

**ÇİLEKTE ( *Fragaria x ananassa* ) YÜKSEK SICAKLIK  
STRESİNDE FARKLI İFADE EDİLEN GENLERİN  
BELİRLENMESİ**

**Müge KESİCİ ZENGİN**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİLEKTE ( *Fragaria x ananassa* ) YÜKSEK SICAKLIK STRESİNDE FARKLI  
İFADE EDİLEN GENLERİN BELİRLENMESİ**

**Müge KESİCİ ZENGİN**

Prof. Dr. Hatice GÜLEN  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2015

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Müge KESİCİ ZENGİN tarafından hazırlanan “Çilekte ( *Fragaria x ananassa* ) Yüksek Sıcaklık Stresinde Farklı İfade Edilen Genlerin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Hatice GÜLEN

**Başkan** : Prof. Dr. Hatice GÜLEN  
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Doç. Dr. Ahmet İPEK  
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Sezai TÜRKEL  
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Atilla ERİŞ  
Bilgi Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi,  
Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Ece TURHAN  
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İmza

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman Demir**  
**Enstitü Müdürü**  
.../.../2015

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**23/02/2015**

**İmza**

Müge KESİCİ ZENGİN

**ÖZET**  
**Doktora Tezi**

**ÇİLEKTE ( *Fragaria x ananassa* ) YÜKSEK SICAKLIK STRESİNDE FARKLI İFADE EDİLEN GENLERİN BELİRLENMESİ**

**Müge KESİCİ ZENGİN**

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Hatice GÜLEN

Çilekte (*Fragaria x ananassa* Duch.) yüksek sıcaklıklarda farklı ifade edilen genlerin araştırıldığı bu çalışmada yüksek sıcaklığa tolerant (R. Hope) ve hassas (Festival) iki çilek çeşidi kullanılmıştır. Çeşitlere ait frigo fideler perlit, torf ve elenmiş bahçe toprağı karışımı (1:1:1) içeren 14×12 cm çapındaki saksılarda, 30/15°C sıcaklıkta ve ortalama % 65 oransal nemde 5-6 yapraklı döneme kadar yetiştirilmiştir. Daha sonra bu çeşitlere kademeli olarak yüksek sıcaklık (35, 40, 45, 50°C) uygulanarak yapraklardan örneklemeler yapılmıştır. Yüksek sıcaklık uygulamalarını takiben hücrede meydana gelen zararlanmaları belirlemek için iyon sızıntısı testi uygulanmıştır. Çalışma iki temel prensipte yürütülmüştür. Yüksek sıcaklık ile birlikte farklı ifade edilen genlerin belirlenmesi amacıyla yüksek sıcaklık uygulamalarını takiben toplam RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve tasarlanan primerler ile QRT-PCR çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre R. Hope çeşidinde “LMW heat shock protein mRNA” geninin anlatımının 35°C’ye göre 45°C’de 4582,09 kat arttığı Festival çeşidinde ise “18.1 kDa class I heat shock protein-like” geninin anlatımının 35°C’ye göre 45°C’de 337 kat artarak Festival çeşidi için anlatımı en yüksek gen olduğu belirlenmiştir. Yüksek sıcaklığın protein metabolizmasına olan etkisini ve toleransla ilişkili proteinleri belirlemek amacıyla toplam protein izolasyonunun ardından SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Burada stres ile değiştiği belirlenen protein bantları izole edilerek dizi analizine gönderilmiştir. Dizi analizi sonuçlarına göre, R. Hope çeşidinde “Translationally-controlled tumor protein homolog” ve “Heat shock cognate 70 kDa protein 2” proteinlerinin toleransta etkili proteinler olabileceği, Festival çeşidinde ise “Small heat shock protein, chloroplastic, HSP22”, “Translationally-controlled tumor protein homolog”, “Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic”, “Calmodulin-2”, “Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)”, “60S ribosomal protein L23” ve “Profilin” proteinlerinin yüksek sıcaklıklara olan duyarlılık ile ilişkilendirilebileceği görülmüştür. Ardından 2D-PAGE analizi ile proteinler izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmıştır. Burada da 35, 40 ve 45°C’de ifade edilen proteinlerin ifade düzeyleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklıklara olan tepkilerindeki temel farklar gen ve protein metabolizması incelenerek ortaya konulmuştur. Toleranslı R. Hope çeşidinin HSP70 gibi yüksek sıcaklık stresine cevapta merkezi görevi olan protein ve “LMW heat shock protein mRNA” gibi düşük moleküler ağırlıklı transkriptlerin koordineli çalışmasıyla bu strese cevap verebildiği ancak duyarlı olan Festival çeşidinde ise yüksek sıcaklık stresine cevapta merkezi rol üstlenmeyen sadece düşük moleküler ağırlıklı protein ve genlerin bu strese cevapta yeterli olamadığı saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** ilek, *Fragaria x ananassa*, yüksek sıcaklık stresi, farklı ifade edilen genler, protein  
**2015, x, 108 sayfa.**

**ABSTRACT**  
**PhD Thesis**

**DETERMINATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES DURING  
HEAT STRESS IN STRAWBERRY ( *Fragaria x ananassa* )**

**Müge KESİCİ ZENGİN**

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Horticulture

**Supervisor:** Prof. Dr. Hatice GÜLEN

In this study, the mechanism of tolerance to high temperatures was investigated in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch) using two strawberry cultivars which were high temperature tolerant (R. Hope) and sensitive (Festival). Seedlings were planted in 14x12 cm pots using perlite, peat and garden mold mix (1:1:1) and grown for 2 months at 30/15°C and 65% relative humidity. Plants were transferred to climate chamber to expose high temperature stepwise to 35, 40, 45 and 50°C for 24 hours and then samples were taken. Following the treatments ion leakage test was performed in order to determine the membrane injury. The experiment had two principles. Following the heat treatments, total RNA isolation, cDNA synthesis and QRT-PCR studies were done with designed primers to determine the differentially expressed genes with the high temperature stress. According to the results, the expression of “LMW heat shock protein mRNA” transcript was 4582,09 fold higher at 45°C than 35°C as the highest expressed transcript in R. Hope and the expression of “18.1 kDa class I heat shock protein-like” transcript was 337 fold higher at 45°C than 35°C as the highest expressed transcript in Festival. To investigate protein metabolism and identify proteins related to tolerance to high temperature of strawberry, total soluble protein profiles were determined using SDS-PAGE analyse. Stress related bands were isolated then send to sequence analyse. According to protein sequence analyse results, “Translationally-controlled tumor protein homolog” and “Heat shock cognate 70 kDa protein 2” proteins were thought to be effective in tolerance in R. Hope cultivar. “Small heat shock protein, chloroplastic, HSP22”, “Translationally-controlled tumor protein homolog”, “Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic”, “Calmodulin-2”, “Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Fragment)”, “60S ribosomal protein L23” and “Profilin” proteins were also thought to be related with sensitivity to high temperature stress in Festival cultivar. Then the proteins were separated due to their isoelectric points and expression levels were determined at 35, 40 and 45°C.

As a conclusion, basic differences between R. Hope and Festival were explained in the meaning of high temperature stress responses by examining gene and protein metabolism in this thesis study. R. Hope cultivar’s tolerance can be explained with the coordination of HSP70 that as a central role in stress response and “LMW heat shock protein mRNA” that has a low molecular weight transcript and supplementary role for a complete response to high temperature stress. However, it’s determined that sensitive cultivar Festival can respond only with the low molecular weight protein and transcripts that don’t have a central role in high temperature stress response.

**Keywords:** Strawberry, *Fragaria x ananassa*, high heat stress, diferentially expressed genes, proteins.  
**2015, x, 108 pages.**



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hatice GÜLEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bilgi, görüş ve önerileriyle beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocalarım Prof. Dr. Vedat ŞENİZ'e, Doç. Dr. Ahmet İPEK'e ve Yrd. Doç. Dr. Figen ERSOY'a teşekkür ederim.

Tezim süresince manevi destek ve dostlukları için Doç. Dr. Asuman CANSEV ve Yard. Doç. Dr. Sergül ERGİN'e teşekkür ederim.

OUAP(Z)-2012/8 nolu proje olarak bu çalışmayı destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Çalışma materyali olarak kullanılan çilek fidelerini temin eden YALTIR A.Ş. (Adana)'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyen ve anımda olan canım aileme teşekkür ederim.

Müge KESİCİ ZENGİN  
23/02/2015

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
2.1. Yüksek sıcaklık stresinin etkisi.....	6
2.2. Yüksek sıcaklık stresinde genetik çalışmalar.....	10
2.3. Yüksek sıcaklık stresinde protein metabolizması.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
3.1. Materyal.....	36
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Yüksek sıcaklık uygulamaları.....	37
3.2.2. Toplam RNA izolasyonu.....	39
3.2.3. cDNA sentezi.....	41
3.2.4. Primer tasarımı ve RT-PCR analizi.....	42
3.2.5. Protein analizleri.....	43
3.2.5.1. Toplam çözünebilir protein analizi.....	43
3.2.5.2. SDS-PAGE analizi.....	45
3.2.5.3. 2D-PAGE analizi.....	48
3.3. İstatistiksel analizler.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1. Hücre zarı zararlanması.....	52
4.2. RT-PCR çalışmaları.....	53
4.3. Proteomiks çalışmaları.....	59
4.3.1. Toplam çözünebilir protein miktarı.....	59
4.3.2. SDS-PAGE.....	60
4.3.3. 2D-PAGE.....	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	73
KAYNAKLAR.....	79
EKLER.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	107

## KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
$\mu\text{g}$	mikrogram
$\mu\text{l}$	mikrolitre
$\mu\text{m}$	mikrometre
2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BSA	Bovin serum albümin (Sığır serumu albümini)
$\text{Ca}^{+2}$	Kalsiyum
CaM	Kalmodulin
cDNA	Tamamlayıcı DNA (complementary DNA)
CDPK	Kalsiyum bağımlı protein kinaz
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
CTAB	Setil trimetilamonyum bromit
DD-RT-PCR	Differential Display Real Time Polimerase Chain (Farklılıkların gösterimi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
DNA	Deoksiribonükleik asit
EST	İfade edilmiş dizi kısımlar (expressed sequence tags)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agricultural Organisation)
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HSF	Yüksek sıcaklık faktörü (Heat Stress Factor)
HSP	Isı şoku proteini (Heat shock protein)
mA	miliAmper
ml	mililitre
mM	milimolar
mRNA	mesajcı RNA
$^{\circ}\text{C}$	derece santigrat
OD	Absorbans değeri (Optical density)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
pH	hidrojenin gücü (power of hydrogen)
ppm	part per million (milyonda bir kısım)
PSS	Fenolik ayrıştırıcı solüsyon
QTL	Quantitative trait locus (Niceliksel özellik bölgeleri)
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	Ribonükleik asit interferansı
Rpm	Dakikadaki dönme sayısı (Revolution per minute)
rRNA	ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR	Real Time Polimerase Chain Reaction (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
RuBisCo	Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz

SAGE	Gen ifadesinin seri analizi (serial analysis of gene expression)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi
sn	saniye
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
TCA	Trikloroasetikasit
TCTP	Translasyonel olarak kontrol edilen tümör proteini
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamin
V	Volt
$\beta$ ME	Betamerkaptoetanol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1. R.Hope (A) ve Festival (B) çeşitlerine ait bitkilerin genel görünümü...	36
Şekil 3.2. Farklı ifade edilen genlerin analizi sırasında izlenen iş planı.....	38
Şekil 3.3. Proteinlerin analizi sırasında izlenen iş planı.....	39
Şekil 3.4. 2D Elektroforez sistemini şematikgösterimi.....	51
Şekil 4.1. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin zararlanma oranları (%).....	52
Şekil 4.2. R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresi sırasında anlatımı artan genlerin ifade düzeyleri.....	56
Şekil 4.3. R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresi sırasında anlatımı azalan genlerin ifade düzeyleri.....	57
Şekil 4.4. Yüksek sıcaklık stresine cevapta farklı ifade edilen genlerin Venn diyagramında gösterimi.....	58
Şekil 4.5. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin toplam çözünebilir protein miktarları.....	59
Şekil 4.6. R. Hope çilek çeşidine ait SDS-PAGE profilinde belirlenen polimorfik bantlar.....	60
Şekil 4.7. Festival çilek çeşidine ait SDS-PAGE profilinde belirlenen polimorfik bantlar.....	61
Şekil 4.8. R. Hope (A) ve Festival (B) çilek çeşitlerine ait yaprak proteinlerinin 2D jel görüntüsünde serpm çizim grafikleri.....	67
Şekil 4.9. R. Hope çilek çeşidinde yaprak proteinlerine ait 2D jel görüntüleri (A: 35°C, B: 40°C, C: 45°C).....	68
Şekil 4.10. R. Hope çilek çeşidine ait 2D jellerinin (35, 40 ve 45°C) üst üste çakıştırılarak elde edilmiş görüntüsü.....	69
Şekil 4.11. Festival çilek çeşidinde yaprak proteinlerine ait 2D jel görüntüleri (A: 35°C, B: 40°C, C: 45°C).....	70
Şekil 4.12. Festival çilek çeşidine ait 2D jellerinin (35, 40 ve 45°C) üst üste çakıştırılarak elde edilmiş görüntüsü .....	71

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşimler ve miktarları.....	41
Çizelge 3.2. cDNA sentezinin son aşamasında kullanılan bileşimler ve miktarları .....	41
Çizelge 3.3. Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu çözeltisinde kullanılan bileşenler ve çözelti içerisindeki miktarları.....	43
Çizelge 3.4. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için BSA standartlarının hazırlanması.....	44
Çizelge 3.5. Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için örneklerin hazırlanması.....	45
Çizelge 3.6. Laemmli çözeltisi bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları.....	45
Çizelge 3.7. Ayırıştırma jeli bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları.....	46
Çizelge 3.8. Örnek yükleme jeli bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları.....	47
Çizelge 3.9. Yürütme tamponu çözeltisi bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları.....	47
Çizelge 4.1. R. Hope çilek çeşidinde sıcaklıklara göre anlatımı azalan ve artan genlerin değişimi.....	54
Çizelge 4.2. Festival çilek çeşidinde sıcaklıklara göre anlatımı azalan ve artan genlerin değişimi.....	55
Çizelge 4.3. Dizi analiz sonuçlarına göre R. Hope çeşidine ait tanımlanan muhtemel proteinler.....	61
Çizelge 4.4. Dizi analiz sonuçlarına göre Festival çeşidine ait tanımlanan muhtemel proteinler.....	63

## 1. GİRİŞ

Evrim süresince karasal bitkiler (yaklaşık 400 milyon yıl önce), aniden değişen çevresel koşullara hızlı bir şekilde ayak uydurabilecek özel adaptasyonlar kazanmıştır (Levitt 1980). Ancak bitkilerin strese olan cevabı deneysel olarak 19. yy'ın ortalarından itibaren çalışılmaya başlanmıştır ve hücrese seviyede strese cevapta esas kilometre taşı İtalyan gelişimsel biyolog F. Ritossa'nın meyve sineği ile yaptığı çalışma olmuştur (Baniwal ve ark. 2004). Aradan geçen bu zamanda bilimsel açıdan oldukça yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmiştir.

Yaşanan bu gelişmelerin yanında dünyanın artan nüfusu ile aynı doğrultuda tüketim ihtiyacının da arttığı bilinen bir gerçektir. Ancak bu ihtiyacı karşılamak değişen iklim şartları altında gün geçtikçe daha da zorlaşmaktadır. Bu duruma sebep olan en büyük etkenin çevresel stres koşulları olduğu kabul edilmektedir. Çevresel ve biyolojik faktörlerin veya bunların çeşitli bileşimlerinin etkisiyle fizyolojik süreçte anormal değişimlerin görülmesi stres olarak tanımlanabilir (Hale ve Orcutt 1987). Tarımsal üretimi engelleyen bu stres faktörleri ise biyotik ve abiyotik olarak sınıflandırılmaktadır. Çevresel stres faktörlerinden olan abiyotik stres koşulları bitki verimliliğini büyük ölçüde etkilemektedir ve özellikle başlıca ürünlerde verimin %50'den fazla azalmasına sebep olarak dünya çapında ürün kaybının birincil sebebi olarak gösterilmektedir (Wang ve ark. 2004). Abiyotik stres etkenleri içinde incelenen yüksek sıcaklık stresi; belirli bir sürede, belirli bir eşik seviyesinin üzerinde, bitki büyüme ve gelişmesi için geri dönüşümsüz zararlanmaya neden olan sıcaklıktaki artış olarak tanımlanmaktadır ve kesin bir temele dayandırmak mümkün değildir (Levitt 1980, Wahid ve ark. 2007). İdealin üzerindeki sıcaklıklar tüm canlı organizmalar tarafından sıcaklık stresi olarak hissedilmektedir (Kotak ve ark. 2007). Özellikle tarımsal ürünlerde ve bahçe bitkilerindeki sıcaklık stresi karmaşık bir konudur (McKersie ve Leshem 1994). Parry ve ark. (2007)'ı bu yüzyıl sonunda bitkisel ürünlerin hassasiyetinin değişken yüksek sıcaklıklar ile birlikte artacağını öngörmüştür. Ayrıca sıcaklıkların 1-3°C'nin üzerinde artması ılıman bölgelerde pek çok üründe verim düşüşüne sebep olacağı ve sonuç olarak 3°C'lik bir küresel ısınma sebebiyle küresel üretimde düşüşler yaşanabileceği bildirilmiştir (Schneider ve ark. 2007).

Yaşanan bu değişimlerden bitkiler hayvanlara göre farklı biçimde etkilenmektedir. Bitkilerin hareketli canlılar olmaması onların çevresel streslere karşı gösterdikleri tepkilerin diğer canlılara göre daha farklı ve özel olmasına neden olmuştur. Stresten kaçarak korunamadıkları için dormansi, strese dayanım-tolerans ve stres geri kazanımı gibi mekanizmalar geliştirmişlerdir (Huey ve ark. 2002). Bunların dışında strese cevapta, bitkilerin kendilerini morfolojik, fenolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak çeşitli seviyelerde düzenlediği bilinmektedir (Zhang ve ark. 2000). Bitkiler abiyotik strese maruz kaldıklarında, stres koşullarına uyum sağlamak amacıyla moleküler anlamda tepki olarak bazı genlerin anlatımlarında değişimler meydana gelmektedir (Seki ve ark. 2001, Singh ve ark. 2002). Stres koşullarında anlatımı değişen genler a) sadece stres koşullarında anlatım yapanlar, b) anlatımı artanlar, c) anlatımı azalanlar, d) anlatımı duranlar şeklinde dört grupta toplanmaktadır. Özellikle sadece stres koşullarında anlatım yapan ve streste anlatımı artan genlerin, stres tepki mekanizmasının stres toleransını artırma, gen anlatımının düzenlenmesi ile sinyal iletimi kısımlarında işlevlerinin olduğu düşünülmektedir (Yamaguchi-Shinozaki ve ark. 2002). Yapılan çalışmalarda bitkinin savunma ve cevap genlerinin transkripsiyonel olarak bir patojen ya da çeşitli abiyotik etkenler tarafından uyarıldığı belirlenmiştir (Pérez-Clemente ve ark. 2013). Bu uyarımlar sonrasında çeşitli bitkilerde yüksek sıcaklık stresine verilen cevap olarak genomun %2'sinin etkilendiği yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Qu ve ark. 2013). Bu bağlamda ilk karakterize edilen ve klonlanan yüksek sıcaklık faktörü (HSF) geni maya yüksek sıcaklık faktörüdür (Guo ve ark. 2008).

