

TC
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜKSEK TUZ TOLERANSINA SAHİP FASULYE GENOTİPİNDE
TOLERANS İLE İLGİLİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
BELİRLENMESİ

Gökhan GÖKDEMİR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

SAMSUN

2017

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Gökhan GÖKDEMİR tarafından hazırlanan “Yüksek Tuz Toleransına Sahip Fasulye Genotipinde Tolerans İle İlgili Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 10/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Musa KAVAS
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan Doç. Dr. Musa KAVAS
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Kubilay Yıldırım
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım. .../.../2017

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

10/05/2017

Gökhan GÖKDEMİR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YÜKSEK TUZ TOLERANSINA SAHİP FASULYE GENOTİPİNDE TOLERANS İLE İLGİLİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ

Gökhan GÖKDEMİR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Musa KAVAS

Ap2-ethylene-responsive element binding factor (AP2-ERF) süperailisi gelişimsel ve fizyolojik olarak önemli rollere sahiptir. Fasulye genomunun dizilemesi tamamlandığından dolayı AP2-ERF genlerinin hepsinin tanımlanması mümkün hale gelmiştir. Bu çalışmada biyoinformatik analizler ile 180 AP2-ERF süperailisi geni bulunmuş ve bu genlerden *PvAP2-ERF31* geninin karakterizasyonu yapılmıştır. *PvAP2-ERF* gen ailesinin yerel hizalama ve filogenetik analizleri, intron/exon yapısı, genlerinin kromozomlar üzerindeki dağılımı ve motif tahmini yapılmıştır. Ayrıca *PvAP2-ERF* genlerinin promotor yapıları ve miRNA hedefleri, gen ontolojisi ve fonksiyonel anlamlandırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. AP2-ERF proteinleri arasındaki etkileşimler, amino asitlerin fiziksel ve kimyasal karakteristikleri analiz edilmiştir. Ek olarak *PvAP2-ERF* genlerinin ekspresyon seviyeleri *in silico* ve qRT-PCR analizi ile değerlendirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda *PvAP2-ERF31* geni Gateway klonlama sistemiyle klonlanıp *Agrobacterium* ile tütüne aktarılmıştır. T1 Transgenik tütün adaylarının moleküler ve fizyolojik analizler yapılmıştır. T1 transgenik adaylar 200 mM NaCl içeren ortamlarda stres testine tabi tutulmuş ve transgenik tütün adayları sağlıklı bir şekilde çimlenmiş ve büyümüştür.

Mayıs 2017, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: AP2-ERF ailesi, Tuza dayanıklılık, Gateway klonlama, Genom çapında analiz

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF TRANSCRIPTION FACTORS RELATED TO
TOLERANCES IN BEAN GENOTYPE WITH HIGH SALT TOLERANCES

Gökhan GÖKDEMİR

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Musa KAVAS

Apeta2-ethylene-responsive element binding factor (AP2-ERF) superfamily has developmental and physiologically important roles. Since the sequencing of the bean genome is complete, it has become possible to identify all of the AP2-ERF genes. In this study, 180 AP2-ERF superfamily genes by bioinformatic analysis were identified and among these genes, PvAP2-ERF31 gene was characterized. Distribution of genes on chromosomes, intron / exon structure, local alignment and phylogenetic analysis of the PvAP2-ERF gene family and motif prediction were done. In addition, gene ontology and functional annotation, promoter structures and miRNA targets of PvAP2-ERF genes were performed. Interactions between AP2-ERF proteins, physical and chemical characteristics of amino acids have been analyzed. In addition, the expression levels of PvAP2-ERF genes were assessed by in silico and qRT-PCR analysis. As a result of bioinformatics analysis, PvAP2-ERF31 gene was cloned by Gateway cloning system and transferred to Agrobacterium to tobacco. Molecular and physiological analyzes of T1 transgenic tobacco candidates were carry out. T1 transgenic candidates were done stress test in medium containing 200 mM NaCl and transgenic tobacco candidates were germinate and grown up as a healthy.

May 2017, 80 pages

Keywords: AP2-ERF family, Salt resistant, Gateway cloning, Genome wide analysis

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Musa KAVAS'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım. Aynı zamanda hoşgörülerini ve bilgilerini esirgemeyen diğer bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bölümdeki araştırma görevlisi arkadaşım Zafer SEÇGİN'e her türlü katkısından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca diğer araştırma görevlisi arkadaşlarım Gürkan BİLİR ve Ömer TAŞ'a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Elif Seda ATABAY ve Samuel Aduse POKU'ya teşekkürlerimi sunarım. Bana sağladığı çalışma olanaklarından dolayı Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Mayıs 2017, Samsun

Gökhan GÖKDEMİR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	İ
ABSTRACT.....	İİ
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	İİİ
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	İV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	1
1.2. Bitkilerde Çevresel Stres Faktörleri	3
1.3. Tuz stresi	4
1.4. Bitkilerde Tuz Stresinin Zararları	5
1.5. Tuza Adaptasyon.....	6
1.6. Tuz Stresine Karşı Geliştirilen Tolerans Mekanizmaları.....	8
1.6.1. Tuzu Bünyeye Almama	8
1.6.2. Tuzun Eliminasyonu	8
1.6.3. Tuzun Protoplastlardaki Bölmelerde Biriktirilmesi.....	9
1.7. Tuz Toleransı Mekanizmaları	9
1.8. Apetala2/Etilen Cevabı Faktörü (AP2/ERF) Transkripsiyon Faktörleri.....	10
1.8.1. AP2/ERF Proteinlerinin Sınıflandırılması ve Yapısal Özellikleri	11
1.8.2. Aktivasyon ve Baskılama.....	13
1.8.3. ERF Transkripsiyon Faktörlerinin Post Transkripsiyonel Düzenlenmesi	14
1.8.4. Protein-Protein Etkileşimlerinde Yer Alan ERF Proteinleri.....	15
1.8.5. Gelişimsel Süreçlerde Yer Alan ERF Transkripsiyon Faktörleri	17
1.8.6. Birincil ve İkincil Metabolizmanın Düzenlenmesinde ERF Genleri	19
1.8.7. Biyotik ve Abiyotik Stres Cevabında ERF Transkripsiyon Faktörleri	20
1.8.8. ERF Genlerinin Genetik Mühendisliği/İslahının Tarımda Uygulanabilirliği	21
.....	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
2.1. AP2-ERF Dizilerinin Tanımlanması ve Filogeninin Kurulması.....	22
2.2. Intron/Exon Yapısı, Genom Dağılımı ve Motif Tahmini.....	23
2.3. 3D Protein Homolojisinin, Moleküler ve Fizikokimyasal Parametrelerin	24
Tahmini	24
2.4. Tahmini PvAP2-ERF Promotor Bölgesinin ve miRNA'ların Hedeflenmesinin	24
Analizleri	24
2.5. Gen Ontolojisi (GO) ve Fonksiyonel Anlamlandırma	25
2.6. Protein-Protein İnteraksiyonu Ağlarının Tahmini	25
2.7. PvAP2-ERF Genlerinin In Silico Ekspresyon Analizi.....	26
2.8. Bitki Materyalleri, Büyüme Koşulları ve Tuz stresi Uygulamaları	26
2.9. RNA Ekstraksiyonu ve Kantitatif real-time PCR Analizi.....	26
2.10. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı.....	27
2.11. Kullanılan Bakteri Suşları ve Plazmidler	27
2.12. Bakteriyel Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları	27
2.13. Primer Dizayını	28

2.14. Fasulye Bitkilerinin Yetiştirilmesi	28
2.15. Total RNA İzolasyonu	28
2.16. cDNA Sentezi.....	29
2.17. cDNA PCR İşlemi.....	30
2.18. Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	31
2.19. Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) <i>PvAP2-ERF31</i> Geninin Klonlanması	33
2.19.1. Koloni PCR.....	33
2.19.2. Plazmit izolasyonu ve dizileme.....	34
2.20. <i>PvAP2-ERF31</i> Geninin Bitki Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	35
2.20.1. Plazmit izolasyonu	36
2.21. İpk Vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e (AGL1) Transformasyonu .	37
2.21.1. Kompetan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) bakterilerinin hazırlanması	37
2.21.2. Elektrokompentan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) bakterilerine İpk vektörünün transformasyonu.....	38
2.21.3. Koloni PCR.....	38
2.22. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Aracılığıyla Tütün Transformasyonu.....	39
2.22.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) bakterilerinin büyütülmesi	39
2.22.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile tütün yapraklarının inokülasyonu	40
2.23. Aday Transgenik Tütünlerde Analizler.....	40
2.23.1. T1 tütün bitkilerinden DNA izolasyonu.....	40
2.23.2. <i>PvAP2-ERF31</i> ve <i>HptII</i> genleri için PCR.....	41
2.23.3. Mendel ayrılma (segregasyon) analizi	42
2.23.4. Aday transgenik tütün bitkilerinde fizyolojik analizler	42
2.23.4.1. Tuz stresi çalışmaları	42
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
3.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> 'de <i>PvAP2-ERF</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve Tanımlanması	42
3.2. AP2-ERF Ailesinin Filogenetik Analizi	45
3.3. Intron/Exon Yapısı, Genom Dağılımı ve Motif Tahmini.....	46
3.4. 3D Protein Homoloji Modellemesi	47
3.5. Tahmini <i>PvAP2-ERF</i> Promotor Bölgesinin ve miRNA'ların Hedeflenmesinin Analizleri	47
3.6. Gen Ontolojisi (GO) ve Fonksiyonel Anlamlandırma	48
3.7. <i>PvAP2-ERF</i> Genlerinin Gen Duplikasyon Oranı.....	48
3.8. Protein-Protein İnteraksiyonu Ağlarının Tahmini	49
3.9. <i>PvAP2-ERF</i> Genlerinin In Silico Ekspresyon Analizi.....	49
3.10. Kantitatif real-time PCR Analizi.....	50
3.11. cDNA Sentezi ve Gradient PCR	51
3.12. Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) <i>PvAP2-ERF31</i> Geninin Klonlanması	51
3.13. Bitki İfade Vektörüne <i>PvAP2-ERF31</i> Geninin Klonlanması.....	52
3.14. Genimizi İçeren pIPKb004 Vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e (AGL1) Transformasyonu.....	54
3.15. <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Tütün Transformasyonu.....	56
3.16. <i>PvAP2-ERF31</i> Geninin Aday T1 Transgenik Bitkilerinde Analizler	59
3.16.1. Moleküler analizler	59
3.16.1.1. Mendel analizi.....	59

3.16.1.2. Aday transgenik tütün bitkilerinde PCR analizleri	60
3.16.2. Fizyolojik analizler	61
3.16.2.1. Tuz stresi analizi	61
4. SONUÇ	63
EKLER.....	64
EK 1-180 PVAP2-ERF GENİNİN GENE STRUCTURE DISPLAY SERVER (GSDS) İLE EXON İNTRON YAPILARININ ANALİZİ	65
EK 2- PVAP2-ERF PROTEİNLERİNİN MEGA 6 YAZILIMI İLE KORUNMUŞ MOTİFLERİN ÇOKLU HİZALAMA İLE BULUNMASI	68
EK 3- QRT-PCR EXPRESYON ANALİZİNDE KULLANILAN PRİMER SEKANSLARI.....	68
EK 4- BİTKİLERDEKİ AP2-ERF TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ SAYISININ ÖZETİ	69
EK 5- FASULYEDEKİ AP2-ERF SÜPER AİLESİNİN CUCUMİS MELO, SOLANUM LYPERİCON, GLYCİNE MAX, ARABİDOPSİS THALİANA İLE KARŞILAŞTIRILMASI.....	70
EK 6- FASULYEDE BULUNAN 180 AP2-ERF GENİ.....	71
EK 7- PVAP2-ERF AİLESİNİN PROTEİN MOLEKÜLER AĞIRLIKLARI, Pİ DEĞERLERİ, KARARLILIK İNDEKSİ, ÇÖZÜNÜRLÜK VE SUBSELÜLER LOKALİZASYON ANALİZ.....	75
EK 8- PVAP2-ERF GENLERİNİN IN SİLİCO EKSPRESYON SONUCU	80
EK 9- PVAP2-ERF GENLERİNİN KANTİTATİF RT-PCR SONUÇLARI.....	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

dk	Dakika
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
μ l	Mikrolitre
μ mol	Mikromol
rpm	Dakikadaki devir sayısı
$^{\circ}$ C	Santigrat

KISALTMALAR

NAA	Naftalin asetik asit
BA	Benzil aminopüril
NaCl	Sodyum Klorürü
cDNA	Komplementer DNA
MS	Murashige-Skoog
LB	Luria Broth
PCR	Polymerase Chain Reaction
HptII	Hygromycin phosphotransferase gene
FAO	Food and Agricultural Organisation

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya kuru fasulye üretiminde ülkelerin sıralaması (FAO, 2014).....	2
Şekil 1.2. Türkiye’de kuru fasulye üretim miktarlarının sayısal verileri (TUİK, 2015)	2
Şekil 1.3. Dünya’da yeşil fasulye üretim miktarlarının sayısal verileri (FAO, 2014) .	3
Şekil 1.4. Tuz uygulanmayan kontrollere göre, tuz stresine maruz bırakılmış farklı bitkilerin büyüme oranı (Greenway & Munns, 1980).	7
Şekil 3.1. 180 <i>PvAP2-ERF</i> geninin kromozomlar üzerindeki dağılımı	44
Şekil 3.2. 180 AP2-ERF proteininin Mega 6 yazılımı ile hizalanıp Neighbor-Joining (NJ) metodu filogenetik ağaç oluşturulması.....	46
Şekil 3.3. <i>PvERF49</i> , <i>PvERF89</i> ve <i>PvERF94</i> proteinlerinin Phyre2 kullanılarak tahmin edilen 3 boyutlu yapısı.....	47
Şekil 3.4. <i>PvAP2-ERF</i> genlerinin moleküler fonksiyonları	48
Şekil 3.5. Fasulyenin Arabidopsis’deki ortologlarına göre AP2-ERF genleri arasındaki etkileşim ağları	49
Şekil 3.6. <i>PvAP2-EFR31</i> geninin % 1’lik agaroz jeldeki sonucu	51
Şekil 3.7. pENTR™/D-TOPO- <i>PvAP2-ERF31</i> giriş vektörü	52
Şekil 3.8. <i>PvAP2-EFR31</i> genine ait koloni PCR sonucu	52
Şekil 3.9. LR klonaz enzimi ile <i>PvAP2-ERF31</i> genini içeren bitki ifade vektörü pIPKb004.....	53
Şekil 3.10. <i>PvAP2-ERF31</i> - pIPKb004 vektörünün E. Coli’ye transformasyonundan sonra koloni PCR’ın % 1’lik agaroz jel ile yapılan elektroforez sonucu ..	53
Şekil 3.11. pIPKb004 vektörünün E.coli’ye transformasyonundan sonra <i>HptII</i> geni için yapılan koloni PCR’ın %1’lik agaroz jel ile yapılan elektroforez sonucu	54
Şekil 3.12. pIPKb004- <i>PvAP2-ERF31</i> vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hücrelerine transformasyondan sonra yapılan koloni PCR’ın elektroforez sonucu.....	55
Şekil 3.13. pIPKb004- <i>PvAP2-ERF31</i> vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hücrelerine transformasyonundan sonra <i>HptII</i> primerleri ile yapılan koloni PCR’ın elektroforez sonucu.....	55
Şekil 3.14. pIPKb004- <i>PvAP2-ERF31</i> vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> hücrelerine transformasyonundan sonra <i>VirD</i> primerleri ile yapılan koloni PCR’ın elektroforez sonucu.....	56
Şekil 3.15. <i>A.tumefaciens</i> ile gen aktarımı yapılmış ve besi yerinde (MS + BA (1mg/l) + NAA (0.1mg/l)) 3 gün inkübe edilmiş tütün eksplantları	57
Şekil 3.16. Gen aktarılmış tütünlerin yaklaşık 1 ay sonra oluşturduğu kallus ve sürgünler	57

Şekil 3.17. Gen aktarımı yapılmış kalluslardan elde edilen sürgünlerin köklendirme ortamına alınması	58
Şekil 3.18. Bitkilerin köklendirme ortamına alındıktan yaklaşık 8 hafta sonraki görüntüsü	58
Şekil 3.19. Seraya alınan aday transgenik tütün hatları	59
Şekil 3.20. <i>PvAP2-ERF31</i> geni için yapılan PCR sonuçları.....	60
Şekil 3.21. <i>HptII</i> geni için yapılan PCR sonuçları	61
Şekil 3.22. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyütülen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları (a: transgenik tütün, b: kontrol (wild-type) (2. hat)).....	61
Şekil 3.23. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wld-type) tütün bitkileri (a: transgenik tütün bitkileri, b: kontrol tütün bitkileri (2. Hat)).....	62
Şekil 3.24. 200 mM tuz içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Çevresel stres faktörleri (Levitt, 1972)	3
Çizelge 2.1. <i>PvAP2-ERF31</i> geni için dizayn edilen primerler.....	28
Çizelge 2.2. cDNA sentezi için ilk aşamada gerekli bileşenler ve miktarları.....	30
Çizelge 2.3. cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler ve miktarları	30
Çizelge 2.4. PCR koşulları	31
Çizelge 2.5. <i>PvAP2-ERF31</i> genini PCR'la çoğaltmak için kullanılan bileşenler ve miktarları	31
Çizelge 2.6. Tampon 1	32
Çizelge 2.7. Tampon 2	32
Çizelge 2.8. Gateway klonlama sisteminde giriş vektörü için kullanılacak bileşenler ve miktarları	33
Çizelge 2.9. Koloni PCR için kullanılacak bileşenler ve miktarları	34
Çizelge 2.10. <i>PvAP2-ERF31</i> Koloni PCR koşulları	34
Çizelge 2.11. Bitki ifade vektörüne <i>PvAP2-ERF31</i> genini klonlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları	35
Çizelge 2.12. Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarlar	36
Çizelge 2.13. Koloni PCR şartları.....	36
Çizelge 2.14. <i>VirD</i> , <i>HptII</i> ve <i>PvAP2-ERF31</i> genlerine özel primer dizileri.....	38
Çizelge 2.15. Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	39
Çizelge 2.16. Koloni PCR şartları.....	39
Çizelge 2.17. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları	41
Çizelge 2.18. <i>PvAP2-ERF31</i> , <i>HptII</i> ve <i>VirD</i> genlerini çoğaltmak için gereken PCR koşullar	41
Çizelge 3.1. Tütün T1 döllerinin mendel kalıtım analizi	60

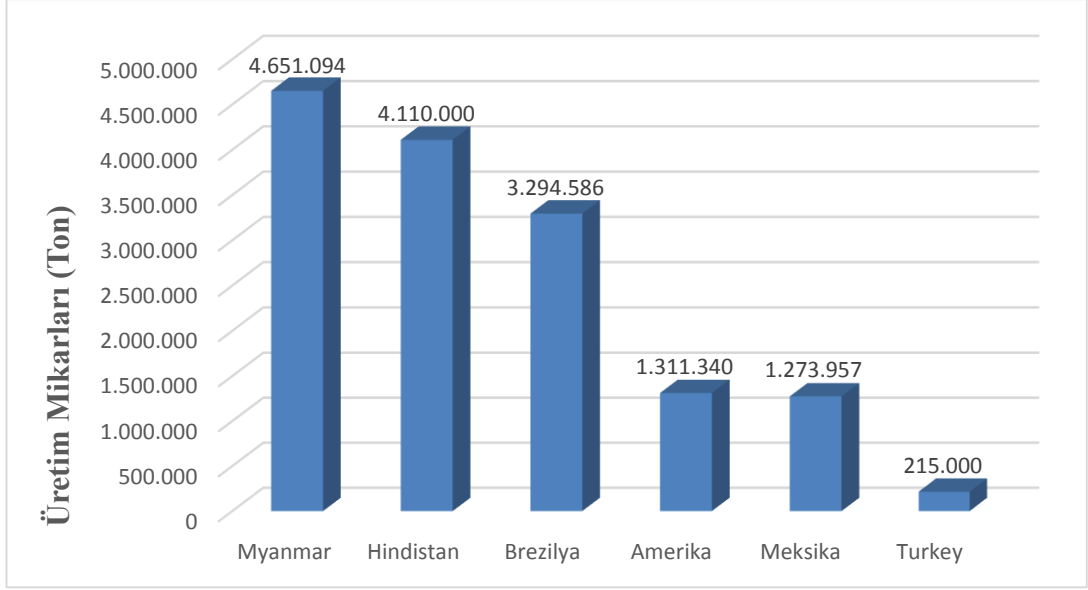
1. GİRİŞ

Günümüzde dünyada insan beslenmesinin büyük bir bölümünü bitkisel ürünler oluşturmaktadır. Bunlardan en önemlilerinden biri olan baklagillerdir. Dünya’da tarımı çok eski yıllardan beri yapılan baklagiller insanların beslenmesinde önemli bir yer edinmektedir. Bileşimlerinde % 18-31.6 protein bulunduran baklagiller aynı zamanda A, B ve D vitaminlerince de zengindir (Şehirli, 1988).

Önemli besin değerinin yanı sıra baklagiller toprağı azot bakımından zenginleştirmektedirler. Havadaki serbest azotu köklerindeki *Rhizobium* bakterileri sayesinde toprağı bağlayarak toprağı azot bakımından zenginleştirir. Baklagiller ayrıca kökleri ile toprağı hafifletir, boşlukları genişletir ve toprak içerisinde kanallar açarak toprağı sıkışmasını önler. Böylece daha sonra ekilecek başka bir ürün için de toprağı uygun hale getirmiş olur (Şehirli, 1988).

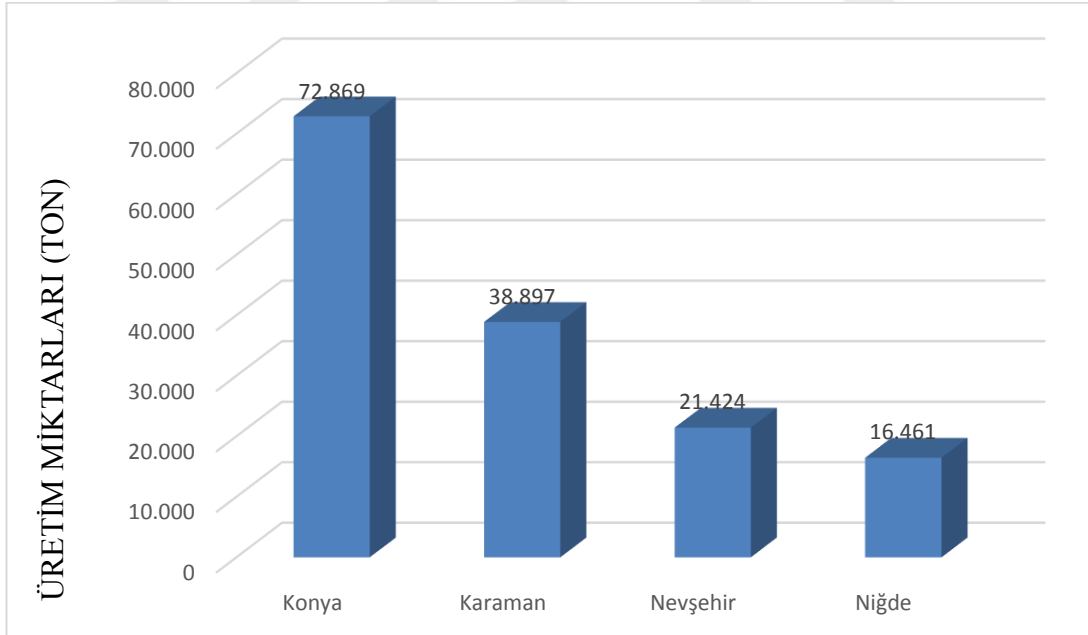
1.1. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fasulye, baklagiller (Fabaceae) ailesinin *Phaseolus* cinsinden tek yıllık Amerika kökenli bir bitkidir. Fasulye üretim açısından tahıllardan sonra gelen en önemli ürünlerden birisidir. FAO 2014 yılı verilerine göre kuru fasulye üretimi 26.529.580 tondur. Dünya genelinde toplam ekim alanı ise 8666 hektardır. Dünya’da 2014 yılına göre en çok üretim yapan ülkeler şunlardır. Myanmar 4.651.094 ton, Hindistan 4.110.000 ton, Brezilya 3.294.586 ton, Amerika Birleşik Devletleri 1.311.340 ton, Meksika 1.273.957 ton’dur (FAO, 2014). Türkiye ise bu sıralamada biraz gerilerde olup üretim miktarı 215.000 ton’dur (FAO, 2014).



Şekil 1.1. Dünya kuru fasulye üretiminde ülkelerin sıralaması (FAO, 2014)

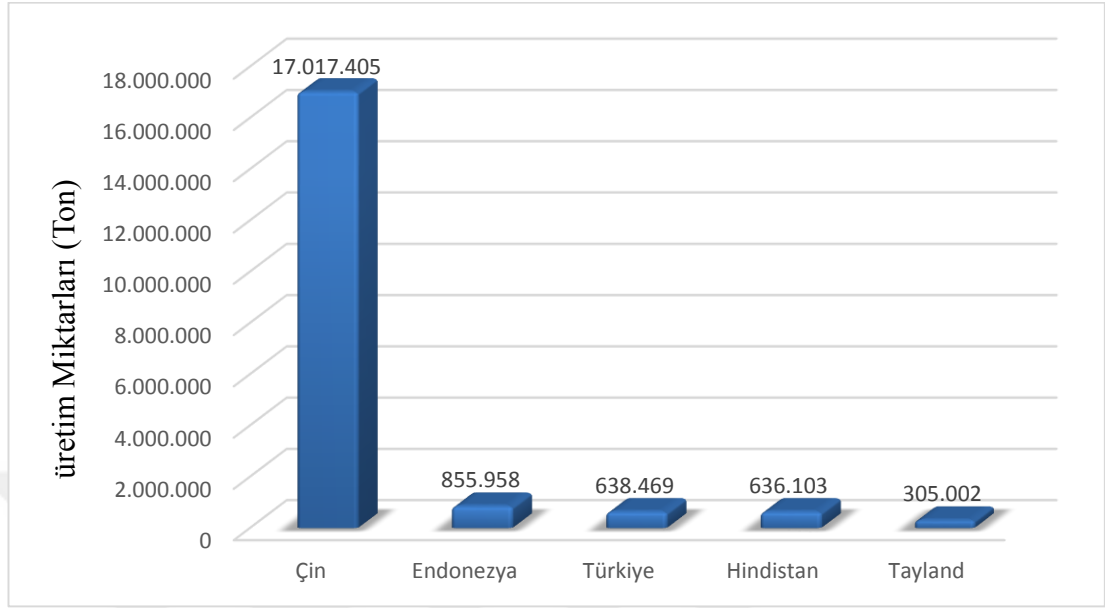
Türkiye’de ise 2015 TÜİK verilerine göre toplam kuru fasulye üretimi 235.000 ton’dur. Türkiye’de toplam üretimin yarından fazlasını oluşturan illerimiz şöyledir. Konya 72.869 ton, Karaman 38.897 ton, Nevşehir 21.424 ton ve Niğde 16.461 ton’dur.



Şekil 1.2. Türkiye’de kuru fasulye üretim miktarlarının sayısal verileri (TÜİK, 2015)

Dünya’da kuru fasulye üretiminde arka sıralarda olan Türkiye yeşil fasulye üretiminde 2014 verilerine göre 3. Sıradadır. Dünya’da üretimin % 90’ına yakını

oluşturan ilk beş ülke şunlardır. Çin 17.017.405 ton, Endonezya 855.958 ton, Türkiye 638.469 ton, Hindistan 636.103 ton ve Tayland 305.002 ton'dur (FAO, 2014).



Şekil 1.3. Dünya'da yeşil fasulye üretim miktarlarının sayısal verileri (FAO, 2014)

1.2. Bitkilerde Çevresel Stres Faktörleri

Stres genellikle, olumsuz bir etki oluşturan dışsal bir etmen olarak adlandırılmaktadır. Hem yabancı form bitkiler hem de tarımsal olarak yetiştirdiğimiz bitkiler sıklıkla stres koşullarına maruz kalmaktadır. Bazı stres faktörleri kısa sürebilirken bazıları da günlerce sürebilmekte ve bu da bitkiler üzerinde olumsuz etki yapmakta ya da bitkiyi öldürebilmektedir. Stres çeşitleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır (Levitt, 1972). Biyotik stres faktörleri biri diğerinin büyümesini engelleyen bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalardır. Abiyotik stres faktörleri ise, su, sıcaklık, kuraklık, mineraller, gazlar, kimyasallar ve radyasyon'dur (Levitt, 1972).

Çizelge 1.1. Çevresel stres faktörleri (Levitt, 1972)

Biyotik Stres Faktörleri	Abiyotik Stres Faktörleri
Bitkiler	Su
Hayvanlar	Sıcaklık
Mikroorganizmalar	Kuraklık
	Mineraller
	Gazlar
	Kimyasallar
	Radyasyon

Bitkiler stres etmenlerinde kaçamadığından dolayı bu stres koşullarına doğrudan maruz kalır. Bunun sonucunda bitki bu durumdan etkilenebilir ve hatta ölebilir. Stres faktörlerinin neden olduğu zarar bitkinin türüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin bezelye ve soya fasulyesi en iyi büyümeyi sırasıyla 20 °C ve 30 °C’de gösterirler. Soya fasulyesi 30 °C’de stresle ilgili bir durum göstermezken bu durum soya fasulyesine stres oluşturabilir (Taiz & Zaiger, 2002).

Bitkilerin yaşam döngüleri boyunca karşılaştığı stres faktörlerinin mekanizmalarının aydınlatılması ve biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi çok önemlidir.

1.3. Tuz stresi

Tuz, yeryüzündeki yaşamın evrimi süresince karşılaşılan ilk stres faktörlerinden birisidir. Başlangıçtan itibaren organizmalar, iyonların dengesinin sağlanması ve hücre içeriğinin stabilizasyonu için etkili mekanizmalar geliştirmek zorunda kalmışlardır. Tuzlu yaşam alanları kolay çözünen tuzların anormal düzeyde yüksek içeriklerine sahiptirler. Okyanuslar, tuz gölleri ve tuzlu havuzlar akuatik tuzlu habitatlar olarak kabul edilirler. Karada yaşayan bitkiler doğal koşullarda deniz suyunun ve tatlı suyun birbirine karıştığı yerlerde, gelgitlerle yer değiştiren deniz kıyıları ve deltalarda toprağın tuz konsantrasyonunun artmasıyla karşı karşıya gelmektedirler. İç kısımlarda jeolojik deniz birikimlerinden yayılan doğal tuz sızıntıları toprağın tuz konsantrasyonunu artırmaktadır. Tuzluluğun oluşmasının bir diğer sebebi ise insan eliyle yapılan yanlış sulamalardan kaynaklanmaktadır. Bu yanlış sulamalar ile toprağın alt katmanında olan tuz minerallerinin çıkışı hızlandırılmakta ve topraklar tarım için elverişsiz hale gelmektedir (Ghassemi, 1995).

Tuzlar, evaparasyon ve transpirasyon ile topraktan suyu buharlaştırır ve geriye tuz minealleri kalır ve bu da toprağın tuz konsantrasyonunun artmasına sebep olur. Toprak tuzluğu, topraktan oluşan evaporasyonun yıl boyunca toprağa süzülen yağış miktarından daha fazla olduğu kurak bölgelerde büyük ölçüde artma göstermektedir. Taban suyunun yüksek olduğu veya drenajın olmadığı çukur alanlarda sulama suyunda ve yetersiz drenaj koşullarında fark edilir derecede yüksek tuz içeriğinin olduğu

gözlenmektedir. Sulamaların yoğun olarak yapıldığı alanlarda da fazla miktarda tuz birikimi olmaktadır (Ghassemi, 1995).

Nemli bölgelerde tuzlu topraklar esas olarak NaCl içerirler. Bu tip nötral tuzlu topraklar kurak bölgelerde de meydana gelmektedir. Step ve çöl toprakları ise kendilerini daha alkalın yapan Na, Mg Ca'un sülfat ve karbonatları içermektedirler. Yarı-kurak alanlarda oldukça tuzlu topraklar genellikle, yüzeydeki tuz kırıntıları ile tanınırlar. Sodyum klorür ve sodyum sülfat, tuzlu topraklarda en çok bulunan topraklardır. Tuz minerallerinin fazla miktarda bulunması kurak ve yarı kurak bölgelerde başlıca sorunlar arasındadır, çünkü bu alanlardaki yağış miktarı toprağın yüzeye yakın katmanlarından tuz iyonlarını yıkamak için yeterli değildir. Tarımsal alanlarda, tuzu kök bölgesinin bulunduğu seviyelerden daha alt katmanlara yıkamak için yeterli miktarda ve doğru bir şekilde su kullanılmadıysa, sulama toprak tuzluluğuna sebep olmaktadır.

1.4. Bitkilerde Tuz Stresinin Zararları

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri, nem, sıcaklık, sulama, gübreleme, hava kirliliği ve ışık yoğunluğu gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kantar ve Elkoca, 1998). Yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkiler üzerindeki zararı, suyun osmotik olarak tutulmasından ve spesifik iyonların protoplazma üzerine olan etkilerinden kaynaklanmaktadır. Su, tuz çözeltilerinde osmotik olarak tutulmaktadır. Böylelikle tuz konsantrasyonu artarken, bitkilere suyun girişi daha az gerçekleşmektedir. Protoplazmada Na^+ ve Cl^- miktarlarında artışların olması, enzim proteinleri ve membranlar üzerindeki iyonun spesifik etkilerinde olduğu gibi iyonik dengede de (K^+ ve Ca^+ ile Na^+) bozulmalara sebep olmaktadır. Solunuma ait zincirde fotofosforilasyon ve fosforilasyon ile çok az enerji üretilmekte, azot asimilasyonu bozulmakta, protein metabolizmasında karışıklıklar oluşmaktadır. Fotozentez, sadece stomaların kapanması ile değil ayrıca tuzun kloroplastlar üzerindeki özellikle elektron taşınması ve sekonder olaylar üzerindeki etkileriyle de bozulma gösterebilmektedir. Özellikle köklerdeki solunum tuzdan etkilenmektedir. Glikoliz ve trikarboksilik asit (Krebs) döngülerinin enzim sistemleri, tuza daha duyarlıdır. Toprağın NaCl içeriği yüksek olduğunda, mineral besin alımı özellikle de NO_3 , K^+ ve Ca^{+2} 'un alımı azalmaktadır (Larcher, 1995).

