T., Meyer, M., 2015, *Agrobacterium tumefaciens* Gene Transfer: How a Plant Pathogen Hacks the Nuclei of Plant and Non plant Organisms, *Phytopathology*, 105, 1288-1301.
- Çepni, E., Tunalı, B., Gürel, F., 2013, Genetic diversity and mating types of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* originating from different agro-ecological regions in Turkey, *Journal of Basic Microbiology*, 53, 686-694.
- Chiung-Wen, C., Couñago, R. M., Williams, S.J., Boden, M., Kobe, B., 2013, The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the utilization of the minor NLS-binding site in plant nuclear import factor importin- α , *Plant Signaling and Behavior*, 8(10), e25976.
- Chen, Y., Lu, L., Deng, W., Yang, X., McAvoy, R., Zhao, D., Pei, Y., Luo, K., Duan, H., Smith, W., Thammina, C., Zheng, X., Ellis, D., Li, Y., 2006, In vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Euonymus alatus*, *Plant Cell Reports*, 25(10), 1043-1051.
- Christie, P.J., 2007, *Agrobacterium* and plant cell transformation, *Desk Encyclopedia of Microbiology*, 29-43.
- Christie, P.J., 2014, *Agrobacterium* and Plant cell Transformation, *Desk Encyclopedia of Microbiology*, (2), 10-24.

- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., Cascales, E., 2005, Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems, *Annual Review of Microbiology*, 59, 451-485.
- Christie, P.J., Gordon, J.E., 2014, The *Agrobacterium* Ti Plasmids, *Microbiology Spectrum*, 2 (6).
- Citovsky, V., Guralnick, B., Simon, M.N., Wall, J.S., 1997, The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single stranded DNA complexes involved in nuclear import, *Journal of Molecular Biology*, 271, 718-727.
- Citovsky, V., Kapelnikov, A., Oriel, S., Zakai, N., Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Tzfira, T., Loyter, A., 2004, Protein interactions involved in nuclear import of the *Agrobacterium* VirE2 protein in vivo and in vitro, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 29528-29533.
- Citovsky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A., Tzfira, T., 2007, Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection, *Cellular Microbiology*, 9, 9-20.
- Citovsky, V., Zupan, J., Warnick, D., Zambryski, P., 1992, Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells, *Science*, 256, 1802-1805.
- Cokol, M., Nair, R., Rost, B., 2000, Finding nuclear localization signals, *EMBO Reports*, 1 (5), 411-415.
- Collart, M.A., 2003, Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex, *Gene*, 313, 1-16.
- Collart, M.A., Timmers, H.T., 2004, The eukaryotic Ccr4-Not complex: A regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways?, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 77, 289-322.
- Covarelli, L., Gardiner, D., Beccari, G., Nicholson, P., 2013, Fusarium virulence assay on wheat and barley seedlings, *Bio-protocol*, 3 (7), e446.
- Dandekar, A.M., Teo, G., Defilippi, B.G., Uratsu, S.L., Passey, A.J., Kader, A.A., Stow, J.R., Colgan, R.J., James, D.J., 2004, Effect of Down-Regulation of Ethylene Biosynthesis on Fruit Flavor Complex in Apple Fruit, *Transgenic Research*, 13(4), 373-384.
- Dawson, I.K., Russell, J., Powell, W., Steffenson, B., Thomas, W.T.B., Waugh, R., 2015, Barley: a translational model for adaptation to climate change, *New phytologist*, 206, 913-931.
- De Cleene, M., De Ley, J., 1976, The host range of crown gall, *The Botanical Review*, 42, 389-466.
- De La Riva, G.A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R., Ayra-Pardo, C., 1998, *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 1-16.

- DeVelasco, E.A., Verheul, A.F., Verhoef, J., Snippe, H., 1995, *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines, *Microbiological Reviews*, 59(4), 591-603.
- Ditt, R.F., Kerr, K.F., De Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., Nester, E.W., 2006, The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 665-681.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., Hirt, H., 2007, Trojan horse strategy in *Agrobacterium transformation*: abusing MAPK defense signaling, *Science*, 318, 453-456.
- Dong, R.X., Chen, J., Wang, X.M., Li, J.S., Zhou, J., Yang, Y., Yu, C.L., Cheng, Y., Yan, C.Q., Chen, J.P., 2011, *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency is altered in a novel rice bacterial blight resistance cultivar and is influenced by environmental temperature, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 77, 33-40.
- Ergen, Z.N., Thimmapuram, J., Bohnert, H.J., Budak, H., 2009, Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat, *Functional and Integrative Genomics*, 9, 377-396.
- Escobar, M.A., Dandekar, A.M., 2003, *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease, *Trends in Plant Science*, 8, 380-386.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., 2015, The Pfam protein families database: towards a more sustainable future, *Nucleic Acids Research*, 44.
- Forbes, D.J., 1992, Structure and function of the nuclear pore complex, *Annual Review of Cell Biology*, 8, 495-527.
- Fronzes, R., Christie, P.J., Waksman, G., 2009, The structural biology of type IV secretion systems, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 703-714.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G., 2004, Taxonomic Outline Of Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, *Bergey's Manual Trust*.
- Gelvin, S.B., 1998, *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm, *Journal of Bacteriology*, 180, 4300-4302.
- Gelvin, S.B., 2000, *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 223-56.
- Gelvin, S.B., 2003, *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 16-37.
- Gelvin, S.B., 2009, *Agrobacterium* in the Genomics Age, *Plant Physiology*, 150, 1665-1676.
- Gelvin, S.B., 2010, Finding a way to the nucleus, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 53-58.

- Gelvin, S.B., Karcher, S.J., Dirita, V.J., 1983, Methylation of the T-DNA in *Agrobacterium tumefaciens* and in several crown gall tumors, *Nucleic Acids Research*, 11, 159-174.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994, *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM Press.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Quorollo, B., Goldman, B. S., Cao, Y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, C., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, C., Slater S., 2001, Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Science*, 294, 2323-2328.
- Gürel, F., Albayrak, G., Diken, Ö., Çepni, E., Tunalı, B., 2010, Use of Rep-PCR for genetic diversity analyses in *Fusarium culmorum*, *Journal of phytopathology*, 158, 387-389.
- Gürel, F., Öztürk, N.Z., Yörük, E., Uçarlı, C., Poyraz N., 2016, Comparison of expression patterns of selected drought-responsive genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under shock dehydration and slow drought treatments, *Plant Growth Regulation*, 80 (2), 183-193.
- Hampsey, M., 1998, Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcription machinery, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 465-503.
- Hendrie, P.C., Russell, D.W., 2005, Gene Targeting with Viral Vectors, *Molecular Therapy*, 12 (1), 9-17.
- Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., Kumlehn, J., 2009, *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, triticale, and maize, *International Journal of Plant Genomics*, 835608, 1-9.
- Hiei, Y., Komari, T., Kubo, T., 1997, Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Molecular Biology*, 35, 205-218.
- Hisano, H., Sato, K., 2016, Genomic regions responsible for amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley, *Scientific Reports*, 6, 37505.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950, The water-culture method for growing plants without soil, University of California, *Agricultural Experiment Station*, 347, 1-32.
- Hooykaas, P.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoort, R.A., Rorsch, A., 1977, Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to explanta, *Journal of General Microbiology*, 98, 477-484.
- Hooykaas, P.J., Schilperoort, R.A., 1992, *Agrobacterium* and plant genetic engineering, *Plant Molecular Biology*, 19, 15-38.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari T., Kumashiro, T., 1996, High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.