Bitkilerin bu davranışları geçmişten bu yana pek çok yöntemle incelenmesine karşın günümüz teknolojileri sayesinde moleküler seviyede analizler yapılmasına ve anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Son yıllarda ise çıkarımlı hibridizasyon (subtractive hybridization), farklılıkların gösterimi (differential display), seri gen ekspresyon analizleri (serial analysis of gene expression, SAGE), ifade olan gen parçalarının DNA dizilerinin belirlenmesi (sequencing of expressed sequence tags, ESTs) (Şahin-Çevik 2005) ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve RT-PCR teknikleri birçok genin aynı anda farklı koşullarda ekspresyonları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu yöntemler arasında çıkarımlı hibridizasyon, 1992 yılına kadar farklılık gösteren



genlerin izolasyonunda kullanılan tek yöntem durumundaydı (Alves ve ark. 1998). Ancak bitki stres çalışmaları gün geçtikçe daha çok gen ifadesi temeline dayanmaktadır. Bu bağlamda RT-PCR'ın (real time polimerase chain reaction; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) belirgin şekilde hassas oluşu, özel amaçlar için kullanılabilirliği ve diğer tüm tekniklerden daha nicel olması gen ifadeleri çalışmalarında tercih edilmesine sebep olmaktadır (Schmidt ve ark. 2010). RT-PCR düşük yoğunluklu mRNA'ların belirlenmesinde kullanılabileceği gibi transkriptlerin incelenmesinde DNA array'lere göre 100 kat daha hassas bir yöntemdir (Czechowski ve ark. 2004, Nicot ve ark. 2005).

Tüm bunların yanında yapılan çalışmalar sonucu belirlenen gen veya gen bölgelerinin strese cevap bakımından etkili olabilmesi için belirli bir protein veya protein ailesinin sentezlenmesini sağlaması gerekmektedir. Proteom ve yüksek sıcaklık stresi özelinde sentezlendiği bilinen ısı şoku proteinleri (İŞP, HSP; Heat Shock Protein) hücre kompozisyonunu sabit tutarak belirli bir limite kadar yaşamsal faaliyetlerin devamlılığını sağlamaktadır. Özellikle HSP'ler moleküler şaperonlar olarak normal hücresel süreçte protein sentezi, hedef tespiti, olgunlaşma ve parçalanma gibi geniş bir kombinasyonda görev almaktadır. Ancak stres koşulları söz konusu olduğunda ise, protein ve zarların devamlılığı ve proteinlerin katlanmalarından sorumlu oldukları bilinmektedir (Wang ve ark. 2003). Tüm bu özellikleri açısından abiyotik stres koşulları altında ifade olunan genler ve sonucunda sentezlenen proteinler hücrenin gerek moleküler anlamda gerekse organizma seviyesinde yaşamını sürdürebilmesinde birincil öneme sahiptir.

Abiyotik stres koşulları kültür bitkilerinin genetik verim potansiyellerinin ifadesini engelleyecek seviyede olabilir (Peleg ve ark. 2012). Özellikle açıkta yetiştiriciliği yapılan bitkiler yüksek sıcaklık stresine çok sık maruz kalmaktadır. Bu açıdan değerlendirilecek olursa çilek, gerek dünya çapında, gerekse ülkemizde üretimi ve tüketimi gittikçe artan üzüksü bir meyvedir ve dünya üzerinde geniş alanlarda tarımı yapılan bir tür olarak gerek açıkta yetiştiricilikte gerekse örtü altında yüksek sıcaklık stresine çok sık maruz kalmaktadır (Kesici 2009). FAO'nun 2005 yılı verilerine göre; çilek üretimi bakımından ülkemiz, 160 000 ton ile dünyadaki ilk on ülke arasında yedinci sırada yer alırken; 2010 yılı FAO verileri itibariyle çilek üretimi yapan ülkeler

arasında A.B.D.'den sonra ~300 000 ton üretim miktarı ile ikinci sırada yer almaktadır. 2011 yılı FAO verilerine göre ise 302 416 ton ile A.B.D. ve İspanya'nın ardından üçüncü sıradadır. Yine benzer şekilde 2012 yılında da 353 173 ton ile A.B.D ve Meksika'nın arkasından dünya çilek üretimindeki sırasını korumaktadır. Bu verilerden de anlaşılacağı gibi çilek üretimi ülkemiz yetiştiricileri açısından da gün geçtikçe daha ilgi çekici bir ürün haline gelmektedir. Bu bakımdan gittikçe artan çilek üretim potansiyelinin uygun iklim şartları altında daha çok artış göstereceği düşünülebilir. Uluslararası pazarda rekabet edebilmek için yüksek meyve kalitesi de ayırt edici bir etkidir ve yüksek sıcaklık stresi ürün veriminin yanı sıra meyve kalitesini de etkilemektedir. Buna paralel olarak gelecekteki tarımsal faaliyetlerin verimliliği açısından tür ve çeşitlerin genetik olarak geliştirilmesi çok önemli bir ihtiyaçtır. Çileğin yüksek sıcaklıklara gösterdiği tepki bakımından bazı çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalar genellikle bitki büyümesi ve meyve kalitesi (Wang ve Camp 2000), fotosentetik tolerans (Archbold ve Clements 2002), polen kalitesi (Ledesma ve Sugiyama 2005, Gülen ve ark. 2011), membran lipidleri (Wang ve Lin 2006) ve çiçeklenme (Verheul ve ark. 2007) gibi konularda yoğunlaşmıştır. Ancak çileğin yüksek sıcaklık stresine moleküler anlamda tepkisi, ülkemizde ilk kez Gülen ve Eriş'in (2003, 2004) yapmış oldukları toplam çözünebilir protein ve DNA miktarı ile peroksidaz (PRX) enzim aktivitesindeki değişimlerin araştırıldığı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Kesici (2009) ve Kesici ve ark., (2013)' nın yapmış olduğu çalışmalarda ise, ülkemizde ve dünyada ticari olarak yetiştiriciliği yapılan 15 çilek çeşidinin yüksek sıcaklığa toleransları literatürde ilk kez belirlenmiştir. Ergin (2012), yüksek sıcaklığa tolerans bakımından farklılık gösteren Cal-Giant3 (CG3) ve Redlands Hope (R. Hope) çilek çeşitlerinde toleransın kazanılmasında etkili olabilecek HSP'ler ile bazı enzim ve ozmoregülanların etkinliğini araştırarak çeşitler arasındaki genotipsel farklılıkları ortaya koymuştur. Yine, Ergin ve ark., (2012) tarafından sıcaklık stresi altındaki çilek bitkilerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve peroksidaz aktivitesindeki değişimleri incelenmiştir.

Küresel ısınma nedeniyle tarımsal üretimin giderek azalacağı öngörüsü, stres faktörlerine, özellikle de yüksek sıcaklık stresine karşı ısı toleransı yüksek kültür çeşitlerinin geliştirilmesini çok önemli bir ihtiyaç olarak ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, çilek bitkisi özelinde, bitkilerin yüksek sıcaklıklara tepki gösterirken gen

ifadesindeki değişimler ve bu değişim sonucunda etki ettikleri proteinler hakkında bilgi edinilmesi tolerant bitkilerin geliştirilebilmesi, yetiştiricilik süresince karşılaşılabilecek sorunların giderilmesi ve egzogen genlerin ifade sistemlerinin kurgulanması açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle yürütölen çalışmanın amacı yüksek sıcaklık stresine tolerant (R. Hope) ve duyarlı olduğu bilinen (Festival) ilek çeşitlerinin gen ifadesinde sıcaklık stresi ile birlikte hangi değişimlerin olduğu ve neticesinde etki ettiği protein metabolizmasının tolerans mekanizmasını ne şekilde yönlendirdiğinin belirlenmesidir. Bu amaçla ifadesi değişen genlerin belirlenmesinde toplam RNA izolasyonundan yola çıkarak cDNA elde edilmiş, ardından tasarlanan primerler ile RT-PCR alışmaları yürütölmüştür. Değişen protein profillerinin belirlenmesinde ise toplam çözünebilir protein izolasyonu ve kantifikasyonunun ardından SDS-PAGE ve 2D-PAGE protein analiz teknikleri kullanılarak sıcaklıklara göre farklılaşan proteinler belirlenmiştir. Protein dizi ve analiz sonuçları ile anlatımı değişen genler birlikte değerlendirilerek yorumlanmiştır ve çilekte yüksek sıcaklığa tolerans mekanizması ile ilgili temel veriler ortaya konulmuştur.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde, yüksek sıcaklık stresinin etkisi ve bu etki sonucunda meydana gelen genetik değişimler ve protein metabolizması ile ilgili kaynaklara ayrı alt başlıklar halinde yer verilmiştir. Her alt başlık kendi içinde genel bilgiler, diğer bitki türleri ve çilek bitkisi özelinde literatür bildirişleri olacak şekilde sıralanmıştır.

### 2.1. Yüksek sıcaklık stresinin etkisi

Mittler (2006)'e göre yüksek sıcaklık, fizyolojik olarak yaprak sıcaklığı, stomatal geçirgenlik ve solunumda artışlara sebep olmaktadır ve normalin üzerindeki sıcaklıklar tüm canlılar tarafından sıcaklık stresi olarak algılanmaktadır. Sıcaklık stresi, hücre dengesini bozarak büyüme ve gelişmede ciddi gerilemelere hatta ölümlere sebep olmaktadır. Yerleşik organizmalar olan bitkiler ise sıcaklık değişiminden ve diğer abiyotik streslerden sıklıkla etkilenmektedir. (Kotak ve ark. 2007). Abiyotik stresler bitkinin büyüme ve verimini olumsuz etkileyerek bir seri morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikleri tetiklemektedir. Bitki, abiyotik strese maruz kaldığında bir dizi gen uyarılmaktadır ve böylece strese belirli bir derecede karşı gelmekle görevli birçok metabolit ve proteinin miktarı artmaktadır (Bhatnagar-Mathur ve ark. 2008).

Geçtiğimiz 140 yılda, artan küresel CO<sub>2</sub> konsantrasyonu sıcaklıklarda 0,5 ve 0,7°C'lik artışa sebep olmuştur ve bu artış önümüzdeki 50 ila 100 yıl içinde her bir 10 yılda 0,2°C olacak şekilde hızlanarak artacaktır. Sıcaklıklarda meydana gelen her 1,5°C'lik artış ise sıcak bölgelerin 50 ila 80 km kadar güneye konumlanmasına neden olacaktır (Else ve Atkinson 2010). Daha yüksek sıcaklıklar üretimin daha kuzeye (ya da güney yarım kürede daha güneye) kaymasına neden olacaktır ya da aynı bölgelerin daha yüksek kesimlerinde daha uzun süren üretim dönemleri olacaktır (Wheeler ve Kay 2010). Çilek, böğürtlen ve ahududu gibi yumuşak meyvelerde ise sıcaklıkların artışı ile ilgili asıl mesele buharlaşma isteğindeki artış, bitki terleme oranı ve bundan dolayı bitki su kullanım miktarıdır (Else ve Atkinson 2010). Bu nedenle abiyotik stres altındaki bitki, yaprağın normal görevini devam ettirebilmesi için köklerinde sentezlenen hormon ve

amino asit gibi bileşikleri ve/veya su ve mineral besleyicileri sürgünlere taşımak zorundadır (Ghanem ve ark. 2011).

Yüksek sıcaklık stresi gibi abiyotik stresler dünya çapında tarımsal üretime ve büyümeye zarar veren anahtar sınırlayıcı faktördür ve stresli çevreler tohum çimlenmesinde gecikmeye neden olmak, bitki büyümesini geriletmek ve sonuç olarak bitkisel verimi azaltmak gibi pek çok etkiye sahiptir (Hossain ve ark. 2012).

Bitkilerde şiddetli hücrel zararlanmayı tetikleyen, sıcaklık, kuraklık, soğuk ve tuzluluk başlıca abiyotik stresler olarak bilinmektedir. Abiyotik stresler genellikle birbirleri ile ilişkilidir. Ancak ister bireysel ister bileşik halde olsun morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olarak bitki büyümesi, verimliliği ve ürünü üzerine olumsuz etkileri vardır (Bita ve Gerats 2013).

2011 yılında yayımlanan İklim Değişikliği Ulusal Eylem Planında, Türkiye’de yıllık ortalama sıcaklık artışının 2,5°-4°C kadar artacağını ve bu artışın Ege ve Doğu Anadolu Bölgeleri’nde 4°C’yi, iç bölgelerinde ise 5°C’yi bulacağını öngörülürken, Türkiye’nin yakın gelecekte daha sıcak, daha kurak ve yağışlar açısından daha belirsiz bir iklim yapısına sahip olacağı belirtilmiştir (Anonim 2014).

Anderson (2002)’un biberde (*Capsicum annuum* L.) yüksek sıcaklığın etkilerini araştırdığı çalışmasında bitkiler 24/20°C (gündüz/gece) sıcaklığında 8 hafta boyunca yetiştirildikten sonra bu bitkilere 15’er dakika 24, 48 ve 54°C’lik sıcaklıklar uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda yüksek sıcaklık ile birlikte bitkilerdeki zararlanmanın da doğrusal biçimde arttığı belirlenmiştir.

Yüksek sıcaklığa duyarlı *Festuca arundinacea* cv. Barlexas ve orta derecede tolerant *Lolium perenne* cv. Accent bitkileri 22/16 °C’lik gündüz/gece sıcaklığında 14 gün yetiştirildikten sonra, bu bitkilerin yarısı sıcaklık alıştırması için 3 gün boyunca 30°C’lik sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Daha sonra bu bitkilere ve alıştırmayı yapmayan diğer bitkilere 14 saatlik 38, 42 ve 46°C’lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır. Bitkilerde yaprak oransal su kapsamı, lipid peroksidasyonu, hücre zarı geçirgenliği, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AsA,

O<sub>2</sub><sup>-</sup> ve glutatyon içeriği analizleri yapılmıştır. Yüksek sıcaklık ile birlikte yaprak oransal su kapsamı bakımından her iki türde de gerileme, sıcak alıştırılması yapılmış grupta ise daha az miktarda gerileme olduğu belirlenmiştir. Sıcağa alıştırılmamış bitkilere göre sıcak alıştırılması yapılan bitkilerde daha yüksek zar geçirgenliği ve daha düşük lipid peroksidasyonu ürünü (MDA) tespit edilmiştir. Ancak özellikle 46°C’de alıştırma uygulamasına bakılmaksızın *Festuca arundinacea* cv. Barlexas’ın *Lolium perenne* cv. Accent’e göre daha yüksek zar zararlanması gösterdiği belirlenmiştir (Xu ve ark. 2006).

*Annona cherimola* bitkisinde meyve oluşumu ve meyve büyümesi 30/25°C’lik gündüz/gece sıcaklığında belirgin bir şekilde gerilemiştir. Bu sıcaklıklar yerfıstığı için 33/22°C, lahana için 35/15°C olarak belirlenmiştir. Domates gibi yüksek sıcaklıklara hassas bir türde ise 35/23°C’de meyve oluşumu gözlenmemiştir. Börölce, fasulye ve şeftalide çiçek gelişimi sırasında görülen yüksek sıcaklıklar meyve oluşumunda belirgin bir düşüşe neden olmaktadır (Ledesma ve ark. 2008).

Çilek, ideal yetişme sıcaklığının 10 ila 26°C’ler arasında değişmesi nedeniyle ılıman iklimlerde yetişir (Strik 1985). 30°C’nin üzerindeki sıcaklıkların meyve büyüklüğünü (Wang ve Camp 2000), meyve ağırlığını (Kumakura ve Shishido 1994) ve tüm bitkinin gelişimini (Hellman ve Travis 1988) geriletlediği bilinmektedir. Ayrıca Mori (1998) 32/27°C gündüz/gece sıcaklığında aken oluşumunun sırasıyla 24/19°C ve 20/15°C’ye göre daha düşük olduğunu bildirmiştir.

Gülen ve Eriş (2003)’in çilekte (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) kademeli ve şok sıcaklık uygulamalarının etkilerini araştırdıkları çalışmada çilek fidelerine 48 saat süresince 30, 35, 40 ve 45°C’lik kademeli ve şok sıcaklıklar uygulanmıştır. Her iki uygulama için yaprak oransal su kapsamı-turgor kaybı, klorofil içeriği ve stres toleransı testleri yapılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, sıcaklık artışı ile birlikte bitkilerdeki hücrel zararlanmanın da arttığı ve kademeli sıcaklık uygulanmış bitkilerin şok sıcaklık uygulanan bitkilere göre stres toleransını arttırdığı belirlenmiştir.

Wu (2011)'nin yapmış olduğu çalışmada, arbusküler mikoriza bakterisi ile bulaştırılmış çileklerde bulaşık olmayanlara göre yüksek sıcaklıklarda (>35°C) daha iyi büyüme özellikleri (yaprak ve kök sayısı, yaprak ve kök kuru ağırlığı, gövde çapı, taç çapı) görülmüştür.

Bitkinin yüksek sıcaklığa toleransı ile çiçek tozlarının yüksek sıcaklıktan etkilenme düzeylerinin araştırıldığı çalışmada Redlands Hope (yüksek sıcaklığa tolerant) ve Cal-Giant 3 (CG-3; duyarlı) olarak belirlenmiş iki çilek çeşidi kullanılmıştır. Yarı açmış çiçek tomurcuklarına laboratuvar ortamında 35°C'den başlayarak kademeli olarak 40, 45, 50, 55 ve 60°C'lik sıcaklıklar uygulanmıştır. Her sıcaklık kademesinde yüksek sıcaklık uygulamasını takiben çiçek tozlarının canlılığı Triphenyl Tetrazolium Chlorid (TTC) testi ile belirlenmiştir. Genel olarak her iki çeşitte de sıcaklığın artmasına paralel olarak çiçek tozu canlılığında ve çimlenme oranında düşüş görülmüştür. Ancak çeşitler karşılaştırıldığında R. Hope çeşidinde uygulanan sıcaklıklar bazında canlı ve yarı canlı polen oranları CG-3 çeşidine oranla daha yüksek olduğu ve R. Hope çeşidinde 60°C uygulamasında dahi ~%20 oranında yarı canlı çiçek tozu tespit edilmiştir. Çiçek tozu çimlenme oranları bakımından ise R. Hope çeşidine ait çiçek tozları uygulanan tüm sıcaklık derecelerinde CG-3 çeşidinden daha yüksek çiçek tozu çimlenme oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, çiçek tozlarının yüksek sıcaklığa toleranslarının çeşitlerin genel olarak tepkileri ile paralellik gösterdiği ortaya konulmuştur (Gülen ve ark. 2011).

Ülkemizde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan 15 çilek çeşidinin yüksek sıcaklıklara toleranslarını belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada çileklere kademeli olarak 35, 40, 45 ve 50°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır ve bu bitkilerde yaprak oransal su kapsamı-turgor kaybı, klorofil kapsamı ve lipid peroksidasyonu testleri yapılmıştır. Çeşitlerin stres toleranslarını belirlemek için sıcak su banyosunda 60°C'ye kadar kademeli olarak tutulmuş ve iyon sızıntısı testi sonucuna göre her bir çeşide ait yüksek sıcaklık tolerans dereceleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, Elsanta, Redlands Hope ve Camarosa çeşitlerinin yüksek sıcaklığa göreceli olarak tolerant oldukları, Whitney, Fern, Festival ve CG-3 çeşitlerinin ise nispeten daha hassas çeşitler olduğu ortaya konulmuştur (Kesici 2009, Kesici ve ark. 2013).