Büyüme ile ilgili olaylar tuza duyarlılık gösterir. Bu nedenle de büyüme oranları ve biyokütle üretimi, tuz stresinin derecesini ve bitkinin buna dayanma yeteneğini belirlemek için güvenilir bir ölçüttür. Fide ve genç bitkiler, olgun halofitlere göre tuza daha duyarlılık göstermektedir. Genç bitkiler, köklerinin en yüksek tuz konsantrasyonu içeren toprağın üst tabakaları ile çevrelenmesinden ötürü, daha büyük zararlara maruz kalırlar. Çimlenme, tuzsuz veya az tuzlu ortamlarda çok başarılı olarak gerçekleşmektedir (Larcher, 1995).

Ekstrem tuz stresi, bodurlaşmaya ve kök büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Bu stresin etkisi ile tomurcuk açması gecikmekte, sürgünlerin boyu kısalmakta, yapraklar küçülmekte ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca köklerde, tomurcuklarda, yaprak kenarlarında ve sürgün uçlarında nekrozlar oluşmakta, yapraklar sararmakta ve sürgünün tüm kısımlarında kurumalar meydana gelmektedir. Bitkilerde hormonal denge, tuzluluk tarafından etkilenen önemli bir faktördür. Sitokininin düşük seviyeleri, absisik asit ve etilenin artan miktarları, olgunlaşmanın erken başlamasında etkili olmaktadır (Larcher, 1995).

Tuz stresi, bitkilerde ölüme yol açabilmekte, tuzun toprak içerisindeki konsantrasyonu ve bitkinin dayanıklılığına göre büyümeyi engellemekte, yaprak yanıklığı gibi nekrozlara, klorozlara, dölllenme bozukluklarına, meyvelerin küçük olmasına, kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olabilmektedir.

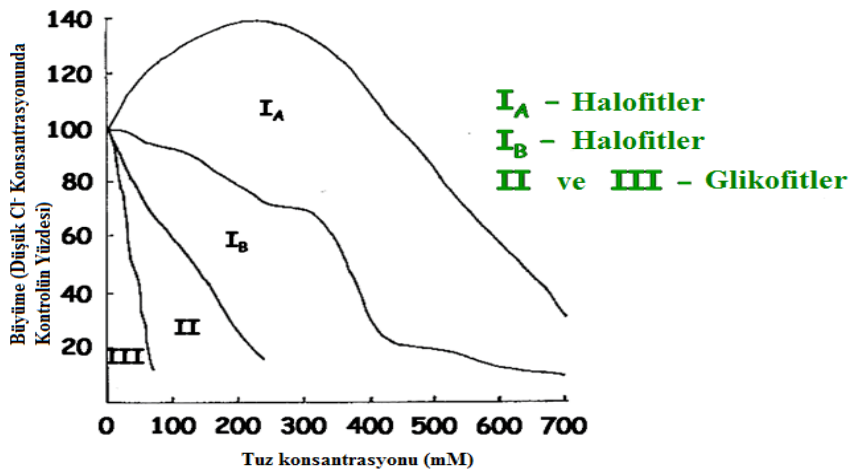
1.5. Tuza Adaptasyon

Yüksek tuz konsantrasyonlarına cevap verme yönünden bitkiler iki gruba ayrılmaktadır (Larcher, 1995; Ellialtıoğlu & Tıpırdamaz, 1988). Bunlardan ilki tuzlu topraklara özgü olan halofitler, ikincisi ise glikofitlerdir.

Halofitler (tuzcul bitkiler): Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilirler. Tuz düzeyi düşük koşullarda yaşayamazlar. Tuzlu habitatlarla çevrelenmiş obligat halofitlerde büyüme, tuzun ılımlı miktarlarda alımı ile ilerletilebilir. Sadece tuz yüksek seviyelere ulaştığında büyüme bozulur ve bitki, antosiyanin üretimi veya klorofil parçalanması gibi stres sinyalleri gösterir obligat halofitlere örnek olarak *Salicornia herbacea* ile *Atriplex vericaria* verilebilir. Fakültatif halofitler hafif tuzlu topraklar üzerinde gelişirler, tuz miktarının arttığı durumlarda ise büyümeleri kısa sürede engellenmektedir.

Glikofitler: Tuza duyarlı bitkilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayamazlar. Tarımı yapılan bitkiler arasında mısır, soğan, turunçgiller, ceviz, marul ve fasulye tuza yüksek oranda duyarlı, pamuk ve arpa orta derecede toleranslı, şeker pancarı ile hurma ağacı ise yüksek oranda toleranslı bitkilerdir.

Aşağıdaki şekilde Greenway ve Munns tarafından topraktaki tuz konsantrasyonlarındaki yaşam kabiliyetlerine göre bitkilerin sınıflandırılması yer almaktadır.



Şekil 1.4. Tuz uygulanmayan kontrollere göre, tuz stresine maruz bırakılmış farklı bitkilerin büyüme oranı (Greenway & Munns, 1980).

Grup IA (halofitler): Bu türlerin büyümesi 400 mM'ın altındaki Cl⁻ seviyelerinde teşvik edilmektedir. Grup IIB (halofitler): Bu bitkiler tuza tolerans gösterirler ancak büyümeleri engellenir. Grup II (halofit ve halofit olmayanlar): Tuza toleranslı *Festuca rubra* ve *Puccinellia peisonis* gibi halofit çimenleri, pamuk ve arpa gibi halofit olmayan bitlileri içerir. Tüm yüksek tuz konsantrasyonlarında büyümeleri engellenir. Ayrıca bu grup içinde domates orta derecede toleranslı, fasulye ve soya fasulyesi duyarlıdır. Grup III: Bu grupta yer alan (glikofitler) türler düşük tuz konsantrasyonlarında ciddi derecede engellenirler ya da ölürlür. Bu grupta mandalina veya avokado gibi meyve ağaçları yer alır (Greenway & Munns, 1980).

Tuzlu habitatlarda büyüyen bitkiler, tuz etkilerinden kaçınmayabilirler ve bu nedenle en azından bir miktar dayanıklılık geliştirmek zorundadırlar. Tuza maruz kalan bitkilerde büyüme ve metabolizmanın korunabilme derecesi tuz dayanıklılık

olarak adlandırılmaktadır. Tuza dayanıklılık, bir bitkinin ya protoplazmada ulaşılan aşırı tuz miktarlarının düzenlenmesi, diğer bir ifade ile tuz regülasyonu yolu ile olan kaçınma veya alternatif olarak, artan iyon konsantrasyonu ile bir araya gelen toksik ve osmotik etkileri tolere etme yeteneği ile sağlanabilmektedir (Levitt, 1972; Larcher, 1995).

1.6. Tuz Stresine Karşı Geliştirilen Tolerans Mekanizmaları

Bitkiler çeşitli mekanizmalar ile tuz stresinin zararlarını önleyebilmek ya da en aza indirgeyebilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir.

1.6.1. Tuzu Bünyeye Almama

Tuzun bitkinin kendi bünyesine alınmaması kök bölgesindeki yüksek tuz konsantrasyonu varlığında kökün belirli iyonların (Na^+ , Cl^-) geçişini düşürerek sağlamaktadır. Bu mekanizmada kök ve sürgünlerdeki tuz taşınmasının engellenmesi söz konusudur. Kökteki bu engelleme kaspari şeridi adlı yapı sayesinde gerçekleşir. Örneğin, bazı mangrov ağaç türlerinin köklerdeki taşınım bariyerleri tarafından oluşturulan ultrafiltrasyon, iletim sisteminde su tuzluluğunun çok yüksek hale gelmesini önlemektedir. *Prosopis farcta*'da tuz iyonları, özellikle de Na^+ , kökler tarafından alınmalarına rağmen, tuzlar yapraklara hemen hemen hiç ulaşmamaktadır. Tuz iletiminin kesilmesi, değişik ürün bitkilerinde de meydana gelebilmektedir. Özellikle de halofilik bitki türlerindeki fazla miktardaki iyonlar, köklerde, sapın üst kısımlarında, yaprak ve çiçek saplarında tutulurlar. Böylelikle de tuzun meristemlere, gelişmekte olan yapraklara ve genç meyvelere ulaşan miktarı azaltılmış olur.

1.6.2. Tuzun Eliminasyonu

Bir bitki, tuzları kök ve sürgün yüzeyleri ile dışarı atarak, özelleşmiş bezler ve tüylerle dışarı atarak ve tuz içeren bitki kısımlarını dökerek kendini aşırı tuzdan koruyabilir. Tuz salgılayan bezler ise aktif olarak tuzları elimine ederek, belirli sınırlar içinde yapraklardaki birikimi idare ederler. Tuzu gidermenin bir başka yolu, bitkinin önemli miktarlarda tuzu biriktiren yaşlı yapraklarını dökmesidir (Munns, 1993; Larcher, 1995). Bu özellik tuzlu çevrelerde yer alan bitkilerin geliştirdikleri en önemli uyum mekanizmaları arasındadır.

1.6.3. Tuzun Protoplastlardaki Bölmelerde Biriktirilmesi

Tuzlu topraklarda yaşayan bitkiler, hücre özsularında tuz biriktirme yoluna giderek ozmotik potansiyellerini azaltırlar ve turgor basıncını korumaya çalışırlar. Bitkilerin hücre özsularındaki Na^+/K^+ ve $\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}$ iyon oranları, bitki familyası ve türüne özeldir. Tuz iyonlarının çoğunluğu vakuollerde birikmektedir. Böylelikle sitoplazmanın ve en önemlisi de kloroplastların maruz kaldıkları konsantrasyonlar azaltılarak, enzim sistemleri doğrudan tuz stresinden korunmuş olmaktadır (Larcher, 1995).

1.7. Tuz Toleransı Mekanizmaları

Tuz toleransı, yüksek konsantrasyonda tuz içeren ortamlarda yaşam döngüsünü sürdürme ve tamamlama yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Parida ve ark., 2004). Bu, protoplazmanın ait olduğu bitki türüne, doku tipine bağlı olarak tuz stresi ile bir arada olan iyonik dengesizliği ve artan iyon konsantrasyonlarının ozmotik etkilerini tolere edebildiği dereceyi kapsamaktadır. Familya cins ve türler arasında, hatta aynı türe ait çeşitler arasında da tuza toleranslılık bakımından da farklılıklar bulunmaktadır (Larcher, 1995).

Bitkiler, tuz stresi ile başa çıkabilmek için çeşitli biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar geliştirmişlerdir. Biyokimyasal mekanizmalar seçici bir yöntemle iyonların biriktirilmesi ve atılması, köklerden tuz iyonlarının alımının ve yapraklara iletimini kontrolü, fotosentez yollarında değişiklikler, membran yapısında değişiklik, antioksidan enzimlerin üretilmesi ve hücreleri korumaya yönelik hormonların üretilmesi ile gerçekleşir (Parida vd, 2005). Moleküler mekanizmalarda ise, tuz stresine karşı gen ekspresyonunun düzenlenmesi bitkiler tarafından spesifik gen ürünlerinin (protein ve RNA) üretilmesini artırarak veya azaltarak çok kapsamlı bir oranda koruma yelpazesini içermektedir (Gupta & Huang, 2014). Bu moleküler mekanizmaların ve genlerin aydınlatılması için günümüzde yürütülen genomik çalışmalar önemli genlerin fonksiyonlarının aydınlatılmasında ve karakterizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bitkilerde çevresel streslere verilen cevaplarda birden fazla sinyal iletim yolu işlev görür. Tuz stresinin çok sayıda bitki geninin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir ve bu genlerin düzenlenmesini sağlayan sinyal yollarının bir kısmının ABA tarafından kontrol edildiği diğer kısmının ise tuz stresi

tarafından indüklendiği saptanmıştır (Zhu, 2002). Bu sonuçlara bakılarak; NaCl stresinin uyardığı gen ekspresyonu genel olarak ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız sinyal iletim yolları tarafından etkilendiğini göstermektedir (Cheong & Yun, 2007). Sinyal iletimi, ilk olarak stresin algılanması ile başlar ve bunu takiben habercinin oluşumu takip eder. İkincil haberci hücre içi Ca^{+2} düzeyini ayarlayarak protein fosforilasyon aşamalarını başlatır. Bu fosforilasyon aşamalarında hedef proteinleri, hücrel korumayı içeren proteinler veya stres-düzenleyici genlerin kontrolünde yer alan transkripsiyon faktörlerini oluşturmaktadır (Xiong vd, 2002). Geçmişten günümüze kadar genomik ve transkriptomik yaklaşımlar kullanılarak tuz stresine cevap olarak upregüle ya da downregüle olmuş çok sayıda transkripsiyon faktörü ve geni tanımlanmıştır.

Transkripsiyon faktörleri bitkilerdeki tuz stresine karşı savunma mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için en fazla çalışılan konulardan birisidir. Transkripsiyon faktörleri bir genin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA'lar üzerindeki spesifik bölgelere bağlanabilen proteinler olarak adlandırılmaktadır (Latchman, 1997). Transkripsiyon faktörleri tek başına veya başka proteinlerle kompleks oluşturarak, bir genin ifadesini artırır ya da azaltır (Latchman, 1997).

Abiyotik stres koşulları altında, strese cevap verecek genlerin önemli bir kısmını transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler oluşturmaktadır. Bitki tuz stresi gibi olumsuz bir stres koşulu ile karşı karşıya kaldığında, transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu artar (Hasegawa & Bressen, 2000). Tuz stresi sonucunda genlerin ifade olmasını sağlayan sinyal yolları ABA bağımlı ve ABA bağımsız olduğu için haliyle transkripsiyon faktörleri de bu iki kategoride yer almaktadır. ABA bağımlı sinyal yollarında MYB/MYC ve bZIP gibi transkripsiyon faktörleri bulunurken, ABA'dan bağımsız sinyal yollarında ise DREB2 transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır (Mahajan & Tuteja, 2005).

1.8. Apetala2/Etilen Cevabı Faktörü (AP2/ERF) Transkripsiyon Faktörleri

Evrim sürecinde, DNA bağlayıcı proteinler ökaryotik genomlara katıldı ve transkripsiyon faktörlerinin yeni gen aileleri oluşturuldu (Yamasaki vd, 2012). Başlangıçta bitkiye spesifik olarak tanımlanan AP2/ERF domain'i ayrıca protistler, siyanobakteriler ve faj proteinlerinde de bulundu (Wessler, 2005). Bu proteinlerin

DNA'yı bağlama yeteneği bulunduğu da gözlemlendi ancak bitki dışındaki organizmalardaki AP2 domainlerinin endonükleazları barındıran histidine ve asparajin bakımından zengin HNH sınıfıyla ilişkili bulunmuştur (Wessler, 2005). Geçmişte oluşturulan bitki ve bitki dışındaki organizmalar arasındaki gen değişiminin çeşitli hipotezleri arasında en makul senaryo AP2'yi içeren proteinlerin bakterilerden veya virüslerden bitkilere lateral transfer yoluyla aktarıldığıdır (Licausi, 2010a).

1.8.1. AP2/ERF Proteinlerinin Sınıflandırılması ve Yapısal Özellikleri

Tarihsel olarak AP2 domaini adlı en az bir DNA bağlanma domaini içeren AP2/ERF proteinleri ERF, AP2 ve RAV aileleri adlı üç farklı aileye ayrılmıştır. AP2 / ERF süper ailesi, yaklaşık 60 ila 70 amino asitten oluşan ve DNA bağlanmasına katılan AP2/ERF ile tanımlanır (Nakano vd, 2006). Bu üç aile şu şekilde tanımlanmıştır. AP2 ailesi proteinleri, iki AP2 / ERF domainini, ERF ailesi proteinleri tek bir AP2 / ERF domainini ve RAV ailesi proteinleri, diğer bitki spesifik transkripsiyon faktörlerinde korunan bir DNA bağlama domaini olan bir B3 domaini, ek olarak da tek AP2/ERF domaini içerir (Nakano vd, 2006; Sakuma vd, 2002).

Tek bir AP2 domainine sahip ve genomik dizisi az miktarda intron içeren çoğu protein ERF ailesine atfedilir (Nakano vd, 2006). AP2 ailesi çift AP2 domaini ve nükleer lokalizasyon dizisinin amino asit sekansına göre AP2 ve ANT alt gruplarına ayrılmıştır (Shigyo & Ito, 2004). Üçüncü sınıf bir protein, bir B3 bağlanma domaini ile bağlantılı bir ERF domainine sahiptir. Bunlar RAV ailesini oluşturur (Swaminathan vd, 2008). Şimdiye kadar dizilenen tüm bitki genomlarında korunmuş olan AP2/ERF ailesine ait ek bir dizidir: Soloist (Nakano vd, 2006; Zhuang vd, 2008; Licausi vd, 2010a). Bu protein tek bir AP2 domaini içermesine rağmen, sekansı ve gen yapısı ERF transkripsiyon faktörlerinden farklıdır (Nakano vd, 2006; Sakuma vd, 2002).

AP2 domaini, ilk olarak çiçek gelişiminde rolü olan *Arabidopsis thaliana* AP2 proteininde tekrarlanan bir motif olarak tanımlandı (Jofuku vd, 1994). ERF domaini ilk olarak tütünde (*Nicotiana tabacum*) ERF 1, 2, 3, 4 adlı 4 DNA bağlanma proteininde korunmuş bir motif olarak tanımlanmıştır ve genlerin etilen cevabı transkripsiyonunda yer alan bir DNA sekansı olan GCC kutusu ile spesifik olarak bağlandığı gösterilmiştir (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995).

RAV ailesinde ise, RAV1 ve RAV2 ilk olarak *Arabidopsis thaliana*'da bir B3 benzeri domain ve bir AP2 / ERF domaini içeren proteinleri kodlayan cDNA olarak tanımlandı (Kagaya vd, 1999).

ERF transkripsiyon faktörlerinin terminolojisi (adlandırılması) fonksiyonel tanımayı kolaylaştıran bu proteinlerin filogenetik gruplara dönüştürülmesine yönelik iki büyük çabaya dayanmaktadır (Sakuma vd, 2002; Nakano vd, 2006). 2002'de Sakuma ve arkadaşları *Arabidopsis thaliana*'daki 121 ERF proteini onların AP2 domainin benzerliğine göre iki ana gruba bölünmüştür. Bunlar dehidrasyon cevabı elementi bağlanma proteinleri (DREB) ve her biri 6 alt gruba bölünen ERF olarak ikiye ayrılırlar. 4 yıl sonra Nakano ve arkadaşları (2006) ERF genlerinin intron-ekson yapısını ve ek motiflerin varlığı göz önüne alarak Sakuma'nın sınıflandırmasını düzenlemek ve güncellemek için *Oryza sativa* ve *Arabidopsis thaliana* genomunu anlamlandırmayı artırmak için kullandı. Bu yolla ERF proteinleri Sakuma ve arkadaşları (2002) tarafından oluşturulan sınıflandırmaya önemli ölçüde uyan 12 alt gruba ayrılmıştır. Nakano ve arkadaşları (2006) tarafından ERF ailesinin yeni sınıflandırmasının getirdiği avantajlar iki kat fazlaydı. Bu avantajlardan bazıları şunlardır: Transkripsiyon faktörlerinin bu sınıfının filogenetik geçmişi yeniden özetlendi ve ek olarak benzer düzenleyici özelliklere sahip olan proteinlerin gruplandırılmasına izin verildi. Nitekim ilerleyen yıllarda, ERF alt gruplarının korunmuş birkaç motifinin fonksiyonu tanımlanmıştır. Günümüzde hala iki adlandırma da (terminoloji) bağımsız olarak kullanılmaktadır. Fakat belirsizliklerden kaçınmak ve ezberlemeyi (hatırlamayı) kolaylaştırmak için bu iki terminolojinin birleştirilmesi önerildi.

AP2/ERF süper ailesinin korunmuş DNA bağlanma domaini karakteristiği, tipik bir üç boyutlu konformasyon sunan (veren) paralel bir alfa-heliks ile takibinde üç antiparalel beta-sheet tabakasından oluşan 60 amino asitlik bir rezidüden oluşmaktadır (Allen vd, 1998). ERF ailesi içinde AP2/ERF DNA bağlanma domaini belirli konumlardaki rezidülerin kimliğine bağlı olarak DREB ve ERF domainleri arasında ayırım yapılır (Sakuma vd, 2002). Amino asit dizisindeki farklılıklar iki at ailenin DNA afinitesi ve özgünlüğünü yansıtır. Pek çok DREB proteinleri sıklıkla ABA, kuraklık ve soğuğa karşı yanıt veren genlerle ilişkili olan bir A/GCCGAC elementine bağlandığı görülmüştür (Stockinger vd, 1997). Öte yandan ERF alt ailesi üyeleri, etilene, patojenere ve yaralanmaya karşı cevap veren genlerin genellikle upstream

bölgelerinde bulunan GCC kutusu adı verilen bir AGCCGCC elementine in vitro olarak bağlanırlar (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995). Bu genellemeye rağmen her iki ailenin tek bir üyesi DRE ve GCC elementlerine (Sun vd, 2008) veya bu ikisinden önemli ölçüde farklı olan DNA elementlerine bile bağlandığı bildirilmiştir (Welsch vd, 2007; Shaikhali vd, 2008). DNA bağlanma afinitelerinin yüksek oranda farklılığı strese özgü modüllere göre farklı uyarılara cevabı ayarlama gerekebilir (Mizoi vd, 2012). Ek olarak, benzer DNA tanıma bölgelerini barındıran proteinler tarafından spesifik olarak bağlanan çok çeşitli oligonükleotidler, farklı protein ailelerine ait transkripsiyon faktörleri ile etkileşiminin fazlalığı göz önüne alınarak açıklanabilir. Şaşırtıcı bir şekilde, bir çift AP2 domainine sahip olan AP2 ailesinin üyeleri ERF veya DREB bağlanma elementlerinin ardışık bir tekrarını tanımazlar *Arabidopsis thaliana* AP2-13 (APETALA2) ikinci AP2 tekrarıyla doğrudan temas eden bir T/A'ce zengin bir element içeren bir motife monomer olarak bağlanır (Dinh vd, 2012). AP2 proteinleri çiçeklenmeyi düzenleyici genlerin promotörü ile etkileşime girmesine rağmen, bu proteinlerin DNA bağlanma özellikleri hakkındaki bilgiler eksiktir (Mathieu vd, 2009). RAV1'deki AP2 domaini bir CAACA motifine bağlanır (Kagaya vd, 1999).

1.8.2. Aktivasyon ve Baskılama

Genel bir kuralın ardından AP2 domaini içeren transkripsiyon faktörleri, spesifik hedef genleri transkripsiyonunu etkinleştirip etkinleştirmedigine bağlı olarak kabaca aktivatör ya da baskılayıcı olarak sınıflandırılabilirler. Transkripsiyonel baskılayıcılar ayrıca aktif ve pasif baskılayıcılar olarak da sınıflandırılırlar. Aktif baskılayıcılar bir transkripsiyon faktörü ya da DNA bağlanma domainin aktivitesini baskılamayı sağlayan farklı bir baskılama domaini içerir. Promotor bölgesine bağlandığında bu proteinler hedef bir genin transkripsiyonunu aktif olarak engelleyebilir. Buna karşın, pasif baskılayıcılar bir baskılayıcı domaine sahip değildir. Daha ziyade bu pasif baskılayıcılar hedef dizinin bağlanması için transkripsiyonel aktivatörler ile rekabet ederek transkripsiyonu baskırlar (Mitsuda & Ohme-Takagi 2009).

Genel olarak, bitki transkripsiyon faktörlerinde tanımlanmış aktivasyon domainleri belirgin dizi motiflerine sahip değildir ancak asidik amino asitler bakımından zengin olma eğilimindedir. Tütündeki ERF2 ve ERF4'ün asidik N-terminal veya C-terminal bölgesi protoplastlarda aktivasyon domainleri olarak rol

almaktadır (Ohta vd, 2000). Son zamanlarda AtERF98/TDR1 transkripsiyon faktöründe bulunan EDLL motifinin güçlü bir aktivasyon domaini olduğu ve heterolog DNA bağlanma proteinlerine güçlü bir transkripsiyonel aktivasyon potansiyeli vermede yararlı bir araç olabileceği görülmüştür (Tiwarei vd, 2012). Bitki Transkripsiyonel aktivatörlerinde bulunan aktivasyon domainlerinin aksine bitki transkripsiyon aktif baskılayıcıları genellikle farklı bir baskılama domaini içerir. ERF ile ilişkili amfifilik baskılama motifi (EAR) (Ohta vd, 2001; Hiratsu vd, 2003), TLLLFR motifi (Matsui vd, 2008) ve B3 baskılama domainleri (BRD: RLFGV) (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009) bitkilere özgüdür. Arabidopsis'deki 147 AP2/ERF proteini arasından 23 tanesi ya bir EAR motifi ya da bir BRD motifi içerir (Nakano vd, 2006) (Tablo 1). Bir EAR veya BRD motifi içeren ERF'ler Transkripsiyonel baskılayıcılar gibi görünür ve TOPLESS (TPL) ve TOPLESS-RELATED (TPR) Transkripsiyonel korepresörleri ile etkileşime girerek hedef genlerin transkripsiyonunu baskılar (Causier vd, 2012). AP2-13 çiçek gelişiminin pozitif bir düzenleyici olmasına rağmen AGAMOUS geninin negatif bir düzenleyicisi olarak görev yapar (Drews vd, 1991).

1.8.3. ERF Transkripsiyon Faktörlerinin Post Transkripsiyonel Düzenlenmesi

ERF protein aktivasyonunun transkripsiyon sonrası kontrolü, bitkilerdeki çeşitli fizyolojik süreçlerin anahtar bir özelliği olarak ortaya çıkmaktadır. Alternatif splicing'in çim türlerinde DREB2 benzeri dizilerin hızlı toplanmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Arpa (DRF1), buğday (WDREB2) ve mısır (DREB2A) ortologları stres koşulları olmadığı durumda DNA bağlanma domaininden önce bir stop kodonuyla karakterize olan bir mRNA izoformunun biriktiği görülür, bu yüzden fonksiyonu olmayan bir protein üretilir (Xue & Loveridge, 2004; Egawa vd, 2006; Qin vd, 2007). Bir stres uyarıcısı ortaya çıktığında alternatif splicing erken durdurma kodonu içeren ekson hariç, hızlı bir şekilde fonksiyonel bir izoform üretimi gerçekleşir. Alternatif splicing Arabidopsis ve domatesteki ERF-VII grubunun üyelerinde bildirilmiştir. Bu durumlarda ilk ekson'un çıkarılması stabil olmayan protein elementlerinin serbest bırakılmasına sebep olacaktır (Pirrello vd, 2006; Licausi vd, 2010b).

ERF transkripsiyon faktörlerinin bolluğu ve aktivitesinin düzenlenmesi de aynı zamanda protein seviyesinde gerçekleşir. Nakano ve arkadaşları (2006)'da Arabidopsis ve pirinçte VI, VII ve IXb gruplarına ait ERF proteinlerinde varsayımsal

fotofosforilasyon bölgeleri ile ilişkili birçok motif tanımlanmıştır (Nakano vd, 2006). Bazı ERF proteinleri için fosforilasyon tarafından yürütülen düzenleme mekanizmaları karakterize edilmiştir (Nakano vd, 2006). ERF-VI sitokininin cevabi faktörlerinin (CRFs) sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirmede, protein histidin kinazlar ve histidin içeren fosfotransfer proteinleri tarafından gerçekleştirilen fosforilasyona ihtiyaç duyduğu ileri sürülmüştür (Rashotte vd, 2006). Arabidopsis’de ERF ailesinin 15 üyesi mitojen aktive edilmiş protein kinazların (MPKs) substratları olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Popescu vd, 2009). Özellikle Arabidopsis’de patojen cevabının pozitif bir düzenleyicisi olan AtERF104 (ERF-IXb grubu) MPK6 ile etkileşim yaparak stabil duruma geçtiği rapor edilmiştir (Bethke vd, 2009). Birkaç kanıt, DREB2A homologlarının transkripsiyonel aktivitesinin negatif düzenleyicisi olarak işlev gören fosforilasyona işaret etmektedir (Sakuma vd, 2006a; Agarwal vd, 2007). Fakat aynı zamanda fosforilasyonun, domates, pirinç ve tütünde ERF proteinlerinin transkripsiyonel aktivitesini artırdığı da görülmektedir (Gu vd, 2000; Cheong vd, 2003; De Boer vd, 2011).

Ayrıca ERF proteinlerinin stabilitesi 26S proteazomu içeren çeşitli yollarla düzenlenir. AP2/ERF proteinlerinin proteazom düzenlenmesine başka bir örnek DREB ailesinden gelmektedir. *Arabidopsis thaliana* DREB2A’nın miktarı stres olmayan koşullarda DRIP1 ve DRIP2 RING-E3 ligazları tarafından sınırlandırılır (Qin vd, 2007). Kuraklık cevabında *Arabidopsis thaliana* ERF53 benzer bir mekanizma ile ubiquitin protein ligaz olan RGL1(RING DOMAIN LIGASE1) ve RGL2 (RING DOMAIN LIGASE2) tarafından ubiquitin ile işaretlendiğinde proteazom tarafından yıkıma uğrar (Cheng vd, 2012). Bazı durumlarda ERF proteinleri ve ubiquitin ligaz arasındaki etkileşim doğrudan değildir, bunun yerine bir adaptör aracılığıyla gerçekleşir. Bu BTB(BR-C, ttk and bab)/POZ (Poxvirus and Zinc Finger) proteinlerinin MATH domainleri ile etkileşim aracılığıyla 26S proteazomu hedef alan *Arabidopsis thaliana* RAP2.4a için de geçerlidir (Weber & Hellmann, 2009).

1.8.4. Protein-Protein Etkileşimlerinde Yer Alan ERF Proteinleri

Post-transkripsiyonel düzenlemeye katılan enzimlerin geçici etkileşiminin haricinde, ERF proteinleri diğer transkripsiyonel düzenleyiciler ve yapısal proteinlerle kararlı kompleksler oluşturabilir. Çoğu durumda, bu etkileşimler ERF proteinlerinin lokalizasyonunu, stabilitesini, miktarını, transkripsiyonel aktivitelerini ve onların

hedef spesifikliğini belirler. Örneğin, Acyl-coA bağlanma proteinleri (ACBPs), bir ankyrin domaini aracılığıyla ERF-VII transkripsiyon faktörüne bağlandığı gösterilmiştir (Li vd, 2008). Özellikle *Arabidopsis thaliana* ACBP1 ve ACBP2 bir lipofilik N-terminal motifinin vasıtasıyla plazma membranı ile ilişkilidir ve onların membran bölgesinde ERF-VII RAP2.12 (Related to Apetala2.12)'yi tuttuğu söylenmiştir (Licausi vd, 2011). Bu yüzden stoplazmadan çekirdeğe giriş önlenir (Licausi vd, 2011). Çünkü ERF-VII proteinleri N-uç kuralını takiben hızlı proteazomal bozulmaya yatkın olduklarından dolayı ACBP'ler hücrelerde gerek duyulduğunda hedeflerinin hızlı bir şekilde aktivasyonuna izin veren potansiyel olarak diğer ERF proteinleri ve RAP2.12'nin rezervuarının sürdürülmesini sağlar (Licausi vd, 2011). Benzer bir şekilde, *Arabidopsis thaliana* ACBP4 stoplazmada ve çekirdeğin çevresinde RAP2.3 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Li vd, 2008). Fakat etkileşimin dinamiği henüz tanımlanamamıştır.

Ayrıca etkileşimin üyeleri de ERF transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini de etkileyebilir. Buna örnek olarak, *Arabidopsis*'de ERF3, SAP18 ve HDA19'dan oluşan kompleksi verilebilir. Bu kompleksde SAP18, ERF3'ün ERF ile ilişkili amfifilik baskılama (EAR) bölgesine histon deasetilasyon enzimi HDA19'u fiziksel olarak bağlayan bir köprü görevi yapmaktadır (Kagale & Rozwadowski, 2011). Bu kompleks etilen cevabı geninde bulunan histonların deasetillenmesi yoluyla aktif bir baskılayıcı olarak davranır, böylece onların aktivasyonlarını bastırır (Song & Galbraith, 2006). ERF7 gibi diğer ERF baskılayıcıları için deasetilleyici aktiviteye bağlantı SIN3 tarafından sağlanmaktadır (Song vd, 2005). Benzer olarak TPL ve TPR transkripsiyonel baskılayıcıları *Arabidopsis*'de EAR ve BRD içeren ERF'ler ile etkileşime girebilirler (Causier vd, 2012). Aynı zamanda homodimerizasyonun ERF transkripsiyon faktörleri üzerine bir etkisi olduğu da gösterilmiştir. Örneğin, *Arabidopsis* RAP2.4a'nın in vitro koşullarda spesifik sistein kalıntılarının oksidasyonu üzerine dimerize olduğu ve bir dimer olarak 2-Cys peroxiredoxin-A'nın promotörüne bağlanabileceğini göstermiştir. Oksidasyon in vivo'da ilerlediğinde daha fazla RAP2.4a alt ünitesinin dimer ile ilişkili olduğu anlaşılmış ve sonuçta bu da promotordan ayrışmaya neden olmaktadır (Shaikhali vd, 2008).