- Jahne, A., Becker, D., Lorz, H., 1995, Genetic engineering of cereal crop plants: a review, *Euphytica*, 85, 35-44.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F., 2002, bZIP transcription factors in *Arabidopsis*, *Trends in Plant Science*, 7, 106-111.
- Jeggo, P., Singleton, B., Beamish, H., Priestley, A., 1999, Double strand break rejoining by the Ku-dependent mechanism of non-homologous end-joining, *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, Série III, 322, 109-112.
- Jones, H.D., Doherty, A., Wu, H., 2005, Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat, *Plant Methods*, 1, 1-5.
- Jouanin, L., Brasileiro, A.C.M., Leplé, G.C., Pilate, G., Cornu, D., 1993, Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees, *Annals of Forest Science*, 50 (4), 325-336.
- Joyce, P., Kuwahata, M., Turner, N., Lakshmanan, P., 2010, Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane, *Plant Cell Reports*, 29, 173-183.
- Kado, C.I., 2000, The role of the T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis, *Current Opinion in Microbiology*, 3, 643-648.
- Knauf, V.C., Nester, E.W., 1982, Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid, *Plasmid*, 8(1), 45-54.
- Komari, T., Halperin, W., and Nester, E.W., 1986, Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542, *Journal of Bacteriology*, 166, 88-94.
- Kumar, S., Dhingra, A., Daniell, H., 2004, Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes, *Plant Molecular Biology*, 56, 203-216.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., Loez, H., 2006, Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Biotechnology Journal*, 251-261.
- Künzel, G., Korzun, L., Meister, A., 2000, Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints, *Genetics*, 154, 397-412.
- Lacroix, B., Citovsky, V., 2013a, Characterization of VIP1 activity as a transcriptional regulator *in vitro* and *in planta*, *Scientific Reports*, 3, 2440.
- Lacroix, B., Citovsky, V., 2013b, The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, *International Journal of Developmental Biology*, 57, 467-481.

- Lacroix, B., Citovsky, V., 2016, A Functional Bacterium-to-Plant DNA Transfer Machinery of *Rhizobium etli*, *PLoS Pathogens*, 12(3): e1005502.
- Lacroix, B., Citovsky, V., 2016, Transfer of DNA from bacteria to Eukaryotes, *mBio*, 7(4):e00863-16.
- Lacroix, B., Loyter, A., Citovsky, V., 2008, Association of the *Agrobacterium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 15429-15434.
- Lacroix, B., Tzfira, T., Vainstein, A., Citovsky, V., 2006, A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners, *Trends in Genetics*, 22, 29-37.
- Lacroix, B., Vaidya, M., Tzfira, T., Citovsky, V., 2005, The VirE3 protein of *Agrobacterium* mimics a host cell function required for plant genetic transformation, *EMBO*, 24, 428-437.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L., 1988, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science*, 240 (4860), 1759-64.
- Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E., Corbett, A.H., 2007, Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α , *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5101-5105.
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., Cai, W., 2017, Methods for genetic transformation of filamentous fungi, *Microbial Cell Factories*, 16 (168), 1-13.
- Li, D.D., Shi, W., Deng, X.X., 2002, *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of *Ponkan mandarin* and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene, *Plant Cell Reports*, 21, 153-156.
- Li, J., Krichevsky, A., Vaidya, M., Tzfira, T., Citovsky, V., 2005, Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 5733-5738.
- Liu, Y., Kong, X., Pan, J., Li, D., 2010, VIP1: Linking *Agrobacterium*-mediated transformation to plant immunity?, *Plant Cell Reports*, 29, 805-812.
- Liu, Y.C., Vidali, L., 2011, Efficient polyethylene glycol (PEG) mediated transformation of the moss *Physcomitrella patens*, *Journal of Visualized Experiment*, 19(50), 2560.
- Loyter, A., Rosenbluh, J., Zakai, N., Li, J., Kozlovsky, S. V., Tzfira, T., Citovsky, V., 2005, The plant VirE2 interacting protein 1, a molecular link between the *Agrobacterium* T-complex and the host cell chromatin?, *Plant Physiology*, 138, 1318-1321.
- Maes, M., Amit, E., Danieli, T., Lebendiker, M., Loyter, A., Friedler, A., 2014, The disordered region of *Arabidopsis* VIP1 binds the *Agrobacterium* VirE2 protein outside its DNA-binding site, *Protein Engineering, Design, and Selection*, 27, 439-446.

- Maghrabi, A.H.A., McGuffin, L.J., 2017, ModFOLD6: an accurate web server for the global and local quality estimation of 3D protein models, *Nucleic Acids Research*, 10.1093/nar/gkx332.
- Mascher, M., Gundlach, H., Himmelbach, A., Beier, S., Twardziok, S.O., Wicker, T., Radchuk, V., Dockter, C., Hedley, P.E., Russell, J., Bayer, M., Ramsay, L., Liu, H., Haberer, G., Zhang, X., Zhang, Q., Barrero, R.A., Li, L., Taudien, S., Groth, M., Felder, M., Hastie, A., Šimkova, H., Staňkova, H., Vrana, J., Chan, S., Munoz-Amatriain, M., Ounit, R., Wanamaker, S., Bolser, D., Colmsee, C., Schmutzer, T., Aliyeva-Schnorr, L., Grasso, S., Tanskanen, J., Chailyan, A., Sampath, D., Heavens, D., Clissold, L., Cao, S., Chapman, B., Dai, F., Han, Y., Li H., Li, X., Lin, C., McCooke, J.K., Tan, C., Wang, P., Wang, S., Yin, S., Zhou, G., Poland, J.A., Bellgard, M.I., Borisjuk, L., Houben, A., Doležel, J., Ayling, S., Lonardi, S., Kersey, P., Langridge, P., Muehlbauer, G.J., Clark, M.D., Caccamo, M., Schulman, A.H., Mayer, K.F.X., Platzer, M., Close T.J., Scholz, U., Hansson, M., Zhang, G., Braumann, I., Spannagl, M., Li, C., Waugh, R., Stein, N., 2017, A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome, *Nature*, 544, 427-433.
- Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., Fujii, N., Hori, K., Itoh, T., Sato, K., 2011, Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries, *Plant Physiology*, 156(1), 20-28.
- Matthysse A.G., 2006, The Genus *Agrobacterium*, *Prokaryotes*, 5, 91-114.
- Matthysse, A.G., 1987, Characterization of non-attaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*, *Journal of Bacteriology*, 169, 313-23.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G.P., Schell, J., Hohn, B., Koncz, C., 1991, T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants, *EMBO*, 10, 697-704.
- McGuffin, L.J., 2008, Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models, *Bioinformatics*, 24, 1798-1804.
- McGuffin, L.J., Atkins, J.D., Salehe, B.R., Shuid, A.N. Roche, D.B., 2015, IntFOLD: an integrated server for modelling protein structures and functions from amino acid sequences, *Nucleic Acids Research*, 43.
- Meier, I., Somers, D.E., 2011, Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 538-546.
- Menkens, A.E., Schindler, U., Cashmore, A.R., 1995, The G-box- a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 506-510.
- Mosley, A.L., Pattenden, S.G., Carey, M., Venkatesh, S., Gilmore, J.M., Florens, L., Workman, J.L., Washburn, M.P., 2009, Rtr1 is a CTD phosphatase that regulates RNA polymerase II during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation, *Molecular Cell*, 34, 168-178.

- Nakashima, K., Satoh, R., Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1998, A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 118, 1233-1241.
- National Resources Conservation Service (NRCS), 2017, United States Department of Agriculture, (www.plants.usda.gov).
- Nevo, E., 1992, Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent, *Barley: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, 19-43.
- Newell, C.A., 2000, Plant transformation technology, developments and applications, *Molecular Biotechnology*, 16, 53-65.
- Newman, C.W., Newman, R.K., A brief History of Barley Food, *Cereal Food World*, 51(1), 4-7.
- Niu, X., Renshaw-Gegg, L., Miller, L., Guiltinan M.J., 1999, Bipartite determinants of DNA-binding specificity of plant basic leucine zipper proteins, *Plant Molecular Biology*, 41, 1-13.
- Niu, X., Li, X., Veronese, P., Bressan, R.A., Weller, S.C., Hasegawa, P.M., 2000, Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of peppermint, *Plant Cell Reports*, 19, 304-310.
- Pacurar, D.I., Thordal-Christensen, H., Pacurar, M.L., Pamfil, D., Botez, C., Bellini, C., 2001, *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76, 76e81.
- Pitzschke, A., Djamei, A., Teige, M., Hirt, H., 2009, VIP1 response elements mediate mitogen-activated protein kinase 3-induced stress gene expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 18414-18419.
- Pitzschke, A., Hirt, H., 2010, New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation, *EMBO*, 29, 1021-1032.
- Reid, M.S., 1987, Ethylene in plant growth and development and senescence, *Plant Hormones*, 486-508.
- Reuhs, B.L., Kim, J.S., Matthysse, A.G., 1997, Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of cell-associated, acidic polysaccharide, *Journal of Bacteriology*, 179, 5372-79.
- Rivera, A.L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A.M., 2012, Physical methods for genetic plant transformation, *Physics of Life Reviews*, 9, 308-345.
- Runions J., Hawes C., Kurup S., 2007, Fluorescent protein fusions for protein localization in plants, *Methods in Molecular Biology*, 390, 239-55.

- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003, TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis, *Biotechniques*, 34(2), 374-378.
- Saisho, D., Takeda, K., 2011, Barley: emergence as a new research material of crop science, *Plant and Cell Physiology*, 52(5), 724-727.
- Salman, H., Abu-Arish, A., Oliel, S., Loyter, A., Klafter, J., Granek, R., Elbaum, M., 2005, Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules, *Biophysical Journal*, 89, 2134-2145.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeleer, M.; De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F., Villarroel, R., 1979, Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the Ti-plasmid and the plant host, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 204, 1155.
- Schlögl, P.S., Kobarg, J., Moreau, V.H., Leite, A., Sabino, A.A., Eberlin, M.N., Menossi, M., 2004, Expression, purification and characterization of a novel bZIP protein from sugarcane, *Plant Science*, 167, 583-595.
- Schrammeijer, B., Risseuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., Hooykaas, P.J., 2001, Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein, *Current Biology*, 11, 258-262.
- Schulte, D., Close, T.J., Graner, A., Langridge, P., Matsumoto, T., Muehlbauer, G., 2009, The international barley sequencing consortium at the threshold of efficient access to the barley genome, *Plant Physiology*, 149, 142-147.
- Shrawat, A.K., Lörz, H., 2006, *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers, *Plant Biotechnology Journal*, 4, 575-603.
- Seldeen, K.L., McDonald, C.B., Deegan, B.J., Bhat, V., Farooq, A., 2010, Dissecting the role of leucine zippers in the binding of bZIP domains of Jun transcription factor to DNA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 1030-1035.
- Shi, Y., Lee, L.Y., and Gelvin, S.B., 2014, Is VIP1 important for *Agrobacterium*-mediated transformation?, *Plant Journal*, 79, 848-860.
- Smith, A.F., 2004, The Oxford Encyclopedia of Food and Drink in America, *Oxford University Press*, 77-85.
- Smith, R.H., Hood, E.E., 1995, *Agrobacterium tumefaciens* Transformation of Monocotyledons, *Crop Science*, 35, 301-309.

- Smith, E.F., Townsend, C.O., 1907, A Plant-Tumor Of Bacterial Origin, *Science*, 25(643), 671-3.
- Stachel, S.E., Zambryski, P.C., 1986, VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*, *The Cell*, 46(3), 325-333.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A., Shetty, H.S., 2012, Pathogenesis related proteins in plant defense response, *Plant defence: biological control*, In: Merillon, J.M., Ramawat, K.G. (ed.), Springer Netherlands, (17)379-403
- Sykes, L.C., Matthysse, A.G., 1986, Time required for tumour induction by *Agrobacterium tumefaciens*, *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3), 597-598.
- Tao, Y., Rao, P.K., Bhattacharjee, S., Gelvin, S.B., 2004, Expression of plant protein phosphatase 2C interferes with nuclear import of the *Agrobacterium* T-complex protein VirD2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5164-5169.
- International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012, A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome, *Nature*, 491, 711-716.
- Tran, L.S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., 2007, Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 20623-20628.
- Tsugama, D., Liu, S., Takano, T., 2014, Analysis of functions of VIP1 and its close homologs in osmosensory responses of *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One*, 9:e103930.
- Tsugama, D., Liu, S., Takano, T., 2012, A bZIP protein, VIP1, is a regulator of osmosensory signaling in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 159, 144-155.
- Tsugama, D., Liu, S., Takano, T., 2016, VIP1 is very important/interesting protein 1 regulating touch responses of *Arabidopsis*, *Plant Signaling and Behavior*, 11(6), e1187358.
- Tufan, F., Uçarlı, C., Tunalı, B., Gürel, F., 2016a, Analysis of early events in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots in response to *Fusarium culmorum* infection, *European Journal of Plant Pathology*, 148(2), 343-355.
- Tufan, F., 2016b, Arpada *Fusarium culmorum* enfeksiyonuna dayanıklılığın gen anlatımı düzeyinde analizi, Thesis (PhD), Istanbul University.
- Tunalı, B., Nicol, J., Erol, F.Y., Altıparmak, G., 2006a, Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions, *Plant Pathology Journal*, 5(2), 143-149.
- Turk, S.C., Van Lange, R.P., Regensburg-Tuïnk, T.G., Hooykaas P.J., 1994, Localization of the VirA domain involved in acetosyringone-mediated vir gene induction in *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Molecular Biology*, 25(5), 899-907.

- Tzfira, T., Citovsky, V., 2000, From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction, *Molecular Plant Pathology*, 1, 201-212.
- Tzfira, T., Citovsky, V., 2002, Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*, *Trends Cell Biology*, 12(3), 121-129.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V., 2004a, *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models, *Trends in Genetics*, 20, 375-383.
- Tzfira, T., Rhee, Y., Chen, M.H., Kunik, T., Citovsky, V., 2000, Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls, *Annual Review of Microbiology*, 54, 187-219.
- Tzfira, T., Vaidya, M., and Citovsky, V. 2004b, Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*, *Nature*, 431, 87-92.
- Tzfira, T., Vaidya, M., Citovsky, V., 2001, VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity, *EMBO*, 20, 3596-3607.
- Tzfira, T., Vaidya, M., Citovsky, V., 2002, Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 10435-10440.
- Tzfira, T., Citovsky, V., 2006, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147-154.
- Uçarlı, C., 2016, *Tuz stresi etkisindeki arpa bitkilerinin gen anlatım profilleri*, Thesis (PhD), Istanbul University.
- Umeda, M., Shimotohno, A., Yamaguchi, M., 2005, Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants, *Plant Cell Physiology*, 46, 1437-1442.
- Vaghchhipawala, Z.E., Vasudevan, B., Lee, S., Morsy, M.R., Mysore, K.S., 2012, *Agrobacterium* May Delay Plant Nonhomologous End-Joining DNA Repair via XRCC4 to Favor T-DNA Integration, *The Plant Cell*, 24, 4110-4123.
- Van der Krol A.R., Chua N.H., 1991, The basic domain of plant bZIP proteins facilitates import of a reporter protein into plant nuclei, *Plant Cell*, 3, 667-675.
- Van larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van Den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J., 1974, Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability, *Nature*, 252, 169-170.
- Vergunst, A.C., Schrammeijer, B., Den Dulk-Ras, A., De Vlaam, C.M., Regensburg-Tuink, T.J., Hooykaas, P.J., 2000, VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells, *Science*, 290, 979-982.

- Vergunst, A.C., Van Lier, M.C., Den Dulk-Ras, A., Stuve, T.A., Ouwehand, A., Hooykaas, P.J., 2005, Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 832-837.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B., McKnight, S.L., 1989, Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins, *Science*, 246(4932), 911-916.
- Wang, Y., Peng, W., Zhou, X., Huang, F., Shao, L., Luo, M., 2014, The putative *Agrobacterium* transcriptional activator-like virulence protein VirD5 may target T-complex to prevent the degradation of coat proteins in the plant cell nucleus, *New Phytologist*, 203, 1266-1281.
- Ward, V.D., Zambryski, P.C., 2001, The six functions of *Agrobacterium* VirE2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 385-386.
- White, P.R., Braun, A.C., 1942, A cancerous neoplasm of plants: autonomous bacteria-free crown gall tissue, *Cancer Research*, 2, 597-617.
- Winans, S.C., 1992, Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions, *Microbiology Reviews*, 56, 12-31.
- Woese, C.R., 1987, Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-71.
- Wohlbach, D.J., Quirino, B.F., Sussman, M.R., 2008, Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation, *Plant Cell*, 20, 1101-1117.
- Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P., Okura, V.K., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G.E., Almeida Jr., N.F., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Karp, P.D., Bovee Sr., D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutayavin, T., Levy, R., Li, M.J., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, C., Wu, Z., Romero, P., Gordon, D., Shiping Zhang, Yoo, H., Tao, Y., Biddle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z.Y., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S.V., Tomb, J.F., Gordon, M.P., Olson, M.V., Nester, E.W., 2001, The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Science*, 294, 2317e23.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2003, Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*- a reply to Farrand et al. (2003), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1681-1687.
- Zaltsman, A., Krichevsky, A., Loyster, A., Citovsky, V., 2010, *Agrobacterium* induces expression of a host F-box protein required for tumorigenicity, *Cell Host Microbe*, 7, 197-209.
- Zambryski, P., 1992, Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story, *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*, 43, 465-490.