## 2.2. Yüksek sıcaklık stresinde genetik çalışmalar

Bir genin belirli bir süreçte anahtar rol oynaması için anlatımının artması ya da azalması gerekli olmasa da, biyolojik sistemlerde moleküler temelde farklı ifade edilen genlerin taranması için açık ve anlaşılır bir yoldur. Farklı ifade edilen genlerin izolasyonu, özellikle düşük miktardakilerin, oldukça zordur. Bunu daha açık anlayabilmek için bir hücrenin transkriptomundaki karmaşıklığı dikkate almak gereklidir (Wan ve ark. 1996).

Yüksek sıcaklık şoku cevabı tüm organizmalarda yüksek sıcaklık ya da diğer toksik ajanlara karşı verilen bir grup genin transkripsiyonunda artış ile kendini gösteren oldukça korunmuş biyolojik bir cevaptır (Waters ve ark. 1996). Stres geni indüklenmesi öncelikle transkripsiyon seviyesinde ortaya çıkmaktadır ve belirli genlerin geçici ve bölgesel ifade kalıplarını düzenleyerek bitkinin strese cevabında önemli bir yer almaktadır (Rushton ve Somssich 1998).

Neff ve ark. (1999), *Arabidopsis*'te yapılan çalışmalar sonucunda *ATST4a*'ün BR (Brassinosteroid) homeostazında katalitik aktiviteye sahip olduğunu ve büyüme ve gelişme üzerine etkisi olduğunu göstermiştir.

Ökaryotik hücre ~15 000-30 000 farklı mRNA içerir ve toplam kütlesi ~100 000 olan mRNA içinde yaygınlıkları birden bine kadar değişiklik göstermektedir. Transkript popülasyonunun %50 kadarı göreceli olarak küçük sayılardır (birkaç yüz) ve farklı mRNA türlerinin sadece %1'ini temsil eder. Diğer yarısı ise "nadir" mRNA'ları içermektedir. Bu nedenle belirli bir biyolojik süreçte özellikli bir görevden sorumlu olan bir genin farkına varılmasındaki zorluk hücrede karışık bir yığın biçiminde bulunan hücre mRNA'sının yanında düşük miktarda ifade edilmesinden kaynaklanmaktadır (Lievens ve ark. 2001).

Bitkilerin strese cevabı birçok sinyal yolağı ile düzenlenmektedir ve bitkilerin çeşitli streslere karşı verdiği cevap için tetiklenen gen ifadesi kalıpları arasında belirgin bir örtüşme söz konusudur (Singh ve ark. 2002). Gen ifadesi seviyeleri genellikle Northern blot analizleri ile belirlenmekteydi. Ancak bu teknik çok zaman alıcıdır ve başlangıçta



yüksek miktarda RNA'ya ihtiyaç duymaktadır. Real Time PCR (RT-PCR) şu an için düşük miktardaki mRNA'ların belirlenmesinde kullanılan en hassas yöntemdir ve farklı uygulamalar için kullanılabilir (Nicot ve ark. 2005).

Çeşitli koşullar altında sıcaklık stresinden etkilenen farklı bitki türlerinin ifade verilerinin kıyaslanmasında, örneğin farklı doku tipleri, gelişimsel dönem, büyüme koşulları ya da uygulamaları ve stres uygulamalarının sürekliliği, transkript birikiminden benzer motifler göstererek genomun %2'si etkilenmektedir (Lim ve ark. 2006).

Bitkilerde savunma ve stres mekanizmaları ile ilgili birçok çalışmanın gen ifadeleri ile ilgili olduğunun anlaşılmasının ardından farklı ifade edilen genlerin fonksiyonlarının ve transkriptom analizlerinin yüksek bitkilerin strese verdikleri cevap ve tolerans mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Bu çalışmalar sırasında da strese yanıtta görevli pek çok yeni gen keşfedilmiştir (Tyagi ve Chandra 2006). Sıcaklık stresine yanıt ve varlığını sürdürebilme bitkilerde oldukça karmaşık bir olgudur. Sayısı artmakta olan ısıtoleransı değiştirilmiş mutantlar da bitkilerde sıcaklık stresine karşı verilen yanıtların karmaşıklığının anlaşılmasında bilinenlerin artmasını sağlamaktadır (Kotak ve ark. 2007).

Strese cevap, monomerik, streste olmayan hücrelerde DNA bağlamayan formda ve stres etkisi ile birlikte trimerik forma dönüşerek sıcaklık stresi genlerinin promotorlarına bağlanabilen sıcaklık stresi faktörleri (HSF) tarafından yönetilmektedir. Bu durum yüksek sıcaklığa maruz kalmış organizmalarda moleküler seviyede en çok gözlenen cevaptır. Ayrıca, farklı bitki türlerinde, değişik dokularda, farklı gelişim dönemlerinde yapılan çalışmalarda bitki genomunun %2'sinin yüksek sıcaklık stresinden etkilendiği belirlenmiştir. Ayrıca etkilenen bu genlerin esas olarak yüksek sıcaklığa cevapta görev alan genler olduğu belirlenmiştir (Bhatnagar-matur ve ark. 2008). Abiyotik streslere cevap ile ilgili günümüze kadar birçok gen belirlenmiştir ve tanımlanmıştır. Ancak bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu *A. thaliana* bitkisinde yürütülmüştür (Peleg ve ark. 2012).

Yüksek sıcaklık stresine cevabın ise süpresörlerce (baskılayıcı) düzenlendiği ve bunlar ortadan kalktığında (knock out hatlarda) sıcaklık stresi toleransına sebep olduğu tespit edilmiştir. Alternatif olarak sıcaklık stresine toleransın yolaklardaki sıcaklık stresi ile ilgili doğrudan olamayan ancak strese cevabı tetikleyen mutasyonlar ile olabileceği ispatlanmıştır (Luhua ve ark. 2013).

*Arabidopsis* genomunun 1500'den fazla transkripsiyon faktörü kodladığının bulunmasından sonra bitkilerin genom kapasitelerinin büyük bir kısmını transkripsiyona ayırdığı anlaşılmıştır (Riechmann ve ark. 2000).

Yüksek sıcaklıklarda, fotosentez bakımından zararın olduğu ana bölgenin tilakoid zarlar olduğu bilinmektedir. Tilakoid zarlarında trienoik yağ asitlerinin daha az olması nedeniyle yabani tiplere göre daha doymuş yağ asitlerine sahip olan *Arabidopsis* double mutanlığı *fad7/8*, yüksek sıcaklıklara karşı daha iyi tolerans ve daha istikrarlı elektron taşınımı göstermektedir (Murakami ve ark. 2000).

Sun ve ark. (2001) *Arabidopsis*'te *At-HSP17.6A*'nın fonksiyonunu belirlemek için yürüttükleri çalışmalarında *At-HSP17.6A*'nın sentezinin tohum gelişiminde olduğu kadar sıcaklık ve kuraklık ile de tetiklendiği tespit edilmiştir.

Nover ve ark. (2001)'nin bildirdiğine göre, bitkiler HSF-kodlayan birçok gene sahiptir ve bunlardan 21 tanesi *Arabidopsis*'te tanımlanmıştır. Bitki HSF'leri temel olarak oligomerizasyon bölgelerinin yapısal özellikleri ile ayırt edilen ve A, B ve C olarak adlandırılan korunmuş 3 evrimsel sınıftan oluşmaktadır.

Panchuk ve ark. (2002)'nin *Arabidopsis*'te yaptıkları çalışmada, yabani tip ve sıcaklık stresi sırasında HSP'lerin sentezini sağlayan *HSF3*'ü aşırı miktarda ifade eden transgenik *Arabidopsis*ler karşılaştırılmıştır. Transgenik *Arabidopsis*lerde 44°C'lik sıcaklık stresi altında dahi sabit kalan bir APX isoformu olan *Apx5* tespit edilirken yabani tip bitkilerde tespit edilememiştir. RT-PCR çalışmaları ile *Apx2* yeni bir ısı şoku geni olarak belirlenmiştir.

Domateste *HsfaA1* sıcaklığa cevapta ana düzenleyici olarak görev almaktadır. Transgenik domateste, bu genin sentezinin baskılandığı bitki grubuna göre 10 kat daha fazla *HsfA1* ifadesi belirlenmiştir. Bu anlamda *HsfA1*'in ısıtoleranstaki eşsiz bir fonksiyonunun olduğu ve başka bir sıcaklık faktörü (Hsf) ile ikame edilemeyeceği bildirilmiştir (Mishra 2002).

Yamanouchi ve ark. (2002), çeltikte benekli yaprak genini (*Sp17*) harita temelli klonlama ile tanımlamışlardır. Bu genin açık okuma çerçevelerinin (ORF) birinin ısı şoku faktörü (HSF) ile yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Dizi analizleri sonucunda mutant allelin HSF DNA-bağlayıcı bölgesinde triptofandan sisteine dönüşme sebep olan sadece 1 bazlık değişim olduğu görülmüştür.

Albrecht ve ark. (2003)'ün *Arabidopsis*'te *CBL1*'in (calcineurin B-like proteins) *in vivo* fonksiyonunu araştırdıkları çalışmalarında *CBL1*'in anlatımının aşırı derecede arttığı hatlarda terlemeyle birlikte kaybedilen su miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Genler düzeyinde ise strese erken cevap vermekten sorumlu olan transkripsiyon faktörlerinin ifadesini ve streste olmayan bitkilerde ise stres adaptasyon genlerini tetiklediği belirlenmiştir.

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heinh. ve *Nicotiana tabacum* L. bitkilerinde yapılan araştırmada bitkiler normal koşullarda yetiştirildikten sonra sırasıyla 37-44°C ve 42°C yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılmıştır. 1 saatlik 37°C sıcaklık stresine cevap olarak *Arabidopsis* bitkisinin yapraklarında *At-HSP17.6* (34,200 kat) ve *At-HSP18.2* (22,800 kat) mRNA protein genlerinde binlerce kat artış belirlenmiştir. 4 saat sonra *At-HSP18.2* (28,500 kat) geni hala yüksek seviyede iken *At-HSP17.6*'nın (9,100 kat) seviyesinde düşüş gözlenmiştir. *Nicotiana tabacum* L.'de yapısal genlerin transkript seviyesinde, yüksek sıcaklık uygulamasını (42°C) takiben düşüş tespit edilmiştir. 24°C'lik normal koşullarda Ribozomal protein olan *Nt-L25* ve aktin genleri olan *Nt-ACT9* ve *Nt-ACT66*'in anlatımları sırasıyla 100, 200 ve 225 kat iken, 2 saat boyunca oda sıcaklığında tutulan bitkilerde bu anlatım miktarı sırasıyla 160, 280 ve 150 kat olarak gözlenmiştir. Ancak, 2 saatlik yüksek sıcaklık uygulamasının ardından bu miktarlar 12, 33 ve 12 kat olacak şekilde azalmıştır (Volkov ve ark. 2003).

HSF'lerin moleküler mekanizmaları ile ilgili bilgi birikimi ağırlıklı olarak *Arabidopsis thaliana* ve domateste yapılan araştırmalar ile edinilmiştir. Domateste, *HsfA1a*, *HsfA2* ve *HsfB1* sıcaklık stresinden sorumlu genlerin ifadesinde düzenleyici bir iletişim ağı şeklinde çalışmaktadır ve *HsfA1a* bu iletişim ağının ana düzenleyicisidir (Baniwal ve ark. 2004).

Lohmann ve ark. (2004)'nın yapmış oldukları çalışmada, bitki ısı şoku transkripsiyon faktörlerinin (HSFs) spesifik fonksiyonel rollerini belirlemek için *Arabidopsis thaliana* *AtHsf1* ve *AtHsf3* genlerinden T-DNA insersiyon mutanları izole edilmiştir. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, *AtHSF1* ve *AtHSF3* genlerinin ısı stresi genlerinin ani tetiklenmesinde anahtar düzenleyiciler olarak görev yaptığı belirlenmiştir.

Sakuma ve ark. (2006)'nın *Arabidopsis thaliana*'da yaptıkları çalışmada mikroarray ve kantitatif RT-PCR analizleri sonucunda *DREB2A*'nın (dehydration-responsive element binding protein) hem su hem de sıcaklık stresinde rolü olduğu belirlenmiştir.

Yokotani ve ark. (2008)'nin transgenik *Arabidopsis*'te yaptıkları çalışmada mikroarray analizleri sonucunda stres altında olmayan *OsHsfA2e*'yi aşırı ifade eden transgenik *Arabidopsis*'lerin ısı şoku proteinleri gibi stresle ilgili belirli genleri fazla miktarda ifade ettiği belirlenmiştir. Bu sebeple, *OsHsfA2e* geninin strese toleranslı bitki geliştirmek için yapılan ıslahta moleküler markır olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.

Gao ve ark. (2008), *Arabidopsis thaliana*'da yürüttükleri araştırmada bilinen klasik HSFler dışında *bZIP28*'in de membrana bağlı transkripsiyon faktörü temelli sinyal yolağı ile sıcaklık toleransına katkıda bulunduğunu tespit etmiştir. *bZIP28*'in aynı zamanda sıcaklık ile tetiklenen, bitkilerde protein katlanması ve ısı tolerans gibi bazı genlerin optimal ifadesinde de gerekli olduğu gösterilmiştir.

Liu ve ark. (2008)'na göre mikroRNAlar (miRNAs) strese cevap ile ilgili bir grup gen ifade düzenleyicisidir ve ifadelerinin stres ile bağlantısı henüz yeni keşfedilmiştir. Bu nedenle yürüttükleri çalışmada *Arabidopsis thaliana* tohumları MS agar ortamında 2 hafta boyunca yetiştirilmiştir. Fidler blotlama kâğıdına aktarılmıştır ve tuz stresi

uygulamak için 300 mM NaCl, kuraklık stresi için ise 200 mM mannitol kullanılmıştır. Sonuç olarak bunlardan 10 tanesi yüksek tuzluluk, 4 tanesi kuraklık ve 10 tanesi de soğuk ile ifade edilen miRNAlar olmuştur. *miR168*, *miR171* ve *miR396*'nın hepsinden sorumlu olduğu belirlenmiştir. RT-PCR analizleri ifade profilleri belirlenerek bu üç stresin birbiri ile olan yakın ilişkisi ortaya konulmuştur.

Wu ve ark. (2009)'nın transgenik çeltik bitkisinde yaptıkları çalışmada *OsWRKY11* geninin cDNA'sını çeltik (cv. Sasanishiki) HSP 101 promotörüne aktarmışlardır. Sıcaklık uygulamaları (su banyosunda 37, 42 ve 45°C'de 1 saat) ile *OsWRKY11*'nin aşırı ifade edildiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *OsWRKY11* geninin kuraklık ve sıcaklık stresine cevapta rol oynadığı ve bu nedenle stres toleransı geliştirilmesinde faydalı olabileceği gösterilmiştir.

Hong ve ark. (2009), 36 saat boyunca su banyosunda transgenik olan (35S:*AtDREB1A*) ve olmayan krizantem bitkilerinde 45°C'lik yüksek sıcaklık uygulamıştır. RT-PCR ve cDNA mikroarray analizleri sonucunda transgenik bitkilerde *DREB1A* ailesine ait 74 genden 55'inin anlatımının arttığı ve *AtDREB1A* geninin aşırı ifadesi ile birlikte sinyal iletiminde görevli genlerin ifadesinde de yüksek bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca metabolizma ve fotosentez ile ilgili genlerin yanı sıra HSP70 geninin transkripsiyonunun da daha erken dönemde gerçekleştiği görülmüştür.

Frank ve ark. (2009) yüksek sıcaklığa tolerant Hazera 3042 ve duyarlı Hazera 3017 domates çeşitlerine 2 saat boyunca 43–45°C'lik yüksek sıcaklık uygulaması yapmıştır. Yüksek sıcaklık uygulanmış domates mikrosporlarında transkriptomik analizler (Affymetrix Tomato Genome Array ve cDNA-AFLP) RT-PCR ve immunoblot çalışmaları ile kuvvetlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda *sHSP*, *HSP70*, *HSP90* gen ailelerinin etkinlikleri ortaya konularak, *HSFA2* ve *HSFA3* gibi transkripsiyon faktörlerinin de fonksiyonları gözlenmiştir.

Li ve ark. (2010)'nın *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yaptıkları çalışmada, *WRKY39* geninin susturulduğu (knock down) mutantların sıcaklık stresine karşı duyarlı olduklarını bunun aksine *WRKY39* geninin aşırı ifade edildiği mutantlarda ise

ısıltoleransın arttığını gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda bu mutantların Salisilik asit ve Jasmonik asit sinyal yolları ile birlikte düzenlendiği belirlenmiştir.

Giorno ve ark. (2010) tarafından 36°C'lik yüksek sıcaklık altında normal meyve oluşumu meydana getiren tolerant domates anterlerinde (*Solanum lycopersicum* cv. Saladett) RT-PCR ile ifade analizleri yürütülmüştür. Analizler sonucunda, *HsfA2* ve *Hsp17-CII*'nin yüksek sıcaklık stresi sisteminde iki önemli üye olduğu belirlenmiştir. Gen ve protein analizleri sonucunda bu genlerin anter gelişimi sırasında düzenlenerek kısa ve uzun sıcaklık stresi ile birlikte ifadesinin tetiklendiği tespit edilmiştir.

Kobayashi ve ark. (2010) Pinot noir üzüm çeşidine 45°C'lik yüksek sıcaklık uyguladıktan sonra *HSG1*, *HSG4*, *HSG14* ve *HSG19* genlerinin anlatımının arttığını ve 26°C'lik geri kazanım uygulaması ile beraber bu genlerin anlatımının temel seviyeye indiği gözlenmiştir. Bu üzüm çeşidinde ısı toleransı arttırmak amacıyla genetik mühendisliği yaklaşımları kullanılarak belirlenen bu dört gen *Arabidopsis thaliana* bitkisine aktarılmıştır. Bu genlerin aşırı ifade edildiği *Arabidopsis* hatlarında bitkilerin büyüme hızlarının herhangi bir zarar oluşturmadan arttığı ve yüksek sıcaklık uygulamasının ardından (45°C'de 1 saat) ısıltolerans testlerine göre kontrol bitkilerine kıyasla belirgin şekilde sağlıklı oldukları belirlenmiştir.

*Arabidopsis* genomu birbirinden uzak 2 *AtCYS* gen kümesinden 7 antosiyanin izoformunu (*AtCYSs*) kodlamaktadır. Yapılan araştırmada *AtCYS1* ve *AtCYS2* her bir kümeden temsilci olarak seçilmiştir ve GUS roportörü ile transgenik bitkiler oluşturulmuştur. Uygulanan sıcaklık stresinin ardından (37°C'de 48 saat) ifade profilleri belirlenmiştir ve her *AtCYS* geninin stres sırasında benzersiz ifade profili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklık stresinin *AtCYS1* ve *AtCYS2*'nin ifadesini arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre, *AtCYS* genlerinin bitki gelişimi ve stres cevabında önemli rolleri olduğu belirlenmiştir (Hwang ve ark. 2010).

Dong ve ark. (2011) bir *VHP* (Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating inorganic pyrophosphatase; VHP, EC 3.6.1.1) geni olan *MdVHP1*'i elmadan izole etmiştir. Nükleotid ve amino asit dizi analizleri bu genin *type-1 VHP* proteinini kodladığını göstermiştir. Bu genin elma

*in vitro* tomurcuk (shoot) kültüründe, vejetatif ve üreme organlarında ifade edildiği ve ifadesinin tuz, osmotik stres, soğuk ve sıcak ile tetiklendiği belirlenmiştir. Ayrıca transgenik domates bitkisinde yabancı tipe göre *MdVHPI*'in aşırı ifadesi tuz ve kuraklık stresine karşı tolerans gelişmesine de neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *MdVHPI*'in içsel iyon ve çözünür maddeleri dengeleyerek abiyotik streslere tolerans geliştirilmesinde önemli bir düzenleyici olduğunu göstermektedir.