Ayrıca ERF transkripsiyon faktörlerinin hedef özgüllüğü etkileşimdeki diğer ortaklarına da bağlıdır. Bu hem gelişimsel programlar hem de stres cevabında

gözlemlendi. Örneğin Arabidopsis AP2-18 (DORNROSCHEN, DRN) ve AP2-19, sınıf III HD-ZIP transkripsiyonel düzenleyicileri PHAVOLUTA, PHABULOSA, REVOLUTA ve ATHB8 ile etkileşime girer (Prigge vd, 2005; Chandler vd, 2007). Bu etkileşimler HD-ZIP proteinleri ve AP2-18, AP2-19'un AP2 domainin PAS-benzeri domainin içerir (Chandler vd, 2007). Bu yüksek dereceli protein komplekslerinin, spesifik hücre tiplerinde hedefleri tanımlayan embriyo paterni kontrolünde transkripsiyonel bir birim olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür (Chandler vd, 2007). ERF proteinleri stres koşullarında transkripsiyonel cevap durumunda, hedeflerin belirli alt gruplarını aktive etmek için etkileşime girer. Bu RAP2.3 ve bZIP transkripsiyon faktörü TGA4 için geçerli olup, etkileşimi, her iki transkripsiyon faktörü için bağlayıcı elementler içeren Promotor aktivasyonunun artırılması ya da belirlenmesinde rolünün olduğu ileri sürülmüştür (Büttner & Singh, 1997).

1.8.5. Gelişimsel Süreçlerde Yer Alan ERF Transkripsiyon Faktörleri

AP2/ERF süper ailesinde, AP2 transkripsiyon faktörleri gelişimsel programların düzenlenmesinde rol alırken, ERF proteinleri esas olarak çevresel uyarılara veya hormonlara verilen yanıtlar çerçevesinde bu süreçleri etkiler. Etilene bağımlı transkripsiyonu düzenleyen ERF'ler, EIN3(ETHYLENE INSENSİTİVE3)'ün uyarılabilir etilen genlerinin downstream'inin ekspresyonunu pozitif ya da negatif olarak düzenler (Solano vd, 1998; Yang vd, 2005). Bazı ERF-VI proteinleri sitokininlere karşı transkripsiyonel cevaba aracılık eder, bu yüzden sitokinin cevabı faktörleri (CRF) olarak adlandırılırlar (Rashotte vd, 2006). Absisik aside duyarlı olmayan abi4 mutanlığı bir AP2/ERF proteinini kodlayan bir gende kodunda değişiklik vardır (Finkelstein vd, 1998) ve AP2 benzeri ABA represör 1 (ABR1), Arabidopsis'de ABA-responsive gen ekspresyonunu baskılar (Pandey vd, 2005).

Birkaç AP2/ERF proteini genleri ektopik olarak eksprese edildiğinde bitki morfolojisini etkilemektedir. Örneğin TINYT, ERF1 veya DREB1'in ektopik ekspresyonu, Arabidopsis'de bir cüce (dwarf) fenotipin görülmesi ve DREB2'nin ifadesi büyümenin gecikmesi ile sonuçlanır (Wilson vd, 1996; Liu vd, 1998; Solano vd, 1998). Bu cücelik ve yavaşlatma fenotipleri ektopik olarak ifade edilen ERF'ler tarafından aktive edilen savunma ya da stresle ilgili genlerin aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı belirtilmektedir (Solano vd, 1998).

Arabidopsis’de AP2-13 (AP2), AP2-05 (AINTEGUMENT, ANT) ve AP2-09 (ANT-LIKE1) genleri çiçek gelişimini ve ovul gelişimini düzenler (Jofuku vd, 1994; Elliott vd, 1996; Klucher vd, 1996; Mizukami & Fischer, 2000; Krizek, 2009). FRIZZY PANICLE (FZP) çeltik başakçığında çiçek meristemi kimliğinin oluşumu ve aksiller meristemlerin oluşumunu baskılamada gerekli olduğu bildirilmiştir (Komatsu vd, 2003). Mısırdaki AP2/ERF proteini Glossy15, yaprak epidermal hücre kimliğini düzenler (Moose & Sisco, 1994). Derinsu çeltiğinin boğumlar arası uzamasının anahtar düzenleyicisi olan SNORKEL genleri, etilen cevabında su altında uyarılmış büyümeyi tetikleyen AP2/ERF transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmıştır (Hattori vd, 2009). Fakat OsEATB (*Oryza sativa* ERF protein associated with tillering and panicle branching), biyosentetik bir giberellin genini downregüle ederek boğumlar arası uzamayı sınırlandırmaktadır (Qi vd, 2011). Oksine duyarlı AP2/ERF transkripsiyon faktörü olan CROWN ROOTLESS5 (CRL5) , sitokinin sinyalinin uyarılmasında, pirinçte kök tacının oluşumunun başlangıcında yer aldığı belirtilmiştir (Kitomi vd, 2011).

Bazı AP2/ERF proteinlerinin kök meristemlerinin gelişimini düzenlediği rapor edilmiştir. Örneğin; *Brassica napus*’da AINTEGUMENTA (ANT) ortoloğu ve AP2’nin alt ailesine ait olan BABY BOOM (BBM) proteinleri, somatik embriyoların spontan oluşumuna sebep olurken (Boutilier vd, 2002), DORNROESCHEN (DRN)’nin ektopik ekspresyonu, *Arabidopsis thaliana*’da sitokininden bağımsız kök oluşumunu uyardığı söylenmiştir (Banno vd, 2001). AP2-06 (PLETHORA1, PLT1) ve AP2-07 (PLT2) gibi ANT benzeri proteinler, Arabidopsis’de embriyonik temellerin oluşması esnasında kök hücrelerinin mikro çevrelerinin (niş) oluşturulması için kilit efektörler olarak rol aldığı söylenmiştir (Aida vd, 2004). Bir diğer araştırma bulgusu ise Wound Induced Dedifferentiation 1 (WIND1), *Arabidopsis thaliana*’da hücre farklılaşmasını kontrol ettiği bildirilmiştir (Iwase vd, 2011). Yaralanmadan sonra organ yenilenmesi sırasında, yetişkin somatik hücreler çoğunlukla hücre çoğalma potansiyelini yeniden kazanmak için dediferansiyasyon olurlar. WIND1 hücre farklılaşmasını ve hücre çoğalmasını pluripotent hücrelerin külesini oluşturmak üzere uyarır. WIND1’in ektopik ekspresyonu, ekzojen oksin ve sitokinin olmaksızın somatik hücrelerin farklılaşma durumunu oluşturmak ve sürdürmek için yeterlidir (Iwase vd, 2011). Bu yüzden WIND1, bitki hücrelerinin farklılaşabilme yeteneği ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bir başka AP2/ERF proteini olan RAP2.6 yaralanmış

Arabidopsis köklerinde dokuların tekrar birleşmesinde gereklidir (Asahina vd, 2011). Ek olarak AP2/ERF transkripsiyon faktörleri *Physcomitrella patens*'de kök hücre kimliğini belirlemektedir (Aoyama vd, 2012). *Arabidopsis thaliana*'daki ANT, PLT ve BBM'nin ortoloğu olan 4 *Physcomitrella* proteini, protonema hücrelerinden gametofor apikal hücrelerin oluşması için vazgeçilmez olduğu görülmüştür.

1.8.6. Birincil ve İkincil Metabolizmanın Düzenlenmesinde ERF Genleri

Grup I ve V' e ait ERF proteinleri, lipidlerin ve hücre duvarı bileşenlerinin biyosentezinde yer alan enzimleri kodlayan genlerin düzenlenmesinde yer aldığı görülmüştür. Arabidopsis'de SHINE (SHN) genlerinin aşırı ifadesi ya da ifadesinin azalmasının analizi, Arabidopsis'de kütin, suberin ve balmumu ile ilgili protein ailelerinin düzenlenmesinde yer alan transkripsiyon faktörlerinin aynı atadan geldiğini göstermiştir (Shi vd, 2011). *Medicago truncatula*'daki balmumu biyosentezi de bir ERF-V, WXP1'in kontrolü altındadır (Zhang vd, 2005). RAP2.12, HRE1 (Hypoxia Responsive ERF1) ve HRE2 (Hypoxia Responsive ERF2) adlı ERF-VII proteinleri sınırlı oksijen yokluğu altında bitkide fermentatif yolağın aktivasyonunda yer alır (Licausi vd, 2010b, 2011). Bu transkripsiyon faktörlerinin temel GCC kutusuna bağlandığı varsayımında bulunuldu ve in vitro testler bu olasılığı doğrulamıştır (Licausi vd, 2010b). Fakat ERF-VII RAP2.2'nin southwestern blotting assay ile bir ATCTA elementine bağlandığı görülmüştür ve aslında anaerobiyoz ile ilişkili genlerin promotorları bu gibi bir elemente sahiptir (Welsch vd, 2007). Stabil RAP2.12'nin ekspresyonu ile aerobik koşullar altında fermentatif yolların temel aktivasyonu transgenik bitkilerin fenotipinde anormalliklere yol açtığını ve yalnızca gerektiğinde ekspresyonlarının sınırlandırılmasının önemi vurgulanmaktadır (Licausi vd, 2011).

İkincil metabolizmaya ait yolların düzenlenmesinde ERF transkripsiyon faktörlerinin katılımı çoğunlukla çok fazla ilgi gösterilen farmasötik uygulamalar için bitki çalışmalarında üretilmektedir. Bu ikincil metabolitlerin özelliği jasmonat'a cevap vermesidir. Örneğin; ERF-IX *Artemisia annua* AaERF1 ve AaERF2 artemisin biyosentetik genlerinin ekspresyonunu düzenler (Yu vd, 2012). Benzer şekilde, jasmonat'a duyarlı *Catharantus roseus* ORCA2 ve ORCA3, terpenoid indol alkaloidlerinin biyosentezi için gerekli streptomisin sentezinin ekspresyonunu kontrol eder (Van Der Fits & Memelink, 2001). Ek olarak, tütünde NIC-2 lokusunda konumlanmış bir ERF-IX kümesinin, nikotin biyosentezinin jasmonat aracılığıyla

aktivasyonunun uyarılmasında gerekli olduğu görülmüştür (De Boer vd, 2011). IX (B3) grubuna ait tüm bu ERF'ler, jasmonat ile uyarılan metabolitlerin sentezini düzenlemek için farklı bitki soylarının erken evriminde görev aldığı söylenmiştir (De Boer vd, 2011).

1.8.7. Biyotik ve Abiyotik Stres Cevabında ERF Transkripsiyon Faktörleri

ERF proteinleri ilk olarak stres cevap genlerinin promotor bölgelerine bağlanan transkripsiyon faktörleri olarak izole edildi. Bu güne kadar incelenen ERF genleri, patojen enfeksiyonu, tuz stresi, osmotik stres, yaralanma, kuraklık, hipoksia, sıcaklık stresi ve stresle ilgili etilen, jasmonik asit ve ABA (Absisik Asit) hormonlarını içeren biyotik ve abiyotik stresler tarafından uyarılır (Finkelstein, 2013).

Birtakım ERF genleri çeşitli bitkilerde ektopik olarak ifade edildiğinde ve birçok durumda çeşitli biyotik streslere tolerans kazandırır. Örneğin birkaç ERF temel savunma ile ilgili genler, patojenez ile ilgili genler, osmotin, kitinaz ve b-1,3-glukonaz'ın transkripsiyonunu aktive eder. Fakat her ERF tarafından düzenlenen hedef genlerin dizisi tamamıyla aydınlatılamamıştır. ERF1 ve ERF-IX grubuna ait homologları muhtemelen *Arabidopsis thaliana*'daki patojen cevabı ile ilişkili en kapsamlı karakterize edilen ERF transkripsiyon faktörleridir (Lorenzo vd, 2003; Zarei vd, 2011; Moffat vd, 2012). Ayrıca birkaç ERF proteini etilen biyosentezini düzenler (Zhang vd, 2009; Li vd, 2011). Tütün OPBP1(Osmotin promoter binding protein 1), transgenik prinçte ektopik olarak eksprese edildiğinde patojenlere karşı dayanıklılığı artırır (Chen & Guo, 2008). *Arabidopsis RAP2.2*, *Botrytis cinerea*'da bitki dayanıklılığı ve etilen cevabında, pirinç OsERF922 ise *Magnaporthe oryzae*'da dayanıklılığı negatif bir şekilde düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır (Liu vd, 2012). Abiyotik stres cevabında en çok çalışılan ERF, DREB proteinleridir. DREB1/CBF alt ailesi üyeleri, soğuk stresine karşı cevap olarak hızlıca uyarılır ve ektopik olarak eksprese edildiğinde, dondurucu soğuğa karşı toleransı artırmaktadır (Jaglo-Ottosen vd, 1998; Liu vd, 1998; Kasuga vd, 1999). Buna karşın CBF1(The C-repeat-binding factor) veya CBF3 (The C-repeat-binding factor)'ü barındıran *Arabidopsis* RNAi hatlarında dondurucu soğuklara karşı toleransı azaltır (Novillo vd, 2007). DREB1/CBF üyeleri ektopik olarak eksprese edildiğinde *Arabidopsis* bitkilerinde bir dizi soğuk stresine karşı cevap genleri upregüle olmaktadır. Upregüle olan genler, karbonhidrat metabolizması ve yağ asidi sentezi için LEA proteini ve

enzimlerini içerir. Bu genler yağ asidi desaturasyonunda yer alan genler ve düşük sıcaklıklarda hayatta kalmak için önemli olduğu düşünülmektedir (Fowler & Thomashow, 2002; Maruyama vd, 2004). Metabolomik analizler, soğuk stresi anında biriken metabolitlerin çoğunun, Arabidopsis bitkilerinde DREB1/CBF'yi eksprese ettiği görülür (Cook vd, 2004; Maruyama vd, 2009). Dondurucu soğuk toleransı için kantitatif karakter lokusunun CBF2 ile ilişkili olması, soğuk ile uyarılabilir DREB1/CBF genlerinin Arabidopsis'de soğuk stresi yanıtının başlıca düzenleyicileri olduğuna işaret eder. Ek olarak CBF2'nin ektopik ekspresyonu Arabidopsis'de yaprak yaşlanmasını geciktirdiği görülmüştür ve bu da CBF'lerin büyümeyi yavaşlatarak soğuğa karşı dayanıklılığı artırdığını ve ilkbaharda sıcaklıklar artana kadar kış ayında çiçeklenmeyi ertelediği söylenmiştir (Sharabi-Schwager vd, 2010).

Arabidopsis veya çeltikteki birçok ERF-VII genin su altında ve oksijen yetmezliğine karşı cevap verdiği görülmüştür. Arabidopsis'de RAP2.12 gibi sürekli çalışan ERF-VII transkripsiyon faktörlerinin, oksijen yetersizliğine moleküler cevap için birincil tetikleyiciler olarak rol alması ve daha sonra hipoksi ile uyarılan ERF genlerinden olan HRE1 (Hypoxia Responsive ERF1) ve HRE2 (Hypoxia Responsive ERF2) tarafından sürdürüldüğü söylenmiştir (Licausi vd, 2010b). Su altı pirincinde Sub1A (Submergence 1) karbonhidrat birikimine sel sonrası toleransı artırmaya izin veren pasif bir stratejiye izin verirken, SK1 (SNORKEL1) ve SK2 (SNORKEL1) su seviyesinin etkisini azaltmak için boğumlar arası uzamayı uyarır (Hattori vd, 2009).

Çeşitli bitkilerdeki birkaç ERF geni ektopik olarak eksprese edildiğinde çoklu stres toleransı kazandırdığı görülmüştür (Yi vd, 2004; Seo vd, 2010; Fukao vd, 2011; Mito vd, 2011). Bu spesifik olmayan etki birincil streslerin sonucu olarak üretilen oksidatif patlamalar gibi genel bir stres durumunu hafifleten tolerans yollarının aktivasyonu ile açıklanmaktadır. Alternatif olarak, ERF'lerin ekspresyonu bitkiye belirli bir stres uygulandığında cevabı hızlandıran veya artıran genel bir uyarı durumuna getirilebilir.

1.8.8. ERF Genlerinin Genetik Mühendisliği/İslahının Tarımda Uygulanabilirliği

2050'ye kadar 9 milyara ulaşması beklenen dünya nüfusundaki artış tarımsal ürünlerin üretiminde ciddi bir sorun oluşturmaktadır (Xu vd, 2011). Gıda üretiminde sadece tarımsal uygulamaları iyileştirmekle elde edilemeyecek olan ihtiyaçlar için hem

tarımsal üretim artırılmalı hem de bu artışa katkıda bulunacak genetik mühendisliği uygulamaları ve ıslahı yapılmalıdır. Tarımsal ürünlerin verimi, suyun eksik ya da aşırı olması, yüksek toprak ve su tuzluluğu, soğuk ve kuraklık stresi gibi çevresel stres faktörlerinden ciddi şekilde etkilenmektedir. Bu yüzden kötü koşullara dayanabilen bitkilerin geliştirilmesi son derece önemlidir. Transkripsiyon faktörleri, stres toleransı veya daha yüksek verimle ilgili spesifik özelliklere sahip bitkilerin geleneksel veya genetik mühendisliği yardımıyla geliştirilmesinde önemli bir araç olarak kullanılabilir. Bunlardan özellikle ERF genleri en önemli transkripsiyon faktörleri arasındadır, çünkü bir dizi stres cevabı yolağını düzenlemede özelleşmişlerdir. Hedeflenen yaklaşımlar yoluyla tarımsal bitkilerin çeşitli stres şartlarına karşı toleransı artırmaya yönelik başarılı girişimlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Örneğin, yabani *Oryza sativa*'nın alt türü olan *indica*'dan gelen ERF-VII *Sub1a* geni sel baskınlarına daha dayanıklı bir varyete oluşturmak için çeltikte geriye melezlenmiştir (Xu vd, 2006). Ayrıca ERF genlerini eksprese etmek ya da endojen olanlarını fazla sentezlemek için transgenik yaklaşımlar tahıllara ve solanaceae familyasına ait farklı bitki türlerinde uygulanmıştır (Xu vd, 2011). Transkripsiyonel düzenleyicilerin ektojik ekspresyonunda gözlemlendiği gibi ERF'lerin aşırı ekspresyonu biyoteknolojik uygulamaları sınırlayacak olan büyüme bozukluklarına yol açmıştır (Pre vd, 2008). Fakat birkaç durumda elde edilen transgenik bitkiler stres olmayan koşullar altında yabani tip ile karşılaştırıldığında fenotipte bir değişiklik görülmemiştir. Fakat stres uygulamalarına tabi tutulduğunda, hayatta kalma ve ürün bakımından daha iyi performanslar sergilemiştir (Oh vd, 2005, 2009; Qi vd, 2011). Fakat bu raporların çoğu küçük çaplı testler ve kontrollü koşullara dayanırken, saha şartlarında denenmesi gerekecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. AP2-ERF Dizilerinin Tanımlanması ve Filogeninin Kurulması

İlk aşamada *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Carica papaya*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa subsp. japonica*, *Physcomitrella patens*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*, ve *Zea mays*'a ait olan AP2-ERF'yi kodlayan amino asit dizileri yerel blast sorgulama dizilerini oluşturmak için bitki transkripsiyon faktörleri veri tabanı

v4.0'dan elde edilmiştir. *Phaseolus vulgaris*'ten homolog peptidleri kodlayan genleri tanımlamak için PHYTOZOME v12 veri tabanından (www.phytozome.net) tblastn araştırması için *Phaseolus vulgaris* v2.1 genom verisi indirildi. Galaxy/GVL 4.1.0 *Phaseolus vulgaris* genom verisi temel alınarak yerel blast veritabanı oluşturuldu ve *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Carica papaya*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa subsp. japonica*, *Physcomitrella patens*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*, ve *Zea mays* bitkilerinin tblastn sorgulamaları gerçekleştirilmiştir. Tblastn yapılan dosyalar indirilerek Microsoft Office Excel kullanılarak gereksiz veriler elimine edilmiştir. Pytozome araçlarından phytomine'da excel dosyasındaki veriler kopyalanarak AP2 (APETALA2), RAV, ERF ve DREB ailesine ait genler tespit edilmiştir. Bu ailelere ait bulunan genlerin sekanslarının tümü InterProScan Sequence Search adlı web tabanlı server (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>) kullanılarak korunmuş AP2-ERF domaininin doğrulanması için analiz edilmiştir. PvAP2-ERF proteinlerinin nihai amino asit sekanslarının çoklu hizalamaları MEGA 6.0.1 kullanılarak MUSCLE ile gerçekleştirilmiştir. Sonra, hizalanan AP2-ERF proteinlerinin filogenetik ağaçları Neighbor-Joining (NJ) metodu aracılığıyla takip eden parametreler ile MEGA 6.0.1 kullanılarak yapılmıştır. Jones-Taylor-Thornton (JTT) modeli, gama dağılımı ve bootstrap methodu seçenekleri seçilerek filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Yapılan filogenetik ağaçlar ITOL v3 (<http://itol.embl.de/>) ile görselleştirilmiştir.

2.2. Intron/Exon Yapısı, Genom Dağılımı ve Motif Tahmini

AP2-ERF genlerinin intron exon yapılarını göstermek için *P. vulgaris* genomundan her tahmin edilen gene karşılık gelen DNA ve cDNA dizileri ve AP2-ERF'lerin intron dağılımı (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Pvulgaris)'den indirilmiştir. Şematik gen yapısı Gene Structure Display Server (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) varsayılan parametreler kullanılarak gösterilmiştir. Tüm PvAP2-ERF genlerinin nükleotid dizileri, bu genlerin fasulye kromozomlarında yerlerinin belirlenmesi için varsayılan ayarlar (www.phytozome.net) kullanılarak PHYTOZOME v12.0 veritabanına dayalı *P. vulgaris* dizilerinin BLASTN araştırması için sorgulama dizisi olarak kullanıldı. Genler 1. kromozomdan 11 kromozoma kadar fiziksel konum sıralarına göre dağıtıldı ve son olarak MapChart v2.2 (www.wageningenur.nl/en/show/Mapchart.htm) adlı bir

yazılım ile görselleştirildi. Ayrıca gen duplikasyonları Plant Genome Duplication Database baz alınarak çalışılmıştır. Aynı kromozom içinde bulunan PvAP2-ERF genleri tandem duplikasyon olarak karakterize edilmiştir. Parçalı duplikasyonlar için BLASTP sorgulaması fasulyede tanımlanmış PvAP2-ERF'nin tüm tanımlanmış peptid sekanslarına dayalı şekilde gerçekleştirilmiştir. AP2-ERF transkripsiyon faktörlerinin korunmuş motifleri takip eden parametreler ile MEME Suite Version 4.11.3 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) web tabanlı sekans analiz aracılığıyla tespit edilmiştir. Yapılan işlemde optimum genişlik 80-100 amino asit, herhangi bir sayıda motif tekrarlanması ve maksimum motif sayısı 10 olarak ayarlanmıştır. Ortaya çıkan motiflerin biyolojik kaynağını belirlemek için, NCBI Conserved Domain Database veritabanında conserved domains aracı kullanılarak genlerimizin dizilerini içeren fasta formatındaki dosyalar yüklenip analiz edilmiştir.

2.3. 3D Protein Homolojisinin, Moleküler ve Fizikokimyasal Parametrelerin Tahmini

Çıkarım yapılan fasulye AP2-ERF proteinlerinin izoelektirik noktası (pI), amino asit bileşimi, moleküler ağırlığı ve değişkenlik indeksleri ProtParam aracı (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) kullanılarak belirlenmiştir. Sub-cellular yerleşim (http://bioinfo.eie.polyu.edu.hk/mGoaSvmServer2/mGOASVM_v2.html) mGOASVM kullanılarak araştırılmıştır. PROSOII web tabanlı yazılım proteinlerin sekans bazlı çözünebilirliğini tahmin etmek için kullanılmıştır. PvAP2-ERF proteinlerinin 3D protein yapısını tahmin için Phyre2 sunucusu (Protein Homology/Analogy Recognition Engine) kullanılmıştır. İlk olarak tüm PvAP2-ERF protein sekansları varsayılan parametreler ile Protein Data Bank'ında (PDB) araştırılmıştır. Sonra veri benzer sekansa sahip en iyi şablon ve bilinen 3 boyutlu yapının tanımlanması için "intensive" modu ile Phyre2 sunucusunda analiz edilmiştir.

2.4. Tahmini PvAP2-ERF Promotor Bölgesinin ve miRNA'ların Hedeflenmesinin Analizleri

Fasulye de toplam 180 AP2-ERF geni, tanımlanmış genlerin promotor sekanslarını elde etmek için Phytozome v12.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>)

2000 bp'lik upstream bölge indirilmiştir. PvAP2-ERF'lerin transkripsiyonel başlangıç bölgesinin 2000 bp'lik upstream fragmenti cis elementleri tanımlamak için promotor bölgesi olarak belirlenmiştir. Promotor sekanslarının tanımlanmış cis elementleri place veritabanı (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) kullanılarak analiz edilmiştir. miRNA' ve onların hedef PvAP2-ERF genlerinin biyoinformatik ve tahmin analizleri web tabanlı psRNA Target server'da (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) gerçekleştirilmiştir.

2.5. Gen Ontolojisi (GO) ve Fonksiyonel Anlamlandırma

AP2-ERF sekanslarının anlamlandırılması ve fonksiyonel karakterizasyonu her BLAST isabeti için GO terimleri ve anlamlandırmayı belirlemek için sekans tabanlı bir araç olan Blast2GO v4.1 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üç ana kategorinin her biri için (Biyolojik Proses-BP, Moleküler Fonksiyon-MF, Hücresel Komponent- HK) GO terimi varsayılan parametreler kullanılarak sekans benzerliği elde edilmiştir. İlk olarak fasulye amino asit sekansları BLASTP sorgulama olarak kullanılmıştır. BLAST sorgulaması 1×10^{-5} e-value değeri ile NCBI'da non-redundant (NR) veritabanı kullanılarak gerçekleştirilip herbir sekans için en yüksek 100 hizalama daha ileriki analizler için kullanılmıştır. Ortaya çıkan Multi Blast veri koleksiyonu bir Blast2GO projesine dönüştürülmüştür. GO anlamlandırması her bir aday GO terimi için bir anlamlandırma skoru hesaplayan Blast2GO anlamlandırma kuralı uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

2.6. Protein-Protein İnteraksiyonu Ağlarının Tahmini

Fasulye interactome verisi için hiçbir referans olmadığından dolayı, *Arabidopsis thaliana*'daki protein-protein etkileşimi ağları baz alınmıştır. İlk olarak, PvAP2-ERF sekansları Inparanoid8'de (<http://inparanoid.sbc.su.se/cgi-bin/index.cgi>) Arabidopsis homolog sekanslarını araştırmak için blast araştırması yapılmıştır. İkinci olarak Arabidopsis ortologlarının (AtAP2-ERFs) eşik bilgi dosyası (querynw.sif) AraNet (<http://www.functionalnet.org/aranet/>) aracılığıyla oluşturulup PvAP2-ERF üyelerinin bir eşik bilgi dosyasını oluşturmak için PvAP2-ERF verilerine yerleştirilmiştir. Son olarak, PvAP2-ERF'nin protein-protein etkileşim ağları Cytoscape v3.2.1 (National Institute of General Medical Sciences, MD, USA) ile görselleştirilmiştir.

2.7. PvAP2-ERF Genlerinin In Silico Ekspresyon Analizi

Yüksek tuz konsantrasyonunda fasulye kök ve yaprak dokularında PvAP2-ERF genlerinin evrensel ifade modelini anlamak için Hiz ve arkadaşları (2014) tarafından daha önce rapor edilen Illumina RNA-seq verisi kullanılmıştır. Sekans okumaları, SRR957668 (Tuz uygulanmış yaprak), SRR957667 (kontrol grubu yaprakları), SRR958472 (Tuz uygulanmış kökler) ve SRR958469 (Kontrol grubu kökler) Sekans Okuma Arşivinden (SRA) elde edilmiştir. FastQC ile belirlenen düşük kalite okumalar (Phred quality (Q) score < 20) CLC Genomic Workbench 8.0 ile düzeltilmiştir. Gen ekspresyonu değerlerinin normalizasyonu the reads per kilobase of exon model per million mapped reads (RPKM) algoritması ile gerçekleştirilmiştir.

2.8. Bitki Materyalleri, Büyüme Koşulları ve Tuz stresi Uygulamaları

Tuza toleranslı yerel bir fasulye çeşidi olan İspir tohumları % 5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk bekletilerek saf distile su ile 5 kez yıkanmıştır. Sonra otoklavlanmış toprak ve vermiküleyt içeren saksılara ekilmiştir. Hoagland sıvı besin çözeltisi ile sulanmıştır. Fideler $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ile 16/8 saat fotoperiyot altında 24°C ve % 50-60 bağıl nem'de büyüme kabiniinde büyütülmüştür. Hoagland çözeltisi, üç yapraklı aşamaya gelinceye kadar bir büyüme kabiniinde fidelere uygulanmıştır. Tuz stresi vermek için fasulye bitkileri 16 günlük iken 150 mM NaCl içeren Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. Tuz stresi uygulandıktan 9 gün sonra tuz uygulanmış ve kontrol bitkilerinden kök ve yaprak dokularından qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi yapmak için bitkilerden RNA izolasyonu yapılmıştır.

2.9. RNA Ekstraksiyonu ve Kantitatif real-time PCR Analizi

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) 150 mM tuz uygulamasından sonra toplanan yaprak ve kök dokularının total RNA'larını izole etmek için kullanılmıştır. İzole edilen Total RNA'lar NanoDrop 2000 UV-VIS spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) kullanılarak miktar tayini ve Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) kullanılarak kalite analizi yapılmıştır. cDNA, RevertAid™ First Strand cDNA sentez kit'i (Thermo Scientific, USA) ile 20 μl 'lik bir reaksiyon hacminde 1 μg DNase I ile muamele edilmiş toplam RNA'dan sentez edilmiştir. Tuz stresi üzerine

RNA-seq analizinde farklı şekilde yükselmiş ekspresyon seviyesi görülen *PvAP2-ERF* transkripsiyon faktörü ailesi genlerinin doku-spesifik ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. qRT-PCR amplifikasyonları varsayılan parametreler ile BioRad CFX96 cihazı (BioRad, Hercules, CA) ile gerçekleştirilmiştir. RNA-seq analizinde daha yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiğinden dolayı, *PvAP2-ERF100*, *PvAP2-ERF111*, *PvAP2-ERF119*, *PvAP2-ERF177*, *PvAP2-ERF69*, *PvAP2-ERF70*, *PvAP2-ERF72*, *PvAP2-ERF150* ve *PvAP2-ERF53* genleri için primerler hem kök hem de yaprak dokuları için dizayn edilmiştir. Primer sekansları (EK 3)'de listelenmiştir. PCR reaksiyonları üretici protokolüne göre SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Biorad) kullanılarak 96 kuyucuklu optik reaksiyon plate'lerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bir kalıp olarak 20 ng cDNA örneği kullanılarak kurulmuştur. Tüm reaksiyonlar üçlü biyolojik kopyalarla 3 kez tekrar edilip veri $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

2.10. Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı

Transformasyon çalışmalarında *Nicotiana tabacum* L. cv. Petite havana kullanılmıştır. Petite havana tohumları 1.5 ml mikrosantrifüj tüp içerisine % 20'lik sodyum hipoklorit eklenip 20 dk bekletilerek steril edilmiştir. Sonra 5 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Steril edilen tütün tohumları MS büyüme ortamına (MS (4.4 g/L) + Sükroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) ph:5.8) ekilmiştir. 24 °C'de 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilip büyütülmüştür. Gen aktarılanlara kadar bitkiler 20-25 günde bir yeni bir MS besisi ortamı hazırlanarak alt kültüre alınmıştır.

2.11. Kullanılan Bakteri Suşları ve Plazmidler

Gen aktarım çalışmalarında *Escherichia coli* (Dh5 α) ve *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakteri suşu ile pIPKb004 ve pENTR™/D-TOPO plazmitleri kullanılmıştır.

2.12. Bakteriyel Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları

Escherichia coli ve *Agrobacterium tumefaciens* bakterilerinin büyüme ortamlarında LB ve YEB kullanılmıştır.

2.13. Primer Dizaynı

Vector NTI, GENTLE ve Primer 3 programları kullanılarak AP2-ERF 31 geni için primer dizayn edilmiştir. Forward primerin 5' ucuna Gateway klonlama sistemindeki giriş vektörüne uyumlu olan CACC bölgesi eklenmiştir.

Çizelge 2.1. *PvAP2-EFR31* geni için dizayn edilen primerler

PvAP2-EFR31 Primerleri	
Forward Primer	CACCATGGTAGAGAAGAAGAAAAA
Reverse Primer	TTAAAGCGAAGAGTCCCAGA

2.14. Fasulye Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Tuza toleranslı yerel bir fasulye çeşidi olan İspir tohumları % 5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk bekletilerek saf distile su ile 5 kez yıkanmıştır. Sonra otoklavlanmış toprak ve vermiküleyt içeren saksılara ekilmiştir. Hoagland sıvı besin çözeltisi ile sulanmıştır. Fideler $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ile 16/8 saat fotoperiyot altında 24°C ve % 50-60 bağıl nem'de büyüme kabininde büyütülmüştür. Hoagland çözeltisi (Hoagland and Arnon, 1950), üç yapraklı aşamaya gelinceye kadar bir büyüme kabininde fidelere uygulanmıştır. Tuz stresi vermek için fasulye bitkileri 16 günlük iken 150 mM NaCl içeren Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. Tuz stresi uygulandıktan 9 gün sonra RNA izolasyonu için yaprak ve kök dokularından örnek alınıp -80°C 'de depolanmıştır.

2.15. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için havanlar, pipet uçları, pensler, saf su ve diğer malzemeler iki kez otoklavlanmıştır. Havanlar RNA izolasyonuna başlamadan önce sıvı azot ile soğutulmuştur. Ellerimizdeki RNase kalıntılarında kurtulmak için RNaseZap® RNase Decontamination Solution adlı sprey ellere püskürtülüp temizlenmiştir.