- Zhao, P., Wang, K., Lin, Z., Zhang, W., Du, L., Zhang, Y., Ye, X., 2016, Cloning and characterization of *TaVIP2* gene from *Triticum aestivum* and functional analysis in *Nicotiana tabacum*, *Scientific Reports*, 6, 37602.
- Zhu, J., Oger, P. M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P. J. J., Farrand, S. K., Winans, S. C., 2000, The bases of crown gall tumorigenesis, *Journal of bacteriology*, 182(14), 3885-3895.
- Zhu, T., Song, F., Zheng, Z., 2006, Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*, *Journal of phytopathology*, 154(6), 378-384
- Ziemienowicz, A., 2014, *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 95-102.
- Ziemienowicz, A., Merkle, T., Schoumacher, F., Hohn, B., Rossi, L., 2001, Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins, *Plant Cell*, 13, 369-383.
- Zohary, D., Hopf, M., 2000, In Domestication of Plants in the Old World, *Oxford University Press*.

EKLER

EK 1. Martı çeşidinde *HvVIP1* dizisi

ATGTGCGAGTGCTCACACGCACCGGCGCCGTCTCTGCTGGCGGTGCGCCGCGCGGCCACCGGCGGGCCCACTCC
 GAGACCTTCATCCGGTTCCCCGACGCGGACCTGCTGCTCAACCCGGACAGCGACTTCTCCTTCTCCGACCTCGAC
 TTCCCCCTCCCTCTCCGACGACTCCCCCGCCGTCTCCTCCGATCCCACCCGCGCCCGCCCGCGCTGCCGCCGCAC
 CAGTCCCCGTGCGCCGGCGCCGCGCCCGCCCGGTGCCGGGGGCGCGCATATGAGGAGCCTCTCGCTCGACGCCGCC
 TTCTTCGACGGCCTCGCGCTGCAGGGAGGAGGCGGAGGCGGGGCTGGGCATAAGAGGAGCGGCTCCATGGATGGA
 GCGAGCTCGCCGTCCGACGGCGAGTCTGCGCTGTCCGGTGGGCTACCGGACTACGCCAAGAAGGCCATTCCCGCG
 GAGAGGCTCGCTGAGCTCGCGCTCCTCGACCCCAAGCGCGCTAAGAGGATTTTGCCCAACAGGCAGTCGGCCGCG
 AGGTCCAAGGAGAGGAAGATCAAGTACACCGGCGAGCTGGAGAGGAAGGTGCAGACGCTGCAGACAGAGGCGACC
 ACGCTCTCTGCACAGCTCACGCTTCTTCAGAGGGATACTTCCGGTTTAACTGTTGAGAACAGAGAGCTCAAATC
 CGGTTGCAGTCCATGGAAGAACAAGCCAACTTCGAGATGCTCTGAATGATGCCTTGAGAGAAGAAGTCCAGCGG
 CTTAAGATAGCGGCAGGTCAAGTTCCAAGCATGAATGGACACCCCTTCGGTGGAGGGCTACAGCAGCAGCAGCAG
 CAAATGCAGAACTATTTCTCGCAGCAGCAGCAGATGCACTACCAAGACCATCAGCATCACCACCCCAAAGCCAT
 CCTCAGAATTCTTCGAACGGAGGCCAGTCGCTCAGTGGCCAGTCTCTAAGCGACTCCATGGATTTTCATGTGA

EK 2. VIP1-benzeri proteinler listesi

Arabidopsis thaliana

>gi|18400998|ref|NP_564486.1| VIRE2-interacting protein 1 [Arabidopsis thaliana]
 MEGGGRGNQITLSEIEHMPEAPRQRISHHRRARSETFFSGESIDDLFLDPSDIDFSSLDLFLNAPPPPPQSSQQQ
 PQASPMVDSEETSSNGVVPNSLPPKPEARFGRHVRSFVSVDFFDDLGVTEEFKFIATSSGEKKKGNNHHHSRNS
 SMDGEMSSASFNIESILASVSGKDSGKKNMGMGGDRLAELALDPKRAKRILANRQSAARSKERKIRYTGELEK
 VQTLQNEATTLSAQVTMLQRGTSLENNTENKHLKMRLQALEQQAELRDALNEALRDELNRLKVVAGEIPQGNNGNSY
 NRAQFSSQQSAMNQFGNKTNNQMMSTNGQPSLPSYMDFTKRG

KRILANRQSAARSKERKIR Basic region (NLS+ DNA binding domains)

LERKVQTLQNEATTLSAQVTMLQRGTSLENNTENKHLKMRLQAL Leucine Zipper domain

bZIP domeni 157. ve 187. amino asitler arasında yer aldığı tahmin edilmektedir

Triticum aestivum

>gi|619504452|gb|AHY03428.1| VIP1 [Triticum aestivum]
 MDPRFPPPPAPSSAGGAPRGHRRRAHSETFIRFPDADLLLDPSDFSFSDLDFPSLSDDSPAVSSDPTPPPPPLPPQ
 QGAAASPSPAPRPPGGGGAHMRSLSLDAAFFDGLALQGGGGGGAGHKRSGSMDGASSPSDGEALSGGLPDYAK
 KAIPAERLAELALLDPKRAKRILANRQSAARSKERKIKYTGELEKRVQTLQTEATTLSAQLTLLQRDTSGLTVEN
 RELKRLQSMEEQAKLRDALNDALREEVQRLKIAAGQVPNMNGNPFGGGLHQHQQQQQIPNYFSQQQMHYQGHQ
 HHPQNHSSQSSNGGQSLSGQSDSMDFM

Hordeum vulgare

>gi|326514596|dbj|BAJ96285.1| predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
 MDPRFPPPPAPSSAGGAPRGHRRRAHSETFIRFPDADLLLDPSDFSFSDLDFPSLSDDSPAVSSDPTPPPPPLPPH
 QSPSPAPRPPGAGGAHMRSLSLDAAFFDGLALQGGGGGGAGHKRSGSMDGASSPSDGEALSGGLPDYAKKAIPA
 ERLAELALLDPKRAKRILANRQSAARSKERKIKYTGELEKRVQTLQTEATTLSAQLTLLQRDTSGLTVENRELKL
 RLQSMEEQAKLRDALNDALREEVQRLKIAAGQVPSMNGHPFGGGLQQQQQQMQNYFSQQQQMHYQGHQHHPQNH
 PQNSSNGGQSLSGQSLSDSMDFM

Brachypodium distachyon

>gi|357157454|ref|XP_003577804.1| PREDICTED: transcription factor VIP1-like [Brachypodium distachyon]
 MDPRFPPPPAPAGGGGERGHRRRAQSETFIRFPDAADLLLDPSDDFSFSDLDFPSLSDSPAASSAAPPQGLPP
 THGGTVSSSSYAPRPPGVCGGGAHVRSLSLDAAFFDGLQLQGGGGGGLAGHKRSGSMDGASSPSEGESALSGGA
 LPDYAKKAIPAERLAELALLDPRRAKRILANRQSAARSKERKIKYTGELEKRVQTLQTEATTLSAQLTLLQRDTSL
 TVENRELKRLQSMEEQAKLRDALNDALREEVQRLKIAAGQAPNMHGNPFGGQQQQMQQQMPNYFSQQQQMQ
 MYHLGGHQGHQNHQNHQQSSSNGGQSLSGQSLSDSMDFM

Setaria italica

>gi|514807805|ref|XP_004978752.1| PREDICTED: transcription factor VIP1-like [Setaria italica]
 MDARLPPPPAPSSSSVFGGGGGGGLPARGHRRRAHSETVIRLPDADLLLDPDADFGFSIDFPSLSDSPAASDPT
 PQPQPPPPAQLQQAQAASSAQRPPSGAHMRSLSLDAAFFDGLSLQGGGGGGGVAGHKRSGSMDGATSPFEGES
 APPGVLPDYAKKAVPAEKLAELALLDPKRAKRILANRQSAARSKERKIKYTSELEKRVQTLQTEATTLSAQLTLL
 QRDTSGLTTENRELKRLQAMEEQAKLRDALNDALREEVQRLKIAAGQVPNMNGNPFNGGLPQQQQQQQMAYFS
 QPQQMQYFGGHQGHQHHRNSSNGGQSLSDSMDFM