Zhang ve ark. (2011)'nin Yunnan kırmızı armudunda kırmızı kabuk renginin mekanizmasını karakterize ettikleri çalışmada suppression subtractive hybridization (SSH) teknolojisi kullanılarak subtractive cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. 100'ün üzerinde farklı ifade edilen EST belirlenmiştir. RT-PCR'da yürütülen ifade analizlerinde açık renk kabuklu 'Zaobaimi' ve kırmızı kabuklu 'Yunhong-1' çeşitleri için 13 gen kullanılmıştır. Bu analiz sonucunda diğer seçilen genlerin anlatımı artar veya azalırken metallothionein-like protein ve NADP-malik asit enzimlerini kodlayan genlerin yapısal olarak ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca, *R2R3MYB* transkripsiyon faktörü *PyMYB10*'nin her iki çeşitte de anlatımının arttığı fakat çeşitler arasındaki kinetiğinin farklı olurken diğer antosiyaninle ilgili genlerin ise MYB-bHLH-WD40 kompleksi ile düzenlendiği belirlenmiştir. *DFR* ve *ANS* genlerinin 'Zaobaimi' çeşidinde renklenmede sınırlayıcı faktör olduğu tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2011), 100 genotip arasında meyve oluşturma performanslarına göre yüksek sıcaklıklara toleranslı (HT) ve duyarlı (HS) olarak belirlenen domates (*Solanum lycopersicum* L.) çeşitlerinde karbon dağılımı ve sukroz ayrıştırma enziminin paternlerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, yüksek kapasitede sukroz alımı ve INV (invertaz) aktivitesinin domatesin genç meyvelerinde glukoz sinyal yolağı aktivitesini arttırarak PCD yolağını baskıladığı belirlenmiştir.

*Musa acuminata* (cv. Carvendish)'da RT-qPCR için en uygun referans genin seçilmesi amacıyla 20 gen kullanılmıştır. Bu amaçla muz meyvelerine yüksek sıcaklık 38°C'de ve üşüme de 8°C'de uygulanmıştır. Örnekler uygulamaların 0, 1, 3, 5 ve 7 gün sonrasında toplanmıştır. Bu uygulamanın dışında başka muz meyvelerine biyotik stres (*Colletotrichum musae*) ve hormon uygulamaları (5 mM salisilik asit ve 0,1 mM metil

jasmonat) da yapılmıştır. 20 gen arasından *ACT1*, *EIF5A-2*, *UBQ2*, *RPS2* ve *CAC* yüksek sıcaklıkta en istikrarlı referans gen olarak belirlenmiştir. Ancak hiçbir gen her beş uygulama için de aynı kararlılığı göstermemiştir (Chen ve ark. 2011).

Nakashima ve ark. (2012)'nin *NAC* transkripsiyon faktörlerinin bitki abiyotik stres toleransındaki rolünü tartışıkları derlemede *NAC* proteinlerinin bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerinden olduğu ve geçmişten günümüze *Arabidopsis* ve çeltikte 100'den fazla *NAC* geninin tanımlandığı bildirmiştir. *NAC* transkripsiyon faktörlerinin sadece bitki gelişiminde değil aynı zamanda abiyotik strese cevapta da pekçok önemli fonksiyonu olduğu, stresten sorumlu *NAC* genlerinin (*SNAC*) aşırı ifadesinin transgenik *Arabidopsis* ve çeltik bitkilerinde kuraklığa karşı toleransı arttırdığı belirtilmiştir.

Zhao ve ark. (2012), elmada üşüme (0, 2, 4, 8, 12 ve 24 saat 4°C), yüksek sıcaklık (40°C), dışsal absisik asit (100 µM), kuraklık (12 güne kadar bitkileri susuz bırakmak), tuz (1 yaşlı fideleri 0, 2, 6, 12, 24 ve 48 saat 100mM NaCl içeren Hoagland solüsyonunda tutmak) stresi gibi 5 farklı abiyotik stres uygulamıştır. Çalışmaların sonucunda ilk kez tüm elma genomunda 6 alt gruba ayrılabilir 68 adet *MdDREB* geni bulunmuştur. Kantitatif RT-PCR sonuçlarına göre varsayılan bazı *MdDREB* genlerinin anlatımının farklı abiyotik stres uygulamaları altında belirgin şekilde arttığını belirlemişlerdir.

*WRKY* transkripsiyon faktörlerinin bitki abiyotik stresindeki rolünün tartışıldığı makalede *WRKY* genlerinin genellikle birçok stres faktörüne tepki gösterdiği ve proteinlerinin de pekçok süreçte olumlu ya da olumsuz yönde düzenleyici rol üstlendiği bildirilmiştir. Bu gen ailesinde *Arabidopsis*'te tanımlananlardan *At2g30250*, *At5g07100* ve *At3g04670*'in yüksek sıcaklık stresi ile ilgili olduğu, *At5g07100* ve *At3g04670*'in ise sadece sıcaklık stresi ile tetiklendiği belirtilmiştir (Chen ve ark. 2012).

Sıcaklık stresi transkripsiyon faktörleri [Heat stress transcription factors (Hsfs)] birçok kimyasal stres etkeni ve sıcaklık stresine karşı genlerin cevap aktivitesini belirleyen sinyal aktarımı zincirinin terminal unsurlarıdır ancak fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır. Bu amaçla çeltikte (*Oryza sativa* L.) 19 ve *Arabidopsis*'te



(*Arabidopsis thaliana*) 21 Hsf üyesi klonlanmıştır. Oligomerik yapılarına göre Hsf proteinleri üç evrimsel sınıfa ayrılmıştır: A, B ve C HsfA aralarında en çok çalışılanıdır. *HsfA1a* ana düzenleyici ve *HsfA2* bitkinin sıcaklığa tepkisinde ana sıcaklık stresi faktörüdür. Buna ek olarak *Arabidopsis*'te, *HsfA4a* ve *HsfA8* ikincil stres faktörü olan reaktif oksijen türlerini algılamada sensör görevi görmektedir (Qu ve ark. 2013).

Yüksek sıcaklıklar lahanada (*Brassica oleracea* L.) hastalıklara dayanımı geriletmektedir ve verimi azaltmaktadır. Bu nedenle lahana ıslahında yüksek sıcaklıklara toleranslı lahana seçimi önemli bir hedefdir ve bunu başarmanın en hızlı yolu moleküler ve biyolojik yöntemlerdir. Bu sebeple yürütülen çalışmada yüksek sıcaklığa tolerant (HT) ve duyarlı (HS) lahana hatlarında sıcaklıktan sorumlu genlerin ifade profilleri incelenmiştir. HT hatlarda *BoHsp70* proteinin ve *BoGRAS* (*SCL13*) transkripsiyon faktörlerinin transkriptleri HS hatlara göre daha güçlü ifade edildiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak bu genlerin lahanada ıslahında ön seçim için moleküler markır olarak kullanılabilmesi önerilmektedir (Park ve ark. 2013).

Suzuki ve ark. (2013) *Arabidopsis*'te *APX1*, *APX2* ve *APX1/APX2*'nin eksik olduğu mutantlarında sıcaklık, tuzluluk, ışık ve oksidatif stres gibi farklı streslere karşı verilen cevabı karakterize etmiştir. *APX2*'nin eksik olduğu mutantlarda ışık stresine karşı toleransın azaldığı ancak buna karşın tuzluluk ve oksidatif strese karşı tolerans geliştirdiği görülmüştür. Şaşırtıcı şekilde, *APX2*'nin olmadığı bitkilerin fide döneminde sıcaklık stresine daha duyarlı, reproduktif dönemde ise daha tolerant olduğu belirlenmiştir. *APX1* ve *APX2* oksidatif stres sırasında birlikte çalışırken, ışık, tuzluluk ya da sıcaklık stresinde çalışmadığı ayrıca uzayan sıcaklık stresi sırasında *APX2* olmayan bitkilerde daha fazla tohum üretildiği tespit edilmiştir. Bu durum *APX2*'den eksik olan bitkilerde bazı farklı mekanizmaların sıcaklık stresi (45°C) sırasında aktifleşerek reproduktif dokuları sıcaklık stresi zararından koruduğunu göstermiştir. Araştırmacılar yüksek sıcaklığın reproduktif organlara zarar vererek dünya çapındaki tarımsal üretimin azalmasındaki ana etken olması sebebiyle bu sonuçların çok önemli olduğunu vurgulamıştır.

Bitkilerin strese olan cevaplarında fosforilasyonun rolü hakkında oldukça az bilgi bulunmaktadır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar sonucunda *MPK6* (mitogen-activated protein kinase)'nin özellikle ana stres transkripsiyon faktörü olan *HsfA2*'yi hedef aldığı kanıtlanmıştır. *MPK6*, *HsfA2*'yi T249 bölgesi üzerinden fosforlayarak hücrelerarası lokalizasyonunu değiştirmiştir. Sonuç olarak 37°C'de 1saat boyunca yüksek sıcaklığa maruz kalan *Arabidopsis* bitkisinde *HsfA2* ve *MPK6* kompleks biçimde sıcaklık stresine cevapta rol oynamaktadır (Evrard ve ark. 2013).

*Arabidopsis thaliana* genomundaki tüm genlerin %13'ünden fazlası fonksiyonu tamamen bilinmeyen proteinleri kodlamaktadır. Fonksiyonu bilinenlerden de >%30'u çok az anlaşılmıştır. *Arabidopsis*'te yürütülen bu çalışmada fonksiyonu bilinmeyen bu genlerin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 1007 adet gen seçilmiş ve onlardan sorumlu olan T-DNA insersiyon mutantlarında tuzluluk (NaCl; 75–150 mM), oksidatif (Sorbitol; 50–250 mM), ozmotik (PEG-8000; –1.2w), sıcak (38C'de 24 saat), soğuk (10C'de 48 saat) ve oksijen azlığı (hava yerine argon) streslerine karşı test edilmişlerdir. Mutantların %12-31'inin değiştirilmiş (altered) strese cevap fenotipine sahip olduğu görülmüştür. Şaşırtıcı biçimde, 1007 mutantın 832'si birden fazla abiyotik strese karşı duyarlılık veya tolerans göstermiştir. Test edilen farklı abiyotik stresler arasından oksidatif ve ozmotik streslerin en yüksek fenotipik etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Luhua ve ark. 2013).

BRler (Brassinosteroids) bitki gelişimi, büyümesi ve strese cevapta düzenleyici rol oynamaktadır. Büyüme ve gelişmedeki rolleri çalışılmış olsa da strese cevaptaki rolleri oldukça az çalışılmıştır. EBR (24-epibrassinolide) oksidatif ve sıcaklık stresine toleransı indüklemekte, *RBOH1*, *MPK1* ve *MPK2* transkript seviyelerini arttırmakta, apoplastik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimini yükseltmekte ve *MPK1/2* aktivasyonunu genişletmektedir. *RBOH1*, *MPK1*, *MPK2* ve *MPK1/2*'nin VIGS (virüs induced gene silencing) ile susturulması stres toleransında azalma ile sonuçlanmaktadır. *RBOH1*'in susturulmasının *MPK1* ve *MPK2*'nin transkript seviyeleri üzerinde bir etki yaratmazken *MPK1/2* aktivitesini ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimini engellemektedir. *MPK1* ve *MPK2*'den birini susturmak *RBOH1* transkript miktarını, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimini ve *MPK1/2* aktivitesini geriletmektedir. Sonuçlar

genel olarak değerlendirildiğinde, MPK2'nin MPK1'e göre EBR indüklü apoplastik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminde daha kritik bir rol oynadığı belirlenmiştir (Nie ve ark. 2013).

Park ve ark. (2013) yüksek sıcaklıklarda baş oluşturma yeteneklerine göre test edilen toleranslı ve duyarlı lahana çeşitlerinde yaptıkları ifade analizleri (*Brassica* microarray) sonucunda tolerant çeşitte sıcaklık stresi koşullarında (42°C'de 24 saat) 500 transkriptin anlatımının arttığını veya azaldığını, normal koşullarda ise 453 transkriptin anlatımının değiştiğini belirtmiştir. Sıcaklığa duyarlı çeşitte ise 354 transkriptin anlatımının belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

Domates bitkisine kontrol (25 °C+0mm NaCl), tuz (25 °C+120 mm NaCl), sıcak (35 °C+0mm NaCl) ve tuz+sıcak (35 °C + 120 mm NaCl) olacak şekilde stres kombinasyonu uygulanmıştır. Her uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonra örnekleme yapılarak bu stres kombinasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Yüksek sıcaklık ve tuz stresi kombinasyonu uygulanmış domates bitkisinde beklenenin aksine bu streslerin negatif etkisi görülmemiştir. Şaşırtıcı biçimde bu kombinasyon domates bitkisine tuz stresine karşı belirgin seviyede koruma sağlamıştır. Bu stres kombinasyonuna karşı bitkilerin glisin betain ve trehalozunda birikiminin olduğu belirgin bir cevap verdiği gözlenmiştir. Yalnız tuzluluğa kıyasla, stres koşulları altında bu bileşenlerin birikimi yüksek K<sup>+</sup> konsantrasyonunun korunup böylece daha düşük Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> oranı sağlanarak fotosentez ve hücre suyu durumunun daha iyi performans göstermesine bağlı olduğu bildirilmiştir (Rivero ve ark. 2014).

Pek çok sıcaklık stresi transkripsiyon faktörü (Hsfs) ve ısı şoku proteinlerinin (Hsps) sıcaklık stresine karşı bitkileri korudukları bilinmektedir. Ancak sıcaklık stresine cevap yollarını düzenleyen anahtar faktörler hala bilinmemektedir. Bu soruna cevap aranan çalışmada *Arabidopsis* model bitki olarak kullanılmıştır. Mikroarray analizleri sonucunda (Heat-Induced Tas1 Target1) *HTT1* ve *HTT2* genlerinin yüksek sıcaklık sırasında oldukça yüksek miktarda ifade edildiği ve bunu yüksek sıcaklık sırasında *HsfA1*'in doğrudan *HTT1* ve *HTT2*'nin promotörlerine bağlanarak yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca, *HTT1*'in *Hsp70-14* ve *40*, Nükleer faktör Y ve Subunit C2 ile etkileştiği tespit edilmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde *HTT1*'in *TAS1a*'yı hedef alması nedeniyle

ısıltolerans yolağını düzenlediği, aslında *HsfA1* tarafından aktive edildiği ve *Hsp70-14* kompleksinin kofaktörü olarak davrandığı gösterilmiştir (Li ve ark. 2014).

Johnson ve ark. (2014)'nin *Sorghum bicolor*'da sıcaklık ve kuraklık stresinin birlikte uyguladıkları çalışmalarında transkriptom analizleri sonucu 25,585 proba sahip mikroarrayin ~%4'ünde kuraklık ve %18'inde sıcaklık stresi ile ilgili genlerin ifadelerinde değişiklik belirlenmiştir. Sadece iki stresin bileşiminde cevapta ise problemlerin %7'sinin ifadesinin değiştiği ve bu durum için "eşsiz" oldukları görülmüştür. Bu eşsiz transkriptlerin ontolojik analizleri sonucunda, *MYB78* ve *ATAF1*'in özgün transkripsiyon faktörü olarak potansiyele sahip oldukları bildirilmiştir.

Hsf gen ailesinin Çin lahanasındaki rolünün araştırıldığı çalışmada Arabidopsis ve çeltik ile filogenetik akrabalığına dayanarak 3 grupta toplanan 35 adet BrHsf geni tanımlanmıştır. Bunlarda 33'ünün kromozom üzerindeki yerleri belirlenmiştir ve bunlar da 3 alt genoma ve 8 atasal karyotipe ayrılmıştır. Dağılım haritası verilerine göre bu BrHsf genlerinin kromozomlar üzerinde rastlantısal olarak dağılmadığı ve Çin lahanası ile Arabidopsis'in 22 ortolog gen çiftini paylaştığı belirlenmiştir. Karşılaştırmalı analizlerde *B. rapa*, *Arabidopsis*, çeltik, *Theobroma cacao* ve *Musa acuminata*'ya ait HSFler kullanılmıştır (Song ve ark. 2014).

*TaHsfA6f*'nin *Triticum aestivum*'daki rolünün araştırıldığı çalışmada bu genin yeşil organlarda yapısal olarak ifade edildiği ve stres sırasında (36°C'de 1,5, 2 ve 5 saat) ifadesinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. *TaHsfA6f*'yi aşırı derecede ifade eden transgenik buğday bitkisinde ısıltoleransın geliştiği bildirilmiştir. Sonuç olarak *TaHsfA6f*'nin bir transkripsiyon faktörü olduğu ve *TaHSP*, *TaGAAP* ve *TaRof1* genlerinin fonksiyonlarını düzenlediği tespit edilmiştir (Xue ve ark. 2014).

NDong ve ark. (1997)'nin çilek bitkisinde (*Fragaria x ananassa*) düşük sıcaklık ile ilgili genleri araştırdığı çalışmalarında *Fcor1* geninin moleküler markır olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Son yıllarda birçok çalışma grubu çilekte olgunlaşma sırasında ifade edilen farklı genlerin tanımlanmasına odaklanmıştır (Medina-Escobar ve ark. 1997, Manning 1998, Nam ve ark. 1999, Aharoni ve O'Connell 2002).

Llop-Tous ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışmada çilek cDNA kütüphanesinden kalsiyum bağımlı protein kinaz (*FaCDPK1*) izole edilmiştir. 4°C'de 5 saat tutulan bitkilerdeki *FaCDPK1*'in mRNA seviyesinin 22°C'de tutulanlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca genç yapraklar ve olgun yapraklar arasında farklılık gözlenmemiştir. Ancak, beyaz meyvelerde tespit edilen transkriptin daha genç meyvelerde ifade edilmediği tespit edilmiştir. Bu bağlamda *FaCDPK1*'in sadece düşük sıcaklıkla değil aynı zamanda meyve gelişiminde de rol oynadığı belirlenmiştir.

Salentijn ve ark. (2003)'nin yapmış oldukları çalışmada Elsanta, Holiday ve Gorella çilek çeşitlerinde meyve sertliği açısından farklılaşan gen ifadeleri incelenmiş ve aday genler araştırılmıştır. Farklılaşan gen ifadelerinin DNA microarray analizleri ile belirlendiği araştırma sonuçlarına göre toplam 61 gende belirgin farklılık gözlenmiştir ve bu array'deki toplam cDNA'lerin %3,6'sı kadar olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak lignin metabolizmasında 2 genin (sinnamol CoA redüktaz ve sinamil alkol dehidrogenaz) en yüksek ifade farklılığına sahip olduğu belirlenmiştir. Elde ettikleri verilere göre bu iki gen meyve sertliği için yeni adaylar olarak tanımlanmıştır.

Takeda ve ark. (2003)'nin kültüre alınmış çilek hücrelerinde hidrodinamik strese karşı farklı ifade olan genleri belirlemek amacıyla RT-PCR kullanarak yaptıkları çalışmada stres ile birlikte kalsiyum bağımlı protein kinaz (*CDPK*) gen ifadesinde artış olduğu ve kalsiyum kanalı engelleyici verapamilinin de *tuf* geninin ifadesini baskıladığı ancak bunun *CDPK*'nin ifadesini etkilemediği belirlenmiştir.