RNA izolasyonunda QIAGEN RNeasy® Plant Mini Kit kullanılmıştır. 100 mg bitki örneği sıvı azot ile havanda tamamen ezilmiştir. Ezilen bitki örneği sıvı nitrojen

ile soğutulan 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Mikrosantrifüj tüp içindeki örnek üzerine 450 µl Buffer RLT eklenerek iyice vortekslenmiştir. Lizat QIAshredder spin kolona (eflatun renkli) eklenip maksimum hızda 2 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant 2 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Süpernatant hacminin yarısı kadar etanol (%100-96) eklenip pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanmıştır. Örnek RNeasy spin kolona (pembe) transfer edilip 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolonun alt kısmında biriken sıvı kısım atılmıştır. RNeasy spin kolonuna 350 µl Tampon RW1 eklenerek 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Alt kısma toplanan sıvı kısım atılmıştır. 70 µl RDD tamponu üzerine 10 µl DNaz I eklenmiş ve nazik bir şekilde alt üst edilerek karışması sağlanmıştır. Hazırlanan 80 µl DNaz I ve tampon karışımı RNeasy spin kolonuna eklenip oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. 350 µl tampon RW1 RNeasy spin kolona eklenip 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılmıştır. RNeasy spin kolona 500 µl tampon RPE eklenip 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılmıştır. RNeasy spin kolona 500 µl tampon RPE eklenip 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılmıştır. Etanol artıklarını uzaklaştırmak için kolon 1 dakika boş olarak maksimum hızda santrifüj edilmiştir. RNeasy spin kolon 1.5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpe konmuştur. Kolonun tam merkezine gelecek şekilde 40 µl RNase-free su eklenip oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonunu artırmak için tüpün alt kısmındaki RNA tekrar kolonun merkezine uygulanmış ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir. 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Elde edilen RNA uzun süre muhafaza edilebilmesi için -80 °C'ye koyulmuştur.

2.16. cDNA Sentezi

cDNA sentezinde Thermo Scientific™ RevertAid™ First Strand cDNA sentez kiti kullanılmıştır. İlk aşamada çizelge 2.2'de verilenler steril edilmiş 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne koyulmuştur.

Çizelge 2.2. cDNA sentezi için ilk aşamada gerekli bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Yaprak	Kök
RNA (Total RNA)	1 µg (1.8 µl)	1 µg (2.5 µl)
Primer (Oligo (dT)₁₈ Primer)	1 µl	1 µl
H₂O	9.2 µl	8.5 µl
Toplam	12 µl	12 µl

Reaksiyon içeriğinin olduğu tüp çok kısa bir şekilde santrifüj edilmiştir. Ardından Çizelge 2.3'teki bileşenler eklenmiştir.

Çizelge 2.3. cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Yaprak	Kök
5X Reaction Buffer	4 µl	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20U/ µl)	1 µl	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl	2 µl
RevertAid M-MuLV RT (20U/ µl)	1 µl	1 µl

Toplam hacmi 20 µl olan reaksiyon kısa bir santrifüj yapılarak 42°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon işlemi durdurmak için 70°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Elde edilen cDNA ürünü -20 °C'ye konmuştur.

2.17. cDNA PCR İşlemi

PCR işlemine başlamadan önce PvAP2-EFR31 geni dizayn ettirdiğimiz primerlerin bağlanma sıcaklığı (T_m değeri) hesaplanmıştır bu işlem için NEB T_m Calculator aracı kullanılmıştır. Bu işlem sonucunda bağlanma sıcaklığı 63°C olarak hesaplanmıştır ve başka bir örnek denemesi için de bağlanma sıcaklığı 2 °C azaltılarak 61°C'lik yeni bir reaksiyon hazırlanmıştır. PCR koşulları Çizelge 2.4'e göre yapılmıştır. PCR reaksiyonunda Çizelge 2.5' teki bileşenler kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. PCR koşulları

PvAP2-EFR31		
	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyonu	98°C	30 sn
Denatürasyon	98°C	10 sn
Bağlanma	61-63°C	30 sn
Uzama	72°C	30 sn
Son Uzama	72°C	5 dk

Çizelge 2.5. *PvAP2-ERF31* genini PCR'la çoğaltmak için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µL)
Q5 reaction buffer	5
10mM dNTP	0.5
Forward primer	1.25
Reverse primer	1.25
cDNA	1
Q5 high fidelity DNA polymerase	0.5
Nuclease free water	15.5

PCR işlemi bittikten sonra DNA'lar % 1'lik agaroz jelde 80 volt 400 mA'de 45 dakika yürütülmüştür.

2.18. Kompetan *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetant *E.coli* hazırlamak için öncelikle tampon 1 ve tampon 2 hazırlanmıştır.

Çizelge 2.6. Tampon 1

Potasyum asetat ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$)	10 mM
RuCl_2	100 mM
CaCl_2	10 mM
Gliserol	8.6 ml
dH_2O	50 ml'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 2.7. Tampon 2

TAMPON 2	
MOPS	10 mM
RuCl_2	10 mM
CaCl_2	75 mM
Gliserol	8.6 ml
dH_2O	50 ml'ye tamamlanır

Tampon 2 malzemeleri 50 ml'lik bir santrifüj tüpüne katılıp iyice çözündürülmüştür. pH'ı KOH ile 6.5'e ayarlanarak filtre sterilizasyonu yapılmıştır. Kullanılmak üzere 4 °C'de bekletilmiştir.

Escherichia coli (*E. coli*) DH5 α bakteri suşu gliserol stoğundan alınarak 50 μl çizgi ekim tekniği ile LA'ya ekim yapılmıştır. Tek koloni alınıp 50 ml'lik falkon tüplere 10 ml ekim yapıp 16 saat 37 °C 200 rpm'de gece boyu inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Sabah kültürden 2 ml alınıp 100 ml LB'ye ekim yapılarak 37 °C 200 rpm'de optik dansitesi O.D 600= 0.4-0.7 olunca 100 ml'lik bakteri kültüründen 50 ml'lik iki falkon tüpe bölünmüştür ve 15 dk buzda bekletilmiştir. Sonra 4 °C'de 5 dk 3500 rpm'de santrifüj yapıp bakteriler çöktürülmüştür. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst sıvı fazı dökülüp buzda bekletilmiş olan tampon 1'den 5 ml falkon tüplerin üzerine eklenerek pipet kullanılarak bakteri çözündürülmüştür. Sonra 4 °C'de 5 dk

3500 rpm'de santrifüj yapıp çöktürülmüş ve sıvı kısmı dökülmüştür. Daha sonra buzda bekletilmiş tampon 2'den 2 ml her bir falkon tüpe eklenmiş ve mikropipet ile nazik bir şekilde pipetaj yapılarak çözülmüştür. Sonra bu çözeltiyi 1.5 ml'lik soğuk santrifüj tüplerine 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. 30 dk buzda bekletilip sıvı nitrojen ile dondurulduktan sonra -80 °C'de depolanmıştır.

2.19. Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) *PvAP2-EFR31* Geninin Klonlanması

PCR ile çoğaltılan *PvAP2-EFR31* geni pENTR™/D-TOPO Cloning Kit (Invitrogen) kullanılarak giriş vektörüne atılmıştır. *PvAP2-EFR31* PCR ürünü 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisinde 1/5 oranında olacak şekilde PCR ürününden 1 µl ve 4 µl saf steril su ile karıştırılarak seyreltilmiştir. Ligasyon için çizelge 2.8'deki malzemeler 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisinde karıştırılıp 25 °C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 2.8. Gateway klonlama sisteminde giriş vektörü için kullanılacak bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar
PCR ürünü	1
Tuz çözeltisi	1
pENTR™/D-TOPO vektör	1
H ₂ O	3

Kompetant *E.coli* bakterilerinin bulunduğu tüpler buz üstüne konarak ligasyon örneğimizden 2 µl eklenip karışması sağlanmıştır. 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Tüplere 42 °C'de 30 saniye ısı şoku uygulanmıştır. Hemen vakit geçirilmeden buz üstüne alınmıştır. Tüpler içerisine 250 µl SOC besi ortamı eklenip 37 °C'de 60 dakika 200 rpm'de sallanarak inkübasyona bırakılmıştır. İçerisinde seçici antibiyotik kanamisin (50 mg/ml) içeren oda sıcaklığındaki katı LB besin ortamına 100 µl bakteri yayılıp 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edilmiştir.

2.19.1. Koloni PCR

PvAP2-EFR31 geninin klonlanıp klonlanmadığını anlamak için koloni PCR yapılmıştır. Kanamisin (50 mg/ml) içeren seçici ortamdan bakteri kolonileri numaralandırılarak seçilmiştir. Seçilen her bir koloni için ayrı PCR tüpü hazırlanıp her

bir koloniden pipet ucu ile bakteri alınmıştır. Çizelge 2.9'daki bileşenler ile karıştırılıp PCR yapılmıştır. PCR şartları Çizelge 2.10'deki koşullar uygulanmıştır.

Çizelge 2.9. Koloni PCR için kullanılacak bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Master mix	10 µL
F primer	1 µL
R primer	1 µL
Su	18 µL

Çizelge 2.10. *PvAP2-EFR31* Koloni PCR koşulları

<i>PvAP2-EFR31</i>	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyonu	94°C	2 dk
Denatürasyon	94°C	20 sn
Bağlanma	51°C	10 sn
Uzama	72°C	40 sn
Son Uzama	72°C	5 dk

2.19.2. Plazmit izolasyonu ve dizileme

PCR sonucu belirlenmiş olan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için bakteriler, içerisine kanamisin (50 mg/ml) eklenmiş 10 ml sıvı LB besin ortamında 37 °C 200 rpm'de 1 gece boyunca inkübatörde büyütülmüştür. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılmıştır. Deneyde yapılan tüm santrifüjler oda sıcaklığında yapılmıştır. Büyütülmüş olan 10 ml'lik bakteri 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Sıvı kısım dökülüp çöktürülen bu bakteri 2 ml sıvı LB ile tekrar çözülmüştür. Çözülen bakteri 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra sıvı faz atılarak pellet üzerine 250 µl resuspension solution eklenip vorteks ile pellet çözülmeye kadar iyice karıştırılmıştır. Pellet çözüldükten sonra 250 µl Lysis Solution eklenip viskoz ve hafif berrak hale gelene kadar tüp ters düz edilmiştir. 350 µl Neutralization Solution eklenip tüp 5 kez alt üst edilip 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant pellete dokunulmadan alınıp GeneJET spin kolona

aktarıldıktan sonra 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra kolona 500 µl Wash Solution eklenip 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra aynı şekilde kolona 500 µl Wash Solution eklenip 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılıp kolondaki etanol kalıntılarının uzaklaştırılması için tüp boş olarak 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon temiz steril bir 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. 50 µl steril saf su kolonun tam merkezine gelecek şekilde eklendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika beklenip 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen plazmidler M13 primer ile birlikte dizilemeye gönderilmiştir. M13 F: GTAAAACGACGGCCAG ve M13 R: CAGGAAACAGCTATGAC primerleri kullanılarak MedSanTek firması tarafından dizilemesi yapılmıştır.

2.20. *PvAP2-EFR31* Geninin Bitki Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Gateway® LR Clonase® II enzim karışım kiti ile iki 35S promotörü ve seçici antibiyotik geni olan *HptII*’yi içeren pIPKb004 vektörüne aktarılmıştır. *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon için oluşturulmuş olan bitki ifade vektörü dizileme sonucu doğrulanan plazmitler ile ifade vektörünü oluşturmak için LR reaksiyonu yapılmıştır. Çizelge 2.11’de verilen bileşenler 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp 2-3 saniye kısa bir santrifüj yapılmıştır.

Çizelge 2.11. Bitki ifade vektörüne *PvAP2-ERF31* genini klonlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar
Giriş vektörü (700 ng)	0.5 µL
pIPKb004 vektörü (300 ng)	0.5 µL
TE tamponu (pH:8.0)	7 µL
LR Clonase™ II enzimi	2 µL

25 °C’de 1 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra reaksiyonu sonlandırmak için 1 µl proteinaz K eklenip vortekslenmiştir. Daha sonra 37 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. 1 µl LR reaksiyon ürünü kompetan *E.coli* bakterisinin üzerine eklenip 10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Mikrosantrifüj tüp içerisindeki bakterinin üzerine 250 µl SOC medium eklenip 200 rpm 37 °C’de 1 saat çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Genimizi içeren pIPKb004 vektörüne sahip bakteri kolonilerini seçmek için spektinomisin (100mg/ml) antibiyotiği içeren LB besin

ortamı hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında ısıtılmış olan spektinomisin (100mg/ml) içeren katı LB ortamına 50 µl bakteri yayılarak 1 gece boyunca (ortalama 14-16 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Genimizi içeren pozitif kolonileri belirlemek için *PvAP2-EFR31* ve *HptII* genine özel primerleri ile koloni PCR yapılmıştır. PCR tüplerinin içerisine Çizelge 2.12 de verilen bileşenler ile belirlenen kolonilerden eklenerek Çizelge 2.13 deki reaksiyon şartlarına göre PCR yapılmıştır. Reaksiyonda 2X PCR Master mix Solution (i-Taq) kullanılmıştır.

Çizelge 2.12. Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarlar

Bileşen	<i>PvAP2</i>	<i>HptII</i>
Master Mix	10 µL	10 µL
10 µM F primer	1 µL	1 µL
10 µM R primer	1 µL	1 µL
dH ₂ O	8 µL	8 µL

Çizelge 2.13. Koloni PCR şartları

	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	94°C	2 dk	94°C	2 dk
Denatürasyon	94°C	20 sn	94°C	20 sn
Bağlanma	48°C	10 sn	50°C	10 sn
Uzama	72°C	40 sn	72°C	40 sn
Son uzama	72°C	5 dk	72°C	5 dk

PCR sonucundan sonra örnekler %1'lik agaroz jelde 80 volt 400 mA'de 45 dakika yürütülmüştür. Sonra pozitif olan kolonilerden birisi transformasyon için seçilmiştir.

2.20.1. Plazmit izolasyonu

PCR sonucu belirlenmiş olan kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için bakteriler, içerisine kanamisin (50 mg/ml) eklenmiş 10 ml sıvı LB besin ortamında 37 °C 200 rpm'de 1 gece boyunca inkübatörde büyütülmüştür. Plazmit izolasyonu için Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep kit kullanılmıştır. Deneyde yapılan tüm santrifüjler oda sıcaklığında yapılmıştır. Büyütülmüş olan 10 ml'lik bakteri 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Sıvı kısım dökülüp çöktürülen bu bakteri 2 ml sıvı LB ile tekrar çözülmüştür. Çözülen bakteri 2 ml'lik mikrosantrifüj

tüpüne aktarılıp 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra sıvı faz atılarak pellet üzerine 250 µl resuspension solution eklenip vorteks ile pellet çözülmeye kadar iyice karıştırılmıştır. Pellet çözüldükten sonra 250 µl Lysis Solution eklenip viskoz ve hafif berrak hale gelene kadar tüp ters düz edilmiştir. 350 µl Neutralization Solution eklenip tüp 5 kez alt üst edilip 13000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant pellete dokunulmadan alınıp GeneJET spin kolona aktarıldıktan sonra 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra kolona 500 µl Wash Solution eklenip 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Sıvı kısım atıldıktan sonra aynı şekilde kolona 500 µl Wash Solution eklenip 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılıp kolondaki etanol kalıntılarının uzaklaştırılması için tüp boş olarak 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon temiz steril bir 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. 50 µl steril saf su kolonun tam merkezine gelecek şekilde eklendikten sonra oda sıcaklığında 2 dakika beklenip 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

2.21. İpk Vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*’e (AGL1) Transformasyonu

2.21.1. Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterilerinin hazırlanması

Boş *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) 10 ml sıvı LB besin ortamına ekilerek 1 gece boyunca 28 °C’de 200 rpm de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bir gece öncesi ekilip büyütülen bakterilerden, 500 ml LB besin ortamına eklenmiştir. 28 °C’de 250 rpm’de OD₆₀₀: 0.5-0.8’e ulaşana kadar büyütülmüştür. Daha sonra buz üstüne alınmıştır. Bakteriler 4000 g de 4 °C’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet üzerine 10 ml steril soğuk su eklenmiştir. Pellet pipetle dikkatli bir şekilde pipetaj yapılarak çözülmüştür. Sonra üzerine 500 ml soğuk steril su eklenmiştir. 4000 g de 4 °C’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşama ikinci kez tekrar edilmiştir. Sıvı kısım dökülüp pelletin üzerine 50 ml soğuk steril su eklenip çözülmüştür. 4000 g de 4 °C’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılıp pelletin üzerine 5 ml %10 luk soğuk steril gliserol eklenerek pellet pipetle çözülmüştür. Kompetant hücreler daha önceden sıvı azot ile soğutulmuş olan buz üzerindeki 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplere 50 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. Tüpler kapatıldıktan sonra üzerlerine sıvı azot dökülüp soğutulduktan sonra -80 °C’de depolanmıştır.

2.21.2. Elektrokompentan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterilerine Ipk vektörünün transformasyonu

PvAP2-EFR31 genini içeren pIPKb004 vektörü *A. tumefaciens* (AGL1) bakterilerine elektroporasyon (Biorad) cihazı ile transforme edilmiştir. Elektroporasyonda kullanılacak küvetler buz üzerine önceden yerleştirilip soğutulmuştur. Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) buz üzerine yerleştirilmiştir. 50 µl bakteri üzerine 3 µl LR reaksiyonu sonucu büyüttüğümüz bakterilerden elde edilen *PvAP2-EFR31* genini içeren pIPKb004 vektörü eklenmiştir. Daha sonra bunlar elektroporasyon küvetine alınıp işlem gerçekleştirilmiştir. İşlem gerçekleştirildikten sonra çok hızlı bir şekilde hücrelerin üzerine 1 ml YEB besin ortamı eklenip 28 °C 200 rpm'de 3 saat büyütülmüştür. Daha sonra spektinomisin (100 mg/ml), carbenicillin (50 mg/ml) ve rifampisin(10 mg/ml) antibiyotikleri içeren katı YEB besin ortamına 100 µl bakteri yayılarak 28 °C'de inkübasyona bırakılıp iki gün boyunca büyütülmüştür.

2.21.3. Koloni PCR

İki gün boyunca büyütülmüş olan bakterilerden bütün transformasyonu için PCR yapılarak pozitif koloniler seçilmiştir. PCR işlemi *PvAP2-EFR31*, *HptII* ve *VirD* genleri için dizayn edilmiş primerler ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.14. *VirD*, *HptII* ve *PvAP2-EFR31* genlerine özel primer dizileri

	Forward primer	Reverse primer
<i>Vir D</i>	5'-CCGCTTATCAAAGCAGCGA C-3'	5'- TCTGGAGGCACAACCGAT TC-3'
<i>HptII</i>	5'-GATGTAGGAGGGCGTGGA TA -3'	5'- ATAGGTCAGGCTCTCGCT GA-3'
<i>PvAP2- EFR31</i>	5'- CACCATGGTAGAGAAGAAGAA AAA-3'	5'- TTAAAGCGAAGAGTCCCA GA -3'

Çizelge 2.14'de verilen bileşenler PCR tüplerine koyularak seçilmiş kolonilerden alınan bakteriler eklenmiştir. Çizelge 2.15'deki içerik ve Çizelge 2.16 da verilen koşullara göre PCR yapılmıştır.

Çizelge 2.15. Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar		
	<i>PvAP2-EFR31</i>	<i>HptII</i>	<i>VirD</i>
Master mix	10 µL	10 µL	10 µL
F primer	1 µL	1 µL	1 µL
R primer	1 µL	1 µL	1 µL
Su	8 µL	8 µL	8 µL

Çizelge 2.16. Koloni PCR şartları

	<i>PvAP2-EFR31</i>		<i>HptII</i>		<i>VirD</i>	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	94°C	2 dk	94°C	2 dk	94°C	4 dk
Denatürasyon	94°C	20 sn	94°C	20 sn	94°C	30 sn
Bağlanma	48°C	10 sn	50°C	10 sn	58°C	30 sn
Uzama	72°C	40 sn	72°C	40 sn	72°C	1 dk
Son uzama	72°C	5 dk	72°C	5 dk	72°C	5 dk

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde 80 volt 400 mA'de 45 dakika yürütülmüştür. Pozitif çıkan koloniler tütüne gen aktarımında kullanılmıştır.

2.22. *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Tütün Transformasyonu

2.22.1. *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterilerinin büyütülmesi

PvAP2-EFR31 genimizi içeren *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterileri karbenisilin (100 mg/l), spektinomisin (100 mg/l) ve rifamisin (10 mg/l) antibiyotiklerini içeren 50 ml sıvı LB ortamında 28°C'de 200 rpm de 1 gün boyunca büyütülmüştür.

2.22.2. *Agrobacterium tumefaciens* ile tütün yapraklarının inokülasyonu

2 ay boyunca MS (MS (4.4gr/l), fitajel (2.8gr/l) ve sükröz (30gr/l) pH:5.8) besin ortamında büyütülmüş olan tütünlerin yaprakları gen aktarımı için kullanılmıştır. 0.5-1 cm² çapında tütün yaprakları kesilerek bir gün öncesinden büyütülmüş olan bakteri kültürü içerisinde 30 dk bekletilmiştir. İnokülasyon işleminden sonra yapraklar katı MS (MS, BA(1mg/l), NAA (0.1mg/l)) ortamına alınarak 3 gün boyunca karanlık ortamda bekletilmişlerdir. Ko-kültivasyondan sonra üzerinde fazla bakteri büyümesi olan yapraklardan bakterileri uzaklaştırmak için timentin (160mg/l) içeren sıvı MS besiyerinde yıkanıp steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur. Gen aktarılmış bitki eksplantlarının seçilmesi için katı MS (MS, BA(1mg/l), NAA (0.1mg/l), timentin (160mg/l), higromisin (50 mg/l)) besiyerine alınmıştır. Rejenerasyon ortamına alınan bitki yaprakları 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyot koşullarını sağlayan iklim kabinine kallus oluşturmaları için inkübasyona bırakılmıştır. 5 hafta sonra ortamlarda kallusların üzerinde gelişen transgenik sürgün adaylarını köklendirmek için timentin (160mg/l) ve higromisin (50 mg/l) içeren köklendirme (MS) ortamına alınmıştır. Yaklaşık 2 ay süreyle bu ortamda kalan bitkiler köklendikten sonra steril edilmiş toprak içeren saksılara dikilerek büyümesi için seraya alınmıştır.

2.23. Aday Transgenik Tütünlerde Analizler

2.23.1. T1 tütün bitkilerinden DNA izolasyonu

Aday transgenik tütünlerimizden DNA izolasyonu ZR plant/Seed DNA MiniPrep™ kit (Zymo research) ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyona başlamadan önce Zymo-Spin™ IV-HRC Spin filtresinin (yeşil kapaklı) alt kısmındaki kapalı olan kısım kırılarak toplama tüpüne yerleştirilerek 8,000 x g' de 3 dk santrifüj yapılmıştır. 150 mg bitki yaprağı tartıldı ve bitki yaprakları bir plate içerisinde bistüri ile küçük parçalara ayrılıp ZR BashingBead™ Lysis tüp içerisine konduktan sonra 750 µl Lysis Solution eklenmiştir. 15 dk en yüksek devirde vorteks yapılmıştır. ZR BashingBead™ Lysis Tube 13,000 x g' de 1 dk santrifüj yapılmıştır. 400 µl süpernatant (sıvı kısım) Zymo-Spin™ IV Spin filtresine (Turuncu kapaklı) transfer edilip 7,000 x g' de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden çıkarılan tüpün alt kısmındaki sıvıya 1200 µl Plant/Seed DNA Binding Buffer eklenip nazik bir şekilde pipet ile karışması sağlanmıştır. Karıştırdığımız sıvıdan 800 µl alınıp Zymo-Spin™ IIC Kolonunun olduğu toplama

tüpüne transfer edilerek 10,000 x g' de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden çıkarılan tüpün alt kısmındaki sıvı dökülüp bu aşama tekrar edilmiştir. Yeni bir toplama tüpüne yerleştirilen Zymo-Spin™ IIC Kolonuna 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklenip 10,000 x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Zymo-Spin™ IIC kolona 500 µl Plant/Seed DNA Wash Buffer eklenip 10,000 x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Temiz bir 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne alınan Zymo-Spin™ IIC Kolonuna 40 µl DNA Elution Buffer kolonun tam merkezine gelecek şekilde eklenerek 10,000 x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Alta geçen eluted DNA Temiz bir 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş olan Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filtresine (yeşil kapaklı) transfer edilerek 8,000 x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerimiz -20 °C'ye konmuştur.

2.23.2. *PvAP2-EFR31* ve *HptII* genleri için PCR

T1 aday transgenik bitkilerden ve kontrol grubu bitkisinden izole edilen DNA'lar ile çizelge 2.17'de verilen bileşenler ile çizelge 2.18'de verilen koşullar ile *PvAP2-EFR31*, *HptII* genleri için PCR yapılmıştır.

Çizelge 2.17. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar	
	<i>PvAP2-EFR31</i>	<i>HptII</i>
Master mix	10 µL	10 µL
F primer	1 µL	1 µL
R primer	1 µL	1 µL
DNA	1 µL	1 µL
Steril Destile Su	7 µL	7 µL

Çizelge 2.18. *PvAP2-EFR31*, *HptII* ve *VirD* genlerini çoğaltmak için gereken PCR koşullar

	<i>PvAP2-EFR31</i>		<i>HptII</i>	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	94°C	2 dk	94°C	2 dk
Denatürasyon	94°C	20 sn	94°C	20 sn
Bağlanma	48°C	10 sn	50°C	10 sn
Uzama	72°C	40 sn	72°C	40 sn
Son uzama	72°C	5 dk	72°C	5 dk

2.23.3. Mendel ayrılma (segregasyon) analizi

T1 aday transgenik bitki tohumlarının Mendel ayrılma (segregasyon) analizi için aday transgenik ve kontrol grubunun tohumları 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere konulup üzerine % 20'lik sodyum hipoklorit eklenerek 20 dakika bekletilmiştir. Sterilizasyondan sonra 5 kez saf steril su ile yıkanmıştır. Higromisin (50mg/l) bulunan katı MS ortamında 25 °C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ortam periyodunda iklim kabininde büyütülmüştür. Mendel kalıtımında beklenen 3:1 oranı p ($\chi^2 \leq 3.841$) =0.95 Ki kare analizi ile belirlenmiştir.

2.23.4. Aday transgenik tütün bitkilerinde fizyolojik analizler

Aktardığımız *PvAP2-EFR31* geninin ifade edilip edilmediğini görmek için tohumlara fizyolojik testler uygulanmıştır. Tuz (NaCl) içeren ortamlara transgenik tohumlar ekilerek çimlenme ve büyümeleri gözlemlenmiştir.

2.23.4.1. Tuz stresi çalışmaları

200 mM NaCl bulunan MS besi ortamına transgenik tohumlar ve kontrol (wild-type) bitki tohumları ekilmiştir. Tohumların çimlenme ve büyüme performansları gözlemlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. *Phaseolus vulgaris*'de PvAP2-ERF Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve Tanımlanması

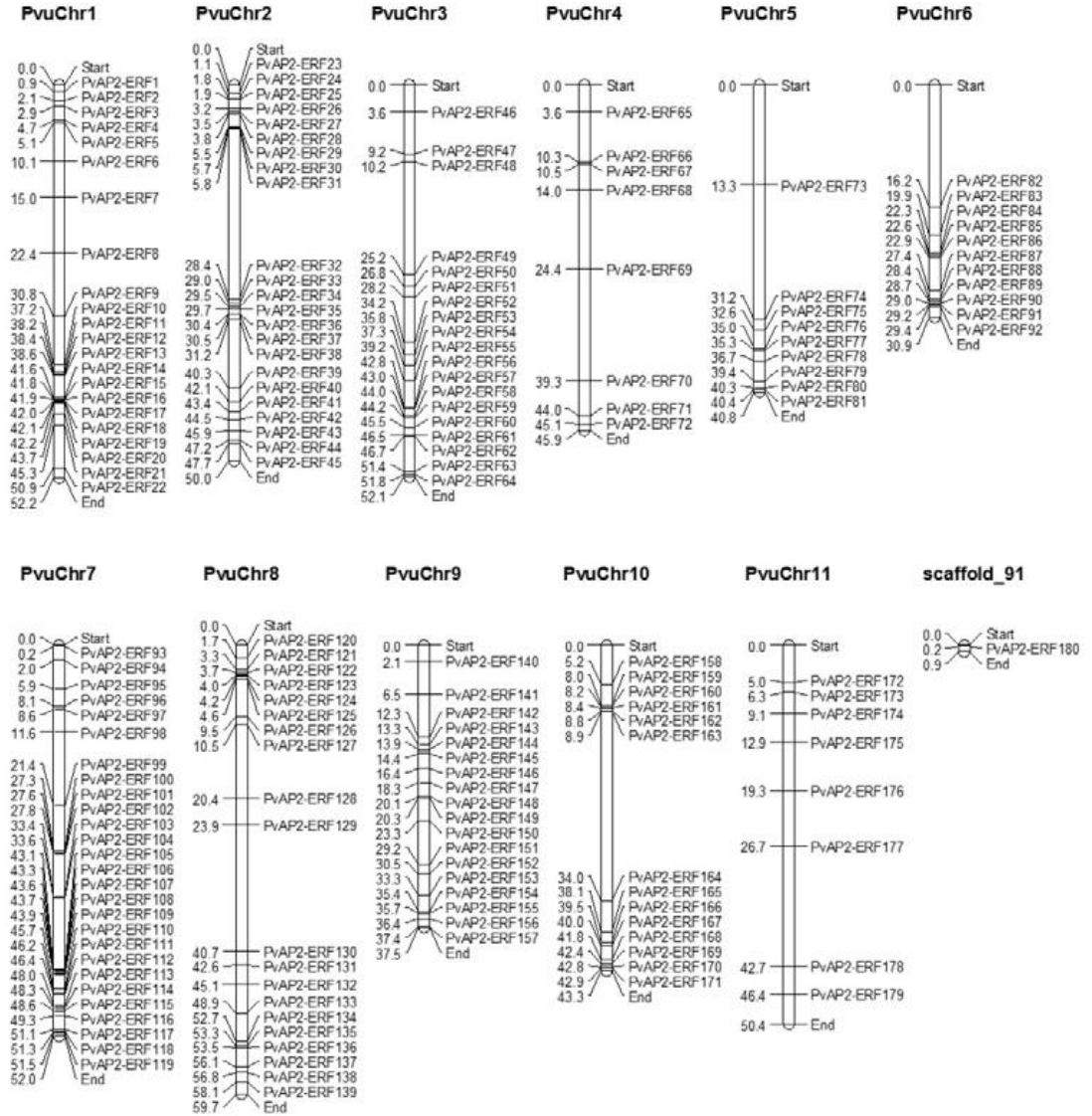
P. vulgaris'in tanımlanmış tüm genom sekansı fasulyede ilk kez AP2-ERF ailesinin genlerinin tanımlanması için bir fırsat sundu. *Arabidopsis thaliana*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, *Ricinus cummunis*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Vigna radiate*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays*'i içeren farklı tür bitkilerden elde edilen AP2-ERF ailesi protein sekansları ilgili veritabanında BLAST araştırmasını gerçekleştirmek için sorgulama olarak kullanılmıştır. Varsayımsal proteinler InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>)

kullanılarak korunmuş AP2-ERF domaininin doğrulanması için analiz edilmiştir. Önemsiz eşleşmelere sahip olan sekanslar daha ileriki analizlerden çıkarılmıştır. Bu analiz sonucunda AP2-ERF domainine sahip olan toplam 180 gen fasulyede tanımlanmıştır (EK 6). Böylece *P. vulgaris*'in, *Cucumis melo*, *Arabidopdsis thaliana*, *Glycine max* ve *Solanum tuberosum*'a kıyasla daha fazla AP2 ve ERF domainleri içerdiği bulunmuştur (EK 5). Bu nedenle farklı bitki türlerine ait AP2-ERF üyeleri arasında sayı, işlev ve yapıda bir varyasyona işaret edilmiştir. AP2-ERF gen ailesi üyeleri kromozomlardaki sıralarına göre *PvAP2-ERF* olarak adlandırılmıştır. Scaffold_91'de bulunan tek bir gen *PvAP2-ERF-180* olarak adlandırılmıştır.

Varsayılan genlerin ORFs ve gen uzunlukları, protein moleküler ağırlıkları, pI değerleri kararlılık indeksi, çözünürlük ve subselüler lokalizasyon analiz edilmiştir ve sonuçlar listelenmiştir (EK 7). Gen uzunlukları 363bp'den (*PvAP2-ERF155*) 7445 bp'e (*PvAP2-ERF128*) kadar, moleküler ağırlıkları 13.33'den (*PvAP2-ERF155*) 75.70 kDa'a (*PvAP2-ERF125*) kadar ve pI değerleri 4.56'dan (*PvAP2-ERF94*) 10.06'ya (*PvAP2-ERF73*) kadar değiştiği görülmüştür. Hüresel lokalizasyon genellikle protein fonksiyonunun belirlenmesinde önemli bir faktör olduğu söylenmiştir (Thamilarasan vd, 2014). mGOASVM ile yapılan subselüler lokalizasyon tahmini 177 proteinin çekirdekte yerleşik olduğunu söylenmiştir. Daha önceki çalışmalarda TF'lerinin sadece çekirdeğin içinde bulunduğu öne sürülmüştür (Liu vd, 2013). Bir düzensizlik indeksine göre *PvAP2-ERF* proteinlerinin çoğu (%95) bir test tüpünde düzensiz olarak tahmin edilmiştir. *Escherichia coli*'de *PvAP2-ERF* proteinlerinin çözünebilirliği onların amino asit sekanslarına göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre *PvAP2-ERF* proteinlerinin hemen hemen yarısı çözünebilir olarak bulunmuştur. AP2-ERF proteinlerinin ortalama amino asit kompozisyonu temel alınarak, en çok bulunan amino asit 11.80 değeri ile Serin olmuştur. Önemli tuza dayanıklılığı sağlayan amino asitler olan Prolin ve Serin'in ortalama miktarı sırasıyla 6.28 ve 6.00 olarak bulunmuştur.