Zea mays

>gi|226499778|ref|NP_001141497.1| putative bZIP transcription factor superfamily protein [Zea mays]
MDPRFPPPAPSSCFGGGGELPARGHRRRAHSETFIRLPDADLLLDPDADFGFSDIDFPSLSDDSPAASDPTPQPQ
APPLQPPLQQAASPASAAPRPPSGAHMRSLSLDAFFDGLSLQGGGGGGVRRGMAGHKRSGSMDGDTSPFEGE
SAPPSVLPDYAKKAVPDDKLAELALLDPKRAKRILANRQSAARSKERKIKYTSELERKVQTLQTEATTLQAQLTL
LQRTSGLTENRELKLRLQAMEEQAKLRDALNDALREEVQRLKIAAGQVPNMNGNPFNGGLSQQQQMPSYFSQP
QQMQYFSGHQGQHHPKHDPQNSSNGGGQPLSDSMDFM

Oryza sativa

>gi|1002309671|ref|XP_015618202.1| PREDICTED: transcription factor VIP1 [Oryza sativa Japonica Group]
MDGRFPLPPASGGGRGHRRRAHSETFLRLPDADLLLDPEGDFSFSDDLDFPSLSDDSPAISDPTPPPPPPMAATPA
PAPRPPGGAHMRSLSLDTAFFEGFSLQGGGGGGGGGGSGGSGGHKRSGSMDGVNSPFEGESALSGGLPDYAKKAM
PAERIAELALIDPKRAKRILANRQSAARSKERKIKYTSELERKVQTLQTEATTLQAQLTLQRTSGLTAENREL
KLRLQSMEEQAKLRDALNEALREEVQRLKIAAGQAPNMNGNPFNGGLQQQIPYYTQQQQQQQMPYLGHHHAQQ
RHPHQSSSSNGGQSLSGQSLNDSMDFM

Oryza brachyantha

>gi|1002872999|ref|XP_015698033.1| PREDICTED: transcription factor VIP1-like [Oryza brachyantha]
MRSLSLDAAFFEGLPFQGGIGGGAGHKRSGSMDGESSLFEGESAPPDYAKKAMPADRLAELSLLDPKRAKRILAN
RQSAARSKERKIKYTSELEKKVQTLQTEATTLSTQLTLQRTSGLTAENRELKLRLQSMEEQAKLRDALNDALR
EEVQRLKIAAGQVPNMNGNSFNNGMQHQQQQMPTYFSQPQQMHYLGGHQGRHHHPNNSHSSLNGGQSMGQTLND
SMDFM

EK 3. Arpada VIP1 genomik dna dizisi (morex data base, mloc_71198).

>contig_59327 9196 assembly3_WGSMorex_rbca.fasta

GTTACTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTAGCATCATATATGTTGCTCANNAGTTGCATATCTAGACAATCT
 ATTTGTTGTTAAACCTAATTTGTTAAAGGAAAAGCTTAAAATTGATAGTTGCCTATTACAGCCTCCTGTATT
 CAACCATATCGATCCTTTCAAACCTTGAAGTAACTCAATTTAAAATACATCAACTGTGTATGTAATCGT
 GACTGTATCTTAAGATTTGAACCAAGAAATAACACGATGAGGGTTATAATTGACTCGTAAGCAGGTGTTT
 AGGATCACTTCTTGATCATTATTAGTTTACGTTTCAATATGCATAGATTACTCATCTTATTCTTGTAATC
 GTAAATTAACCAGATATAAAATACTAAGTGCTTGTGTCAGCCTCACGACTTAAACAATCCATACCCATGAA
 GCTATGCTAGTCTTGCTACCCCTTGGTAATGAGATTGCCGAGTCTTCGTGGCACATAGATTACTGCAACAA
 TAGATGCAGGTACAGGTAAATCGATGCTTTGATATGAGAGCGATGATTGTTCTATTTGAAATTTTTACTT
 CTTTCGTGTCATCATAGGATGGGTTCAGATCGCCAACCTGGGATTAGCAGGGTGGACATTGTCTCTTTT
 TTGTTTGTTCATCCGTAGCCGGATCGTGCTCTTTTATATGATGATTGCTATGTATTGATGTATTGAGA
 TATTCATGTTGTAGCTTGTGATGAGTGAAGTCAACTCCATATATTCATCTTTTCTTACATGTATTGTG
 ACGATATCCATTATTGCAAAACGATCCAAAATGCGCTTCTATCATTATTGAGACCCTCAAGCCGTCGCAA
 GGATAATGCCGCATTTTGGACGTTACACTAAATCAGACCAAGGCGTCTCAACATCATATTTAACACGTA
 AAACACTTTTATCAACAGTAAATGTATGAATCCATATTGAAGAAAAGTAATAAAGATGTGCCATAATATAA
 CTACGCCTAGTTAAGGAAGGTGCCAGTGTGGACATGTGAGGAAGCCACTACCTTTTTGAACACGACATAG
 ACACAAATGTTTATACATCTTATGAACATTCATCTCTATGAATGCACACATATGTCTCATCATCACACAC
 GTTTTCGTAGTCAAAAAGAGGCTGCAATAAATTTAAAAAATGAAAGCATCAATATTAATCTAAAATT
 TGAATTTTCATGAGCAAGAAATATCGCTATCCTCATAACCATCCGATCACAAGCTGATTTCGCACGAGGAA
 GTCCTAGTGTACCATAGCTTGAACAACAGTTCGCAATTCACAAAAAGGGGATAAGAGCAACCCCAATG
 GGAGTACCCATTCTCGTCCGACCCCGTCCGCATAGGTCCGCGAGGACAAAGATGATGGCCCAACGCGGAG
 ACCCATTTCTATTTTTCGCTCCGCATTTTTCGCGACGATCCATTTTCGACGCAAATTTGAATCACATTT
 GGGTCACCAGCGGACAGGAAGCAGACGTTTTCTACGCCTGCGTCGTCGCGCATGTGTTGACCTGACCCAC
 TTGTCACACAACCACCCACCCACCTATGCCTACTTATTTAATTCGTTGATCCCCATCCATCTCTCTCTCT
 ATTATTTTACTACCACGGTACGAGCGAAATGGCCGACAGACCACACACCCATTGGATGCATGTGCTGAGC
 CATTTAAAGAAACGGATACGGACAGGCCGCGCAACGATCCAAACGATCCAAACGAACAAAAACGAACCTC
 CGTTTAGGTTGACGCGTTGGAGATGCTTTAACTACAAACAATACAACGTTGCAGATTGAAATTTAAAAA
 AGAAATGACATTTGAAAGTTGAAACACAACTTCCCTTGCAAGTTGGCAGTACCCTTGCTGCCGATGCCA
 AGGGGTCCGTCGCGGAGAGCCGAGACCGACAAGCCAGCAGGAAAACGCACGGACAGTTGCTCCCGGC
 AATCACCAGAACGCCACGTACACCCGCTAACCCCAAATTCGCTGGGGCCACATGTCATTAATTTTCAAG
 TAAAGCGCAAGGAACAGCCAAACAGCGACCGCACAGCGACAGGGGGTGCTCTTTTTCTAGGAACCACGCG
 GCGTTCTTCCACGGCCACGCAGAATTACCGTTTGGCCCCCTACCCCTCGCTCCCCGACCTCCTTTCCCGT
 ACACCCACCTCATGCACCAGAGACACATCGCGCCGTCGGTACCACGGGGACATTTCGCGCCCTCTGCCTGT
 ACCATCCTAGACCCGGTTCAGTCAATCTCAGGTGCCCGCCGAAGAGAATTACTGTCACTTTACAACGCCG
 GATATTCCTCCCTCCCTGCACCCACCGCACAAACCATACGTTGTGCTAACTGTTGATTCTACCTCGTGA
 TCGCGCTAGTGGCATCTAGTTCATGCACCGGGTCCACGCCAAGTGTGGCGCAGCTCCCTTCTCTCCC
 TCCCCCTTACTGCTTGTACAGCCCCCACCCTGAGCTCCCCGACGCATACGCCCCGACCTCTAC
 TCCCCCTCCGACTCCGAGCAACCCCGCGGACCTTGACCGGAGCTTGACTGCCGCCATGGACCTCGCG
 TTCCCGCCGCCGGCGCGTCTCTGCTGGCGGTGCGCCGCGCGGCCACCGGCGGGCCACTCCGAGACCT
 TCATCCGGTTCCCCGACGCGGACCTGCTGCTCGACCCGGACAGCGACTTCTCTTCTCCGACCTCGACTT
 CCCCTCCCTCTCCGACGACTCCCCCGCCGTCTCTCCGATCCCACCCCGCTCCCCCGCCGCTGCCGCCG
 CACCACTCCCCGTCGCGGCGCGCGCCCGCCCGGTGCCGGGGCGCGCATATGAGGAGCCTCTCGCTCG
 ACGCCGCTTCTTCGACGGCTCGCGCTGCAGGGAGGAGGCGGAGGCGGGGCTGGGCATAAGAGGAGCGG
 CTCCATGGATGGAGCAAGCTCGCCGTCCGACGGCGAGTCTGCGCTGTCGGTGGGCTACCGGACTACGCC
 AAGAAGGCCATTCCCGCGGAGAGGCTCGCTGAGCTCGCGCTCTCGACCCCAAGCGCGCTAAGAGGTGAG
 GTCCTCTTCAGCTCTTCCGTTTTCGCTTTGTCCGTCGAGCGATGCTTATAGGAGTAGATCCAAAGGGTAGT
 TTGCTGCTAGTCTAATGTCTGCGTTACTGGCATCCAGCTCCTTGCTCGTGCCGCTAATTTTGAAGTTC
 CCAGGGTTTCTGTGTTTCAAGTCAAGTTATATTTAGGTTGGTTTCATGGCGGTGGTCTCTGGTGTGCAG
 GATTTTGGCCAACAGGCAGTTCGGCCGCGAGGTCCAAGGAGAGGAAGATCAAGTACACCGGCGAGCTGGAG
 AGGAAGGTGCAGACGCTGCGAGACAGAGGCGACCACTCTCTGACAGCTCACGCTTCTTCAAGGTGTGTA
 TAATTGATCCGTGTTGTTGTAGTCCGTGAACGCAAAGTATGGCGGCATGATTGCTTGAGCCAAACCTAA
 TTAATTGACTAGCTGAAGCCAGTATTCTGTCTGATCAGTCTACATTAGTTGGTTGCTTTCCTTAATTGTT
 GGACAAGTGTGGAACCTGCATTGGTAACACTTGTATGGACCTGACTAATTCAGAGCTTGCCTCCTTAAAG
 AAGCAACCAGGATAAACAAACGGTTGCCCTTCGCTTACAACCTTCTGTTTCAATTATCTCCCTAATAGAATA
 CTGCTTTATTATCTTAGCTTATCTGTTTCCCTCGTGTAACCTTGGCTTTTGAACAGTTCTCATTACTACAG