Elsanta çilek çeşidinde olgunlukla birlikte farklı ifade edilen genlerin belirlenmesinde olgun meyvelerden oluşturulan cDNA kütüphanesinden EST'ler kullanılmıştır. Elde edilen dizilerin %40'ı için veri tabanlarında anlamlı bir benzerlik bulunamamıştır. Anlamlı benzerlik gösterenler arasında ise bitki dünyasında bilinen diziler ile %70 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Aharoni 2004).

2006 yılında Gülgiller Genomiks İdari Komitesi (The Rosaceae Genomics Executive Committee) bu aile içinde çalışmalarını yürütmek için oluşturulan üç aşamalı platformda çileği (*Fragaria spp.*) translasyonel genomiks modeli olarak belirlemiştir (Folta ve Davis 2006, Folta ve Dhingra 2006). Bu aile içinde çileğin translasyonel genomiks çalışmaları için seçilmesinin pek çok sebebi vardır. Arabidopsis gibi çilekte doğada çokça diploid olarak bulunur. Büyük miktarlarda tohum üretir ve yaşam döngüsü sera ve laboratuvar ortamında oldukça hızlıdır. Diğer bir avantajı ise çileğin yabani formlarının küçük diploid bir genoma sahip olması (Folta ve Davis 2006), aktarılabirliği ve büyüyen bağlantı haritasıdır (Sargent ve ark. 2004, 2006). Bu diploid yapı ileri ve geri genetiğe oldukça uyumludur ve ailedeki translasyonel çalışmalar için mükemmel bir sistem sunmaktadır. Arabidopsis'in aksine, diploid çilek tohumla olduğu gibi vejetatif olarak kolaylıkla çoğaltılabilir (Folta ve Dhingra 2006).

Husaini ve Abidin (2008) tarafından çilekte ilk kez tuza dayanıklı 10 adet transgenik hat geliştirilmiştir. Bu doğrultuda yaptıkları çalışmada  $T_{L3}$ ,  $T_{L5}$  ve  $T_{L9}$  hatlarında tuzluluk, su ve düşük sıcaklık stresinde sentezi tetiklenen osmotin geninin varlığı tespit edilmiştir. Yapılan biyokimyasal analizlerde prolin, toplam çözünebilir protein ve klorofil içeriği yabani tiplere göre oldukça yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak yaprak disklerinde yapılan senesens denemelerinde  $T_{L3}$ ,  $T_{L5}$  ve  $T_{L9}$  hatlarının tuzluluk stresine karşı toleranslı olduğu belirlenmiştir.

### **2.3 Yüksek sıcaklık stresinde protein metabolizması**

Sıcaklık stresi faktörü (HSF) kontrolü altında sıcaklık stresi proteinlerinin (HSP) birikimi bitkilerde ve diğer organizmalarda sıcaklık stresine cevapta ve ısı toleransın geliştirilmesinde merkezi bir rol oynamaktadır Şaperon aktivitelerinin öngörülmesi dışında *Hsp60*, *Hsp70* ve *Hsp90*'ın yüksek sıcaklık stresi sırasında yaşamsal aktiviteleri ile ilgili belirgin bir bilgi yoktur. Sıcaklık stresi sırasındaki fonksiyonu sebebiyle *Hsp100/ClpB* ve *sHSP*'ler araştırmalarda en ileri gidilmiş olanlarıdır (Kotak ve ark. 2007).

Hsp100 ailesi bitkilerde yüksek sıcaklık toleransında olmazsa olmazdır ancak normal büyüme koşulları için böyle değildir (Hong ve Vierling 2001). Hsp100/ClpB proteinleri aynı zamanda ATPazlar'ın AAA+ ailesinin bir üyesidir ve protein agregatlarının tekrar çözünebilir olmasından sorumludur (Bösl ve ark. 2006).

*sHSP*'ler 90 amino asitlik korunmuş bir karboksil terminal alanı olan ve  $\alpha$ -kristalin alanı olarak bilinen bir şaperon süper ailesine aittir ve bitkilerde bilinen gelmiş geçmiş en karmaşık gruptur. Çekirdek-sitoplazma kısımlarını, kloroplastları, mitokondriyi endoplazmik retikulum ve peroksizomları hedef alan ve hemen hemen tüm hücrel bölümleri koruyan üyelere sahiptir (Nakamoto ve Vigh 2007).

Proteinlerin organa özgü ifadesi bitki büyüme ve gelişimi için olmazsa olmazdır. Bu nedenle organa özgü proteomiks analizleri bize bitkilerin abiyotik strese cevaplarını anlamada daha iyi bir bakış açısı sağlamaktadır. Abiyotik stres ilk olarak bitkide toprak altı veya toprak üstü kısmı etkilemektedir. Bu durum kökler veya yapraklar tarafından hissedilip hücrel sinyal değişimini etkileyerek moleküler ve metabolik değişiklikleri başlatmaktadır. Bundan dolayı bitkilerin abiyotik strese karşı nasıl cevap verdiğini anlayabilmek için yaprak veya kök sistemine odaklanmak önemlidir. Organa özgü protein miktarının analizi bitkilerin abiyotik streslere verdiği cevaplar hakkında geniş bilgi sağlamaktadır. Ancak yapraklardan toplam protein izolasyonu düşük miktarda bulunan proteinlerin toplam proteinler içinde kendi fiziksel veya kimyasal yapıları nedeniyle maskelenmeleri sonucu oldukça zor hale gelmektedir (Komatsu ve Hossain 2013).

Lee ve ark. (1995) *Arabidopsis*'te yaptıkları çalışmada genetik olarak modifiye edilmiş sıcaklık şoku faktörünün derepresyonu HSP'lerin yapısal sentezini arttırmasına neden olarak sonucunda transgenik *Arabidopsis* bitkisinde ısıtoleransın artmasına neden olduğu belirlenmiştir.

Havuç (*Daucus carota* L. cv. Danvers Half-Long) bitkisinde yüksek sıcaklıkların etkilerinin araştırıldığı çalışmada havuç bitkisine ait hücre kültürleri kullanılmıştır. 37°C'de 2 saat ve ardından geri kazanım için 23°C'de 1,5 saat, 48°C'de 30 dak. ve

tekrar 23°C’de 14 gün tutulan hücre kültürlerinde *Hsp 17,7*’nin ısı toleransta önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir (Malik ve ark. 1999).

14 saat 28°C gündüz ve 10 saat 24°C gece koşullarında yetiştirilen pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) ve 14 saat 25°C gün, 10 saat 21°C gece koşullarında yetiştirilen buğday (*Triticum aestivum* L.)’da kademeli ve ani sıcaklıkların bu bitkilerin yapraklarındaki etkilerinin araştırıldığı çalışmada ani olarak (1°C/dak.) sırasıyla 42,5°C ve 40°C’ye çıkarılan, kademeli olarak da bu sıcaklıklara 2,5 saatte çıkarılmıştır. Pamuk için ani sıcaklıklardaki T<sub>50</sub> değeri 41,1°C ve kademeli sıcaklıklarda 42,4°C iken bu değer buğday için sırasıyla 37,2 ve 39,2°C’dir. Her iki tür için de *RuBP* içeriği 35°C’ye kadar göreceli olarak kararlı kalırken bu sıcaklıkların üzerinde belirgin bir artış göstermektedir. *RuBisCo*’nun göreceli aktivitesi açısından ise T<sub>50</sub> değeri ani sıcaklıklar için pamukta 43,3°C ve kademelide 40,8°C iken buğdayda bu sırasıyla 37,4 ve 39,0°C olmuştur. Çalışma kademeli ve ani sıcaklıklar açısından değerlendirildiğinde ise buğdayın pamuğa göre yüksek sıcaklıklara daha duyarlı bir tür olduğu belirlenmiştir (Law ve Crafts-Brandner 1999).

Domates (*Lycopersicon peruvianum* L.)’te 42°C’lik 2 ve 2,5 saatlik yüksek sıcaklık uygulamasının ardından *Pisum sativum Hsp18,1* ve *Arabidopsis thaliana Hsp17,7 class II* antikoru kullanılarak yürütülen çalışmada sitozolik *Hsp17,7 class I* ve *Hsp17,3 class II* proteinlerinin moleküler şaperon gibi davrandığı belirlenmiştir (Löw ve ark. 2000).

*Arabidopsis*’te *Hsp101*’in rolünün araştırıldığı çalışmada bitkiler çimlenme ortamında 14 gün boyunca yetiştirilmiştir. Yüksek sıcaklık stresi 45°C’lik sıcaklıkta 2 saat boyunca uygulanmıştır ve sonrasında sıcaklık tekrar 22°C’ye getirilmiştir. *Hsp101* proteininin bitkilerde sıcaklık ile birlikte tetiklendiği ve bitkilerin yüksek sıcaklık stresine karşı koymasında oldukça belirgin bir rolü olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinin evrimsel olarak korunmuş olması da proteinin hem yapısal hem de stres koşulunda etkinliğinin yüksek olmasına sebep olduğu belirtilmiştir (Queitsch ve ark. 2000).



Escobar-Galvis ve ark. (2001)'nin bezelyede (*Pisum sativum* L. cv Oregon sugarpod) yürüttükleri çalışmada ilk kez bir mitokondriyel nucleoside diphosphate kinase (*mtNDPK*) izole edilip karakterize edilmiştir. Bezelye *mtNDPK*'sının 86kDa'luk bir protein ile etkileşimde olduğu ve sıcaklık stresi karşısında 86kDa'luk proteinin düzenleyicisi olarak görev yaptığı bildirilmiştir.

Larkindale ve Knight (2002) *Arabidopsis*'te kalsiyum, absisik asit (ABA), etilen ve salisilik asit (SA)'in sıcaklık stresine karşı koruyucu özelliğini araştırmıştır. Sonuçlara göre, Etilen, SA ve ABA *Arabidopsis* tarafından sıcaklıkla tetiklenmiş oksidatif zararlanmaya karşı korunma amaçlı kullanıldığı ve kalsiyumun kalmodulin olarak bu korunma yollarının düzenlenmesinde sinyal olarak görev aldığı belirlenmiştir.

Buğdayda tane dolumu sırasındaki yüksek sıcaklıkların araştırıldığı çalışmada bitkilere 18°C/10°C ve 34°C/10°C'lik iki sıcaklık rejimi uygulanmıştır ve tane proteinleri 2-D protein elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Toplam buğday tane proteinleri arasından 37 tanesinin yüksek sıcaklık ile belirgin biçimde değiştiği belirlenmiştir. Bunlardan 25 tanesinin yüksek sıcaklık ile tetiklendiği ve 1 tanesinin de yüksek sıcaklık ile azaldığı belirlenmiştir (Majoul ve ark. 2003).

*Arabidopsis*'te yapılan biyokimyasal ve genetik analizler sonucunda *AtNDPK2*'nin indirgenme-yükseltgenme olaylarına ortaklık ettiği ve yapısal olarak aşırı ifade edilmesi ile ROS temelli çoklu çevresel streslere karşı tolerans geliştirilebildiği sonucuna varılmıştır. Bu durum, *AtNDPK2*'nin bitkilerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aracılı MAPK sinyalizasyonunda karakterize edilmemiş düzenleyici bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca *AtNDPK2* fosfat grubunu kendi substrat proteini *AtMPK3*'e aktardıktan sonra tekrar fosforlanmadığı ve bunun iki sebebinin olabileceği söylenmiştir. Bunlardan birincisi, *AtNDPK2*'nin substrat proteini ile etkileşiminde böyle bir bölgeye sahip olmadığı, ikincisi ise *AtNDPK2*'nin *AtMPK3*'e bağlı kalmaya devam ettiği ve bu nedenle ATP bağlama ve fosfat aktarımı için yeni bir döngüye uygun olmadığı yönündedir. *AtNDPK2*'nin *AtMKP3*'ü nasıl düzenlediğinin ise bu iki proteinin yapısı ve fonksiyonunun çalışılması ile belirlenebileceği söylenmiştir (Moon ve ark. 2003).

Majoul ve ark. (2004), buğday tanelerinde yüksek sıcaklıkların albüminler ve globülinler özelinde suda çözünebilir kısımların analizini yapmıştır. Bu proteinler 2D protein elektroforezinde ayrıştırılmıştır ve yapılan veri analizi sonucunda değişen 43 proteinden 24'ünün anlatımı artarken 19'unun anlatımının azaldığı belirlenmiştir.

Yüksek sıcaklık (38°C'de 6 saat) ve kuraklık (%70-75 YOSK, 6-7 gün) stresinin birlikte uygulandığı *Arabidopsis*'te transkriptom analizleri yapılmıştır ve sonucunda iki multigen ailesinin kısmi olarak koruma yolağında görev yaptığı görülmüştür. 454 adet transkriptin bu stres bileşimine özel ifade edildiği belirlenmiştir. Metabolik profillemenin ardından sukrozun yanı sıra ve maltoz ve glukoz gibi diğer şekerlerin biriktiğini ve aksine kuraklık stresinde birikimi gözlenen prolinin iki stresin bileşiminde ise gözlenmediği belirlenmiştir (Rizhsky ve ark. 2004).

Domates (*Lycopersicon esculentum*) kloroplast sHSP, HSP21, yapraklarda sıcaklık stresi ile tetiklenmesinin yanı sıra normal büyüme koşulları altında da sentezlenmektedir ve oksidatif stres altındaki PSII sistemini korumaktadır (Neta-Sharir ve ark. 2005).

Ma ve ark. (2006) bitki peroksizomlarındaki düşük yoğunluklu düzenleyici proteinlerin *Arabidopsis* genomundaki olası PTS (peroxisomal targeting signal)leri kodlayan genlerin taranması ile belirlenebileceğini ve bu anlamda *Arabidopsis*'in peroksizom matriksinde sHsp içerdiği gösterilen ilk organizma olduğunu belirtmiştir. Ek olarak, daha önce tanımlanan 6 sHsp ailesine ek olarak bu çalışma ile yedinci peroksizom sınıfı sHSP eklendiği bildirilmiştir.

Moon ve ark. (2007), *Eucalyptus grandis*'nin biyotik stres etmeni olan *Puccinia psidii*'ye karşı toleranslı ve duyarlı çeşitlerinde yaptıkları çalışmada profilin içeren sadece bir transkript dizisi bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca profilinin hücreye mekanik destek verdiğini, hücre hareketliliğine olanak sağladığını, hücre şeklini belirlediğini, sitoplazmanın akışkanlığını ve enfeksiyon bölgesinde bulunduğunu bildirmiştir.

42°C'lik yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış çeltik fidelerinde 12. ve 24. saatte örnek toplanmıştır. Lipid peroksidasyonu ve iyon sızıntısındaki artış ile oksidatif stresin yüksek sıcaklık ile tetiklendiği belirlenmiştir. 2D protein elektroforezinin ardından ile belirlenen 1000 adet protein noktasından 73'ünün farklı ifade edilmiştir ve 48 tanesi MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır. Bu proteinler Hsp, enerji ve metabolizma, yükseltgenme-indirgenme dengesi ve düzenleyici proteinler olarak sınıflandırılmıştır. Bir grup sHSP'nin yüksek sıcaklıkla birlikte ilk kez sentezlendiği ve bunların arasından mitokondriyel sHSP (*MtsHSP*)'nin Western blot analizi ile tespit edildiği bildirilmiştir (Lee ve ark. 2007).

*Heterotrimerik G-proteinleri*, *GPCR* (G-protein-coupled receptors)'den gelen sinyalleri çevirerek sinyal iletiminde önemli rol oynar. G proteinlerinin tuz (300 mM NaCl; 3 ve 6 saat), sıcaklık (37 ve 42°C'de 6 saat) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 nM; 90 ve 180 dakika) stresindeki rollerinin ilk kez açıklandığı çalışmada *Pisum sativum*'dan *Gα*'nın iki (*Gα1*, 1152 bç; *Gα2*, 1152 bç), *Gβ*'dan bir (1134 bç), *Gγc*'nin iki izoformu (*Gγ1*, 345 bç; *Gγ2*, 303 bç) ve *GPCR* (1008 bç) cDNA'leri izole edilmiştir ve tüm rekombinant proteinleri (*Gα*, 44 kDa; *Gβ*, 41 kDa; *Gγ*, 14 kDa; *GPCR*, 35 kDa) saflaştırılmıştır. *Gα* ve *Gβ*'nin transkript seviyelerindeki anlatımları NaCl, sıcaklık ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamalarının ardından artmıştır. Protein-protein etkileşim çalışmalarının sonucunda *Gα*'nın alt ünitesi *Gβ*'nin alt ünitesi ile etkileşimde olduğu ve bezelye fosfolipaz C (*PLCδ*)'nin de kalsiyum bağlama bölgesinde olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular *Gα* ve *Gβ* alt ünitelerinin abiyotik stres toleransı ile ilgili yeni tanımlanmış rollerinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, 3 saat NaCl'e, 6 saat 42°C'ye ve 180 dakika H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz kalan örneklerde *PsGα1* ve *PsGβ*'nin mRNAlarında kontrole göre belirgin bir artış gözlenirken 6 saatlik NaCl uygulamasında bir indüklemeye görülmemiştir. 37°C'lik sıcaklık uygulamasında daha az indüklemeye görülürken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> söz konusu olduğunda 90 dakika uygulaması ile birlikte sadece *PSGα1* transkript seviyesinde belirgin bir tetikleme görülmüştür (Misra ve ark. 2007).

Su ve Li (2008) yüksek bitkilerde plastid stromal *HSP70*'in fonksiyonunu tanımlamak için model olarak *Arabidopsis*'i seçmiştir. Genetik çalışmalar sonucunda *cpHsc70-1*

(At4g24280) ve *cpHsc70-2* (At5g49910) Arabidopsis'te iki olası stromal *HSP70* olarak belirlenmiştir.

Weber ve ark. (2008) 41°C'lik yüksek sıcaklık stresi sırasında *SGs* (stress granules) ya da *PBs* (processing bodies)lerin rolünü araştırmıştır. Bitki hücrelerindeki *PBs* ve *SGs*'yi 5'→3' mRNA degradasyon yolağındaki ve *eIF4E*'yi markır proteinleri olarak *DCP1*, *DCP2* ve *XRN4*'nin tespit edilmesiyle, *SGs*'de bulunan *mRNPs*'nin markır proteini olarak *RBP47* ve *UBP1*'nin tespitiyle belirlenmiştir.

Sugio ve ark. (2009), CPR (cytoplasmic protein response)'nin *Arabidopsis thaliana*'da ısı şoku promotör elementi ile birlikte belirli ısı şoku faktörlerinin katılımıyla –özellikle alternatif kesimle düzenlenen *HSFA2*- ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, Arabidopsis'te *HSFA2*'nin susturulmuş ve ifadesi arttırılmış hatların CPR'de düzenleyici bileşenlerden biri olduğu belirlenmiştir.