AP2-ERF proteinlerinde triptofan ve sistin amino asitlerinin ortalama miktarı, sırasıyla 1.67 ve 1.29 bulunmuştur. *PvAP2/ERF-180* hariç diğer *PvAP2-ERF* genleri 11 kromozomda başarılı bir şekilde haritalanmıştır. Fasulye kromozomlarındaki her bir *PvAP2-ERF* geninin kesin konumu ve dağılımı gösterilmiştir (Şekil 3.1). En yüksek AP2-ERF geni sayısı %15 ile kromozom 7'de bulunmuştur. Bu kromozomdan sonra 2,1 ve 8. kromozomlarında sırasıyla 23/180 (%12.8), 22/180 (%12.2) ve 20/180

(% 11.1) *PvAP2-ERF* geni içerdiği görülmüştür. Hepsinin arasından en az gen dağılımını % 4.4 ile kromozom 4 ve 11’de gözlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 180 *PvAP2-ERF* geninin kromozomlar üzerindeki dağılımı

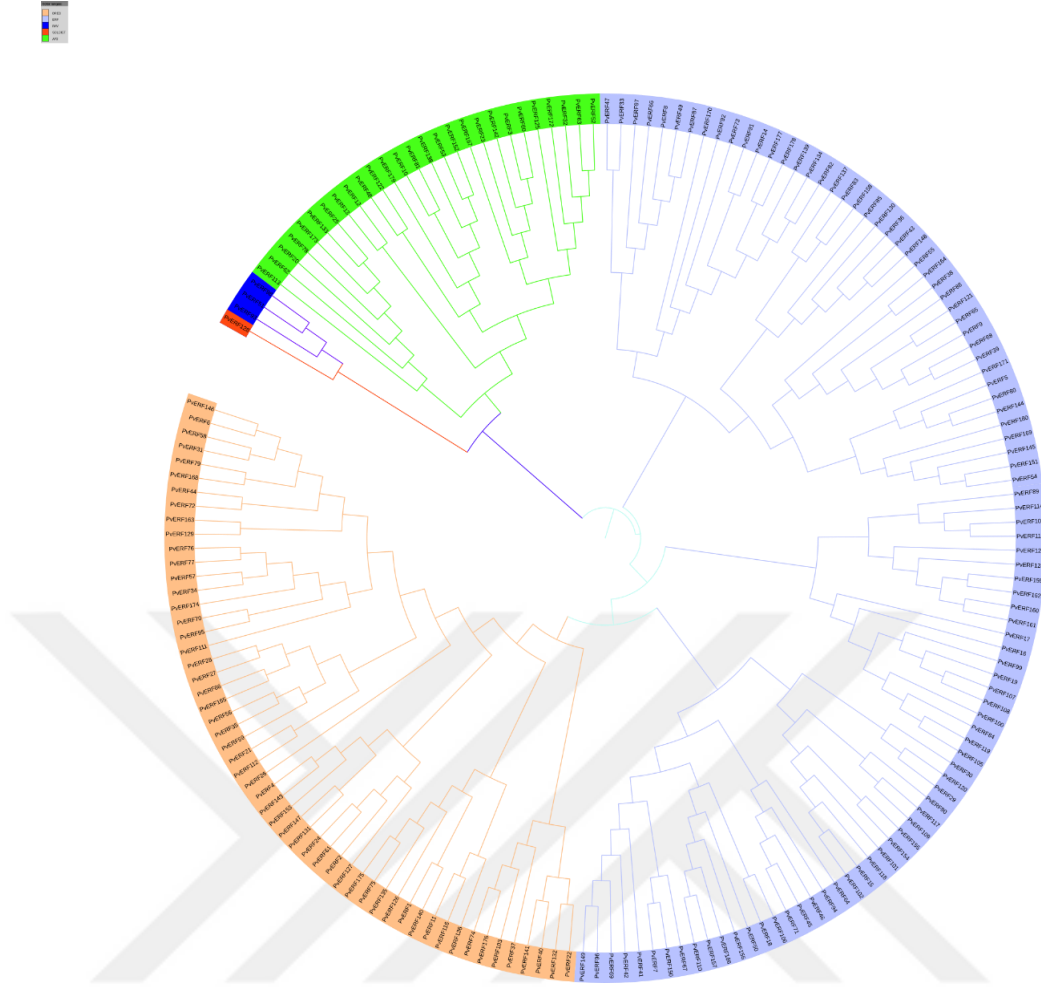
Ayrıca kromozomlar üzerindeki *PvAP2-ERF* genlerinin farklı dağılım düzeni oluşturdukları ve gen kümelerinin kromozom kollarının alt veya üst uçlarında toplandığı fark edilmiştir. Örneğin, kromozom 1,2,7,8 ve 10’da konumlanmış *PvAP2-ERF* genleri her iki kromozom kolları üzerindeki dağılırken kromozom 3,5,6 ve 9’da bulunan genler yalnızca kromozom kollarının alt uçlarının sonunda toplandığı görülmüştür (Şekil 3.1). AP2-ERF transkripsiyon faktörü genleri *Arabidopsis thaliana*’da 122 gen (Nakano vd, 2006), *Brassica oleracea*’da 226 gen (Thamilarasan vd, 2014), *Brassica rapa*’da 248 gen (Song vd, 2013), *Citrus sinensis*’de 108 gen (Ito

vd, 2014), *Cucumis melo*'da 136 gen (Ma vd, 2015), *Cucumis sativus*'da 103 gen (Hu & Liu, 2011), *Daucus carota*'da 267 gen (Li vd, 2015), *Eucalyptus grandis*'de 209 gen (Cao vd, 2015), *Glycine max*'da 98 gen (Zhuang vd, 2008), *Malus domestica*'da 209 gen (Girardi vd, 2013), *Oryza sativa*'da 139 gen (Nakano vd, 2006), *Phyllostachys edulis*'de 116 gen (Wu vd, 2015), *Populus trichocarpa*'da 200 gen (Zhuang vd, 2008), *Ricinus communis*'da 114 gen (Xu vd, 2013), *Salix arbutifolia*'da 173 gen (Rao vd, 2015), *Setaria italica*'da 171 gen (Lata vd, 2014), *Solanum lycopersicon*'da 112 gen (Sharma vd, 2010), *Solanum tuberosum*'da 155 gen (Charfeddine vd, 2015), *Triticum aestivum*'da 117 gen (Zhuang vd, 2011a), *Vitis vinifera*'da 132 gen (Licausi vd, 2010), *Zea mays*'da 184 gen (Du vd, 2014) dahil olmak üzere farklı bitki genomlarında en çok tanımlanmış gen ailesi üyelerinden birisidir. Genomik düzeyde bu gen ailesinin ilk keşfi 2006'da *Arabidopsis* ve *Oryza sativa*'da tanımlanmıştır (Nakano vd, 2006). Bu tarihten itibaren farklı organizmalardan AP2-ERF gen ailesi üyelerinin karakterizasyonu devam etmiştir. *PvAP2-ERF*'nin yoğunluğu analiz edilen bitkilerin çoğundan daha yüksek bir değer olan yaklaşık 0.3066'dır. *Arabidopsis thaliana*'da (0.9037) ve *Triticum aestivum*'da (0.0069) sırasıyla en yüksek ve en düşük AP2-ERF gen yoğunluğuna sahip olduğu görülmektedir (EK 4). Aynı zamanda *P. vulgaris* (180) *Zea mays* (184) ve *Setaria italica*'da (171) benzer gen sayıları bulunmuştur.

3.2. AP2-ERF Ailesinin Filogenetik Analizi

Amino asit hizalaması ve filogenetik analizler sonucunda 180 genden oluşan AP2-ERF ailesi, DREB (54), ERF (95), AP2 (27), RAV (3) olmak üzere 4 alt aile de toplandığı görülmüştür. Ayrıca, AT4G13040'ın ortoloğu olan *PvAP2-ERF128* adlı yalnızca tek bir soloist gen bulunmuştur. Çoklu dizi hizalanmasından sonra 180 *PvAP2-ERF* genlerinin filogenetik ağaçları Neighbor-Joining (NJ) metodu aracılığıyla oluşturulmuştur (Şekil 3.2).

Arabidopsis thaliana (122 üye), *Cucumis melo* (136 üye), *Cucumis sativus* (103 üye), *Solanum tuberosum* (155 üye), *Solanum lycopersicon* (112 üye) ve *Glycine max* (98 üye) ile karşılaştırıldığında, 180 gen ile AP2-ERF ailesi fasulyede nispeten daha fazla üye sayısına sahip olduğu görülmüştür (EK 5).



Şekil 3.2. 180 AP2-ERF proteininin Mega 6 yazılımı ile hizalanıp Neighbor-Joining (NJ) metodu filogenetik ağaç oluşturulması

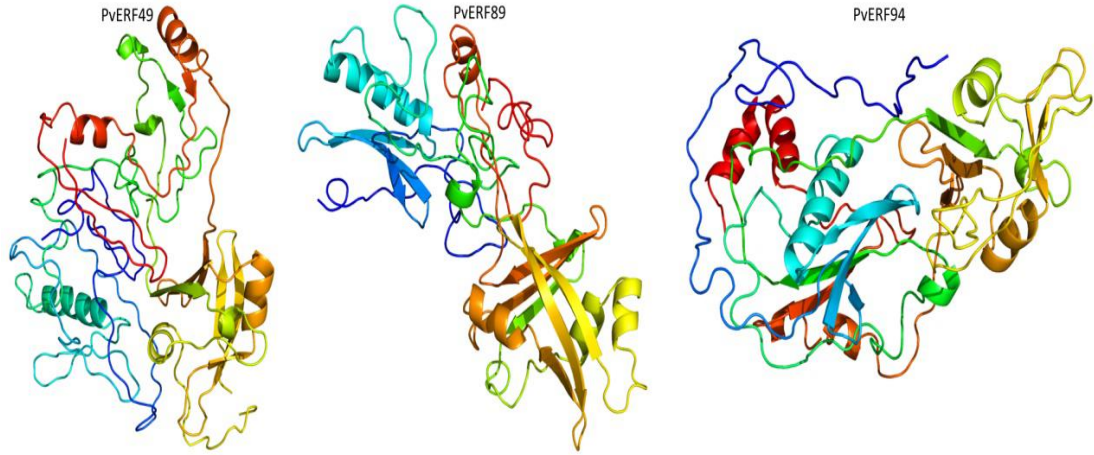
3.3. Intron/Exon Yapısı, Genom Dağılımı ve Motif Tahmini

AP2-ERF genlerinin yapısal çeşitliliği ile ilgili daha ileri bilgiler elde etmek için *PvAP2-ERF* ailesi üyeleri içindeki exon/intron yapıları Gene Structure Display Server (GSDS) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) kullanılarak gösterilmiştir (EK 1). İntronsuz ERF alt ailesi genlerinin sayısı (23 gen) DREB alt ailesi genlerinden (16) daha yüksek olduğu görülmüştür. Fasulyede intron organizasyonu ve AP2-ERF genlerinin sayıları farklı varyasyon ve farklı alt gruplara dağıldığını görülmüştür. AP2 alt ailesi üyelerinin 5-9 intronu ve grup üyelerinin neredeyse yarısının 7 intronu olduğu görülmüştür. AP2 alt ailesinin diğer üyelerinin aksine, yalnızca *PvAP2-ERF179* beş introna sahip olduğu görülmüştür (EK 1). AP2-ERF ailesi üyelerinin amino asit sekansları fasulye AP2-ERF ailesindeki genler arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için ClustalW çoklu hizalaması MEGA 6.0.1'de gerçekleştirilerek

korunmuş motifler gösterilmiştir (EK 2). 3G, 4V, 11G, 16E, 17I, 33R, 35W, 36L, 37G, 45A, 46A, 48A, 49Y, 50D, 51A, 52A, 57G, 60A, 63N ve 64F toplam 20 concensus amino asidin PvAP2-ERF ailesindeki 189 protein arasında %80'den daha fazla korunduğu gösterilmiştir (EK 2).

3.4. 3D Protein Homoloji Modellemesi

İlk olarak BLASTP sorgulaması *PvAP2-ERF* proteinleri için 3D homoloji modellemesinin oluşturulması için PDB'de yürütülmüştür. *PvAP2-ERF* proteinlerinden sadece üçü (*PvAP2/ERF-49-89-94*) daha yüksek homoloji oranı göstermiştir. Daha sonra Phyre2'nin intensive modu kullanılarak proteinlerin 3 boyutlu yapısı gösterilmiştir (Şekil 3.3).



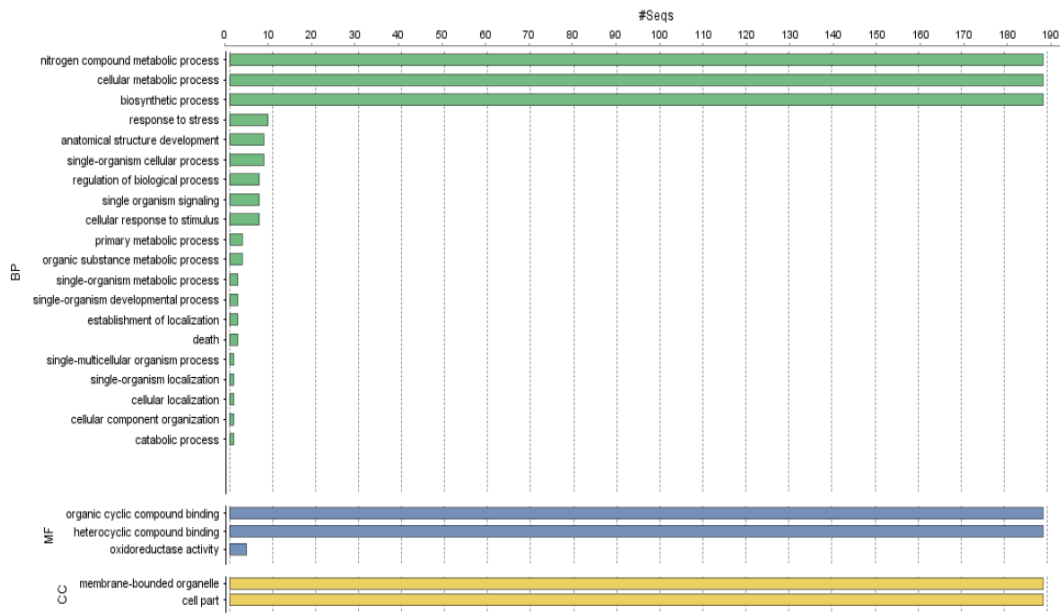
Şekil 3.3. *PvERF49*, *PvERF89* ve *PvERF94* proteinlerinin Phyre2 kullanılarak tahmin edilen 3 boyutlu yapısı

3.5. Tahmini *PvAP2-ERF* Promotor Bölgesinin ve miRNA'ların Hedeflenmesinin Analizleri

Fasulye de toplam 180 AP2-ERF geninin 2000 bp'lik upstream bölgeleri kullanılarak miRNA analizi yapılmıştır. Promotor bölgesindeki genlerin upstream'da konumlanmış ve Transkripsiyon Faktörü bağlanma bölgeleri olarak görev yapan cis elementler PLACE veritabanı kullanılmıştır. Sonra bu kısa diziler psRNA Target server'da analiz edilmiştir. Bu çalışmada 44 farklı bitki türü miRNA'ları tarafından hedeflenen neredeyse tüm *PvAP2-ERF* genleri tanımlanmıştır. En fazla hedef genler *PvAP2/ERF-20-25-62-78-113-173* olarak bulunmuştur.

3.6. Gen Ontolojisi (GO) ve Fonksiyonel Anlamlandırma

PvAP2-ERF genlerinin GO terimleri, onların biyolojik süreçlerine, moleküler fonksiyonlarına veya hücrenel bileşenler gibi içeriklerine göre anlamlandırılmıştır. Farklı biyolojik süreçlere, hücrenel içeriklere ve moleküler fonksiyonlara ait olan *PvAP2-ERF* genleri şekil 3.4’te gösterilmiştir. Çok sayıda *PvAP2-ERF* genleri azot bileşiği metabolik süreci, hücrenel metabolik süreçler ve biyosentetik süreçler gibi biyolojik süreçlerde yer aldığı görülmüştür. Biyolojik süreçler bağlamında *PvAP2-ERF* genlerinin çoğu hem organik hem de heterosiklik bileşik bağlama aktivitesi göstermiştir.



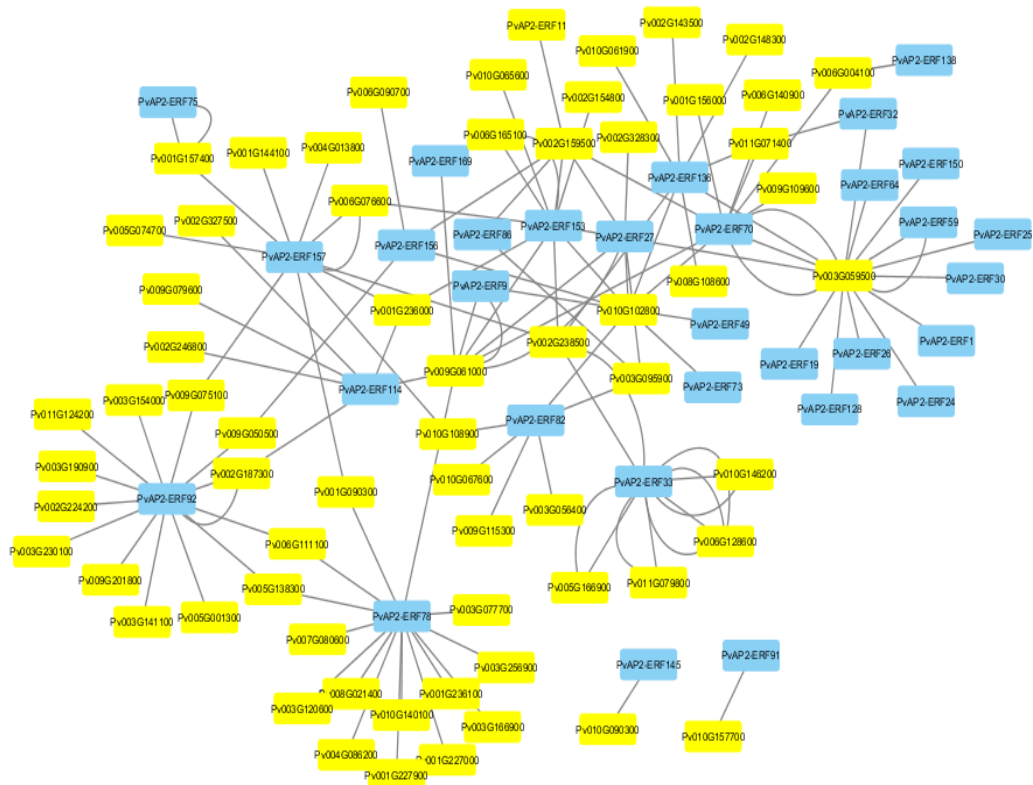
Şekil 3.4. *PvAP2-ERF* genlerinin moleküler fonksiyonları

3.7. *PvAP2-ERF* Genlerinin Gen Duplikasyon Oranı

Phaseolus genomunda rastgele duplikasyondan ziyade parçalı gen duplikasyonları meydana geldiği gözlemlenmiştir. Toplamda AP2-ERF genlerinin yaklaşık %57’sini (103-180) oluşturan 103 parçalı duplicate bulunmuştur. Toplamda 14(%8) rastgele duplicate *PvAP2-ERF* tespit edilmiştir.

3.8. Protein-Protein İnteraksiyonu Ağlarının Tahmini

Fasulye de *AP2/ERF*'ler ve diğer genler arasındaki etkileşimleri tespit edebilmek için proteinler arasındaki binlerce etkileşimin karmaşık biyomoleküler ve yolak bilgisini sağlayan bir veri tabanı olan Arabidopsis Interaction Viewer kullanılmıştır. Fasulye genomunda diğer genlerle etkileşime girdiği görülen 32 *AP2/ERF* geni tespit edilmiştir. 27 gen çifti görselleştirilememiştir. At2G28550'nin ortoloğu olan *PvAP2-ERF78* transkripsiyon faktörü en az 15 protein ile etkileşime girdiği görülmüştür. Fakat 12 *AP2-ERF* transkripsiyon faktörü osmotik ve oksidatif strese karşı tepki için önemli bir protein olan fasulye proteini Phvul.003G059500 tarafından düzenlendiği ve ilişkisi olduğu görülmüştür.



Şekil 3.5. Fasulyenin Arabidopsis'deki ortologlarına göre *AP2-ERF* genleri arasındaki etkileşim ağları

3.9. *PvAP2-ERF* Genlerinin In Silico Ekspresyon Analizi

AP2-ERF genlerinin in silico ekspresyon analizi fasulyede farklı iki doku örneği ile çalışılmıştır. RNA-seq analizi sonuçlarına göre 12 *AP2-ERF* geninin ifadesi (*PvAP2-ERF117*, *PvAP2-ERF13*, *PvAP2-ERF152*, *PvAP2-ERF154*, *PvAP2-ERF155*, *PvAP2-*

ERF159, PvAP2-ERF160, PvAP2-ERF17, PvAP2-ERF38, PvAP2-ERF71, PvAP2-ERF85, PvAP2-ERF99) hem kök hem de normalize edilmiş RPKM değerlerine dayalı olarak yaprak dokularına ait okumalarda saptanamamıştır. Toplamda 78 *PvAP2-ERF* geni en az bir dokuda farklı şekilde eksprese edildiği görülmüştür. 180 *PvAP2-ERF* arasından *PvAP2-ERF27, PvAP2-ERF1, PvAP2-ERF119, PvAP2-ERF126, PvAP2-ERF69, PvAP2-ERF111* ve *PvAP2-ERF3* genlerini içeren 35 *PvAP2-ERF* yaprak dokusunda farklı şekilde upregüle olduğu görülmüştür. Kök dokusunda *PvAP2-ERF150, PvAP2-ERF72, PvAP2-ERF119, PvAP2-ERF96, PvAP2-ERF53* dahil toplamda 10 *PvAP2-ERF* yüksek ekspresyon seviyesi görülmüştür. *PvAP2-ERF*'lerin (*PvAP2-ERF69, PvAP2-ERF119, PvAP2-ERF100, PvAP2-ERF53, PvAP2-ERF70* ve *PvAP2-ERF177*) 6 tanesi hem yaprak hem de kök dokularında yüksek oranda eksprese olmuştur. Ayrıca genom çapında ifade analizi, tuz stresi sonrası yaprak dokularında toplamda 68 upregüle ve 56 downregüle *PvAP2-ERF* bulunduğunu görülmüştür (EK 7). Benzer şekilde kök dokularında 51 upregüle olmuş *PvAP2-ERF* geni ve 84 downregüle olmuş *PvAP2-ERF* geni olduğu görülmüştür.

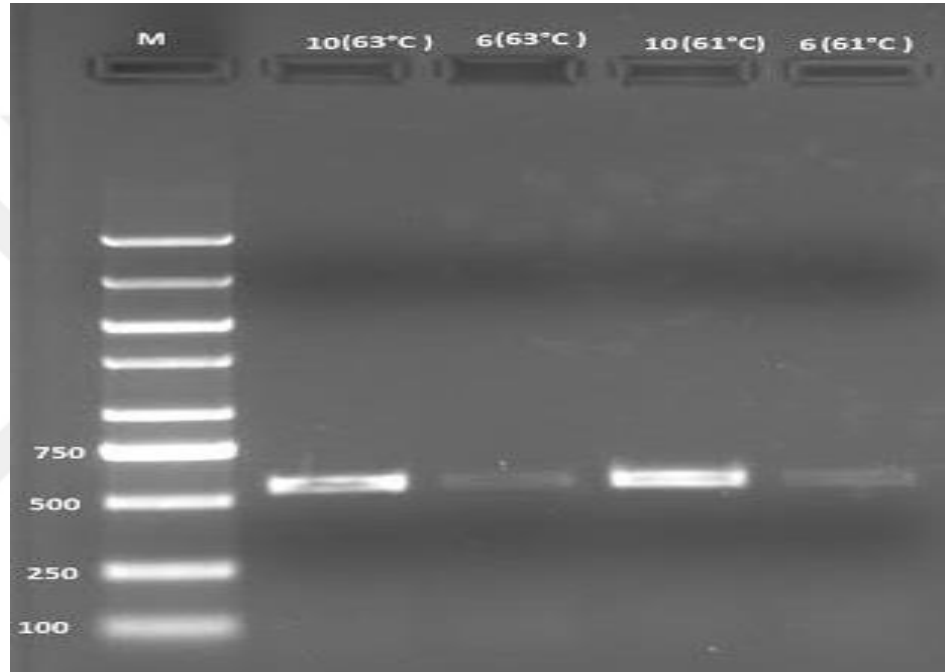
3.10. Kantitatif real-time PCR Analizi

Tuz stresi uygulanmış kök ve yaprak dokularında 9 *PvAP2-ERF* gen ailesi üyesinin (*PvAP2-ERF100, PvAP2-ERF111, PvAP2-ERF119, PvAP2-ERF177, PvAP2-ERF69, PvAP2-ERF70, PvAP2-ERF72, PvAP2-ERF150, PvAP2-ERF53*) ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. qRT-PCR sonuçları seçilen 9 genin 7'si tuz uygulanmasından sonra fasulye yaprak dokularında upregüle olduğunu ortaya konmuştur (EK 8). Bunların arasından *PvAP2-ERF111, PvAP2-ERF119, PvAP2-ERF72* ve *PvAP2-ERF150* kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden, qRT-PCR kullanılarak yaprak dokusundaki 7 *PvAP2-ERF* doğrulanmıştır. Benzer şekilde, RNA-seq analizinden sonra seçilen genlerin ekspresyonu ayrıca kök dokularında da qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlara göre *PvAP2-ERF111, PvAP2-ERF119, PvAP2-ERF72* ve *PvAP2-ERF150* kontrol dokusunun ekspresyon seviyesi ile karşılaştırıldığında ekspresyon paterninde iki kat değişiklik göstermiştir. Seçilen *PvAP2-ERF*'lerden üçü (*PvAP2-ERF100, PvAP2-ERF69* ve *PvAP2-ERF177*) kök dokularında tuz uygulandıktan sonra downregüle gen ekspresyon paterni göstermiştir. Bu sonuçlar

PvAP2-ERF genlerinin genel olarak tuz stresinden etkilendiğini ve bunun pozitif bir regülasyon yolağı ile tuz stresi sinyali iletiminde rol aldığını göstermiştir.

3.11. cDNA Sentezi ve Gradient PCR

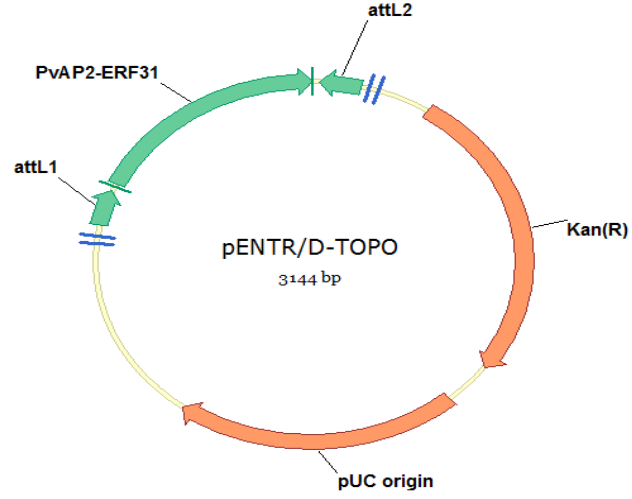
Tuz stresi (150 mM) uygulanmış fasulyelerden total RNA izolasyonu yapıp cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'dan PCR yapılarak *PvAP2-EFR31* geni çoğaltılmıştır. Genimizi çoğaltmak için en uygun bağlanma sıcaklığı 61 °C'de olarak belirlenmiştir.



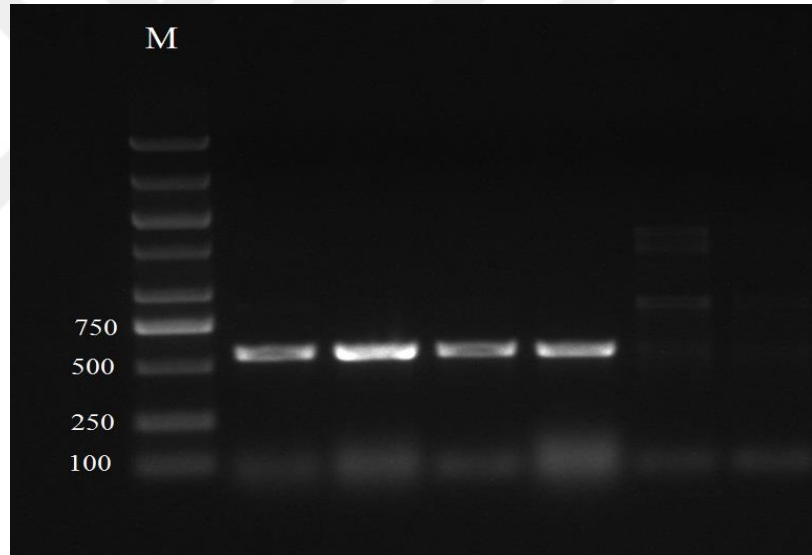
Şekil 3.6. *PvAP2-EFR31* geninin % 1'lik agaroz jeldeki sonucu

3.12. Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) *PvAP2-EFR31* Geninin Klonlanması

PvAP2-EFR31 geninin PCR ürünü gateway klonlama sistemi kullanılarak pENTR™/D-TOPO giriş vektörü oluşturulmuştur. Gateway klonlama prosedürüne göre giriş vektörü oluşturulduktan sonra kompetan *E. Coli* bakterisine aktarılmıştır. İşlemden sonra *PvAP2-EFR31* genini içeren bakterileri seçmek için kanamisin (50mg/ml) içeren ortamda 1 gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. Aktardığımız geni belirlemek için koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde 80 volt 400 mA'de 45 dakika yürütülmüş ve genimizi içeren pozitif koloniler belirlenmiştir.



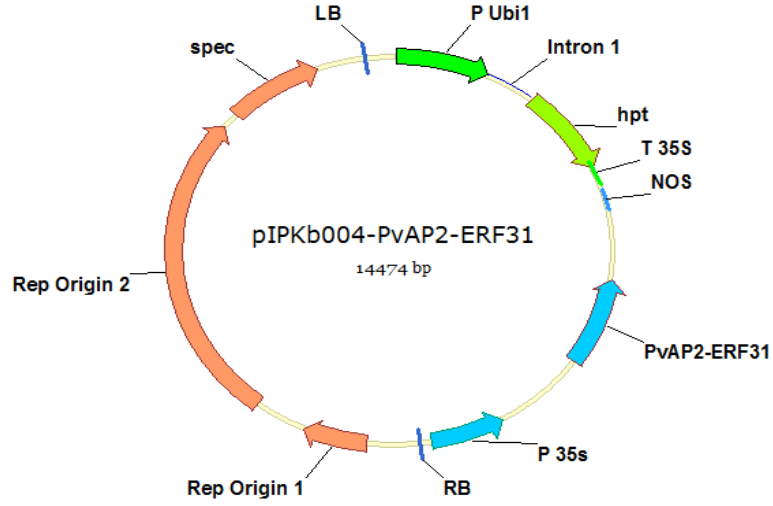
Şekil 3.7. pENTR™/D-TOPO-*PvAP2-ERF31* giriş vektörü



Şekil 3.8. *PvAP2-ERF31* genine ait koloni PCR sonucu

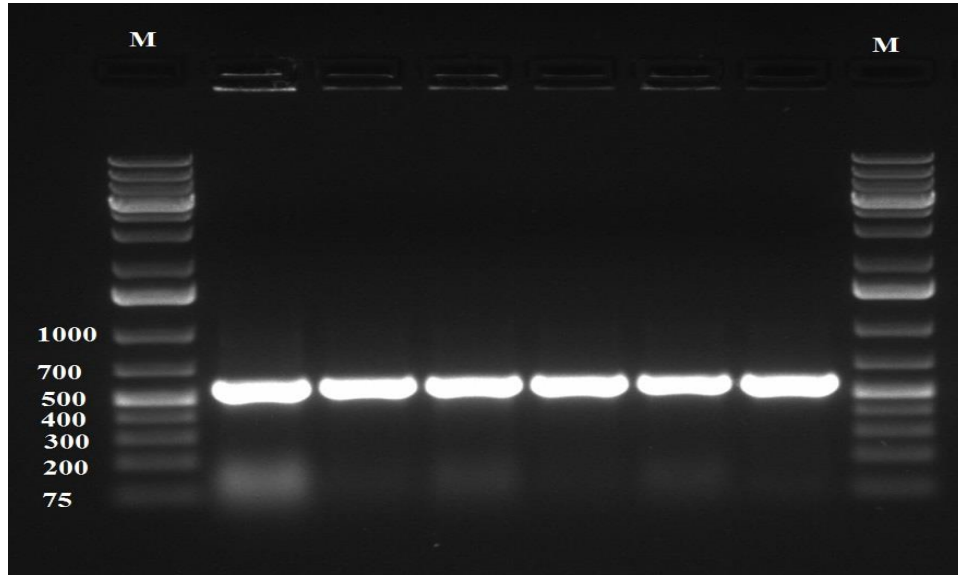
3.13. Bitki İfade Vektörüne *PvAP2-ERF31* Geninin Klonlanması

Sekans sonucu doğrulanan *PvAP2-ERF31* geni pIPKB004 bitki ifade vektörüne aktarılmıştır.