TTGTTGACATTTCTATCAGCATTTCCCTTTAAAAATCAGTAACTATTTTCTCTTCTTAGAGTTAATACTTA
 ATGATGACATTCTCTTTGTTTATTCTCTGAAGGGAATTTTTTAAATTGCACTTTAAATGCTGTCCACTTG
 TGTATTTATTATATCTGTGGGTACACATATGCTGGGTCTGAGATGACGTGTTACCCTCTGTTTTCTGAT
 TTTTCATCTGACATTCAGTGAAGATTGCGTTTTTTTAAACCCATCACCTTAGTTGTTTCCAATCATCGAGTT
 AATAGAGCTTTTAAATAATTGAATTTTCAACATAGTGGATGACATGATCCGAATGAGTTTAAATCTCCGT
 TTGGTAGTTAGTTTACACATATTGCTGTCTGTCACTATGAAATACAAATATCACCTTCTGCTTCCCTGAGGA
 CTCGCCATTTTGTATCGACTTCTTTTTATTGTTGTCTCACTTTTGTGTTATAGTATATATATCTTA
 GGATGCATCCACCCACCTTTAATGAATGTGTAGTATCAAATTTTATCATATTTCTTCCCTGCTACGCTGA
 AGCTATAAACTATCAGTCTATGTGGAGAAAACCTTCCCTGGACTAGATTAGCTCCCCAAGATTGATTTGTTG
 TTTTCATGACAATCGATAAAAAATATCATGAATCAAGTAGTTCTCTACCTGTATATACAGTGCCTGTTTT
 CTTTTCGTTTTTAAATTCTTTTCCCTTACGAGAGAGGAGCTGGAAGAGAAGGACCTTATAATACTAAATTAC
 ATGAGCATGTAGTGGATTTTCGCGTGTAGCCCTTGAATATCTAACTGCTGTTTTCTACTCCTGCCGTTCCCT
 AAATATAAGTCTTTTTTAGAGATTTCACTGCGGACTACATACGGATGTATATAGACATACTTTAGGGTGTA
 GATTCACCCATTTTGTCTCTTATGTAGTCCATAGTGGAATCACTAAAAAGACTTATATTTAGGAACGAAG
 GGAGTAGTTACACACAGATATTTTTAAGGGAAAACCTTATGACGGGCGTACATATAAATGAATGCTCGCAA
 GCGGACACGTCCGCGTTGTCCGTGGCAGCCTGAGATGAACTAATGTGTTGTTGCTTTAATAGTGGTCTG
 CTCTAATTATACTCTTGCAGGATGTATCCCTATAAAAAAGTTGATCCTGTAGTTGATGTGACTACTACATGA
 TTTGTTGCACCCAAAAGTAGGTGGGATAATGCAGGCGCCTCTGCTTGATGGCTGGTCATGTCAAAAACAG
 GGAAGCAAAGCTCTATTTGAAAGCTAATTTGATTGAAGATGTTGGAACCGATTGGGTGGCGTTAGGGTG
 AAGCTTTGGCTTGGTGGGCAGGGATAGTAACAGAAGAAATTTATCTTCTTCCAGAAAGCTTGGCCAATA
 CTGAACATCTTATTTGTATTTACGCTGGAAACGAAATAAGGAAGGGAAAAAGATTTATTAAGACCTGATC
 CATAATCAGCACTACTCCCTCTGGTCCATATTACTTGTACAGGTTTAGTACAACTTTTTTGTACTAAAG
 TTGTACTAAAGCTGCGACAAGTAATATGGATCGAAGGGAATAATAAAATTGTGTAGTACTCCCTCCGTTC
 CTAAATANNNNNNNNNNNAGAGGTTTCACTAGTGGACTACACACGGATGCATATAGACATACTTTAGAGT
 ATAGATTCATCATTTAGCTTCGTATGTAGATCCCTAGTAAAACCTCTTAAAAGACTTANNNNNTAGGAAC
 GGAGGGAGTAGAAGCTAGTGAACCTTTGTATTCTTGGTAATGCTACTTTCTGAGAAAAATGAGTGTCAAA
 TTTATATCTCACTGGCAGTTGTGTTTGTGATTGCTCATGACACCTGTGACTGTATACCAATATTTTGT
 TGTATTACTTTACAGTCCCTTTTTTTTTTTGTAACCAGAGGGATACCTCCGGTTAACTGTTGAGAACAG
 AGAGCTCAAACTCCGGTTGCAGTCCATGGAAGAACAAAGCCAAACCTTCGAGATGGTATGCTCTAGTCTTGT
 TTTCAAAGTTTGTAGTCACTGTAATATAGGCTCAGAACAAAAATCATCCTTTTCCGTGAACATTTAAGG
 CATCTGAGGGTGCAGCAGTGACCAATCAGTCACCTTGTGACCATGTATCTGTTCCATGCACTCTGAATG
 ATGCCTTGAGAGAAGAAGTCCAGCGGCTTAAGATAGCGGCAGGTCAAGTTCCAAGCATGAATGGACACCC
 CTTCCGTTGAGAGGCTACAGCAGCAGCAGCAGCAAATGCAGAACTATTTCTCGCAGCAGCAGCAGATGCAC
 TACCAAGGCCATCAGCATCACCACCCCAAAACCACCTCAGAACTCTTCGAACGGAGGCCAGTGCCTCA
 GTGGCCAGTCTCTAAGCGACTCCATGGATTTTCATCTGAGGGCAACGTTGGGACGCATACCGATCACAGTT
 CGGTAGCTGTAAAGATAACTGATGTATACTGTATGCACATGAATCATTCTGAGGGTAGCTAGATGTTCTT
 TGTACCATTAATCAAGAAAAATCATCGGTGTGTGTCGAGTTGATCATCTCCCTTTTTCTTTCGGGGTACA
 TGCATGCCCTTAGCCCGAAGTCTGAACGAACCATGCTTAACATGCTGCCTGTAGTTGTACCCCTGTAAAGG
 TGTATAGTGAATGGAATGATTTCTGGTTGGAATCTTAAACTTCTCTGTTCTTCAGCTGCTGGTTGCT
 GATGTGAACCGAACTGGTGACTGGCAAGCAGTGTCACTAACTGGTGGTGCCTACGCAGATTTTAGCTACC
 GGTTTAGGAAAAGTACCCGTAAATTTTAGGCTGTTTATAGTGGGGAGTAACATATAGTAGTCTTACCGT
 CCAAGAAAATCATACGCAAAATTCGACTAGCTTTGTCTAAATTTGGGACTGGGATTAGGTGACTTGGCCAC
 AGGCAGTCGCGCGCTGTAAACATACGACTACAAATCCAGCGTTTATTCAAGATCCAACGGTGAGGATTGAT
 CAAGATCCAATGGTGGGATTTGATCTATGAAAAAAACGCCAACACTTGGCAGTTTTTAAGACGCCAC
 TTTGTATACATGCAACAAGCTATGCACTGCCACTAATTTGCTTTTATTACAAATACGTTTTCAGAAATTCATG
 CATTAAAGTTCTTTACAATACATTTAAACCGGCTGATTTTAAACAAGTATAATTATTTTAAAAAACAAAACA
 AAAACTAAGGACAATGACCTCGTTACATGAACACCTGGTTGGCAGCTCATTGGTCGATGTTCTGTGTCAT
 CACGGTCGTTGTGCGAGGCCAGTGTGGCACCGCCCGGGACGCTTCTGTTGGTGGTCTCGGACCGGTCCTC
 GGCCAGGCTAGCGCAAGGTCGGGTCTAACATTACCTAACCCGACATGACGCTTGTGTAACATTGGCCC
 GACACTCGTGTTCATGTTGCGCTGTGCGAAGGGTGGCGCAACGCCAGAGTAGGGTTTTTGGGCACGTGCG
 GTCTAATCAACATCCATGCCGTTAAGGGGCATCCACCATGAAGCACGAAGATTGGCATGAATGTGCGGCG
 ACCGTTGGCGACCTTATTTTCATACATTCTTTAAATTTAGACGGCAATCGTTGGAGATCCGTCCAGTAA
 CACGTTTAGCTTTTTGTTTACTTAAAAAAAGTTGAACTTGTAAAAAATCATGTGATTTTGAATGTAACATA
 TAGAAGTTGTTAAAAATAGCCGTCTCCTTGTGGGCAGCAGTGCATGAGCGCTCCTCGACTATCTCG
 GCAACGACGGCAGTGACTCAGCAAGCACGACGAGACTGACTCTGACTACTCTATGATGGAGACAGGCTCC
 GACGACATCGCATCAGAGCCCGTGCCATGTGTACCGGCTGCATCATGGAGCAGGCACATGCACACTTCA
 ACACCGTCATGGCGGAGGAGCAGCCTGGGCCGACTTAAATTTCTAGAGTGATATGAAAGGCGCGGGAAAG
 ACGGATGGGGGATTTTGGTGGGTGAGGGCGATCAGAAGCGAGTGTGCAACGGTTCGGACGCCCAAAAG
 CCTCCGACGTTTGTCTCCGGTTTGAGAGAAAAGTGTGTTTCAACCGTCCCGCGGATCGATACAGTGGCGG