Buğday, İtalya gibi bölgelerde ani düşük sıcaklıklara maruz kalabilmektedir. Tohum tane proteinleri albuminler, globülinler ve prolaminlerdir. Bunlar haricinde nonprolamin kısımlar denilen ve metabolik aktivite ve yapısal özellikler ile ilgili proteinleri içeren bölgeler de vardır. Nonprolamin kısımların incelenmesi için İtalyan durum buğdayı çeşidi olan Svevo'ya 37/17°C (13 saat gün/11 saat gece)'lik yüksek sıcaklık rejimi uygulandıktan sonra sıcaklık 4 saatliğine 28°C'ye indirilmiştir. Daha sonra tekrar 20/17°C (13 saat gün/11 saat gece)'lik normal sıcaklık rejimine dönmüştür. Uygulamalar sonucunda proteinler 2-D protein elektroforezi ile ayrıştırılıp tanımlanmıştır. Analizler sonucunda yüksek sıcaklık stresinin durum buğdayında proteomunu etkilediği ve değişim aralığının 1,2-2,2 kat arasında olduğu bildirilmiştir. 132 farklı ifade edilen protein noktasından 47 tanesi MALDI-TOF ve MALDI-TOF-TOF MS ile tanımlanmıştır ve HSP'ler dâhil proteinlerin glikolizis ve karbonhidrat metabolizması ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. Bu polipeptidlerden birçoğunun duyarlı bireyler için alerjen olduğu söylenmiştir (Laino ve ark. 2010).

Çeltikte antezis dönemi yüksek sıcaklıklara en duyarlı olunan dönemdir. Bu amaçla Moroberekan (anteziste yüksek sıcaklıklara çok duyarlı), indica type IR64 (orta

derecede tolerant) ve Aus type N22 (yüksek derecede tolerant) çeltik genotipleri 6 saat boyunca 38°C'lik yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak anterlerin protein ifadeleri incelenmiştir. 2-D protein elektroforezi analizi sonucunda 46 protein noktası değişmiştir ve bunlardan 13'ü MS/MALDI-TOF ile tanımlanmıştır. Soğuk ve ısı şoku proteinlerinin ifadesinin N22'de belirgin şekilde arttığı ve bu özelliğin N22 genotipine tolerans yeteneğini kazandırabileceği bildirilmiştir (Jagadish ve ark. 2010).

Kötü çevresel koşullar bitkilerde endoplazmik retikulum (ER) stresine neden olmaktadır. Arabidopsis, yüksek sıcaklık ve ER stresine cevapta stresin zararını hafifletmek için ER-ilişkili transkripsiyon faktörü ve RNA splicing faktörü olan *IRE1b*'yi aktive etmektedir. *IRE1B*, mRNA-encoding *bZIP60*'ı ekler. *bZIP60*, ER stresine karşı *BIP3* (Binding protein3)'ün anlatımının artması, *IRE1b*'de fonksiyon kaybunu mutasyonları ya da eklenme bölgelerinde nokta mutasyonları için gereklidir. Elde edilen sonuçlara göre, bitkilerde *bZIP60*'ın, RNA eklenmesi (splicing) ile aktive edilerek stres cevabında bitkilerin bu durumu denetleme ve dengelemesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Deng ve ark. 2011).

Merewitz ve ark. (2011) sitokininlerin kuraklık stresine adaptasyonunda düzenleyici rol oynayabileceği fikrinden hareketle içsel sitokinin miktarının artmasını sağlayan *SAG12* (senescence-activated promoter) ve *ipt* (isopentyl transferase) içeren *Agrostis stolonifera* transgenik hatlarında yaprak ve köklerdeki proteomik değişiklikleri incelemiştir. Eşit su eksikliğinde (%47 oransal su kapsamı), *SAG12-ipt* bitkileri kontrol bitkilerine göre *RuBisCo*, *GADPH*, amino asit sentezi (metiyonin, glutamin), *EF-Tu* (chloroplastic elongation factor), *PDI* (protein disulphide isomerases) ve antioksidatif savunma sistemini içeren (katalaz ve peroksidaz) yüksek miktardaki proteinleri içerdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre içsel sitokininlerdeki artışın doğrudan ya da dolaylı olarak protein miktarını düzenleyebileceği belirlenmiştir.

*Arabidopsis thaliana* hit1-1 sığağa toleranslı bir mutanttır ve *HIT1* geni maya Vps53p'te homologu bulunan bir proteini kodlamaktadır. hit1-1 mutant hatlarının stresin sürekliliğine (37 °C'de 3 gün) duyarlı ancak yoğunluğuna (44°C'de 30 dakika) duyarlı

olmadığı bildirilmiştir. Sonuçlar, HIT1'in bitkilerde plazma zarı trafiğinde uzun dönemli sıcaklık stresine adaptasyonda rol oynadığı belirlenmiştir (Wang ve ark. 2011).

*Rosaceae* ailesinde, pathogenesis-related protein (PR-10, birch allergen Bet v1 homologous protein), thaumatin-like protein (TLP, PR-5 protein), non-specific lipid transfer protein (nsLTP, PR-14 protein) ve profilin olmak üzere 4 ana allerjen ailesi tanımlanmıştır (Hyun ve Kim 2011).

*ALDH* (aldehyde dehydrogenases) her ne kadar *Arabidopsis* ve çeltik gibi bitkilerde çalışılmış olsa da üzüm *ALDH* genlerinin diğer *ALDH*ler ile olan evrimsel yakınlıkları henüz araştırılmamıştır. Mikroarray analizi sonuçlarına göre, osmotik stres altında en az 13 üzüm *ALDH* geninin farklı ifade edildiği bildirilmiştir. Soğuk koşullarda (5°C) iki *ALDH* geninin ifadesinin arttığı ancak sıcaklık stresi sırasında *ALDH* genlerinin ifadesinde değişim görülmediği bildirilmiştir. Üzüm ve *Arabidopsis* arasındaki synteny analizinin sonuçlarına göre birçok üzüm *ALDH* homologunun *Arabidopsis* synteny bloklarının sorumluluğunda bulunduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2012).

Chauhan ve ark. (2012)'nin çeltik ve *Arabidopsis*'te yaptıkları araştırmada, GUS röportör sistemi ile kloroplastik *sHSP26*'nın tohum olgunlaşması ve çimlenmesinin yanı sıra sıcaklık stresinde de rolü olduğunu belirlemiştir.

Bitki kök sistemi bitkinin tümünün sıcaklık stresine adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır ancak en az çalışılan konulardandır. Bu amaçla, sıcaklığa toleran C3 türü *Agrostis scabra* ve duyarlı *Agrostis stolonifera* türünde yüksek sıcaklıklara farklı kök cevaplarının karşılaştırmalı analizi yapılmıştır. *Agrostis stolonifera*'da 37°C'de yeni sentezlenen proteinlerin ve toplam protein miktarının azaldığı buna karşılık *Agrostis scabra*'da azalışın bu kadar fazla olmadığı bildirilmiştir. *HSP16*, *HSP60* ve *HSP70* Western blot analizleri sonucunda *HSP16*'nın sıcaklık ile indüklendiği ancak yapısal olarak bulunan *HSP60* ve *HSP70*'in 40°C'de bozunduğu tespit edilmiştir. Proteomik analizler sonucunda köklerin ısı toleransının proteinlerin istikrarı ve daha az bozunması ile ilişkili olduğu ve buna ek olarak ısı toleransı olan köklerin stres sırasında büyüme

ve çeşitli aktiviteleri stres koruma proteinleri (HSP, süperoksit dismutaz, peroksidaz ve glutatyon S-transferaz) ile düzenleyebildiği belirtilmiştir (Huang ve ark. 2012).

Turp serin iklim sebzesidir ve yüksek sıcaklıklara duyarlıdır. Bu bitkinin sıcaklık stresine cevabını araştırmak için 30 günlük turp fidelerine 40°C'lik yüksek sıcaklık uygulanmıştır ve 0., 12. ve 24. saatte örnekleme yapılmıştır. Proteinler 2-D protein elektroforezinde ayrıştırılmıştır ve MS ile tanımlanmıştır. Toplamda 11 protein noktası tanımlanmıştır. Bunlardan dördünün HSP, dördünün enerji ve metabolizma, 2 tanesinin indirgenme-yükseltgenme dengesi ve 1 tanesinin de sinyal iletimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Zhang ve ark. 2013).

Sun ve ark. (2013)'nın bildirdiğine göre profilin hem sinyal iletiminde hem de plazma zarı ve aktin iskeleti arasında bağlantı kurmakta görev almaktadır.

Candat ve ark. (2014), *LEA* (Late embryogenesis abundant) gen ailesi proteinlerinin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması için her proteinin hücrealtı lokasyonunu belirlemiştir. Böylece, 36 *LEA* proteininin hücre sitozolünde, 3 proteinin sadece plastid ya da mitokondride, diğer ikisinin ise plastid ve mitokondrinin her ikisini de hedef aldığı bulunmuştur. *LEA* protein ailesinin eşsiz bir hücrealtı lokalizasyonu varken *LEA\_4* ailesi geniş bir alanda (sitozol, mitokondri, plastid, ER ve peksozofagom) dağılım gösterdiği ancak A $\alpha$ -heliks motifini paylaştıkları tespit edilmiştir. Bu nedenle stres koşulları altında birçok hücre zarı etkileşimleri kurabilecekleri beklenmektedir.

Medina-Escobar ve ark. (1998), çilek bitkisinden elde ettikleri cDNA'yı (klon *njjs4*) karakterize ettiklerinde bu cDNA'nın pek çok yüksek bitki *class-I low-molecular-weight (LMW) heat shock protein geni* ile benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir. 468 bç'lik bu genin 17,4 kDa ve 6,57 pI'a sahip bir proteini kodlaması beklenmiştir. Ancak southern analizleri sonucunda gözlenen birçok yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA bantları bu genin tek bir kopya halinde bulunmadığını belirtmektedir. Ayrıca araştırmacılar bu geni kök, yaprak, çiçek veya stolonlarda değil meyve akenlerinde ve çiçek tablasında tespit etmiştir. Yüksek miktardaki mRNA ifadesinin özellikle metabolik aktivitelerin yoğun olduğu meyve olgunlaşması sürecinde gözlemlendiği

belirtilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre çilek *njjs4* geninin tohum ve meyve olgunlaşması ile ilgili olduğu ve bazı *class-I LMW heat shock* genlerinin de bitki gelişiminde meyve olgunlaşması gibi sıcaklık stresinden bağımsız süreçlerde de rol oynadığı belirlenmiştir.

Çilekte (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) uzun süreli yüksek sıcaklıkların etkisinin araştırıldığı çalışmada, fidelere 48 saat boyunca 30, 35, 40 ve 45°C'lik kademeli ve şok yüksek sıcaklık stresi uygulanmıştır. Toplam protein ve DNA içeriklerinin sıcaklık stresi ile değişiklik gösterdiği görülmüştür. Kademeli yüksek sıcaklık uygulamasındaki bitkilerin şok yüksek sıcaklık uygulamasına göre sıcaklık stres toleransında artış belirlenerek bunun sebebinin kademeli sıcaklık uygulamasındaki sıcaklık stresiyle ilgili bazı proteinlerin sentezlenmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Gülen ve Eriş 2003).

Gülen ve Eriş (2004)'in 'Camarosa' çeşidinde yürüttükleri çalışmada bitkilere 30, 35, 40 ve 45°C'lik yüksek sıcaklıklar uygulanmıştır ve sıcaklık artışına bağlı olarak PRX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Ledesma ve ark. (2004) 'Nyoho' ve 'Toyonaka' çilek çeşitlerinin yapraklarında yüksek sıcaklıkların proteinlere olan etkilerini araştırdıkları çalışmada 2D protein elektroforezinde 20°C'de proteinlerin bir çoğunun görünür olduğu belirtilmiştir. Ancak 33 ve 42°C'de protein noktalarının ya azaldığı ya da yok olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan 4 tanesinin bu sıcaklıkta hala görünür olduğu ve noktaların daha koyu olduğu görülmüştür ve bu noktaların 19-29 kDa (pI 5,5-7,0) arasında olduğu tahmin edilmiştir. Daha yüksek moleküler ağırlıktaki proteinlerin (30-94 kDa) birçoğunun yüksek sıcaklık stresi ile birlikte yok olduğu ve yüksek sıcaklık stresi ile birlikte anlatımı tetiklenen hiçbir protein spotunun olmadığı belirlenmiştir.

Chen ve Murata (2011)'nin derlemelerinde bildirdiklerine göre glisin betain (GB) en çok çalışılan bileşiklerden biridir ve GB birikimi strese cevapta bazı genlerin indüklenmesini sağlamaktadır. *Fragaria x ananassa* Duch.'da ise stres altında olmayan



bitkilerde GB birikimi  $1,8\mu\text{mol g}^{-1}$  TA iken stres koşullarında birikimin  $3,7\mu\text{mol g}^{-1}$  TA olduğu bildirilmiştir.

Ergin (2012), kademeli olarak yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış (35, 40, 43, 46, 49, 52, 55 ve  $60^{\circ}\text{C}$ ) tolerant R. Hope ve duyarlı Festival çilek çeşitlerinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar ile protein metabolizmasını araştırmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, *HSP60* için yapılan immunoblot çalışmalarında sadece 23kDa proteininin sıcaklığa bağlı değişimi tespit edilmiştir. Bu nedenle araştırmacı 23kDa'luk HSP'nin çilek yaprak dokularının yüksek sıcaklık toleransı ile ilişkilendirmiştir.

Christou ve ark. (2014), Camarosa çilek çeşidinin köklerini  $\text{H}_2\text{S}$  vericisi olan NaHS ile önceden muamele edip ( $100\mu\text{M}$ , 48 saat) ardından  $42^{\circ}\text{C}$ 'de 8 saat şok sıcaklık uygulamıştır.  $\text{H}_2\text{S}$ 'in öncül uygulaması ile birlikte HSP70, HSP80 ve HSP90 gibi ısı şoku proteinlerinin ifade seviyelerinin arttığı belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

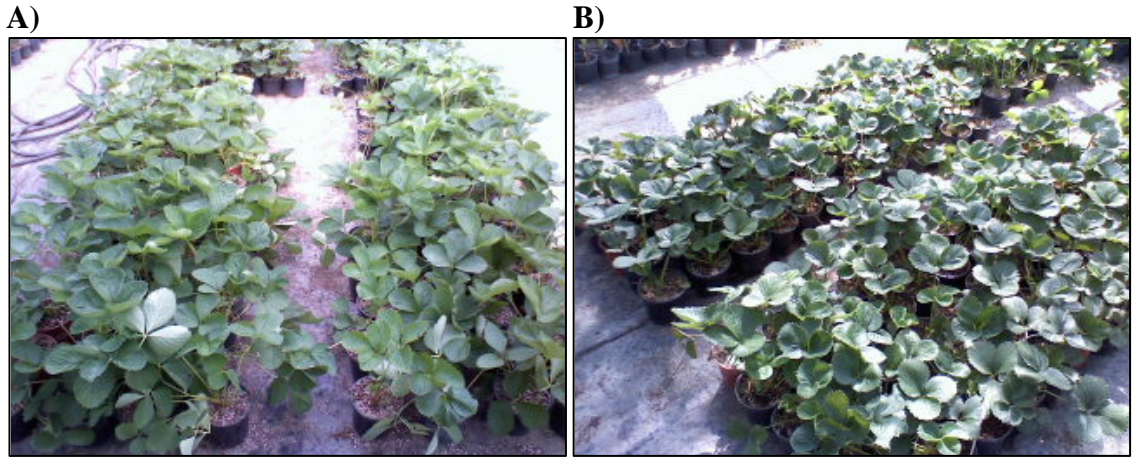
Bu araştırma 2011–2014 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarı ile Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne ait Bitki Genetiği Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

#### 3.1. Materyal

Denemede, daha önceki çalışmalarla (Kesici 2009, Kesici ve ark. 2013) yüksek sıcaklığa toleranslı ve hassas olarak belirlenen Redlands Hope (R.Hope) ve Festival çilek çeşitleri kullanılmıştır.

**R. Hope:** Kökeni Avustralya'dır. Kısa gün çeşididir ve erkencidir. Yazlık dikime uygundur. Meyveleri konik şekilli, orta parlaklıkta, kırmızı portakal renktedir meyve eti serttir (Özdemir ve ark. 2007). Yüksek sıcaklık stresine toleranslı bir çeşittir (Kesici 2009, Kesici ve ark. 2013).

**Festival:** Kökeni Florida'dır. Kısa gün çeşididir. Konik şeklinde ve orta büyüklükte ve konik meyvelere sahiptir (Okie 2004). Yüksek sıcaklık stresine hassas bir çeşittir (Kesici 2009, Kesici ve ark. 2013).