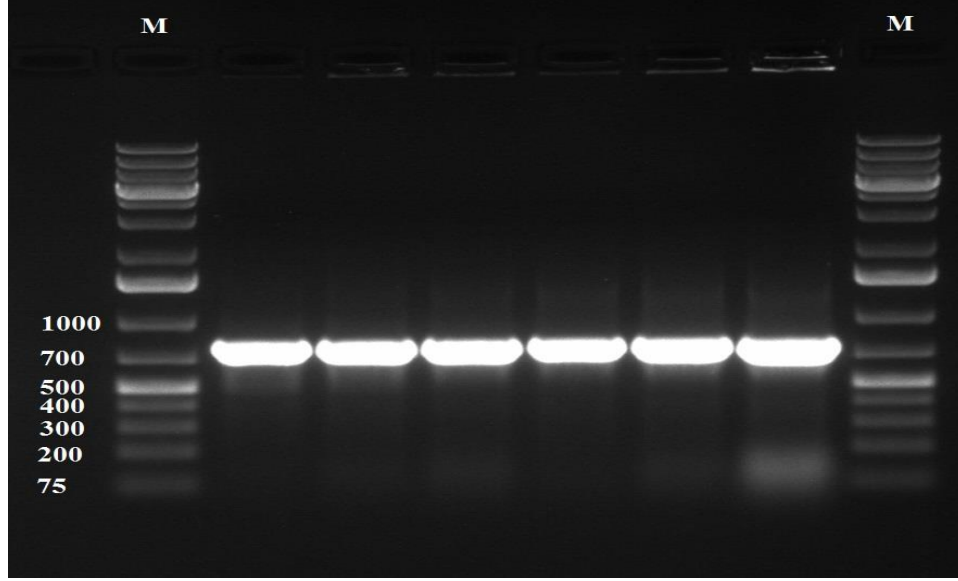


Şekil 3.9. LR klonaz enzimi ile *PvAP2-ERF31* genini içeren bitki ifade vektörü pIPKb004

LR reaksiyonu ile oluşturulan ve genimizi içeren pIPKb004 vektörü kompetan *E. Coli* hücrelerine transforme edilerek spektinomisin (100 mg/ml) içeren katı LB ortamında 37°C’de bir gece boyunca inkübe edilerek büyütülmüştür. Büyüyen kolonilerden bakteriler seçilerek *PvAP2-ERF31* ve *HptII* genleri için koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünleri % 1’lik agaroz jelde 80 volt 400 mA’de 45 dakika yürütülmüştür.



Şekil 3.10. *PvAP2-ERF31*- pIPKb004 vektörünün *E. Coli*’ye transformasyonundan sonra koloni PCR’ın % 1’lik agaroz jel ile yapılan elektroforez sonucu

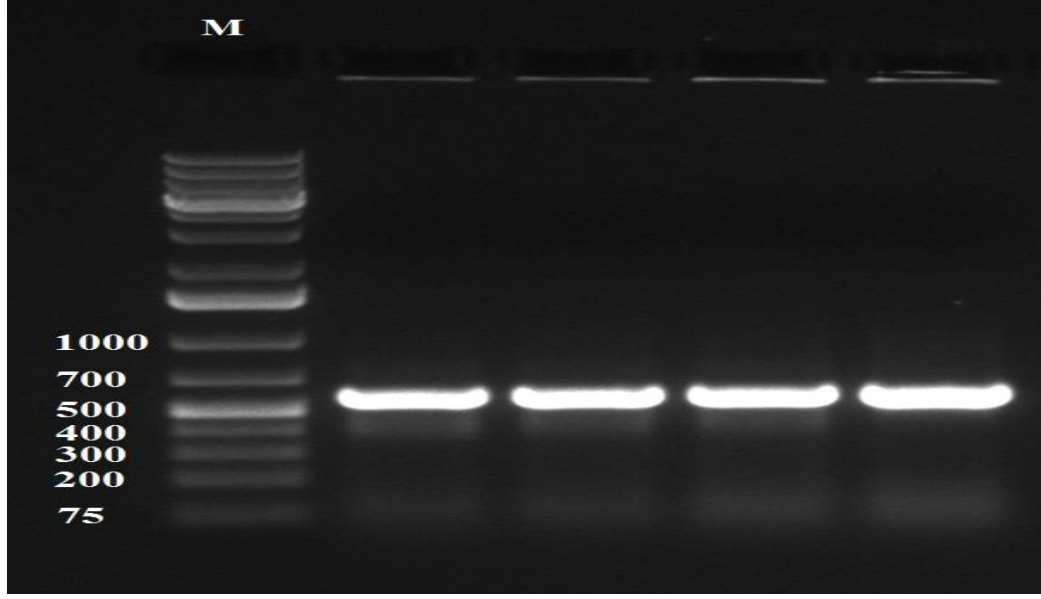


Şekil 3.11. pIPKb004 vektörünün *E.coli*'ye transformasyonundan sonra *HptII* geni için yapılan koloni PCR' in %1'lik agaroz jel ile yapılan elektroforez sonucu

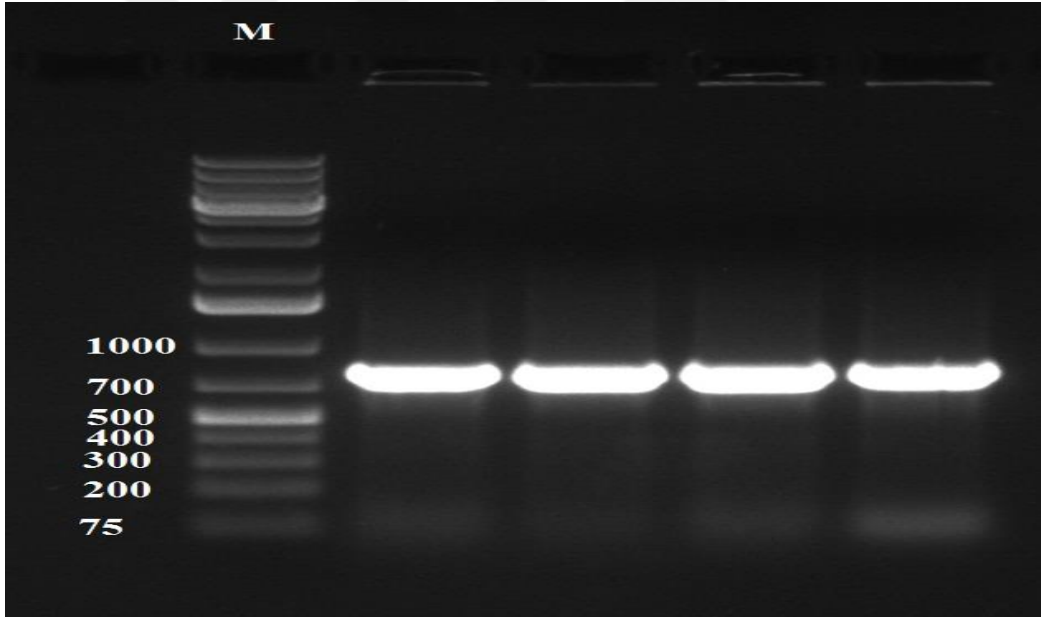
Doğrulaması yapılan pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep ile yapılmıştır.

3.14. Genimizi İçeren pIPKb004 Vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*'e (AGL1) Transformasyonu

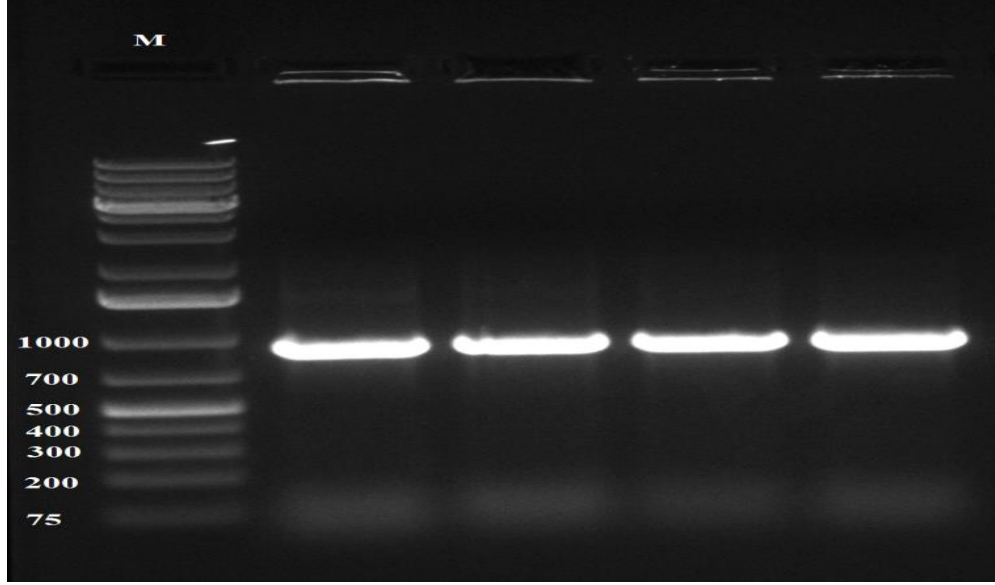
PvAP2-ERF31 genini içeren pIPKB004 vektörü elektroporasyon ile kompetant *Agrobacterium tumefaciens*'e (AGL1) aktarılmıştır. Spektinomisin (100 mg/ml), karbenisilin (50 mg/ml) ve rifampisin (10 mg/ml) antibiyotiklerini içeren LB besiyerinde büyütülmüştür. Daha sonra koloniler seçilerek *PvAP2-ERF31*, *HptII* ve *VirD* genlerinin tespiti için PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforez ile yürütülüp görüntülenmiştir.



Şekil 3.12. pIPKb004-*PvAP2-ERF31* vektörünün *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine transformasyondan sonra yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu



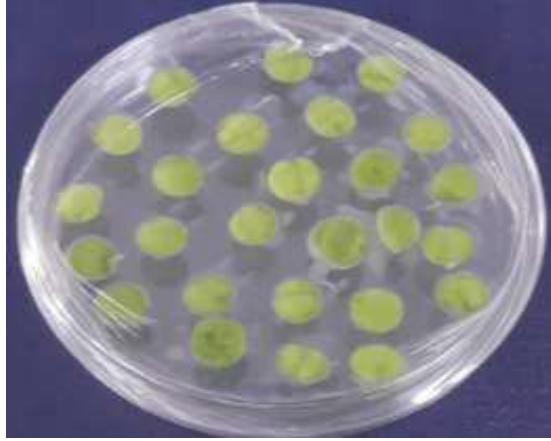
Şekil 3.13. pIPKb004-*PvAP2-ERF31* vektörünün *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine transformasyonundan sonra *HptII* primerleri ile yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu



Şekil 3.14. pIPKb004-*PvAP2-ERF31* vektörünün *Agrobacterium tumefaciens* hücrelerine transformasyonundan sonra *VirD* primerleri ile yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu

3.15. *Agrobacterium* Aracılığıyla Tütün Transformasyonu

PCR sonucu genimizi içeren pIPKb004 ekspresyon vektörüne sahip *A. tumefaciens* (AGL1) suşu ile tütüne gen aktarımında kullanılmıştır. *A. tumefaciens* (AGL1) karbenisilin (100 mg/l), spektinomisin (100 mg/l) ve rifampisin (10 mg/l) antibiyotiklerini içeren LB besin ortamında büyütülmüştür. 2 ay boyunca büyütülmüş olan tütün yapraklarından alınan eksplantlar *A. tumefaciens* (AGL1) bakterileri ile muamele edilerek transformasyon gerçekleştirilmiştir. 3 gün süreyle karanlık ortamda bekletilmiştir.



Şekil 3.15. *A.tumefaciens* ile gen aktarımı yapılmış ve besi yerinde (MS + BA (1mg/l) + NAA (0.1mg/l)) 3 gün inkübe edilmiş tütün eksplantları

Daha sonra bitki yaprakları üzerindeki fazla bakteriden kurtulmak için timentin (160mg/l) içeren sıvı LB besiyerinde yapraklar yıkanmıştır. Yapraklar timentin (160mg/l), higromisin (50 mg/l), BA(1mg/l) ve NAA (0.1mg/l) içeren katı LB ortamına alınmıştır. 1 ay sonra oluşan sürgünlerin köklendirilmesi için higromisin (50 mg/l) ve timentin (160mg/l) içeren MS besi ortamına alınmıştır.



Şekil 3.16. Gen aktarılmış tütünlerin yaklaşık 1 ay sonra oluşturduğu kallus ve sürgünler



Şekil 3.17. Gen aktarımı yapılmış kalluslardan elde edilen sürgünlerin köklendirme ortamına alınması



Şekil 3.18. Bitkilerin köklendirme ortamına alındıktan yaklaşık 8 hafta sonraki görüntüsü



Şekil 3.19. Seraya alınan aday transgenik tütün hatları

3.16. *PvAP2-ERF31* Geninin Aday T1 Transgenik Bitkilerinde Analizler

3.16.1. Moleküler analizler

3.16.1.1. Mendel analizi

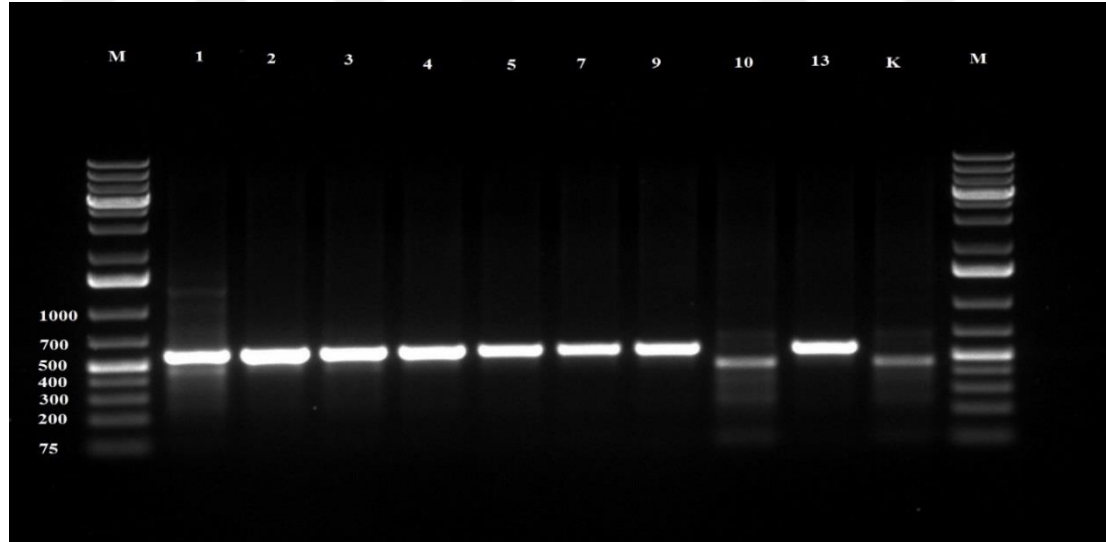
Aday T1 transgenik tütün tohumları %20'lik sodyum hipokloritte 20 dk steril edilip 5 kez saf streil su ile yıkanmıştır. Her bir hattan 30 tohum 50 mg/ml higromisin içeren MS besi ortamına ekilmiştir. Bu deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Mendel analizi 8 hafta sonra transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde hayatta kalan bitkiler ile kalmayanlar $p(\chi^2 \leq 3.841) = 0.95$ formülü temel alınarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. Tütün T1 döllerinin mendel kalıtım analizi

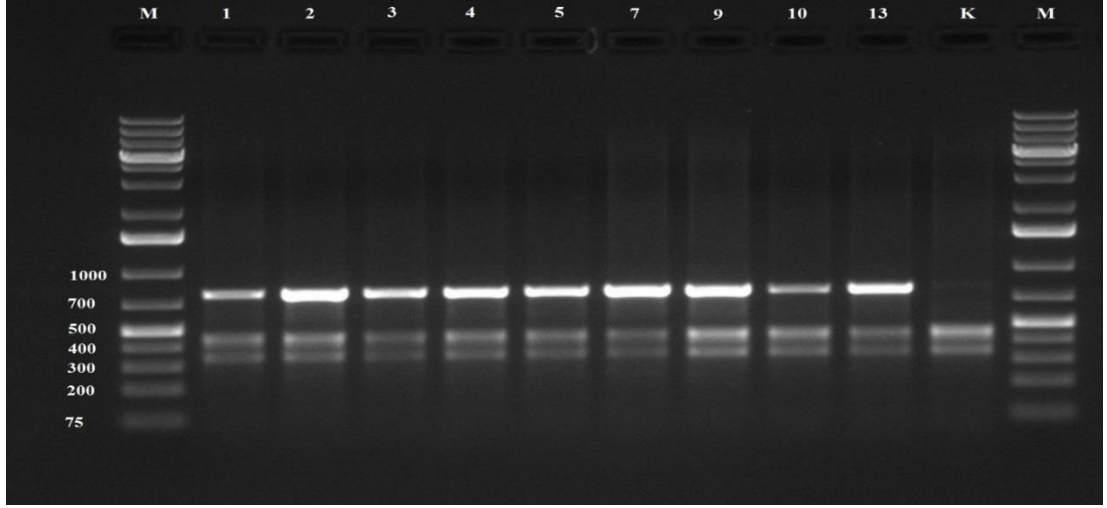
Hat	Toplam Tohum Sayısı	Çimlenen Tohum Sayısı	χ^2	Sonuç
Transgeik olmayan (wild-type) tütün	30	0	300	Kabul edilmedi
1	30	29	0.03	Kabul edildi
2	30	20	3.3	Kabul edildi
3	30	27	0.3	Kabul edildi
4	30	21	2.7	Kabul edildi
5	30	21	2.7	Kabul edildi
7	30	13	9.6	Kabul edilmedi
9	30	14	8.5	Kabul edilmedi
10	30	17	5.6	Kabul edilmedi
13	30	21	2.7	Kabul edildi

3.16.1.2. Aday transgenik tütün bitkilerinde PCR analizleri

T1 transgenik bitkilerin 9 hattından ve kontrol bitkilerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. *PvAP2-ERF31*, *HptII* genleri için PCR yapılmıştır. PCR sonucunda 9 hattın tamamında *HptII* geni *PvAP2-ERF31* geni ise 8 hatta bulunduğu görülmüştür.



Şekil 3.20. *PvAP2-ERF31* geni için yapılan PCR sonuçları



Şekil 3.21. *HptII* geni için yapılan PCR sonuçları

3.16.2. Fizyolojik analizler

3.16.2.1. Tuz stresi analizi

Transgenik ve transgenik olmayan bitkiler üzerindeki tuz stresinin etkileri 200 mM NaCl içeren MS ortamlarında test edilmiştir. 200 mM NaCl içeren MS besi ortamında büyütülen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkileri 8 hafta büyütülüp karşılaştırıldığında transgenik bitkilerin kök ve yaprakların daha iyi geliştiği gözlenmiştir.



Şekil 3.22. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyütülen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları (a: transgenik tütün, b: kontrol (wild-type) (2. hat))



Şekil 3.23. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wld-type) tütün bitkileri (a: transgenik tütün bitkileri, b: kontrol tütün bitkileri (2. Hat))



Şekil 3.24. 200 mM tuz içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması

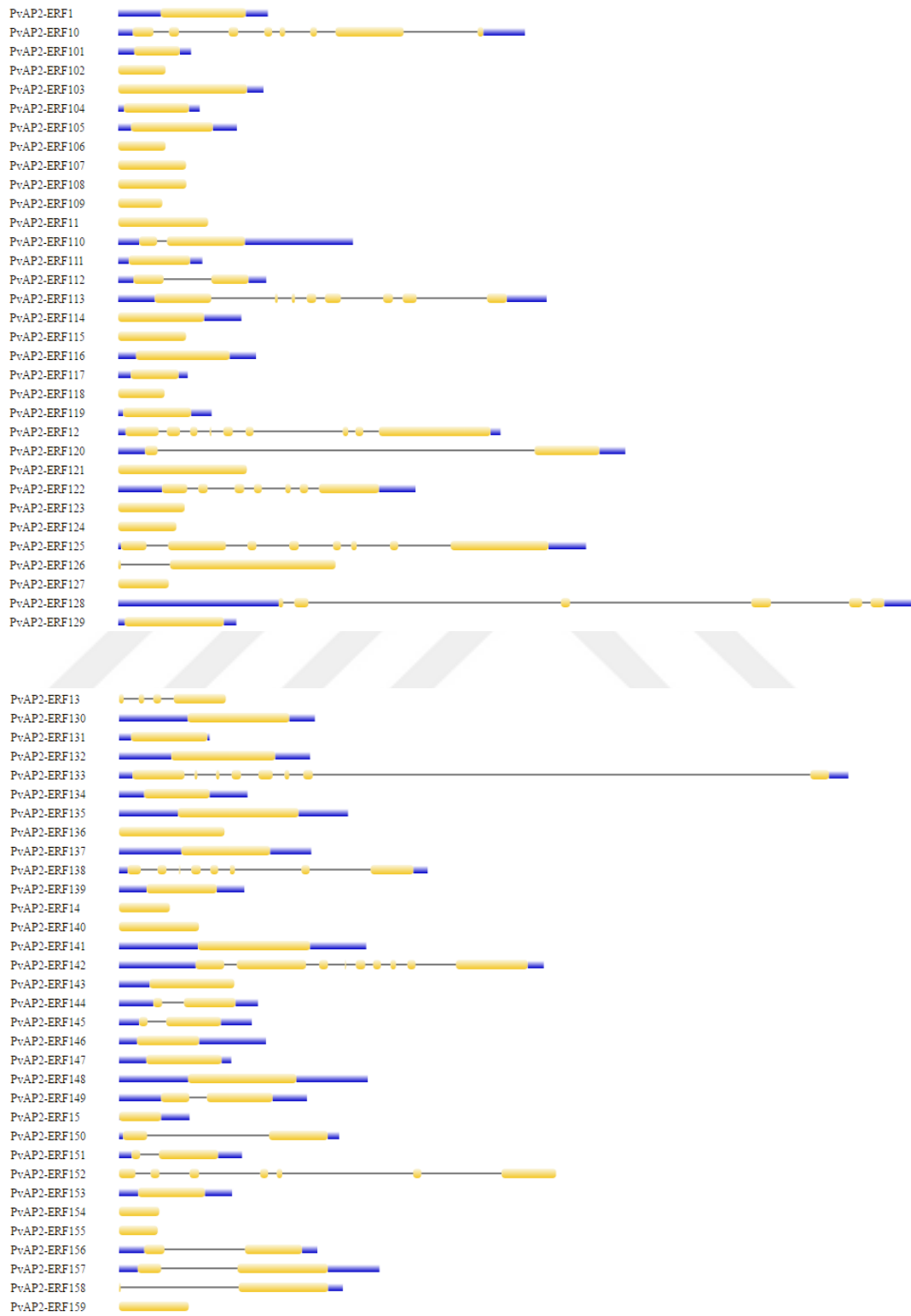
4. SONUÇ

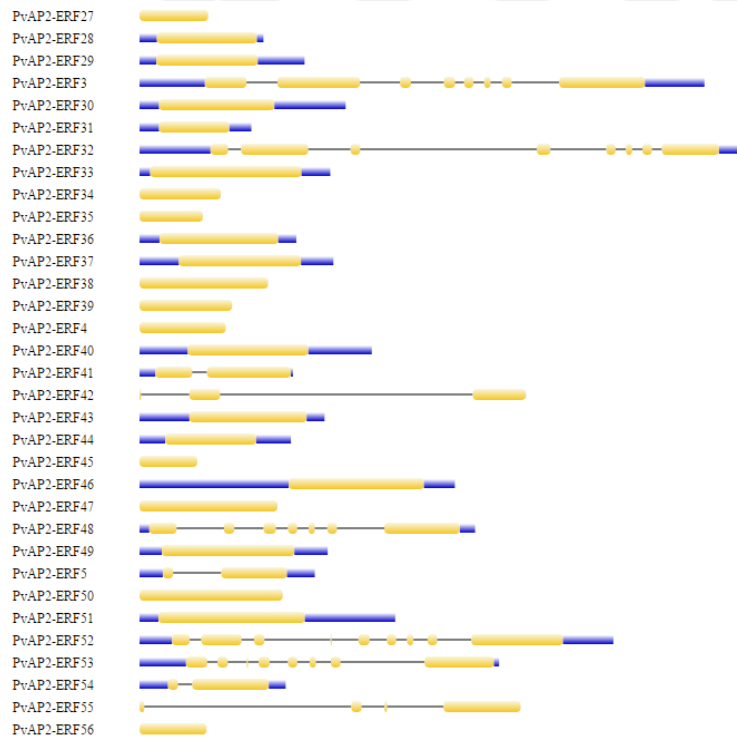
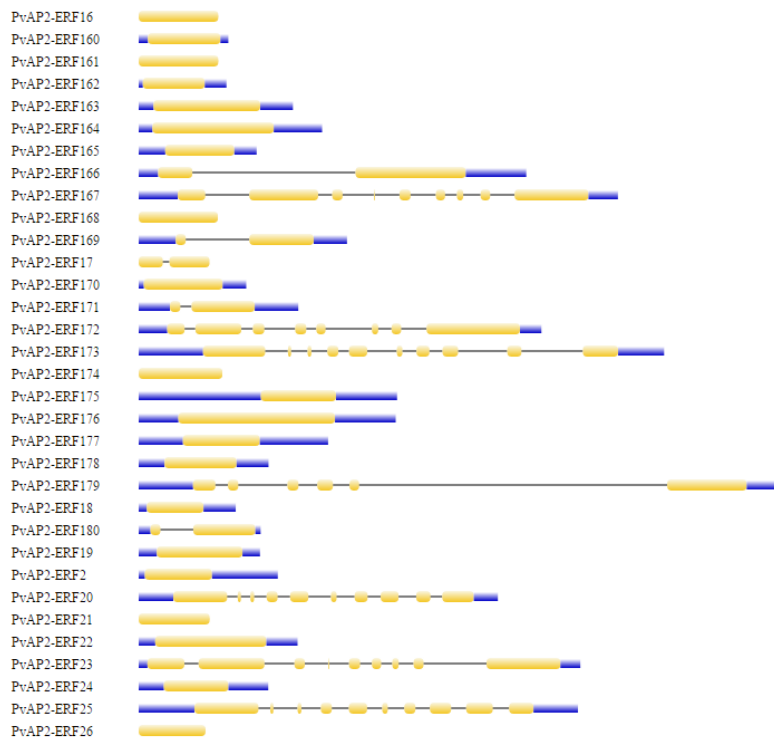
AP2-ERF transkripsiyon faktörleri büyüme, gelişme ve stres cevabı gibi farklı bitki süreçlerinin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Bu önemli fonksiyonlardan dolayı farklı bitkilerde kapsamlı analizleri yapılmıştır. Bu çalışma, fasulye de AP2-ERF transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi ve tanımlanması ile ilgili ilk rapordur. AP2-ERF ailesine ait toplam 180 varsayımsal fasulye geni biyoinformatik araçlar kullanılarak tanımlandı. Ek olarak, tüm AP2-ERF transkripsiyon faktörü genlerinin genomik yapıları kromozomal lokasyonları, promotor analizi, protein etkileşimi ve sekans homolojilerinin karakterizasyonları gerçekleştirildi. Seçilen AP2-ERF genlerinin ekspresyon analizi qRT-PCR ve tuz stresine maruz bırakılmış kök ve yaprak dokularından elde edilen daha önceden yüklenmiş olan RNA-seq verileri kullanılarak yapıldı. Biyoinformatik çalışmalardan sonra en yüksek ekspresyon seviyesine sahip genler klonlanarak tuz stresine tabi tutulmuşlardır. Bu çalışma sonucu 200 mM tuz dayanıklı olduğu ispatlanmıştır. Bu geniş kapsamlı mevcut çalışmanın sonuçları tuza toleranslı fasulye çeşidinde AP2-ERF ailesi üyelerinin rollerini anlamak için yardımcı olacaktır ayrıca genetik mühendisliği yaklaşımları için fonksiyonel gen kaynakları da sağlayabilir.

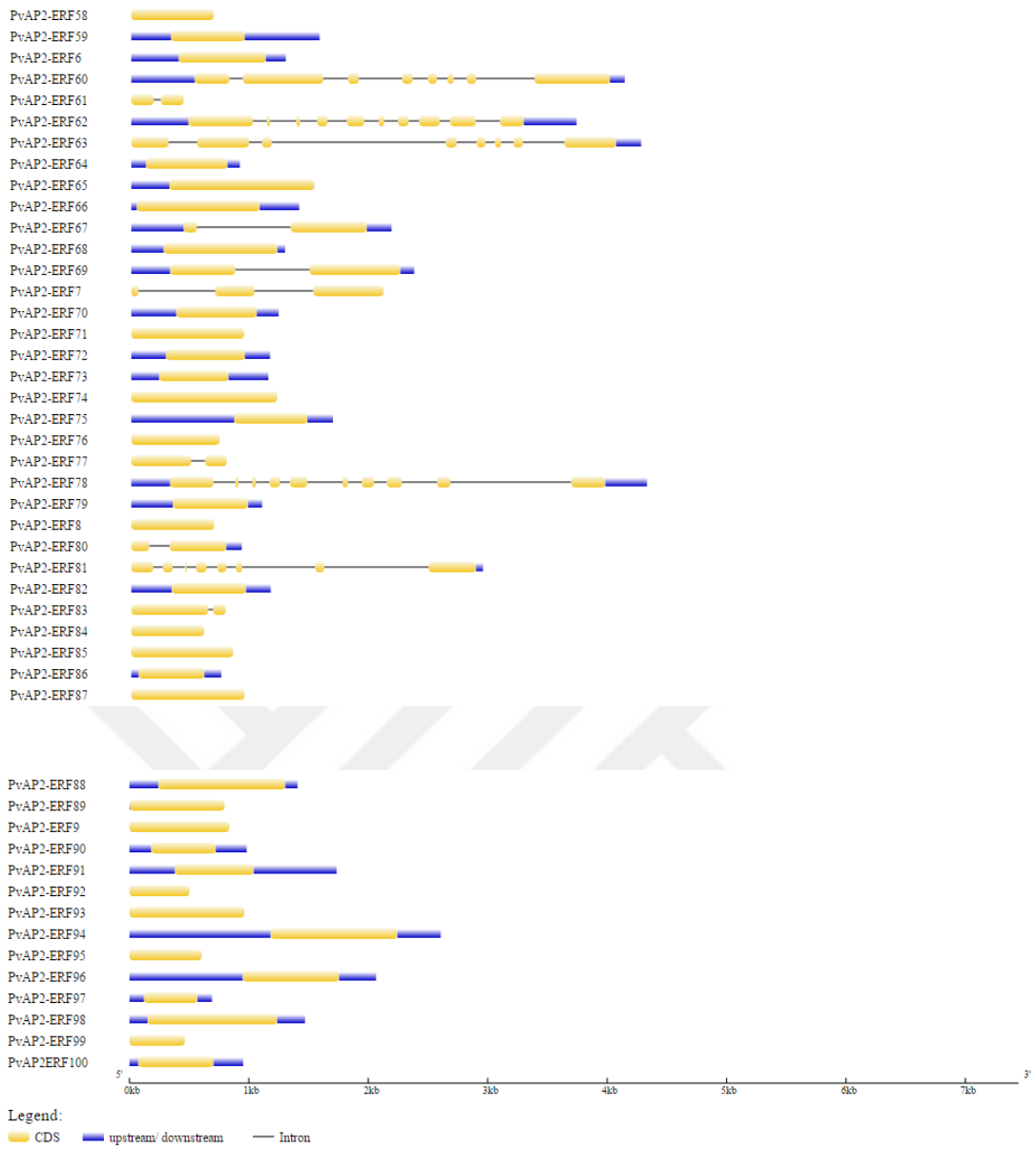
EKLER



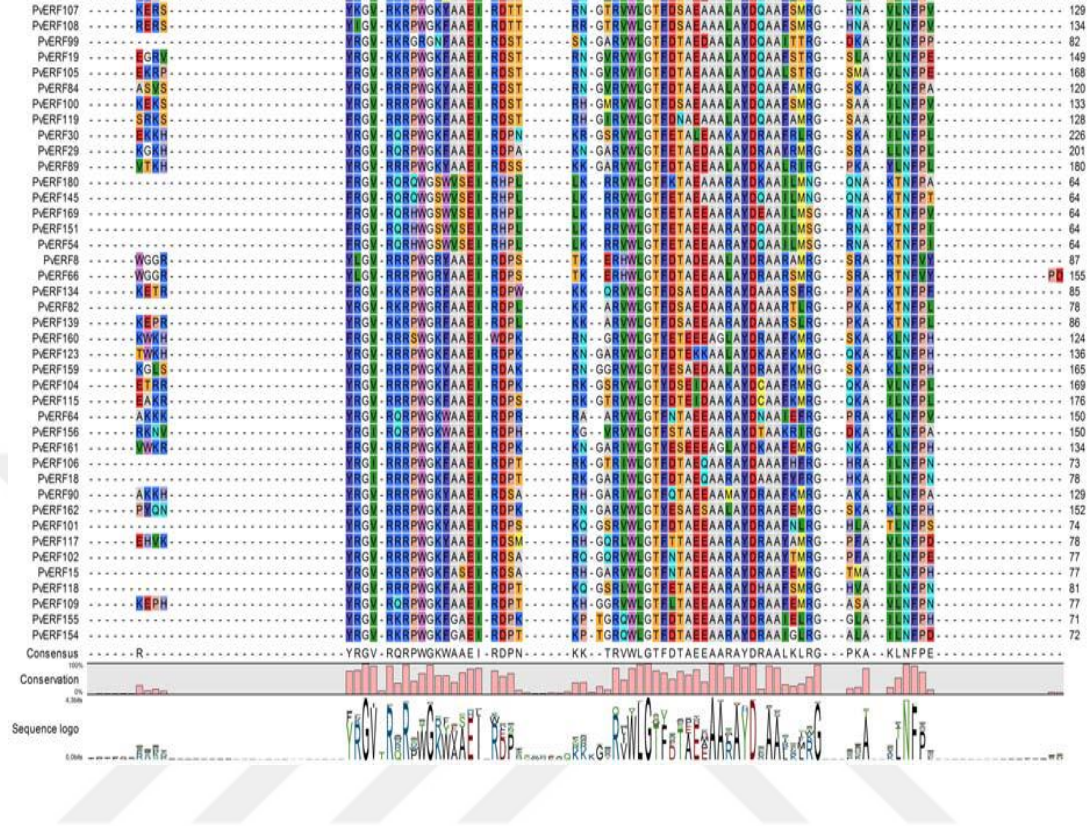
EK 1-180 PVAP2-ERF GENİNİN GENE STRUCTURE DISPLAY SERVER (GSDS) İLE EXON İNTRON YAPILARININ ANALİZİ