AGGCAGCAATCTGGCAAGGTTAGGCCTCCGCCACATCTAAAAAAATTATATTCAGGCTATATGCACACTA
 GTGTTGGAGAAATTTTAGAACTTGGTGTGTTGTGTGTCATGGCAGGTTGCATTGGCCATATCATAAAAAA
 TATTCTGTATTCCGCCACTGCCGATACAAGACCTATATTCTGTATTTCGTCACTGCCGATACAAGACCGTGT
 TGAATGCGTGATGACTGGATGTGTTGATAAATTAATTGATGCATGCTTGATCTGTGCCTTGTCTTAGTTA
 CAATGTATACAGATTTATATATAATATAGGCTCAGTTTTTATTTTTACAACTGATCGTTGTTGTTAGCT
 GATTGTTACTGTGCAATGCCTGAAAAATGGCCAAGTCTAAATATTTTTCTACCAAGTTCAACCAGTGACGT
 TGGCTCTTGCTTGGAGGGTGAATGTGGAGCCGCATGTTACGGCGTGAGCAGCTCACCCGATCCCAGTCCT
 TGTCAAAGTCCTCTCCCATCTGCTTGAAATGCAAGGTGTGCGGTTGAGCTATCTCACTCGCTTGACGGAA
 CCAGACCATATGTTGGAATTGATGTGATTAATTATGTGCATCCACTTGGAAATATCGGTTAGTGAGTCT
 CCAGTGTCAACCTTTCTCTCGCGAAAAATGCTACACCTACGAAAGGTGCTACTAAAAGGTAACTTTTCAC
 CCCTAATTAGGACAAGTTCTTTTAATTAGCATAAGTTCTTTTGCTGGCTTATTATTTTTTAAACGCGGT
 CCCTTAGGTATCGATCTCATTAAAAAAGATCGAAGAGAGTTGCCCGGTTAATAATTGAAAAACCGGGCTA
 AAACCGTCACAGTACGCCCTGCCACAACAAGGCACACAGGGCGACCTGGCAACCTACACAAGAACGCACAC
 ACGTCGTAGAGGGGAAGAGCTCTGTGCGAGGTTGAAATCCCGCGTCATCGTCATCACGCCCTTCGCGAGGGC
 GACTCCGACATCGCCATCGACGACCACCGATGTAGTCTCCACCGCAGACGAGCGAAGAGGTATGCGTCGG
 ACAACGCCAAACAGTCCACCACACGGGCCGACGACCAGGCAGCTTCGACTCAGCCGACGAGCATTGTAGG
 ATAAAAGCACTGGATCTGCGCCGAGCCAACGTCAAACCGACCACCCGTCTTCACGTCATCGTCGCCGCA
 AGGTTGCTCCTCAAACAGATCCGACTTCAGAAGACAAGAGAGGCACGACGACCCCTCGAACACGCCGGAT
 GAGACCGACTACCCGAACCCAACAAC

(<https://ics.hutton.ac.uk/morexGenes>)


```
arti  GQSLSDSMDFM---
      GQS--DSMDFM---
      GQSLSDSMDFM---
      GQTLNDSMDFM---
      GQSLSDSMDFM---
      GQSLSDSMDFM---
      GQPLSDSMDFM---
      . . ***
```

EK 5. XRCC4-benzeri proteinler listesi

Arabidopsis Thaliana

NP_001154639.1 DNA ligase IV-binding protein [*Arabidopsis thaliana*] 264 aa
MIGVDSKSSSTTFIETMVESEKTKHTCLRLAISGADPIFVKGTWHNSRFDISVTDGSSSWICNATEEEVAERAAQ
WDQPVSEYLKLAEQYLGFGQPNSVYSFSDALEGSKRLSWTFEKEGKLEWRWKCKPSDDSKKITVIGILDFLMEAN
IRLSEEVVNKTRSFEMRSEAERCLAQGEKLCDEKTEFESATYAKFLSVLNKAKLRLRDKEDSVRVVEEES
TDKAESFESGRSDDEKSEEEASKKATSSKARGGKRAARS

Triticum aestivum

AEJ83861.1 X-ray repair cross-complementing 4 [*Triticum aestivum*] 279 aa
MAAAPRHSCAKLSVAVEDPKAPGGGGIFVKATWLPTRFSLAVTDGAGAWVADASDAEVLRLAEQWDQPVSEYLAL
AERYLAFHQPSSTYSFHEAGAGRRLSWTFEKQGTKLEWRWKLQPAPHPQQTIAEVLDFLMDANIRLSEEVVRKTQ
SFEKVKQEAENCLQQSERFNTEKAEFEQASFTKFVAVLNSKKAKLRQLKDRIAALESADKATKEEEEEEEAGHS
TDRTEPIEEGSDKDHVNDEPSETGSGGDPHSSPEKSAAAATSRGRRGRKRTRK