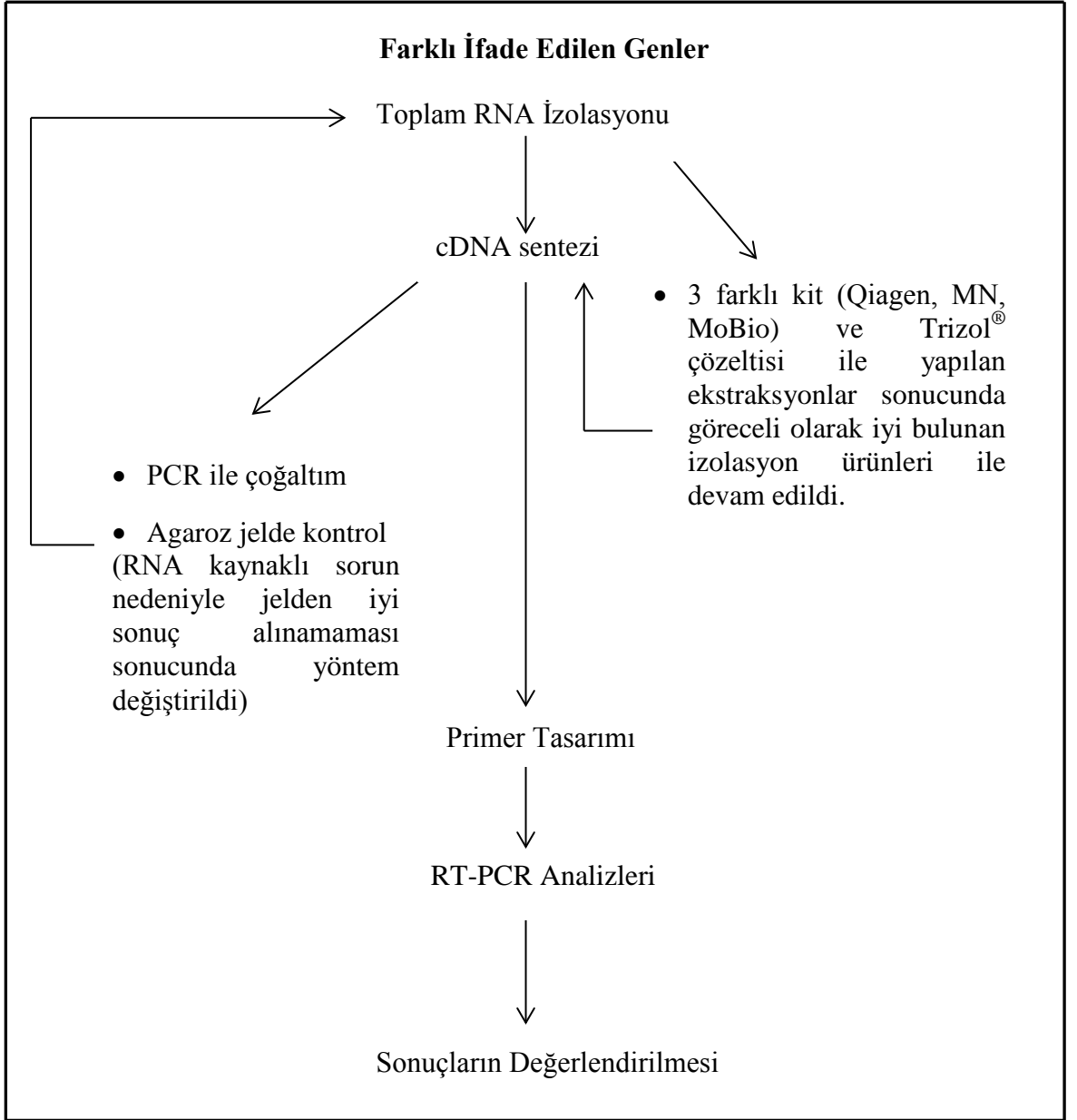


**Şekil 3.1.** R.Hope (A) ve Festival (B) çeşitlerine ait bitkilerin genel görünümü

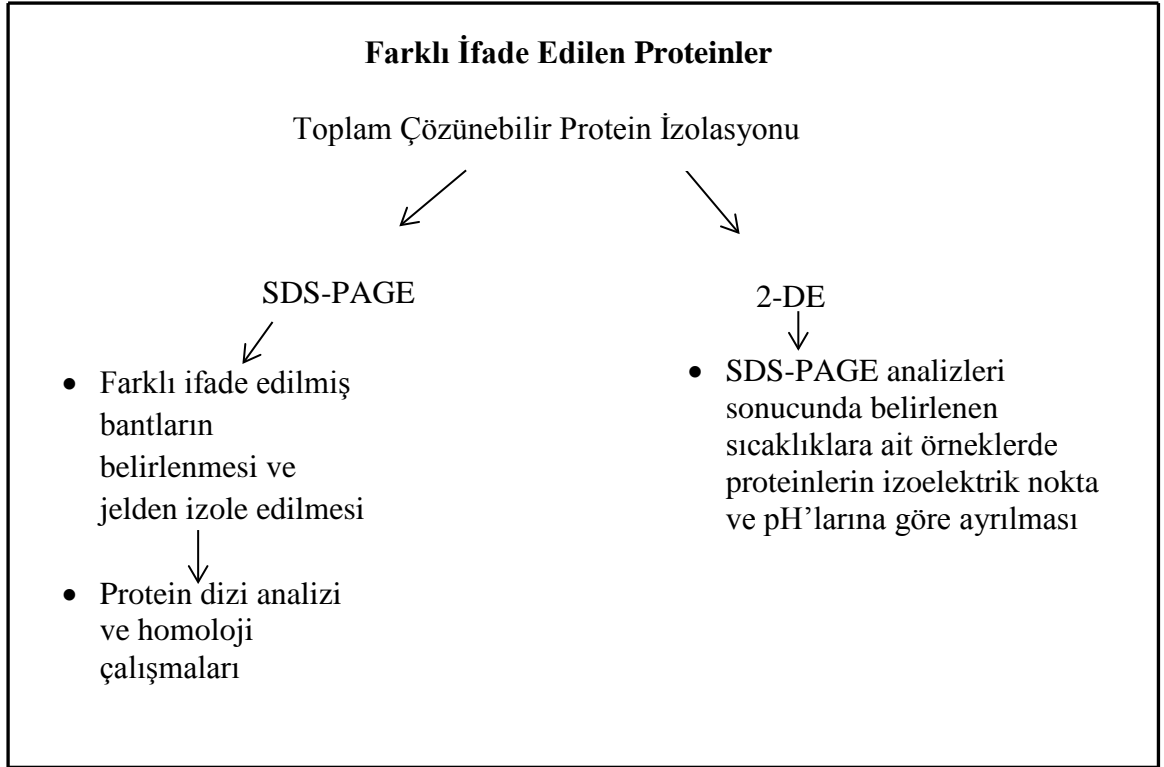
## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Yüksek sıcaklık uygulamaları

Çeşitlere ait frigo fideler serada perlit, torf ve elenmiş bahçe toprağı karışımı (1:1:1) içeren ortama 14×12 cm çapındaki saksılara dikilmiştir. Bitkilerin yetiştirildiğı ortamda gündüz/gece sıcaklığı 30/15°C, ortalama oransal nem %65 ve ortalama güneşlenme şiddeti 525 cal/cm<sup>2</sup> olarak ölçülmüştür. Bitkilerin düzenli olarak bakımları yapılmış ve haftada bir Actagro Seven (7:7:7) (Actagro LLC, Biola, CA, USA) ticari gübresi ile gübrenlenmiştir. Serada 5-6 yapraklı döneme kadar yetiştirilen saksılı çilek bitkileri kontrollü koşullarda yüksek sıcaklık uygulamaları için laboratuvardaki iklimlendirme kabinine (Sanyo Electric Co Ltd. Japan, MLR-351H) yerleştirilmiştir. %65 RH ve 5500 lux ışık şiddetinin (16 saat) uygulandığı kabinin sıcaklığı 35°C'den başlayarak her 24 saatte 5°C arttırılarak sırasıyla 40, 45 ve 50°C'ye kadar yükseltilmiştir. Her sıcaklık kademesinde bitkilerden alınan taze yaprak örneklerinden toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Kalan kısmı ise sıvı azot ile muamele edildikten sonra moleküler analizlerde kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Kontrol bitkileri ise deneme boyunca serada tutulmuştur. Tez boyunca takip edilen iş planı Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te şematize edilmiştir.



**Şekil 3.2.** Farklı ifade edilen genlerin analizi sırasında izlenen iş planı



**Şekil 3.3.** Proteinlerin analizleri sırasında izlenen iş planı

### 3.2.2. Toplam RNA izolasyonu

Toplam RNA izolasyonu, PowerPlant® RNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda, çilek bitkisi için modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Bu yöntem sırasında kullanılan basamaklar aşağıdaki gibidir:

- 50 mg yaprak örneği üretici firma tarafından tedarik edilen 1,5ml'lik içerisinde parçalayıcı bilye bulunan santrifüj tüplerine konularak her bir örnek üzerine 544,5 µl PR1 solüsyonu, 5,5 µl βME ve 50 µl PSS (fenolik ayrıştırma solüsyonu) eklenmiştir.
- Tüm örnekler, örnek parçalayıcıda 5 dakika çalkalanmıştır.
- Örnekler 16 000g, 25 °C'de 3 dak. santrifüj edilmiştir.
- Üstte kalan sıvı kısım 2 ml'lik yeni tüplere aktarılarak her bir örneğe 150 µl PR2 solüsyonu eklenmiştir ve tüm örnekler +4 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Örnekler 2 dakika 16 000 g'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

- 650 µl kadar sıvı faz 2ml'lik yeni tüplere aktarılmıştır. Üzerine 650 µl PR3 ve 650 µl PR4 solüsyonları eklenip vortekslenmiştir.
- Oluşan karışımdan 650 µl'lik kısım Spin Filter'a yüklenip 16 000g'de oda sıcaklığında 2 dakika santrifüj edilmiştir. Aynı işlem tüm karışım bitinceye kadar tekrarlanmıştır.
- 600 µl PR5 solüsyonu Spin Filter'a eklenip 16 000g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Altta kalan sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 600 µl PR4 solüsyonu eklenerek tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir.
- Altta kalan sıvı kısım tekrar uzaklaştırılır ve kalan yıkama artıklarının da temizlenmesi için 16 000g'de 2 dakika daha santrifüj edilmiştir.
- Spin Filter yeni bir 2 ml'lik tüpe yerleştirilir. Üzerine 50 µl PR6 solüsyonu eklenerek 13 000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Filtre uzaklaştırıldıktan sonra hazır hale gelen toplam RNA sonraki işleme kadar -80°C'de bekletilmiştir.

Toplam RNA izolasyonunun tamamlanmasının ardından Qubit® (RNA Broad Range, Invitrogen) ile örneklerin RNA yoğunlukları aşağıdaki gibi belirlenmiştir. 10 örnek için;

Çalışma solüsyonu	Toplam miktar (µl)
Çözelti	10 x 199µl=1990µl
Boya	10 x 1µl=10µl

Çalışma çözeltisi yukarıdaki şekilde hazırlandıktan sonra tüpler numaralandırılmıştır. Ölçümdeki hassasiyet nedeniyle 0,5ml'lik ince duvarlı, tam şeffaf mikro santrifüj tüpleri (Axygen PCR-05-C) kullanılmıştır. Her bir örnek tüpüne 198µl ve her bir standart tüpüne 190µl çalışma solüsyonu konulmuştur. Ardından toplam hacimleri 200µl olacak şekilde örnekler için toplam RNA'dan 2µl, standartlar için ise 10'ar µl eklenip kabarcık oluşumunu önleyecek biçimde kısaca karıştırılmıştır. Tüm tüpler oda sıcaklığında 2 dak. bekletilmiştir. Okumalar Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen)'da gerçekleştirilmiştir. Okumalar sonucunda toplam RNA miktarının çok düşük çıkması nedeniyle 50°C sıcaklığa maruz kalan bitkilerin yaprakları gen ifadesi çalışmalarında kullanılmamıştır.

### 3.2.3. cDNA sentezi

cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi amacıyla Qiagen® marka kit (Qiagen, QuantiTect Reverse Transcription Kit) üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kullanılmıştır. cDNA sentezi genel olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada genomik DNA'nın uzaklaştırılması amacıyla bir uygulama yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşimler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
gDNA Wipeout Tamponu, 7X	2µl
Kalıp RNA	Örnek konsantrasyonuna göre kullanıldı
RNase-free water	Örnek konsantrasyonuna göre kullanıldı
Toplam hacim	14µl

Her bir örnek için tüm bileşenler aynı tüpe konulduktan sonra 42°C'de 2 dakika inkübasyon yapılmıştır. Inkübasyon sonunda cDNA sentezi için örneklerin üzerine reaksiyon ve enzim karışımı Çizelge 3.2'de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** cDNA sentezinin son aşamasında kullanılan bileşimler ve miktarları

Bileşenler	Miktar
<b>Ters Transkriptaz Reaksiyon İçeriği</b>	
Quantiscript Ters Transkriptaz	1µl
Quantiscript RT Tamponu, 5X	4µl
RT Primer Karışımı	1µl
Kalıp RNA	*
Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu	14µl
Toplam hacim	20µl

\*Elde edilen RNA miktarına göre belirlenmiştir.

Tüm bileşenler aynı tüpte bir araya getirildikten sonra örnekler önce 42°C 30 dak. ve hemen ardından 95°C'de 3 dak. inkübe edilmiştir ve bu işlemler sonucunda tek zincirli

cDNA oluşturulmuştur. Bu aşamadan sonra farklı ifade edilen genlerin belirlenmesinde “Farklılıkların Belirlenmesi (Differential Display)” yöntemi kullanılması öngörülmüştür. Ancak yapılan denemeler sonucunda toplam RNA kalitesinin düşük olması nedeniyle bu yöntemin uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra uygun primerler tasarlanarak Gerçek Zamanlı PZR (RT-PCR) çalışmaları ile farklı ifade edilen genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. RT-PCR reaksiyonları için hazır hale getirilen cDNA’lar kullanılmaya kadar -80°C’de bekletilmiştir.

### 3.2.4. Primer tasarımı ve RT-PCR analizi

#### Primer tasarımı

Elde edilen cDNA’lerden yüksek sıcaklık stresinde ifadesi değişen genlerin belirlenmesi amacıyla gerçek zamanlı PZR reaksiyonları yapılmıştır. Bu nedenle Primer 3<sup>®</sup> ve Bio Edit<sup>®</sup> paket programları kullanılarak uygun primerler tasarlanmıştır. Hazırlanan primerler Ek-1’de listelenmiştir.

#### RT-PCR (Kantitatif PZR) analizi

R. Hope ve Festival çilek çeşitlerine ait Kontrol, 35, 40, 45 ve 50°C’lik yaprak örnekleri toplanmıştır. cDNA’lar Qiagen<sup>®</sup> marka kit (Qiagen, QuantiTect Reverse Transcription Kit) kullanılarak toplam RNA’dan sentezlenmiştir. PRZ karışımı her bir örnek için 10µl SYBR green (JumpStart Taq Ready Mix, Sigma S4438), ileri ve geri her bir primer için 0,8µl, 3,4µl H<sub>2</sub>O ve 1/20 oranında seyreltilmiş 5µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. 18S kalıbı kullanılarak sonuçların normalizasyonu sağlanmıştır. Bu düzenlemenin ardından RT-PCR aşağıdaki adımlara göre devam ettirilmiştir:

- 95°C → 2 dak
  - 95°C → 15 sn
  - 55°C → 15 sn
  - 72°C → 15 sn
- } 40 döngü



RT-PCR çalışmaları BIONEER (*Exicycler*<sup>TM</sup> 96) marka cihaz ile yürütülmüştür. Yukarıdaki protokole göre devam eden PCR döngüsü her döngü sonunda yaptığı tarama ile 40 ve 94°C arasında her 0,3 sn'de bir okuma yaparak bir erime eğrisi oluşturmaktadır. Analiz sonunda kantifikasyon sonuçları Exicycler Data Analyser ile açılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$R = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta CP \text{ hedef (kontrol-örnek)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP \text{ ref (kontrol-örnek)}}$$

R= Göreceli ifade oranı

E= Gerçek Zamanlı PZR'nin verimliliği

$\Delta CP$ = Bilinmeyen örneğin bilinen bir kontrole göre farkı

### 3.2.5. Protein analizleri

#### 3.2.5.1. Toplam çözünebilir protein analizi

##### Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu Arora ve ark. (1992, 1997)'nin yöntemi kullanılarak, Gülen ve Eriş (2003)'in çilek bitkisi için önerdiği değişiklikler doğrultusunda uygulanmıştır. Ekstraksiyon çözeltisi Çizelge 3.3'deki gibi hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.3.** Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu çözeltisinde kullanılan bileşenler ve çözelti içerisindeki miktarları

Ekstraksiyon çözeltisinin bileşenleri	Miktar
Boraks (Sodyum tetraborat)	50 mM
Askorbik asit	50 mM
PMSF (Fenilmetilsülfonil)	1 mM
$\beta$ -merkaptoetanol	% 1

Yöntem basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1 g yaprak örneği yukarıdaki bileşenlerden hazırlanan ekstraksiyon çözeltisinden 5 ml alınarak havan yardımıyla homojenize edilmiştir.
- Homojenize edilen örnekler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 26 000 g'de 4°C'de 1,5 saat santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz alınarak 0,45 ve 0,22 µm çaplı filtrelerden geçirilmiştir.
- Elde edilen süzütünün 1000 µl'si alınarak SDS-PAGE'de kullanılmak üzere TCA (trikloroasetik asit) ile çöktürülmüştür. Geri kalan süzüntü toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

### **Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi**

Toplam çözünebilir protein miktarı Arora ve Wisniewski (1994) tarafından önerildiği şekilde Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Protein ekstraksiyonundan elde edilen süzüntüdeki protein miktarı spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Ölçümler, 595 nm dalga boyunda tek kullanımlık polikarbonat küvetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve toplam çözünebilir protein miktarının hesaplanması için 0, 10, 20, 30, 40, 50 µg/µl'lik BSA (bovin serum albumin) standartları kullanılmıştır. BSA stok çözeltisi 5 mg BSA/ml ekstraksiyon çözeltisi olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.4.** Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için BSA standartlarının hazırlanması

Standartlar	Konsantrasyon (µg/µl)	BSA Stok (µl)	Ekstraksiyon çözeltisi (µl)	HCl (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Protein Boya Çözeltisi (ml)
STD 0	0	0	10	10	80	3,5
STD 10	10	2	8	10	80	3,5
STD 20	20	4	6	10	80	3,5
STD 30	30	6	4	10	80	3,5
STD 40	40	8	2	10	80	3,5
STD 50	50	10	0	10	80	3,5

**Çizelge 3.5.** Toplam çözünebilir protein miktarının belirlenmesi için örneklerin hazırlanması

Örnekler	Protein ekstraktı (µl)	HCl (µl)	dH <sub>2</sub> O (µl)	Protein Boya Çözeltisi (ml)
1.1	10	10	80	3,5
1.2	10	10	80	3,5
1.3	20	10	70	3,5
1.4	20	10	70	3,5
2.1	10	10	80	3,5
...	10	10	80	3,5

### 3.2.5.2. SDS-PAGE analizi

Sıcaklık uygulamalarının çeşitlerin protein profillerine olan etkisi SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemiyle belirlenmiştir (Lim ve ark., 1999; Gülen 2000). Bu yönteme göre:

- Ekstrakte edilen toplam protein çözeltisinden 1000 µl'si alınarak üzerine %10 TCA eklenmiştir.
- 16 000 rpm'de santrifüj edilerek proteinler çöktürülmüştür.
- Çöktürülen proteinler soğuk asetonla (-20°C) üç kez yıkanmıştır.
- Protein çökeltisinin kuruması ve asetonun buharlaşması için tüpler ağzı açık şekilde oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletilmiştir.
- Kurutulan protein örnekleri, Laemmli (1970) çözeltisi (Çizelge 3.6) yardımıyla çözündürülerek SDS-PAGE için yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Laemmli çözeltisi bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları

Çözelti bileşenleri	Miktar
Tris-HCl pH 6,8	60 mM
Gliserol	% 10
SDS	% 2

Hazırlanan çözültiden, her örnek için 100 µl alınarak üzerine % 5 β-Merkaptoetanol eklenmiştir. Karışıma renk vermesi amacıyla eser miktarda 'bromfenol mavisi' eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışımdan her bir örnek üzerine 100 µl konulmuştur. Örnekler, 5 dakika kaynar suda bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandıktan sonra vortekslenerek çözümleri sağlanmıştır. Son olarak 16 000 g'de 30 sn santrifüjden sonra örnekler yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

### **SDS-PAGE jelinin hazırlanması**

SDS-PAGE jeli hazırlanmasında Bio-Rad® Mini Protean III dikey elektroforez sistemi kullanılmıştır. SDS-PAGE jeli, %12,5'lük ayırma jeli (Çizelge 3.7) ve %4'lük yükleme jelinden (Çizelge 3.8) oluşmaktadır. Jel kalınlığının 0,75 mm olmasını sağlayan jel kasetleri kullanılmıştır.

**Çizelge 3.7.** Ayırma jeli bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları

<b>Ayırma jeli bileşenleri (% 12,5'lük)</b>	<b>Miktar</b>
Saf su	1000 µl
1 M Tris-HCl pH 8,8	2200 µl
%1 SDS	600 µl
%36 Acrylamide/Bis (29:1)	2100 µl
%3 Amonyum persülfat	100 µl
TEMED	4 µl

Yukarıda içeriği verilen karışımdan mikro pipet yardımıyla jel kaseti içerisine 3,5 ml dökülmüştür. Jelin havayla temasını kesmek için üzerine 200 µl saf su eklenerek polimerizasyonun sağlanması için 45 dakika bekletilmiştir. Polimerize olmuş ayırma jeli üzerine taraklar takılarak aşağıdaki şekilde hazırlanan örnek yükleme jeli, ayırma jeli üzerine mikro pipet yardımıyla dökülmüştür. Jelin polimerizasyonu için 45 dakika beklendikten sonra jel kasetleri elektroforez işlemi için tank içerisine yerleştirilmiştir.

**Çizelge 3.8.** Örnek yükleme jeli bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları

<b>Örnek yükleme jeli bileşenleri (% 4'lük)</b>	<b>Miktar</b>
Saf su	1662 µl
1 M Tris-HCl pH 6,8	620 µl
%36 Acrylamide/Bis (29:1)	500 µl
%3 Amonyum persülfat	25 µl
TEMED	4 µl

### **Elektroforez**

Elektroforezde yürütme tamponu olarak Tris-Glisin-SDS çözeltisi kullanılmıştır. Çizelge 3.9'da hazırlanışı verilen çözelti stok olarak tutulup kullanım sırasında 1 X'e seyreltilmiştir.