EK 2- PVAP2-ERF PROTEİNLERİNİN MEGA 6 YAZILIMI İLE KORUNMUŞ MOTİFLERİN ÇOKLU HİZALAMA İLE BULUNMASI



EK 3- QRT-PCR EXPRESYON ANALİZİNDE KULLANILAN PRİMER SEKANSLARI

	Primer	Forward	Reverse	NCBI
PvERF69	PHAVU_004G09	CTTGGCACATTTGAC	AGAGGTGGAAGTCT	XM_0071519
	2100g	ACTGA	CTAAC	23.1
PvERF119	PHAVU_007G27	ACATGGATTGCTCAC	TTCTTCGTCTTCTTTG	XM_0071457
	3000g	TCTCT	CAGC	82.1
PvERF100	PHAVU_007G12	CGCAAAGGAGAAGT	GTGTGGAGTCCCTAA	XM_0071440
	7800g	CCTAC	TCTCC	28.1
PvERF53	PHAVU_003G15	ATCTCGGAACTTACG	TGTTGGTGTGTTATT	XM_0071547
	3100g	CTACC	GGGC	91.1
PvERF70	PHAVU_004G12	CAAATGGGTTTGTGA	GCAAAGTTGAGACAC	XM_0071522
	2000g	GGTGA	GCATA	81.1
PvERF177	PHAVU_011G12	CACCAATCCCTTTTC	GAGCCAGGTTAAGAT	XM_0071327
	5200g	GGTT	CGAGA	32.1
PvERF111	PHAVU_007G22	GAGGAGGTGTTAAC	TCTACTGTGGTTTCCC	XM_0071451
	2500g	ATGCC	CATC	79.1
PvERF150	PHAVU_009G16	CACCACTAGCAATGA	CCAGCAGTACCCATG	XM_0071377
	1000g	CCAAG	ATTTG	87.1
PvERF72	PHAVU_004G16	GTCCACTCCAAGAA	GGATTTCCGACACCC	XM_0071528
	9800g	ACGAG	ATTTT	40.1
	Skip16	CACCAGGATGCAAAA	ATCCGCTTGTCCTTG	XM_0071318
		GTGG	AAC	76.1

EK 4- BİTKİLERDEKİ AP2-ERF TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ SAYISININ ÖZETİ

Türler	AP2/ERF Sayısı	Genom Boyutu (Mb)	AP2/ERF/Mb
<i>Arabidopsis thaliana</i>	122	135	0,9037
<i>Daucus carota</i>	267	480	0,5563
<i>Brassica rapa</i>	248	507	0,4892
<i>Populus trichocarpa</i>	200	423	0,4728
<i>Salix arbutifolia</i>	173	425	0,4071
<i>Brassica oleracea</i>	226	603	0,3748
<i>Oryza sativa</i>	139	372	0,3737
<i>Cucumis melo</i>	136	375	0,3627
<i>Ricinus cummunis</i>	114	320	0,3563
<i>Setaria italica</i>	171	515	0,332
<i>Phaseolus vulgaris</i>	180	587	0,3066
<i>Eucalyptus grandis</i>	209	691	0,3025
<i>Citrus sinensis</i>	108	380	0,2842
<i>Cucumis sativus</i>	103	367	0,2807
<i>Vitis vinifera</i>	132	487	0,271
<i>Malus domestica</i>	209	881	0,2372
<i>Solanum tuberosum</i>	155	800	0,1938
<i>Solanum lycopersicum</i>	112	950	0,1179
<i>Glycine max</i>	98	975	0,1005
<i>Zea mays</i>	184	2067	0,089
<i>Phyllostachys edulis</i>	116	2050	0,0566
<i>Triticum aestivum</i>	117	17000	0,0069

EK 5- FASULYEDEKİ AP2-ERF SÜPER AİLESİNİN CUCUMİS MELO, SOLANUM LYPERİCON, GLYCİNE MAX, ARABİDOPSİS THALİANA İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Group	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Solanum lycopersicon</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AP2	27	13	16	26	18
ERF	149	119	93	120	122
CBF/DREB	54	55	25	36	57
ERF	95	64	60	62	58
Diğerleri					7
Tamamlanmamış AP2/ERF			8	22	
RAV	3	4	3	2	6
Soloist	1				1
Toplam	180	136	112	148	147

EK 6- FASULYEDE BULUNAN 180 AP2-ERF GENİ

ID	Phytozome Identifier	Chromosomes	Start and end positions (bp)	Length (bp)	CDS (bp)	Protein length (aa)
PvERF1	Phvul.001G010400	Chr01	931454-932855	1402	798	265
PvERF2	Phvul.001G023700	Chr01	2101326-2102436	1111	537	178
PvERF3	Phvul.001G031200	Chr01	2907733-2912245	4513	2064	687
PvERF4	Phvul.001G044500	Chr01	4680371-4681060	690	690	229
PvERF5	Phvul.001G046900	Chr01	5091472-5092865	1394	600	199
PvERF6	Phvul.001G073800	Chr01	10050549-10051844	1296	735	244
PvERF7	Phvul.001G084000	Chr01	14986698-14988815	2118	981	326
PvERF8	Phvul.001G099700	Chr01	22388801-22389496	696	696	231
PvERF9	Phvul.001G111800	Chr01	30786425-30787261	837	837	278
PvERF10	Phvul.001G131300	Chr01	37223732-37227544	3813	1254	417
PvERF11	Phvul.001G136100	Chr01	38195399-38196241	843	843	280
PvERF12	Phvul.001G137500	Chr01	38448464-38452047	3584	1845	614
PvERF13	Phvul.001G137600	Chr01	38463292-38464293	1002	657	218
PvERF14	Phvul.001G157600	Chr01	41586154-41586630	477	477	158
PvERF15	Phvul.001G160100	Chr01	41963965-41964626	662	393	130
PvERF16	Phvul.001G160200	Chr01	41973984-41974619	636	636	211
PvERF17	Phvul.001G160300	Chr01	41988449-41989014	566	513	170
PvERF18	Phvul.001G160400	Chr01	42010504-42011278	775	453	150
PvERF19	Phvul.001G160500	Chr01	42037682-42038650	969	684	227
PvERF20	Phvul.001G174400	Chr01	43723288-43726156	2869	1380	459
PvERF21	Phvul.001G187100	Chr01	45289609-45290175	567	567	188
PvERF22	Phvul.001G251200	Chr01	50886895-50888163	1269	888	295
PvERF23	Phvul.002G009100	Chr02	1058028-1061555	3528	1794	598
PvERF24	Phvul.002G016700	Chr02	1837177-1838211	1035	516	171
PvERF25	Phvul.002G016900	Chr02	1860815-1864323	3509	1515	504
PvERF26	Phvul.002G035100	Chr02	3499002-3499535	534	534	177
PvERF27	Phvul.002G035900	Chr02	3545434-3545982	549	549	182
PvERF28	Phvul.002G036000	Chr02	3561530-3562521	992	801	266
PvERF29	Phvul.002G055700	Chr02	5668036-5669347	1312	813	270
PvERF30	Phvul.002G055800	Chr02	5691260-5692900	1641	915	304
PvERF31	Phvul.002G056800	Chr02	5810982-5811876	895	564	187
PvERF32	Phvul.002G146400	Chr02	28359488-28364314	4827	1512	503
PvERF33	Phvul.002G149500	Chr02	28972219-28973736	1518	1203	400
PvERF34	Phvul.002G153900	Chr02	29528341-29528991	651	651	216
PvERF35	Phvul.002G154000	Chr02	29572213-29572719	507	507	168
PvERF36	Phvul.002G162500	Chr02	30433762-30435007	1246	942	313
PvERF37	Phvul.002G163700	Chr02	30545248-30546790	1543	969	322
PvERF38	Phvul.002G168900	Chr02	31177497-31178525	1029	1029	342
PvERF39	Phvul.002G237300	Chr02	40301361-40302101	741	741	246
PvERF40	Phvul.002G254500	Chr02	42080727-42082576	1850	957	318

PvERF41	Phvul.002G267800	Chr02	43308758-43309976	1219	957	318
PvERF42	Phvul.002G281300	Chr02	44487105-44490185	3081	681	226
PvERF43	Phvul.002G295700	Chr02	45929067-45930538	1472	930	309
PvERF44	Phvul.002G310200	Chr02	47177131-47178333	1203	729	242
PvERF45	Phvul.002G315900	Chr02	47666399-47666860	462	462	153
PvERF46	Phvul.003G035500	Chr03	3558866-3561380	2515	1083	360
PvERF47	Phvul.003G064800	Chr03	9171392-9172486	1095	1095	364
PvERF48	Phvul.003G069000	Chr03	10190940-10193616	2677	1206	404
PvERF49	Phvul.003G102500	Chr03	25181566-25183062	1497	1053	350
PvERF50	Phvul.003G107900	Chr03	26813958-26815094	1137	1137	378
PvERF51	Phvul.003G111800	Chr03	28178527-28180564	2038	1164	387
PvERF52	Phvul.003G144500	Chr03	34150168-34153951	3784	1581	526
PvERF53	Phvul.003G153100	Chr03	35757558-35760426	2869	1107	368
PvERF54	Phvul.003G165000	Chr03	37339186-37340346	1161	693	230
PvERF55	Phvul.003G180000	Chr03	39171521-39174562	3042	759	252
PvERF56	Phvul.003G212700	Chr03	42784293-42784829	537	537	178
PvERF57	Phvul.003G212800	Chr03	42804542-42805711	1170	882	293
PvERF58	Phvul.003G222600	Chr03	44044998-44045690	693	693	230
PvERF59	Phvul.003G223600	Chr03	44193652-44195231	1580	618	205
PvERF60	Phvul.003G232600	Chr03	45498765-45502904	4140	1980	659
PvERF61	Phvul.003G241700	Chr03	46504117-46504556	440	381	126
PvERF62	Phvul.003G241900	Chr03	46544077-46547812	3736	1554	517
PvERF63	Phvul.003G288500	Chr03	51447092-51451369	4278	1566	521
PvERF64	Phvul.003G292400	Chr03	51831261-51832171	911	684	227
PvERF65	Phvul.004G031900	Chr04	3566458-3567993	1536	1215	404
PvERF66	Phvul.004G068900	Chr04	10270274-10271682	1409	1032	343
PvERF67	Phvul.004G069900	Chr04	10524334-10526517	2184	747	248
PvERF68	Phvul.004G081200	Chr04	14013830-14015119	1290	954	317
PvERF69	Phvul.004G092100	Chr04	24438791-24441164	2374	1308	435
PvERF70	Phvul.004G122000	Chr04	39326716-39327951	1236	675	224
PvERF71	Phvul.004G157600	Chr04	43964844-43965791	948	948	315
PvERF72	Phvul.004G169800	Chr04	45126736-45127899	1164	663	220
PvERF73	Phvul.005G074700	Chr05	13295710-13296859	1150	582	193
PvERF74	Phvul.005G105200	Chr05	31203406-31204629	1224	1224	407
PvERF75	Phvul.005G111200	Chr05	32566424-32568115	1692	615	204
PvERF76	Phvul.005G126300	Chr05	35040940-35041680	741	741	246
PvERF77	Phvul.005G126600	Chr05	35099239-35100039	801	684	227
PvERF78	Phvul.005G138300	Chr05	36714215-36718541	4327	1383	475
PvERF79	Phvul.005G170600	Chr05	39420680-39421777	1098	633	210
PvERF80	Phvul.005G180600	Chr05	40253016-40253942	927	627	208
PvERF81	Phvul.005G183700	Chr05	40443575-40446525	2951	966	321
PvERF82	Phvul.006G047800	Chr06	16171033-16172202	1170	624	207
PvERF83	Phvul.006G080000	Chr06	19885920-19886712	793	753	250

PvERF84	Phvul.006G106100	Chr06	22259920-22260531	612	612	203
PvERF85	Phvul.006G110200	Chr06	22619263-22620117	855	855	284
PvERF86	Phvul.006G114100	Chr06	22942518-22943272	755	552	183
PvERF87	Phvul.006G163100	Chr06	27418948-27419898	951	951	316
PvERF88	Phvul.006G173500	Chr06	28425098-28426505	1408	1062	353
PvERF89	Phvul.006G179700	Chr06	28949911-28950707	797	792	263
PvERF90	Phvul.006G179800	Chr06	28956271-28957252	982	540	179
PvERF91	Phvul.006G183100	Chr06	29213340-29215073	1734	660	219
PvERF92	Phvul.006G183200	Chr06	29232219-29232722	504	504	167
PvERF93	Phvul.007G002900	Chr07	201437-202399	963	963	320
PvERF94	Phvul.007G027000	Chr07	1987568-1990173	2606	1062	353
PvERF95	Phvul.007G066500	Chr07	5928454-5929059	606	606	201
PvERF96	Phvul.007G082000	Chr07	8065792-8067856	2065	807	268
PvERF97	Phvul.007G086600	Chr07	8592476-8593166	691	447	148
PvERF98	Phvul.007G102800	Chr07	11606561-11608030	1470	1086	361
PvERF99	Phvul.007G121200	Chr07	21423708-21424172	465	465	154
PvERF100	Phvul.007G127800	Chr07	27274067-27275018	952	630	209
PvERF101	Phvul.007G128000	Chr07	27559597-27560279	683	429	142
PvERF102	Phvul.007G128100	Chr07	27720034-27720477	444	444	147
PvERF103	Phvul.007G135300	Chr07	33385083-33386444	1362	1209	402
PvERF104	Phvul.007G135900	Chr07	33583547-33584310	764	612	203
PvERF105	Phvul.007G193300	Chr07	43116184-43117296	1113	768	255
PvERF106	Phvul.007G193400	Chr07	43136157-43136600	444	444	147
PvERF107	Phvul.007G193700	Chr07	43194246-43194881	636	636	211
PvERF108	Phvul.007G193800	Chr07	43227132-43227770	639	639	212
PvERF109	Phvul.007G193900	Chr07	43237645-43238058	414	414	137
PvERF110	Phvul.007G217800	Chr07	45677796-45679996	2201	900	299
PvERF111	Phvul.007G222500	Chr07	46214380-46215168	789	576	191
PvERF112	Phvul.007G222600	Chr07	46221519-46222906	1388	633	210
PvERF113	Phvul.007G240200	Chr07	48016768-48020784	4017	1233	410
PvERF114	Phvul.007G241600	Chr07	48138008-48139162	1155	807	268
PvERF115	Phvul.007G241800	Chr07	48154568-48155203	636	636	211
PvERF116	Phvul.007G255100	Chr07	49321858-49323149	1292	879	292
PvERF117	Phvul.007G272800	Chr07	51105207-51105858	652	450	149
PvERF118	Phvul.007G272900	Chr07	51111180-51111614	435	435	144
PvERF119	Phvul.007G273000	Chr07	51127595-51128470	876	639	212
PvERF120	Phvul.008G019600	Chr08	1707540-1712293	4754	726	241
PvERF121	Phvul.008G039300	Chr08	3311273-3312478	1206	1206	401
PvERF122	Phvul.008G043500	Chr08	3742495-3745281	2787	1182	393
PvERF123	Phvul.008G046400	Chr08	4004959-4005582	624	624	207
PvERF124	Phvul.008G046500	Chr08	4010611-4011156	546	546	181
PvERF125	Phvul.008G052000	Chr08	4601738-4606123	4386	2070	689
PvERF126	Phvul.008G092800	Chr08	9500856-9502893	2038	1578	525

PvERF127	Phvul.008G098900	Chr08	10466381-10466854	474	474	157
PvERF128	Phvul.008G131500	Chr08	20402865-20410309	7445	690	230
PvERF129	Phvul.008G141000	Chr08	23916631-23917738	1108	930	309
PvERF130	Phvul.008G159400	Chr08	40680584-40682430	1847	963	320
PvERF131	Phvul.008G165000	Chr08	42621369-42622218	850	717	238
PvERF132	Phvul.008G172200	Chr08	45116054-45117855	1802	984	327
PvERF133	Phvul.008G185400	Chr08	48884848-48891709	6862	1077	358
PvERF134	Phvul.008G214700	Chr08	52704530-52705744	1215	615	204
PvERF135	Phvul.008G220400	Chr08	53286141-53288298	2158	1143	380
PvERF136	Phvul.008G222400	Chr08	53485082-53486071	990	990	329
PvERF137	Phvul.008G246000	Chr08	56074147-56075959	1813	753	280
PvERF138	Phvul.008G253600	Chr08	56759415-56762319	2905	909	302
PvERF139	Phvul.008G271100	Chr08	58092188-58093372	1185	660	219
PvERF140	Phvul.009G013200	Chr09	2059353-2060102	750	750	249
PvERF141	Phvul.009G029600	Chr09	6536069-6538397	2329	1062	353
PvERF142	Phvul.009G074300	Chr09	12286871-12290865	3995	1974	657
PvERF143	Phvul.009G084400	Chr09	13327339-13328429	1091	804	267
PvERF144	Phvul.009G089300	Chr09	13898357-13899669	1313	576	191
PvERF145	Phvul.009G093600	Chr09	14411949-14413203	1255	594	197
PvERF146	Phvul.009G109600	Chr09	16431520-16432907	1388	585	194
PvERF147	Phvul.009G123300	Chr09	18302891-18303953	1063	708	235
PvERF148	Phvul.009G137000	Chr09	20103112-20105454	2343	1026	341
PvERF149	Phvul.009G137900	Chr09	20264478-20266250	1773	891	296
PvERF150	Phvul.009G161000	Chr09	23312039-23314113	2075	777	258
PvERF151	Phvul.009G196900	Chr09	29159605-29160767	1163	636	211
PvERF152	Phvul.009G206500	Chr09	30520376-30524486	4111	1041	346
PvERF153	Phvul.009G225000	Chr09	33327983-33329052	1070	627	208
PvERF154	Phvul.009G240800	Chr09	35418233-35418610	378	378	125
PvERF155	Phvul.009G240900	Chr09	35430515-35430877	363	363	120
PvERF156	Phvul.009G251600	Chr09	36449776-36451645	1870	726	241
PvERF157	Phvul.009G262200	Chr09	37365318-37367770	2453	1068	355
PvERF158	Phvul.010G035200	Chr10	5211022-5213130	2109	855	284
PvERF159	Phvul.010G050500	Chr10	8020695-8021348	654	654	217
PvERF160	Phvul.010G050600	Chr10	8042080-8042795	716	579	192
PvERF161	Phvul.010G050700	Chr10	8078193-8078828	636	636	211
PvERF162	Phvul.010G050800	Chr10	8082893-8083593	701	495	164
PvERF163	Phvul.010G054000	Chr10	8503366-8504597	1232	852	283
PvERF164	Phvul.010G092300	Chr10	34005917-34007381	1465	969	322
PvERF165	Phvul.010G114900	Chr10	38090570-38091511	942	552	183
PvERF166	Phvul.010G124700	Chr10	39467544-39470639	3096	1155	384
PvERF167	Phvul.010G130200	Chr10	40027019-40030846	3828	1743	580
PvERF168	Phvul.010G146600	Chr10	41789538-41790170	633	633	210
PvERF169	Phvul.010G154900	Chr10	42398336-42399999	1664	594	197

PvERF170	Phvul.010G158700	Chr10	42752077-42752935	859	630	209
PvERF171	Phvul.010G159500	Chr10	42802726-42804000	1275	588	195
PvERF172	Phvul.011G058000	Chr11	5016893-5020109	3217	1635	544
PvERF173	Phvul.011G071100	Chr11	6338128-6342324	4197	1413	485
PvERF174	Phvul.011G091400	Chr11	9148323-9148991	669	669	222
PvERF175	Phvul.011G107800	Chr11	12892620-12894683	2064	600	199
PvERF176	Phvul.011G118600	Chr11	19321983-19324035	2053	1251	416
PvERF177	Phvul.011G125200	Chr11	26734318-26735830	1513	615	204
PvERF178	Phvul.011G162900	Chr11	42720583-42721619	1037	576	191
PvERF179	Phvul.011G187400	Chr11	46403162-46408304	5143	1197	398
PvERF180	Phvul.L006500		scaffold_91:9073-10046	974	576	191

EK 7- PVAP2-ERF AİLESİNİN PROTEİN MOLEKÜLER AĞIRLIKLARI, pI DEĞERLERİ, KARARLILIK İNDEKSİ, ÇÖZÜNÜRLÜK VE SUBSELÜLER LOKALİZASYON ANALİZ

ID	Phytozome Identifier	Protein length (aa)	pI	Molecular weight (Da)	Instability index	Stable or unstable	Solubility/Score
PvERF1	Phvul.001G010400	265	4,93	29057,1	45,19	unstable	insoluble; 0.574
PvERF2	Phvul.001G023700	178	9,61	20485	41,69	unstable	insoluble; 0.503
PvERF3	Phvul.001G031200	687	6,64	75432,4	49,51	unstable	soluble; 0.608
PvERF4	Phvul.001G044500	229	4,78	25706,2	40,08	unstable	soluble; 0.649
PvERF5	Phvul.001G046900	199	8,86	22372,2	63,16	unstable	insoluble; 0.484
PvERF6	Phvul.001G073800	244	5,77	26835	49,26	unstable	insoluble; 0.571
PvERF7	Phvul.001G084000	326	6,53	36576,4	62,9	unstable	insoluble; 0.329
PvERF8	Phvul.001G099700	231	5,24	25456,7	49,83	unstable	insoluble; 0.501
PvERF9	Phvul.001G111800	278	6,19	30646	43,73	unstable	insoluble; 0.460
PvERF10	Phvul.001G131300	417	8,85	46658	54,45	unstable	insoluble; 0.546
PvERF11	Phvul.001G136100	280	5,13	31503	55,59	unstable	soluble; 0.659
PvERF12	Phvul.001G137500	614	4,98	68086,8	40,63	unstable	insoluble; 0.454
PvERF13	Phvul.001G137600	218	4,95	24504,2	38	unstable	insoluble; 0.419
PvERF14	Phvul.001G157600	158	9,88	17846,5	53,47	stable	insoluble; 0.434
PvERF15	Phvul.001G160100	130	6,83	14743,7	43,74	unstable	soluble; 0.652
PvERF16	Phvul.001G160200	211	9,39	23643,6	47,71	unstable	insoluble; 0.516
PvERF17	Phvul.001G160300	170	4,72	19198,6	61,82	unstable	insoluble; 0.452
PvERF18	Phvul.001G160400	150	6,29	16476,9	43,86	unstable	soluble; 0.823
PvERF19	Phvul.001G160500	227	4,94	25611,2	42,74	unstable	soluble; 0.706
PvERF20	Phvul.001G174400	459	6,23	50414,7	49,98	unstable	insoluble; 0.550
PvERF21	Phvul.001G187100	188	5,02	20166,4	48,7	unstable	soluble; 0.708
PvERF22	Phvul.001G251200	295	5,45	32793,6	45,74	unstable	insoluble; 0.538

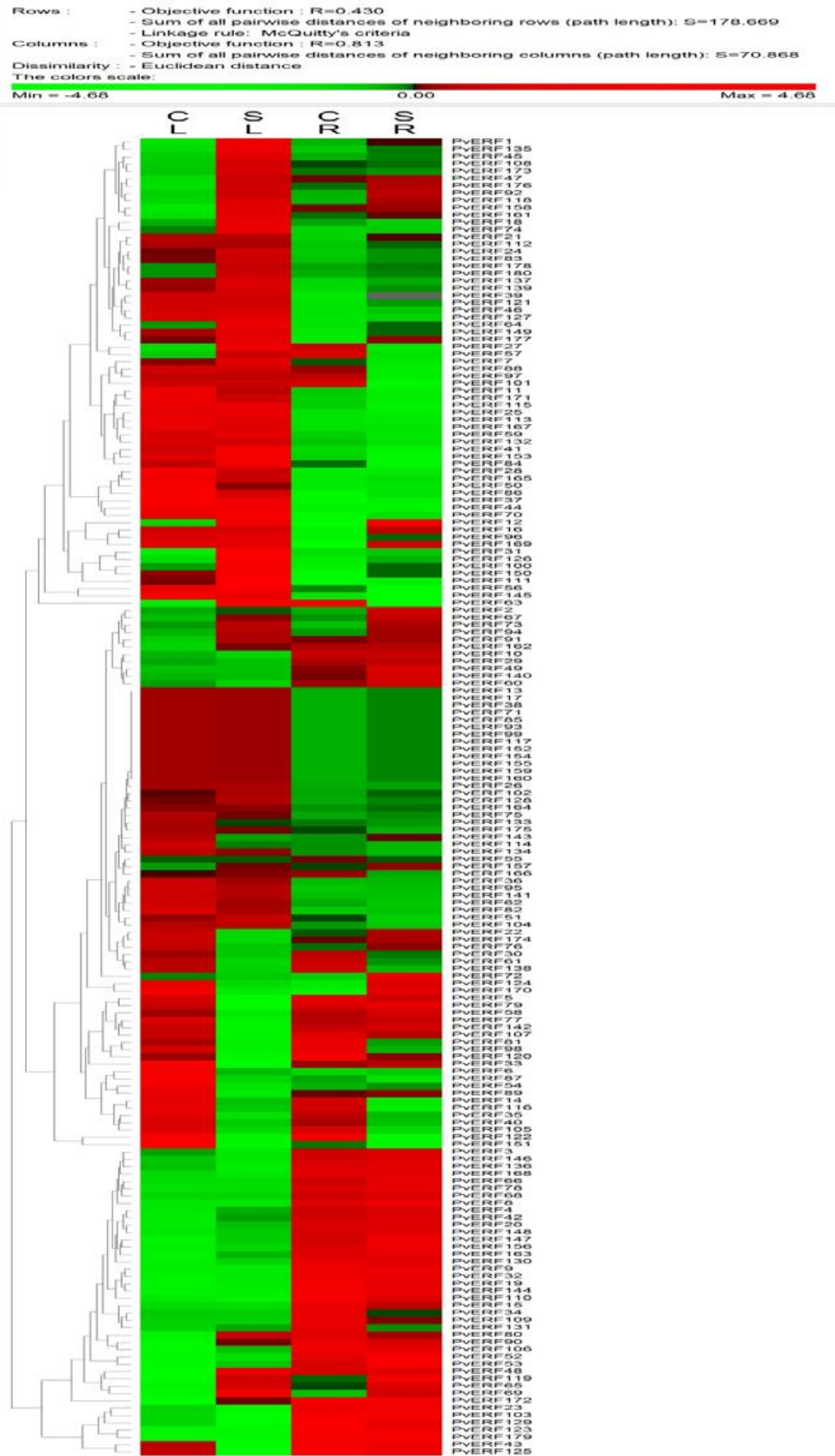
PvERF23	Phvul.002G009100	598	6,88	67205,9	58,1	unstable	insoluble; 0.580
PvERF24	Phvul.002G016700	171	8,6	18862,2	57,28	unstable	soluble; 0.631
PvERF25	Phvul.002G016900	504	7,72	55438,1	56,76	unstable	soluble; 0.707
PvERF26	Phvul.002G035100	177	4,97	19497,4	67,56	unstable	soluble; 0.747
PvERF27	Phvul.002G035900	182	5,71	20227,7	53,55	unstable	insoluble; 0.487
PvERF28	Phvul.002G036000	266	6,12	30003,8	60,57	unstable	soluble; 0.694
PvERF29	Phvul.002G055700	270	6,76	29405	56,74	unstable	insoluble; 0.570
PvERF30	Phvul.002G055800	304	8,45	33907,1	50,65	unstable	insoluble; 0.549
PvERF31	Phvul.002G056800	187	9,28	20656,5	43,05	unstable	soluble; 0.667
PvERF32	Phvul.002G146400	503	6,55	55023,5	42,06	unstable	insoluble; 0.580
PvERF33	Phvul.002G149500	400	6,43	44372	54,56	unstable	insoluble; 0.578
PvERF34	Phvul.002G153900	216	5,11	24572,3	77,64	unstable	insoluble; 0.525
PvERF35	Phvul.002G154000	168	6,42	18511,9	55,04	unstable	insoluble; 0.549
PvERF36	Phvul.002G162500	313	5,44	35023,9	50,33	unstable	soluble; 0.639
PvERF37	Phvul.002G163700	322	8,7	35266,6	41,85	unstable	soluble; 0.600
PvERF38	Phvul.002G168900	342	5,03	38663,8	65,31	unstable	soluble; 0.676
PvERF39	Phvul.002G237300	246	8,27	27875,3	31,33	stable	insoluble; 0.327
PvERF40	Phvul.002G254500	318	5,41	35548,7	44,79	unstable	insoluble; 0.496
PvERF41	Phvul.002G267800	318	6,73	35365,6	65,52	unstable	soluble; 0.772
PvERF42	Phvul.002G281300	226	9,92	25017	67,25	unstable	soluble; 0.774
PvERF43	Phvul.002G295700	309	5	34265	53,76	unstable	soluble; 0.642
PvERF44	Phvul.002G310200	242	4,87	26154,9	54,14	unstable	soluble; 0.856
PvERF45	Phvul.002G315900	153	8,78	17335,5	62,78	unstable	soluble; 0.777
PvERF46	Phvul.003G035500	360	4,71	39370,5	50,93	unstable	soluble; 0.632
PvERF47	Phvul.003G064800	364	6,67	40165,7	58,54	unstable	insoluble; 0.578
PvERF48	Phvul.003G069000	404	9,34	45576,7	60,13	unstable	soluble; 0.604
PvERF49	Phvul.003G102500	350	5,55	38898,6	55,54	unstable	insoluble; 0.382
PvERF50	Phvul.003G107900	378	9,87	43617	32,92	stable	insoluble; 0.454
PvERF51	Phvul.003G111800	387	8,96	42253,5	40,55	unstable	soluble; 0.654
PvERF52	Phvul.003G144500	526	8,55	56410,6	42,69	unstable	soluble; 0.639
PvERF53	Phvul.003G153100	368	6,68	42544,2	49,54	unstable	insoluble; 0.598
PvERF54	Phvul.003G165000	230	6,39	26177,1	66,1	unstable	soluble; 0.683
PvERF55	Phvul.003G180000	252	9,43	28553,7	42,94	unstable	insoluble; 0.445
PvERF56	Phvul.003G212700	178	4,95	19308,6	56,04	unstable	soluble; 0.687
PvERF57	Phvul.003G212800	293	5,26	32295	54,7	unstable	insoluble; 0.405
PvERF58	Phvul.003G222600	230	5,66	25399,8	47,68	unstable	soluble; 0.787
PvERF59	Phvul.003G223600	205	4,84	22308,8	59,27	unstable	insoluble; 0.532
PvERF60	Phvul.003G232600	659	6,27	73664,4	57,59	unstable	insoluble; 0.575
PvERF61	Phvul.003G241700	126	9,2	13914,3	43,37	unstable	insoluble; 0.327
PvERF62	Phvul.003G241900	517	6,24	57051,6	61,82	unstable	soluble; 0.702
PvERF63	Phvul.003G288500	521	5,71	58204,7	48,9	unstable	soluble; 0.649
PvERF64	Phvul.003G292400	227	5,64	25001	40,59	unstable	insoluble; 0.478
PvERF65	Phvul.004G031900	404	4,71	45460,3	48,01	unstable	soluble; 0.684
PvERF66	Phvul.004G068900	343	5,6	37981,9	49,12	unstable	soluble; 0.641

PvERF67	Phvul.004G069900	248	8,63	26614,2	46,23	unstable	soluble; 0.807
PvERF68	Phvul.004G081200	317	5,66	36018,1	41,62	unstable	insoluble; 0.432
PvERF69	Phvul.004G092100	435	6,37	46732,2	61,74	unstable	insoluble; 0.584
PvERF70	Phvul.004G122000	224	6,4	25625,7	68,63	unstable	insoluble; 0.407
PvERF71	Phvul.004G157600	315	4,77	35578,4	52,8	unstable	soluble; 0.712
PvERF72	Phvul.004G169800	220	5,1	23836,3	51,69	unstable	soluble; 0.755
PvERF73	Phvul.005G074700	193	10,1	20929,5	59,57	unstable	soluble; 0.630
PvERF74	Phvul.005G105200	407	5,93	45836,3	61,23	unstable	soluble; 0.650
PvERF75	Phvul.005G111200	204	6,45	21872,2	56,66	unstable	soluble; 0.781
PvERF76	Phvul.005G126300	246	5,86	27360,5	54,95	unstable	soluble; 0.705
PvERF77	Phvul.005G126600	227	9,51	25694,2	44,6	unstable	insoluble; 0.563
PvERF78	Phvul.005G138300	475	7,69	52476,3	45,71	unstable	soluble; 0.780
PvERF79	Phvul.005G170600	210	5,67	23501,5	52,44	unstable	insoluble; 0.573
PvERF80	Phvul.005G180600	208	5,61	23756,4	56,33	unstable	soluble; 0.622
PvERF81	Phvul.005G183700	321	9,36	36157,4	60,51	unstable	soluble; 0.671
PvERF82	Phvul.006G047800	207	5,95	22673,1	62,41	unstable	insoluble; 0.569
PvERF83	Phvul.006G080000	250	8,94	28018,5	53,57	unstable	insoluble; 0.589
PvERF84	Phvul.006G106100	203	5,13	22844,5	57,93	unstable	soluble; 0.670
PvERF85	Phvul.006G110200	284	4,81	32699,4	53,31	unstable	soluble; 0.750
PvERF86	Phvul.006G114100	183	4,92	20309,7	62,07	unstable	insoluble; 0.491
PvERF87	Phvul.006G163100	316	6,05	34649,1	51,3	unstable	soluble; 0.612
PvERF88	Phvul.006G173500	353	5,43	38026,2	39,86	stable	soluble; 0.700
PvERF89	Phvul.006G179700	263	5,37	29608	56,25	unstable	soluble; 0.683
PvERF90	Phvul.006G179800	179	7,88	19891,8	61,56	unstable	insoluble; 0.319
PvERF91	Phvul.006G183100	219	8	23556,9	46,63	unstable	soluble; 0.668
PvERF92	Phvul.006G183200	167	9,72	18196,7	75,11	unstable	soluble; 0.691
PvERF93	Phvul.007G002900	320	5,92	36796,4	37,77	stable	soluble; 0.675
PvERF94	Phvul.007G027000	353	4,56	39102	60,43	unstable	insoluble; 0.449
PvERF95	Phvul.007G066500	201	6	22418,1	55,45	unstable	insoluble; 0.552
PvERF96	Phvul.007G082000	268	6,98	28556,4	79,6	unstable	soluble; 0.663
PvERF97	Phvul.007G086600	148	6,1	16520,7	78,07	unstable	insoluble; 0.489
PvERF98	Phvul.007G102800	361	8,95	39472,3	38,38	stable	soluble; 0.640
PvERF99	Phvul.007G121200	154	9,2	17838,4	55,71	unstable	soluble; 0.731
PvERF100	Phvul.007G127800	209	5	23155,6	65,61	unstable	insoluble; 0.543
PvERF101	Phvul.007G128000	142	9,07	15911,7	70,21	unstable	soluble; 0.794
PvERF102	Phvul.007G128100	147	5,95	16432,9	47,32	unstable	soluble; 0.756
PvERF103	Phvul.007G135300	402	8,56	44331,9	40,45	unstable	soluble; 0.616
PvERF104	Phvul.007G135900	203	8,13	23058,9	61,59	unstable	insoluble; 0.496
PvERF105	Phvul.007G193300	255	5,46	28549,5	58,66	unstable	soluble; 0.685
PvERF106	Phvul.007G193400	147	5,62	16597,4	62,85	unstable	soluble; 0.828
PvERF107	Phvul.007G193700	211	6,08	23812,6	58,32	unstable	soluble; 0.652
PvERF108	Phvul.007G193800	212	5,98	24026	57,25	unstable	soluble; 0.659
PvERF109	Phvul.007G193900	137	5,73	15563,3	56,2	unstable	soluble; 0.778
PvERF110	Phvul.007G217800	299	5,63	33667,5	41,19	unstable	soluble; 0.643