Hordeum vulgare

BAJ89333.1 predicted protein [*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*] 280 aa
MATAAAPRHSCAKLSVAVEDPKAPGGGGIFVKATWLPTRFSLAVTDGAGAWVADASDAEVLRLAEQWDQPVSEY
LALAERYLAFHQPSSTYSFHEAGAGRRLSWTFEKQGTKLEWRWKLQPAPHPQQTIAEVLDFLMDANIRLSEEVVR
KTQSFEKVKQEAENCLQQSDRFNNEKAEFEQASFTKFVAVLNSKKAKLRQLKDKIAALESADKAPKEEEEEEGNS
TDRTEPIEEGSDKDKSVNDGPSETGSGGDTHSSPEKSAAAAATSRGRRGRKRTRK

>HvXRCC4_Mart1 280 aa

MATAAAPRHSCAKLSVAVEDPKAPGGGGIFVKATWLPTRFSLAVTDGAGAWVADASDAEVLRLAEQWDQPVSEY
LALAERYLAFHQPSSTYSFHEAGAGRRLSWTFEKQGTKLEWRWKLQPAPHPQQTIAEVLDFLMDANIRLSEEVVR
KTQSFEKVKQEAENCLQQSDRFNNEKAEFEQASFTKFVAVLNSKKAKLRQLKDKIAALESADKAPKEEEEEEGNS
SDGTEPIMEGSDKDKSVNDGPSETGSGGDTHRSSDKSAAAAATSWGRRRRRRTRK*

Oryza sativa

XP_015631232.1 PREDICTED: DNA repair protein XRCC4 [*Oryza sativa* Japonica Group] 274 aa
MATSTAAPRHSCAKLSVAVEDPKAGGGGAVFVKATWHPTRFSLAVTDGGAAWVAQASDAEVLRLAEQWDQPVADY
LALAERYLAFQPPSSSTYSFHDAGNGSRRLSWTFEKQGTKLEWRWKLQPAPNTQQTIAEILDFLMDANIRLSEEVV
RKTQSFDKVKQESKCLQQSERFNIEKAEFEQSTFSKFVAVLNSKKAKLRQLKDKLTFESADKAPKEEDENSTD
KTELFEEASDKDASVNDEPSETGGGDLHSSPEKTAATSRGGRGRKRTRK

Oryza brachyantha

XP_006650563.1 PREDICTED: DNA repair protein XRCC4 [*Oryza brachyantha*] 276 aa
MATPTAAAPRHSCAKLSVAVEDPKAVGGGAVFVKATWHPTRFSLAVTDGAGAWVAEASDAEVLRLAEQWDQPVAD
YLSLAERYLAFQPPSSSTYSFHDAGNGSRRLSWTFEKQGTKLEWRWKLQPSNTQQTIAEILDFLMDANIRLSEEV
VRKTQSFDKVKQESKCLQQSERFNIEKAEFEQATFSKFVAVLNSKKAKLRQLKNKLTELESAEKAPKEEEDNS
TDKTELFEEESDKNGSINDEPSETGGGDLHSSPEKTGATSRGGRGRKRTRK

Sorghum bicolor

XP_002466484.1 DNA repair protein XRCC4 [Sorghum bicolor]

MAAASSVAPARHSCAKLSVPVEDPKAVAAGAGTVFVKATWLPSPRSLAVTDGAGAWVADASDHEVRLRAEQWDQP
 VTDYLALAERYLAFQQPDSTYSFHDAGKGNNRRLSWTFERQGTKLEWRWKLQSPNTQQTISEILDFLMDANIRLS
 EEVVRKTQSFDKLKQEA EKCLQQSERFNNEKTEFEQATFSKFVAVLNSKKAKLRQLRDKVVELESAGKPPKEEVE
 QQEENSTDRTLEFEGESDKEASINDEPSETGSGNVHSSPERSAATSRGRGRGRKRAKK

Zea mays

ACG28073.1 double strand break repair protein [Zea mays] 290 aa

MAAASSAAPARHSCAKLSVPVEDPKAVTAGGGTVFVKATWLPSPRSLAVTDGAGAWVADASDHEVRLRAEQWDQP
 VADYIALAERYLAFQQPGSTYSFHDAGKGQRRRLAWTFERQGTKLEWRWKLQSPNTQQTISEILDFLMDANIRLS
 EEVVRKTQSFDKLKQEA EKCLQQSERFNNEKAEFEQA AF SKFVAVLNSKKAKLRQLRDKVVELES AVKPPKEEAG
 QE QE QE ENSTDRTLEF EAESDKEASAKDEHSSETGSGNVPTSPGES AATSRGRGRGRGRKKARR

Brachypodium distachyon

XP_003559906.2 DNA repair protein XRCC4 [Brachypodium distachyon] 351 aa

MFVFCFEKMATKNVSGSPRQLGLNSRASMLCIKPKNTQHPSRHTKRSTQPSAHGYSFRRHCSSRLLTLFRTAA
 MATPAAAPRHSCAKLSVAVEDPKAAGGGAI FVKATWLPTRFSLAVTDGAGAWVADASEAEVRLRAEQWDQP VSDY
 LSLAERYLAFQQPSSTYSFHDAGKGNNRRLSWTFERQGTKLEWRWKLQPAPQTQQTIAEVLDLMDANIRLSEEVV
 RKTQSFDKLKEEADKCLQQSERFNNEKAEFE EATFTKFVAVINSKKAKLRQLKDKFSALESSDKAPKEDEENSTD
 RTEPFEEGSDKDPSINDEPSETGSGNLHSSSSPEKTAATSRGRRGRKRTRK

TaXRCC4	EEEEEAGHSTDRTPEIEEGSDKDHSVND - PSETGSGGDPH - - SSPEKS - AAAATSRGRR
HvXRCC4	EEE - - - GNSTDRTPEIEEGSDKDQSVNDG - PSETGSGGDTH - - SSPEKSAAAAATSRGRR
	: :*



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nadia EL SARRAF
Doğum Yeri	Lübnan
Doğum Tarihi	07.08.1985
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer:
Telefon	+905534453380
E-Posta Adresi	nadia_sarraf@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Lübnanlı Üniversitesi (Lübnan)
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.09.2009

Yüksek Lisans	
Üniversite	Reims Champagne Ardennes Üniversitesi (Fransa)
Enstitü Adı	Doğa Bilimleri Fakültesi
Anabilim Dalı	Biyoloji ve Biyokimya
Programı	Tarımsal Kaynakların Değerlenmesi

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi (Türkiye)
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Sattout E., Faour G., El Sarraf N., 2017- Short communication: Stocktaking forestry knowledge in Eastern Mediterranean: a glimpse on where do practitioners stand, <i>Forest Systems</i> , 26(1).	
El Sarraf N., “The role of VIP1 (VirE2-Interacting Protein 1) transcription factor in <i>Agrobacterium</i> transformation and stress responses in monocots”, International Green Biotechnology Congress 2017, Istanbul Turkey, 11-13 September 2017.	
El Sarraf N., McGuffin L., Gürel A.F., "Structural Analysis and Expression of a VirE2-Interacting Protein From Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)", <i>International IV Plant Transformation & Biotechnology Congress</i> 2017, Vienna, Austria, June 29-30, 2017, pp.28-28.	

- El Sarraf N., Uçarlı C., Gürel A.F., "Cloning and Characterization of HvVIP1 (VirE2-Interacting Protein 1) in Barley", *International VI Congress on Plant Protection* 2016, Konya, Turkey, 5-8 September 2016, pp.648-648.
- Tufan F., El Sarraf N., Gürel A.F., "Analysis of pathogenicity- related gene expression in barley roots in Response to *Fusarium culmoum*", *International VI Congress on Plant Protection* 2016, Konya, Turkey, 5-8 September 2016, pp.597-597.
- El Sarraf N., Uçarlı C., Tufan F., Gürel A.F., "Improving the Agrobacterial Attachment to Monocot Cells Using a Cellulose Fibrous Network", *Global Biotechnology Congress* 2016, Boston, USA, 22-25 August 2016, pp.183-183.