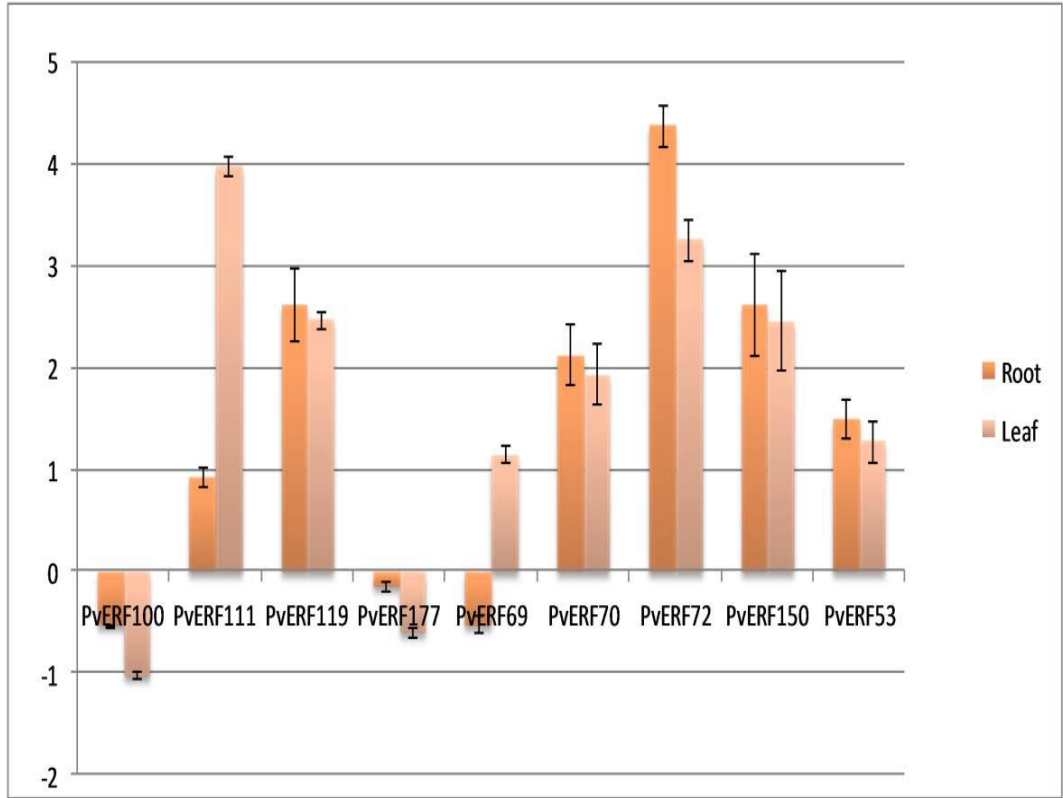
PvERF111	Phvul.007G222500	191	9,4	21805,8	43,4	unstable	insoluble; 0.548
PvERF112	Phvul.007G222600	210	5,48	22518	54,37	unstable	soluble; 0.642
PvERF113	Phvul.007G240200	410	9,16	45025,4	56,46	unstable	soluble; 0.676
PvERF114	Phvul.007G241600	268	8,74	29731,9	59,78	unstable	insoluble; 0.522
PvERF115	Phvul.007G241800	211	5,9	23762,6	54,74	unstable	soluble; 0.641
PvERF116	Phvul.007G255100	292	5,58	33036,9	57,37	unstable	insoluble; 0.504
PvERF117	Phvul.007G272800	149	6,11	16623,1	65,78	unstable	soluble; 0.801
PvERF118	Phvul.007G272900	144	9,38	16758,8	53,4	unstable	soluble; 0.835
PvERF119	Phvul.007G273000	212	6,97	23321,3	72,33	unstable	soluble; 0.745
PvERF120	Phvul.008G019600	241	7,33	27149,7	62,89	unstable	soluble; 0.601
PvERF121	Phvul.008G039300	401	4,61	45535,3	59,62	unstable	soluble; 0.689
PvERF122	Phvul.008G043500	393	7,11	43915,7	51,65	unstable	insoluble; 0.506
PvERF123	Phvul.008G046400	207	9,24	23170,9	58,67	unstable	insoluble; 0.564
PvERF124	Phvul.008G046500	181	7,88	20177,5	55,2	unstable	insoluble; 0.584
PvERF125	Phvul.008G052000	689	6,34	75694,4	49,63	unstable	insoluble; 0.415
PvERF126	Phvul.008G092800	525	5,69	58645,3	48,79	unstable	insoluble; 0.494
PvERF127	Phvul.008G098900	157	9,14	17505,3	52,31	unstable	soluble; 0.730
PvERF128	Phvul.008G131500	230	9	25992,3	63,76	unstable	soluble; 0.638
PvERF129	Phvul.008G141000	309	6,06	33899,2	48,1	unstable	soluble; 0.682
PvERF130	Phvul.008G159400	320	5,37	36312,7	56,11	unstable	soluble; 0.677
PvERF131	Phvul.008G165000	238	4,94	25857,9	72,72	unstable	soluble; 0.619
PvERF132	Phvul.008G172200	327	5,53	36013,3	57,23	unstable	soluble; 0.656
PvERF133	Phvul.008G185400	358	6,1	40305,4	46,68	unstable	soluble; 0.634
PvERF134	Phvul.008G214700	204	7,77	22424,1	56,13	unstable	soluble; 0.764
PvERF135	Phvul.008G220400	380	4,92	42145	39,49	stable	insoluble; 0.381
PvERF136	Phvul.008G222400	329	8,39	36041	44,13	unstable	soluble; 0.627
PvERF137	Phvul.008G246000	280	5,76	30843,2	52,78	unstable	insoluble; 0.589
PvERF138	Phvul.008G253600	302	5,83	34412,7	54,79	unstable	soluble; 0.662
PvERF139	Phvul.008G271100	219	8,88	23636,3	52,88	unstable	insoluble; 0.529
PvERF140	Phvul.009G013200	249	4,71	27586,3	38,98	stable	soluble; 0.732
PvERF141	Phvul.009G029600	353	6,51	38677	58,95	unstable	soluble; 0.625
PvERF142	Phvul.009G074300	657	6,9	72516,7	52	unstable	soluble; 0.609
PvERF143	Phvul.009G084400	267	4,92	29419,5	54,99	unstable	soluble; 0.631
PvERF144	Phvul.009G089300	191	9,48	22239,3	59,03	unstable	insoluble; 0.365
PvERF145	Phvul.009G093600	197	6,23	21850,3	46,49	unstable	soluble; 0.715
PvERF146	Phvul.009G109600	194	5,46	21559,4	40,11	unstable	insoluble; 0.580
PvERF147	Phvul.009G123300	235	5,38	25428,4	63,64	unstable	insoluble; 0.467
PvERF148	Phvul.009G137000	341	4,78	38280,6	55,23	unstable	insoluble; 0.560
PvERF149	Phvul.009G137900	296	9,41	32439,7	57,15	unstable	soluble; 0.655
PvERF150	Phvul.009G161000	258	6,14	28835,2	63,87	unstable	insoluble; 0.582
PvERF151	Phvul.009G196900	211	8,5	23974,9	63,99	unstable	soluble; 0.601
PvERF152	Phvul.009G206500	346	6,61	39530,4	55,13	unstable	insoluble; 0.531
PvERF153	Phvul.009G225000	208	4,57	23074,4	59,22	unstable	insoluble; 0.347
PvERF154	Phvul.009G240800	125	5,16	14314,9	53,35	unstable	soluble; 0.770

PvERF155	Phvul.009G240900	120	5,56	13331,8	64,17	unstable	soluble; 0.793
PvERF156	Phvul.009G251600	241	8,64	26209,6	44,06	unstable	insoluble; 0.474
PvERF157	Phvul.009G262200	355	5,13	39462,6	40,25	unstable	insoluble; 0.476
PvERF158	Phvul.010G035200	284	5,21	33293,3	55,24	unstable	soluble; 0.713
PvERF159	Phvul.010G050500	217	5,97	23746,4	46,44	unstable	insoluble; 0.504
PvERF160	Phvul.010G050600	192	9,3	21430,2	58,05	unstable	soluble; 0.635
PvERF161	Phvul.010G050700	211	9,39	23994,2	58,04	unstable	insoluble; 0.596
PvERF162	Phvul.010G050800	164	8,13	17655,4	40,84	unstable	insoluble; 0.493
PvERF163	Phvul.010G054000	283	5,07	31175,8	43,03	unstable	soluble; 0.734
PvERF164	Phvul.010G092300	322	8,12	34668,3	63,71	unstable	insoluble; 0.420
PvERF165	Phvul.010G114900	183	9,27	20476,2	58,57	unstable	insoluble; 0.477
PvERF166	Phvul.010G124700	384	4,87	42688,3	42	unstable	soluble; 0.621
PvERF167	Phvul.010G130200	580	6,32	63706	51,61	unstable	soluble; 0.626
PvERF168	Phvul.010G146600	210	5,3	23025,7	59,28	unstable	insoluble; 0.436
PvERF169	Phvul.010G154900	197	6,45	22274,9	65,96	unstable	soluble; 0.679
PvERF170	Phvul.010G158700	209	10	22802,8	31,94	stable	insoluble; 0.390
PvERF171	Phvul.010G159500	195	6,71	22013,5	60,18	unstable	insoluble; 0.572
PvERF172	Phvul.011G058000	544	6,03	60221,1	46,56	unstable	soluble; 0.624
PvERF173	Phvul.011G071100	485	6,24	53472,1	47,48	unstable	soluble; 0.714
PvERF174	Phvul.011G091400	222	5,27	24412,1	46,3	unstable	soluble; 0.673
PvERF175	Phvul.011G107800	199	8,73	21443,9	44,19	unstable	soluble; 0.712
PvERF176	Phvul.011G118600	416	5,52	46738,7	73,62	unstable	soluble; 0.708
PvERF177	Phvul.011G125200	204	9,57	22862,7	62,32	unstable	insoluble; 0.569
PvERF178	Phvul.011G162900	191	9,39	20836,2	63,05	unstable	insoluble; 0.541
PvERF179	Phvul.011G187400	398	6,09	44689,1	67,19	unstable	insoluble; 0.595
PvERF180	Phvul.L006500	191	6,96	21264,9	49,52	unstable	insoluble; 0.460

EK 8- PVAP2-ERF GENLERİNİN IN SİLİCO EKSPRESYON SONUCU



EK 9- PVAP2-ERF GENLERİNİN KANTİTATİF RT-PCR SONUÇLARI



KAYNAKLAR

- Allen M D, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M & Suzuki M (1998). A novel mode of DNA recognition by a [beta]-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO Journal*, 17(18): 5484–5496. doi: 10.1093/emboj/17.18.5484
- Agarwal P, Agarwal P K, Nair S, Sopory S K & Reddy M K (2007). Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(2): 189–198. doi:10.1007/s00438-006-0183-z
- Aoyama T, Hiwatashi Y, Shigyo M, Kofuji R, Kubo M, Ito M & Hasebe M (2012). AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 139(17): 3120-3129. doi: 10.1242/dev.076091
- Asahina M, Azuma K, Pitaksaringkarn W, Yamazaki T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M & Satoh S (2011). Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38): 16128–16132. doi: 10.1073/pnas.1110443108
- Bethke G, Unthan T & Uhrig J F (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19): 8067-8072. doi:10.1073/pnas.0810206106
- Büttner M & Singh K B (1997). *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11): 5961–5966.
- Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, Kieft H, Ouellet T, Zhang L & van Lookeren Campagne M M (2002). Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a

- Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell*, 14(8): 1737–1749. doi: 10.1105/tpc.001941
- Causier B, Ashworth M, Guo W & Davies B (2012). The TOPLESS Interactome: a framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(1): 423–38. doi: 10.1104/pp.111.186999
- Chandler J W, Cole M, Flier A, Grewe B & Werr W (2007). The AP2 transcription factors DORNROSCHE and DORNROSCHE-LIKE redundantly control Arabidopsis embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development*, 134(9): 1653–1662. doi: 10.1242/dev.001016
- Chen X & Guo Z (2008). Tobacco OPBP1 Enhances Salt Tolerance and Disease Resistance of Transgenic Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(12): 2601–2613. doi: 10.3390/ijms9122601
- Cheng M-C, Hsieh E-J, Chen J-H, Chen H-Y & Lin T-P (2012). Arabidopsis RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. *Plant Physiology*, 158(1): 363–375. doi: 10.1104/pp.111.189738
- Cheong Y H, Moon B C, Kim J K, Kim C Y, Kim M C, Kim I H, Park C Y, Kim J C, Park B O & Koo S C (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology*, 132(4): 1961–1972. doi: 10.1104/pp.103.023176
- Cheong M S & Yun D-J (2007). Salt-stress Signaling. *Journal of Plant Biology*, 50(2): 148–155. doi:10.1007/BF03030623
- Cook D, Fowler S, Fiehn O & Thomashow M F (2004). A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42): 15243–15248. doi: 10.1073/pnas.0406069101

- De Boer K, Tilleman S, Pauwels L, Vanden Bossche R, De Sutter V, Vanderhaeghen R, Hilson P, Hamill J D & Goossens A (2011). APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix–loop–helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. *The Plant Journal*, 66(6): 1053–1065. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04566.x
- Dinh T T, Girke T, Liu X, Yant L, Schmid M & Chen X (2012). The floral homeotic protein APETALA2 recognizes and acts through an AT-rich sequence element. *Development*, 139(11): 1978-86. doi: 10.1242/dev.077073
- Drews G N, Bowman J L & Meyerowitz E M (1991). Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell*, 65(6): 991–1002. doi: 10.1016/0092-8674(91)90551-9
- Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C & Takumi S (2006). Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes & Genetic Systems*, 81(2): 77-91. doi: 10.1266/ggs.81.77
- Ellialtıoglu S & Tıprıdamaz R (1998). Doku Kùltürünün Tuz Stresine Dayanıklılıktaki Kullanımı. Bitkilerde stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu, 70-81, Bornova-Izmir
- Elliott R C, Betzner A S, Huttner E, Oakes M P, Tucker W Q, Gerentes D & Smyth D R (1996). AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *The Plant Cell*, 8(2): 155–168. doi: 10.1105/tpc.8.2.155
- Finkelstein R (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11: e0166. doi: 10.1199/tab.0166
- Finkelstein R R, Wang M L, Lynch T J, Rao S & Goodman H M (1998). The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *The Plant Cell*, 10(6): 1043–1054. doi: 10.1105/tpc.10.6.1043

- Fowler S & Thomashow M F (2002). Arabidopsis Transcriptome Profiling Indicates That Multiple Regulatory Pathways Are Activated during Cold Acclimation in Addition to the CBF Cold Response Pathway. *The Plant Cell*, 14(8): 1675–1690. doi: 10.1105/tpc.003483
- Fukao T, Yeung E & Bailey-Serres J (2011). The Submergence Tolerance Regulator SUB1A Mediates Crosstalk between Submergence and Drought Tolerance in Rice. *The Plant Cell*, 23(1): 412–427. doi: 10.1105/tpc.110.080325
- Ghassemi F, Jakeman A J & Nix H A (1995). Salinisation of land and water resources : human causes, extent, management and case studies. Centre for Resource and Environmental Studies. The Australian National University, Australia.
- Gu Y Q, Yang C, Thara V K, Zhou J & Martin G B (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell*, 12(5): 771–785. doi: 10.1105/tpc.12.5.771
- Gupta B & Huang B (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014 (2014): 701596. doi: 10.1155/2014/701596
- Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K & Bohnert H J (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51(1): 463-499. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.463
- Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song X-J, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A & Kitano H (2009). The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*, 460(7258): 1026–1030. doi: 10.1038/nature08258
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T & Ohme-Takagi M (2003). Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34(5): 733–739. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01759.x

- Ikeda M & Ohme-Takagi M (2009). A novel group of transcriptional repressors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(5): 970-975. doi: 10.1093/pcp/pcp048
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H & Sugimoto K (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Current Biology*, 21(6): 508–514. doi: 10.1016/j.cub.2011.02.020
- Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, Schabenberger O & Thomashow M F (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280(5360): 104–106. doi: 10.1126/science.280.5360.104
- Jofuku K D, den Boer B G, Van Montagu M & Okamoto J K (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *The Plant Cell*, 6(9): 1211–1225. doi: 10.1105/tpc.6.9.1211
- Kagale S & Rozwadowski K (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: an underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics*, 6(2): 141-146. doi: 10.4161/epi.6.2.13627
- Kagaya Y, Ohmiya K & Hattori T (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research*, 27(2): 470–478. doi: 10.1093/nar/27.2.470
- Kantar F & Elkoca E (1998). Kültür bitkilerinde tuza dayanıklılık. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29(1): 163-174
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17(3): 287–291. doi: 10.1038/7036

- Kitomi Y, Ito H, Hobo T, Aya K, Kitano H & Inukai Y (2011), The auxin responsive AP2/ERF transcription factor *CROWN ROOTLESS5* is involved in crown root initiation in rice through the induction of *OsRR1*, a type-A response regulator of cytokinin signaling. *The Plant Journal*, 67(3): 472–484. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04610.x
- Klucher K M, Chow H, Reiser L & Fischer R L (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell*, 8(2): 137–153. doi: 10.1105/tpc.8.2.137
- Komatsu M, Chujo A, Nagato Y, Shimamoto K & Kyojuka J (2003). *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development*, 130(16): 3841–3850. doi: 10.1242/dev.00564
- Krizek B (2009). *AINTEGUMENTA* and *AINTEGUMENTA-LIKE6* Act Redundantly to Regulate *Arabidopsis* Floral Growth and Patterning. *Plant Physiology*, 150(4): 1916–1929. doi: 10.1104/pp.109.141119
- Larcher W (1995). Ecophysiology and stress physiology of functional groups. *Physiological plant ecology*. Springer, 340-353, Berlin
- Latchman D S (1997). Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(12): 1305-1312. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00085-X
- Levitt J (1972). Responses of plants to environmental stresses. *Academic Press New York*, 177(4051): 786. doi: 10.1126/science.177.4051.786
- Licausi F, Giorgi F, Zenoni S, Osti F, Pezzotti M & Perata P (2010a). Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera*. *BMC Genomics*, 11(1): 719. doi: 10.1186/1471-2164-11-719
- Licausi F, Kosmacz M, Weits D A, Giuntoli B, Giorgi F M, Voesenek L A, Perata P & van Dongen J T (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end

rule pathway for protein destabilization. *Nature*, 479(7373): 419-422. doi: 10.1038/nature10536

Licausi F, Van Dongen J T, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P & Perata P (2010b). *HRE1* and *HRE2*, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 62(2): 302–315. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04149.x

Li H-Y, Xiao S & Chye M-L (2008). Ethylene and pathogen inducible *Arabidopsis* acyl-CoA-binding protein 4 interacts with an ethylene-responsive element binding protein. *Journal of Experimental Botany*, 59(14): 3997–4006. doi: 10.1093/jxb/ern241

Li Z, Zhang L, Yu Y, Quan R, Zhang Z, Zhang H & Huang R (2011). The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor for ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 68(1): 88–99. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04670.x

Liu D, Chen X, Liu J, Ye J & Guo Z (2012). The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 63(10): 3899–3911. doi: 10.1093/jxb/ers079

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(8): 1391–1406. doi: 10.1105/tpc.10.8.1391

Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano J J & Solano R (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell*, 15(1): 165–178. doi: 10.1105/tpc.007468

- Mahajan S & Tuteja N (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2): 139-158. doi: 10.1016/j.abb.2005.10.018
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*, 38(6): 982–993. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02100.x
- Maruyama K, Takeda M, Kidokoro S, Yamada K, Sakuma Y, Urano K & Yamaguchi-Shinozaki K (2009). Metabolic Pathways Involved in Cold Acclimation Identified by Integrated Analysis of Metabolites and Transcripts Regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiology*, 150(4): 1972–1980. doi: 10.1104/pp.109.135327
- Mathieu J, Yant L J, Mürdter F, Küttner F & Schmid M (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biology*, 7(7): e1000148. doi: 10.1371/journal.pbio.1000148
- Matsui K, Umemura Y & Ohme-Takagi M (2008). AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 55(6): 954-67. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03565.x
- Mito T, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M & Matsui K (2011). Generation of chimeric repressors that confer salt tolerance in *Arabidopsis* and rice. *Plant Biotechnology Journal*, 9(7): 736–746. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00578.x
- Mitsuda N & Ohme-Takagi M (2009). Functional Analysis of Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 50(7): 1232–1248. doi: 10.1093/pcp/pcp075
- Mizoi J, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica*

Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 1819(2): 86-96. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.08.004

Mizukami Y & Fischer R L (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2): 942–947. doi: 10.1073/pnas.97.2.942

Moffat C S, Ingle R A, Wathugala D L, Saunders N J, Knight H & Knight M R (2012). ERF5 and ERF6 Play Redundant Roles as Positive Regulators of JA/Et-Mediated Defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(4): e35995. doi: 10.1371/journal.pone.0035995

Moose S P & Sisco P H (1994). Glossy15 Controls the Epidermal Juvenile-to-Adult Phase Transition in Maize. *The Plant Cell*, 6(10): 1343–1355. doi: 10.1105/tpc.6.10.1343

MUNNS R (1993), Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment*, 16(1): 15–24. doi: 10.1111/j.1365-3040.1993.tb00840.x

Nakashima K, Shinwari Z, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Molecular Biology* 42(4):657-665. doi: 10.1023/A:1006321900483

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T & Shinshi H (2006). Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology*, 140(2): 411–432. doi: 10.1104/pp.105.073783

Novillo F, Medina J, & Salinas J (2007). *Arabidopsis* CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52): 21002–21007. doi: 10.1073/pnas.0705639105

- Ohme-Takagi M & Shinshi H (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7(2): 173–182. doi: 10.1105/tpc.7.2.173
- Ohta M, Ohme-Takagi M & Shinshi H (2000). Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant Journal*, 22(1):29-38. doi: 10.1046/j.1365-313x.2000.00709.x
- Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H & Ohme-Takagi M (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, 13(8): 1959–1968. doi: 10.1105/TPC.010127
- Oh S-J, Song S I, Kim Y S, Jang H-J, Kim S Y, Kim M & Kim J-K (2005). Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. *Plant Physiology*, 138(1): 341–351. doi: 10.1104/pp.104.059147
- Oh S-J, Kim Y S, Kwon C-W, Park H K, Jeong J S & Kim J-K (2009). Overexpression of the Transcription Factor AP37 in Rice Improves Grain Yield under Drought Conditions. *Plant Physiology*, 150(3): 1368–1379. doi: 10.1104/pp.109.137554
- Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, Kim B G, Li L & Luan S (2005). ABR1, an APETALA2-Domain Transcription Factor That Functions as a Repressor of ABA Response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(3): 1185–1193. doi: 10.1104/pp.105.066324
- Parida A K, Das A B & Mitra B (2004). Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees*, 18(2): 167-174. doi: 10.1007/s00468-003-0293-8
- Parida A K & Das A B (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3): 324-349. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010
- Pirrello J, Jaimes-Miranda F, Sanchez-Ballesta M T, Tournier B, Khalil-Ahmad Q, Regad F, Latché A, Pech J C & Bouzayen M (2006). Sl-ERF2, a tomato ethylene

- response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiol*, 47(9): 1195-1205. doi: 10.1093/pcp/pcj084
- Popescu S C, Popescu G V, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M & Dinesh-Kumar S P (2009). MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development*, 23(1): 80-92. doi: 10.1101/gad.1740009
- Pre M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse C M J & Memelink J (2008). The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology*, 147(3): 1347–1357. doi: 10.1104/pp.108.117523
- Prigge M J, Otsuga D, Alonso J M, Ecker J R, Drews G N & Clark S E (2005). Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in *Arabidopsis* Development. *The Plant Cell*, 17(1): 61-76. doi: 10.1105/tpc.104.026161
- Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Tran LS, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2007). Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*, 50(1): 54–69. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03034.x
- Qi W, Sun F, Wang Q, Chen M, Huang Y, Feng Y Q & Yang, J (2011). Rice Ethylene-Response AP2/ERF Factor *OsEATB* Restricts Internode Elongation by Down-Regulating a Gibberellin Biosynthetic Gene. *Plant Physiology*, 157(1): 216–228. doi: 10.1104/pp.111.179945
- Rashotte A M, Mason M G, Hutchison C E, Ferreira F J, Schaller G E & Kieber J J (2006). A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103(29): 11081–11085. doi: 10.1073/pnas.0602038103
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, Abe H, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2002). DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis*

- DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3):998-1009. doi: 10.1006/bbrc.2001.6299
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2006a). Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*, 18(5): 1292-1309. doi: 10.1105/tpc.105.035881
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2006b). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18822–18827. doi: 10.1073/pnas.0605639103
- Seo Y, Park J-B, Cho Y-J, Jung C, Seo H, Park S-K, Nahm B & Song J (2010). Overexpression of the ethylene-responsive factor gene BrERF4 from *Brassica rapa* increases tolerance to salt and drought in *Arabidopsis* plants. *Molecules and Cells*, 30(3): 271–277. doi: 10.1007/s10059-010-0114-z
- Shaikhali J, Heiber I, Seidel T, Stroher E, Hiltcher H, Birkmann S, Dietz K J & Baier M (2008). The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes. *BMC Plant Biology*, 8(1): 48. doi: 10.1186/1471-2229-8-48
- Sharabi-Schwager M, Lers A, Samach A, Guy C L & Porat R (2010). Overexpression of the *CBF2* transcriptional activator in *Arabidopsis* delays leaf senescence and extends plant longevity. *Journal of Experimental Botany*, 61(1): 261–273. doi: 10.1093/jxb/erp300
- Shi J X, Malitsky S, De Oliveira S, Branigan C, Franke R B, Schreiber L & Aharoni A (2011). SHINE Transcription Factors Act Redundantly to Pattern the Archetypal Surface of *Arabidopsis* Flower Organs. *PLoS Genetics*, 7(5): e1001388. doi: 10.1371/journal.pgen.1001388

- Shigyo M & Ito M (2004). Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes. *Development Genes and Evolution*, 214(3): 105–114. doi: 10.1007/s00427-004-0385-5
- Song C P, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P & Zhu J K (2005). Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, 17(8): 2384-2396. doi:10.1105/tpc.105.033043
- Song C P & Galbraith D W (2006). AtSAP18, An Orthologue of Human SAP18, is Involved in the Regulation of Salt Stress and Mediates Transcriptional Repression in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 60(2): 241–257. doi: 10.1007/s11103-005-3880-9
- Solano R, Stepanova A, Chao Q & Ecker J R (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 12(23): 3703–3714. doi: 10.1101/gad.12.23.3703
- Stockinger E J, Gilmour S J & Thomashow M F (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(3): 1035–1040. doi: 10.1073/pnas.94.3.1035
- Sun S, Yu J P, Chen F, Zhao T J, Fang X H, Li Y Q & Sui S F (2008). TINY, a dehydration-responsive element (DRE)-binding protein-like transcription factor connecting the DRE- and ethylene-responsive element-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10): 6261–6271. doi: 10.1074/jbc.M706800200
- Swaminathan K, Peterson K & Jack T (2008). The plant B3 superfamily. *Trends in Plant Science*, 13(12): 647–655. doi: 10.1016/j.tplants.2008.09.006
- Şehirli S (1988). Yemeklik Dane Baklagiller. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayın No: 1089. s.435, Ankara.

- Taiz L & Zeiger E (2002). *Plant Physiology* (3rd Edition). Sinauer Associates, 591-623, U.S.A.
- Tiwari S B, Belachew A, Ma S F, Young M, Ade J, Shen Y, Marion C M, Holtan H E, Bailey A & Stone J K (2012). The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *Plant Journal*, 70(5): 855-865. doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04935.x
- Van Der Fits L & Memelink, J (2001). The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *The Plant Journal*, 25(1): 43–53. doi:10.1111/j.1365-313X.2001.00932.x
- Weber H & Hellmann H (2009). Arabidopsis thaliana BTB/POZ-MATH proteins interact with members of the ERF/AP2 transcription factor family. *FEBS Journal*, 276(22): 6624-6635. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07373.x
- Welsch R, Maass D, Voegel T, Dellapenna D & Beyer P (2007). Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology*, 145(3): 1073–1085. doi: 10.1104/pp.107.104828
- Wessler S R (2005). Homing into the origin of the AP2 DNA binding domain. *Trends in Plant Science*, 10(2): 54-56. doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.007
- Wilson K, Long D, Swinburne J & Coupland G (1996). A Dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an Arabidopsis gene related to APETALA2. *The Plant Cell*, 8(4), 659–671. doi: 10.1105/tpc.8.4.659
- Xiong L, Schumaker K S & Zhu J-K (2002). Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, 14(Suppl): 165-183. doi: 10.1105/tpc.000596
- Xu Z-S, Chen M, Li L-C & Ma Y-Z (2011). Functions and Application of the AP2/ERF Transcription Factor Family in Crop Improvement. *Journal of*

Integrative Plant Biology, 53 (7): 570–585. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01062.x

Xue G P & Loveridge C W (2004). HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant Journal*, 37(3): 326–339. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01963.x

Yamasaki K, Kigawa T, Seki M, Shinozaki K & Yokoyama S (2013). DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends in Plant Science*, 18(5): 267-276. doi: 10.1016/j.tplants.2012.09.001

Yang Z, Tian L, Latoszek-Green M, Brown D & Wu K (2005). Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology*, 58 (4): 585–596. doi: 10.1007/s11103-005-7294-5

Yi S Y, Kim J-H, Joung Y-H, Lee S, Kim W-T, Yu S H & Choi D (2004). The Pepper Transcription Factor *CaPFL* Confers Pathogen and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(1): 2862–2874. doi: 10.1104/pp.104.042903

Yu Z-X, Li J-X, Yang C-Q, Hu W-L, Wang L-J & Chen X-Y (2012). The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Molecular Plant*, 5(2): 353–365. doi: 10.1093/mp/ssr087

Zarei A, Körbes A P, Younessi P, Montiel G, Champion A & Memelink J (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 75(4): 321–331. doi: 10.1007/s11103-010-9728-y

Zhang J-Y, Broeckling C D, Blancaflor E B, Sledge M K, Sumner L W & Wang Z-Y (2005). Overexpression of *WXPI*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and

enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*, 42(5): 689–707. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02405.x

Zhang Z, Zhang H, Quan R, Wang X-C & Huang R (2009). Transcriptional Regulation of the Ethylene Response Factor LeERF2 in the Expression of Ethylene Biosynthesis Genes Controls Ethylene Production in Tomato and Tobacco. *Plant Physiology*, 150(1): 365–377. doi: 10.1104/pp.109.135830

Zhu J-K (2002). Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247–273. doi: 10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329

Zhuang J, Cai B, Peng R H, Zhu B, Jin X F, Xue Y, Gao F, Fu X Y, Tian Y S & Zhao W (2008). Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(3): 468–474. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.087

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Gökhan GÖKDEMİR
Doğum Yeri : Simav
Doğum Tarihi : 15.10.1988
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Simav Cumhuriyet Lisesi (2006)
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2013)
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Şubat, 2014 - -)

Yayınlar

GENOME-WIDE INVESTIGATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF AP2-ERF GENE FAMILY IN SALT TOLERANT COMMON BEAN, EXCLI Journal, 14, 11 / 2015, 10.17179/excli2015-600 [Uluslararası]

Konferans Sunumu

Samuel Aduse POKU, Gökhan GÖKDEMİR, Musa KAVAS, Zeytin bitkisindeki *OeSRC1* geninin klonlanması ve tütün bitkisinde fonksiyonel karakterizasyonu, 12 / 2015, Konya (Ulusal)

Şafak Esra ASLAN, Zafer SEÇGİN, Gökhan GÖKDEMİR, Musa KAVAS, Functional Evaluation of ERF Gene Cloned from Salt Tolerant Common Bean in Transgenic Tobacco Plant, 04/2017, Kırşehir (Uluslararası)

Projeler

Seleksiyon Islahı İle Seçilmiş Yerel Bezelye Hatlarından Orta Karadeniz Bölgesine Uygun Farklı Kullanım Şekillerine Sahip Yemeklik Çeşit Adaylarının Tespiti (Bursiyer)