**Çizelge 3.9.** Yürütme tamponu çözeltisi bileşenleri ve çözelti içerisindeki miktarları

<b>Yürütme tamponu çözeltisi bileşenleri (1 l, 10X)</b>	<b>Miktar</b>
250 mM Tris-base	30 g
1,92 M Glycine	144 g
% 0,5 SDS	5 g

Çözelti elektroforez tankı içerisine, yerleştirilmiş jel kasetlerinin üzerini örtecek şekilde eklenmiştir. Hazırlanan örneklerden her bir kuyucuğa 30 µg protein olacak şekilde mikro pipet yardımıyla yüklenmiştir. Thermo EC® 1000-900 güç kaynağı kullanılarak jele 250 V ve 40 mA'lik elektrik akımı verilerek örneklerin jelin sonuna kadar yürümeleri sağlanmıştır. Örneklerin elektroforezi sırasında SDS-PAGE moleküler ağırlık standardı kullanılmıştır (BioRad, SDS-PAGE low molecular weight standard).

### **Jelin boyanması**

Jel üzerindeki toplam protein bantlarının görüntülenmesinde "Commasie Brilliant Blue G-250" çözeltisi kullanılmıştır. Elektroforezin ardından, kasetten çıkarılan jeller oda

sıcaklığında %12'lik TCA çözeltisi içinde 2 saat boyunca bekletilerek proteinlerin jellere sabitlenmesi sağlanmıştır. Jel, üzerindeki TCA kalıntılarının temizlenmesi için jel 3 kez saf su ile yıkandıktan sonra metanolde seyreltilmiş Commasie Brilliant Blue G-250 (Commasie Brilliant Blue G-250: metanol; 4:1) çözeltisine alınmıştır. Jeller gece boyunca çalkalayıcı üzerinde bırakılarak boyanmaları sağlanmıştır. Bu işlemin sonunda protein bantları mavi renkli olarak görünür hale gelmiştir. Jel üzerindeki fazla boyanın alınması için %25'lik metanolde çalkalayıcı üzerinde ~5 dakika bekletildikten sonra tekrar 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra protein bantları görüntüleme sisteminde incelenmiştir.

### **SDS-PAGE sonuçlarının değerlendirilmesi**

R. Hope ve Festival çilek çeşitlerine ait SDS-PAGE protein jelleri öncelikle çıplak göz ile parlak ışık kaynağı üzerinde incelenmiştir. Bant yoğunlukları ve farklılıkları dikkate alınarak görüntüleme sisteminde de fotoğraflanıp incelendikten sonra her iki çeşitte de yüksek sıcaklık stresi ile farklı sentezlendiği belirlenen bantlar tespit edilmiştir. Örneklerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE molekül ağırlık standardı kullanılmıştır (BioRad, SDS-PAGE low molecular weight standard). Böylece molekül ağırlıkları bilinen bantlar temel alınıp, örnekler için protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır. Belirlenen bantlar keskin uçlu bir bisturi yardımıyla jelden izole edilerek steril mikro santrifüj tüplerine konulmuştur. Hazırlanan örnekler BGI-Tech. (Hong Kong, China) firmasına gönderilerek örneklerde dizi analizi yapılması sağlanmıştır. Örneklerde Tripsin enzimi ile ayrıştırma yapılarak MS/MS Ion tekniği ile de bantlarda tanımlama yapılmıştır.

### **3.2.5.3. 2D-PAGE analizi**

#### **Birinci boyut: İzoelektrik odaklama**

Çeşitlere ait toplam proteinlerin ayrıştırılması 2 boyutlu jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ReadyPrep™ 2-D Starter Kit (#163-2105 BIO-RAD) kullanılmıştır. Birinci boyutta, proteinler izoelektrik noktalarına göre BioRad

PROTEAN IEF Cell ile ayrıştırılmıştır. Buna göre yöntem şu basamaklardan oluşmuştur:

- Protein örneği 125µl 2D rehidrasyon çözeltisi içerisinde karıştırılmıştır.
- Protein karışımı PROTEAN IEF odaklama tablasındaki bir kanala yüklenmiştir. Pens yardımıyla IPG şeritler karışımın üzerine jel kısım aşağıya gelecek şekilde ve kabarcık oluşmayacak şekilde yerleştirilmiştir (ReadyStrip™ IPG Strip, 3-10 non-linear (NL), 7 cm, BioRad).
- pH 3 ucu pozitif ve pH 10 ucu negatif tarafta olmasına dikkat edilerek şeritlerin kurumasını önlemek için her bir şerit üzerine 2 ml mineral yağ eklenmiştir.
- Tüm örnekler için aynı işlem tekrarlandıktan sonra odaklama tablası pasif rehidrasyon için PROTEAN IEF Cell (#165-4001)'de 20°C'de 16 sa. inkübe edilmiştir.
- Bu süre sonunda izoelektrik odaklama için şeritler temiz bir odaklama tablasına alınarak jel tarafı yukarıda kalacak şekilde yerleştirilmiştir.
- Şeritleri yüksek voltajdan korumak amacıyla elektrot ve şeritler arasına önceden ıslatılmış elektrot fitiller yerleştirilmiştir.
- Şeritlerin kurumasını önlemek amacıyla şeritlerin üzerine tekrar 2ml mineral yağ eklenmiştir.
- PROTEAN IEF Cell (#165-4001)'de odaklama basamakları Voltaj-saat (Vh) ve akımında doğrusal biçimde artması şeklinde ayarlanarak izoelektrik odaklama başlatılmıştır.
- 7cm'lik şeritler için elektrik akımı ~2 saatte 4000V'a ulaşmaktadır. Bu noktadan itibaren ~6 saat boyunca izoelektrik odaklama gerçekleşmektedir.

### **Şeritlerin dengelenmesi**

Bu aşamada yapılan dengeleme, IPG şeritlerinin SDS'ye doygunluğunu sağlayarak sülfidril gruplarını azaltır ve proteinlerin tamamen denatüre olmasını sağlar. İzoelektrik odaklama sonunda odaklama tablası cihazdan çıkarılarak şeritler temiz bir tablaya mineral yağ uzaklaştırıldıktan sonra aktarılmıştır. Dengeleme çözeltisi-1 ile şeritlerin tam anlamıyla temas etmesi amacıyla şeritler jel kısmı yukarıya bakacak şekilde tablaya

yerleştirilmiştir. Çalkalayıcıda düşük hızda 15 dak. inkübasyon yapılmıştır. Bu süre sonunda dengeleme çözeltisi-1 tabladan tamamen uzaklaştırılarak yerine dengeleme çözeltisi-2 eklenmiştir. Yine benzer şekilde çalkalayıcı üzerinde düşük hızda 15 dak. tutulmuştur.

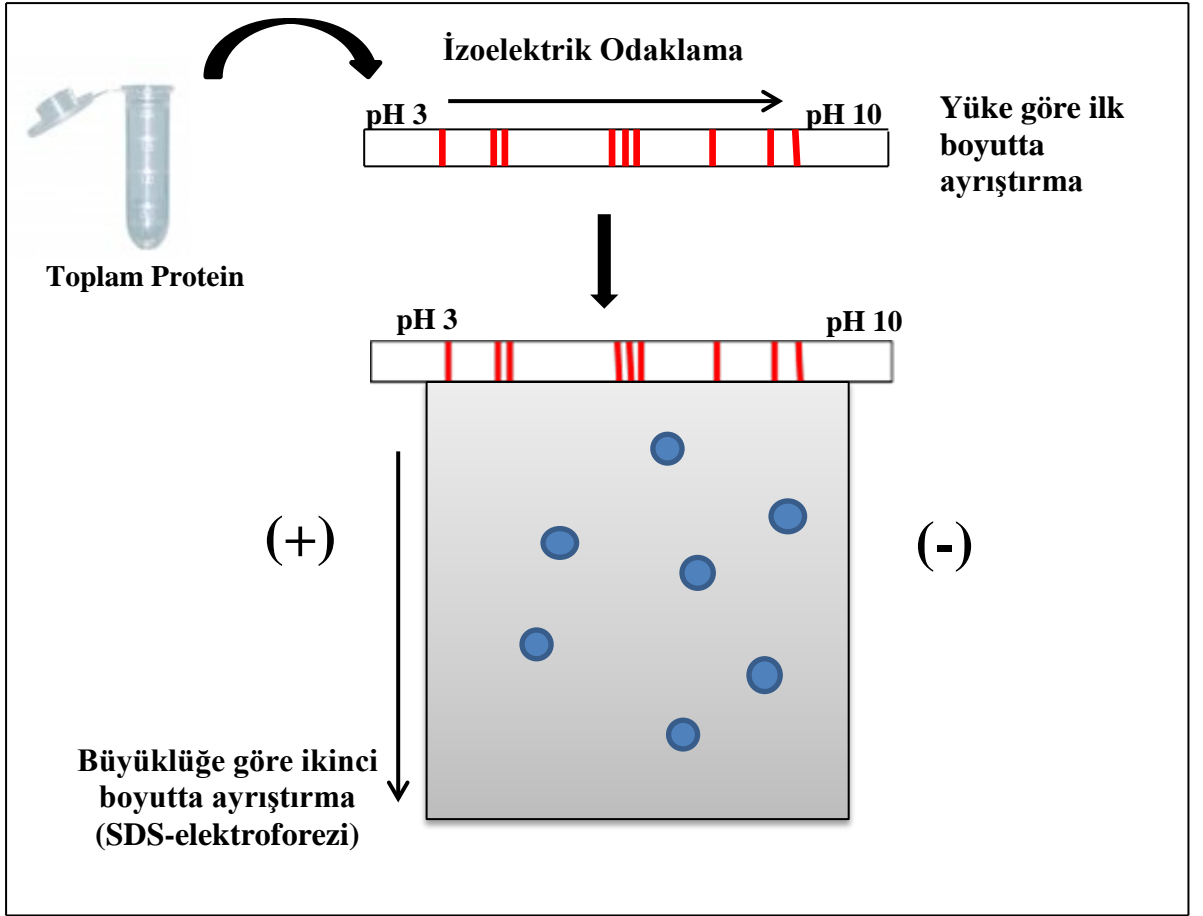
### **İkinci boyut: SDS-PAGE**

Bu aşamada, bölüm 3.2.5.2’de yer alan Çizelge 3.7’de açıklandığı gibi ayrıştırma jeli hazırlanmıştır. Ancak bu kez farklı olarak yükleme jeli hazırlanmamıştır. Denge durumuna getirilen IPG şeritler burada yükleme jeli görevi görmektedir. Bu defa yalnızca overlay agaroz (kaplama agarozu) kullanılarak şeritlerin ayrıştırma jeli ile daha iyi temas etmesi sağlanmıştır. IPG şerit ayrıştırma jeli üzerine yerleştirilmeden önce yürütme tamponu içerisinde birkaç saniye yıkanarak dengeleme çözeltilerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elektroforez aşaması ve sonrasında protein spotların görünür hale gelebilmesi için jel boyama işlemi yine SDS-PAGE jellerinde olduğu gibi tekrarlanmıştır.

### **2D-PAGE sonuçlarının değerlendirilmesi**

SDS-PAGE’de olduğu gibi 2D-PAGE jelleri de öncelikle çıplak göz ile parlak ışık kaynağı üzerinde incelenmiştir. Daha sonra Delta2D (DECODON) analiz programı ile çeşitlere ait jel görüntüleri bir araya getirilerek farklı protein noktaları belirlenmiştir. Her bir protein noktasının uygulanan yüksek sıcaklıklarla birlikte değişen ifade profilleri gibi ayrıntılı kıyaslamalar Ek-2’de, kontrol grubu proteinlere göre stres sırasında belirlenen proteinlerin durumu (serpme çizim grafiği) Şekil 4.10’da verilmiştir.





**Şekil 3.4.** 2D sisteminin şematik gösterimi

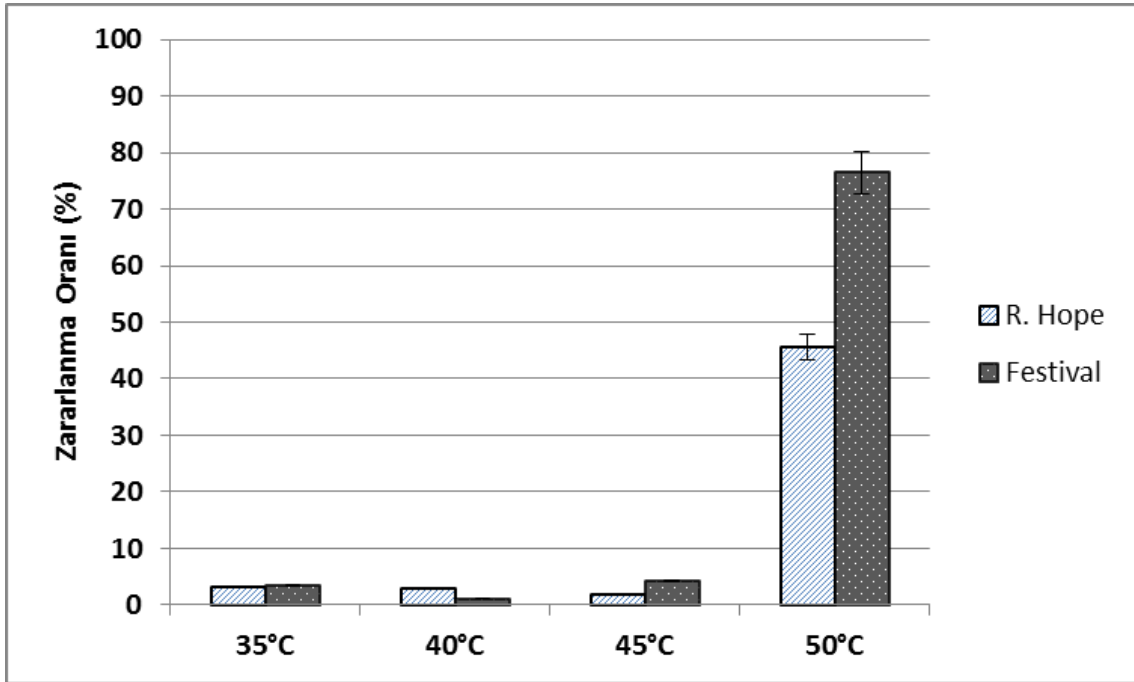
### 3.3. İstatistiksel analizler

Yüksek sıcaklık uygulamaları “Tesadüf Blokları Deneme Desenine” göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Çeşitlere ait “zaralanma oranı” ve “toplam çözünebilir protein miktarı” verileri “SPSS 13 Windows” paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulama ortalamalarının farklılıkları, “Duncan” testi ile ortaya konmuştur (Ek-3).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre zarı zararlanması

R. Hope ve Festival çeşitlerinin yüksek sıcaklık uygulamalarına karşı göstermiş oldukları zararlanma oranları önceki çalışmalarla belirlenmiştir (Kesici 2009, Kesici ve ark. 2013). Ancak bu tez çalışmasında yüksek sıcaklık uygulamalarının etkisini doğrulamak ve örneklemeden emin olmak amacıyla analiz tekrar edilerek doğrulama yapılmıştır. Buna göre; 50°C'ye kadarki sıcaklık uygulamalarında her iki çeşit için de zararlanmada belirgin bir artış gözlenmemiştir. Genel olarak çeşitlerdeki zararlanma oranları %1-4 seviyelerinde olduğu belirlenmiştir. Ancak 40°C dışındaki tüm sıcaklıklarda Festival çeşidi R. Hope'a göre oransal olarak daha fazla zararlanmıştır. Özellikle 50°C'de R. Hope çeşidinin zararlanma oranı %45,65 iken Festival çeşidinin zararlanma oranı %76,41 bulunmuştur (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin zararlanma oranları (%). Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  ss'lerini göstermektedir.

## 4.2. RT-PCR çalışmaları

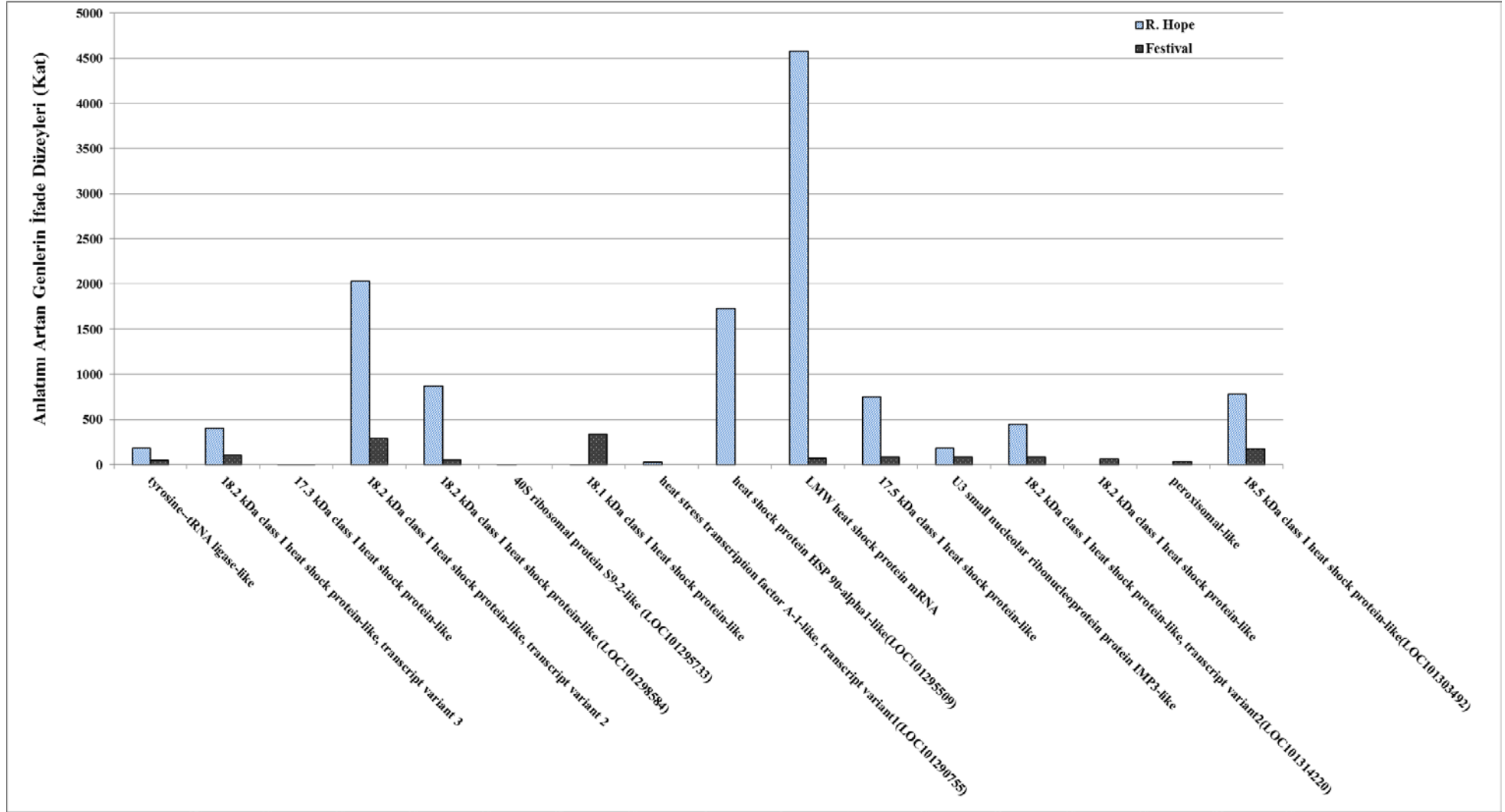
Yüksek sıcaklık stresinde farklı ifade edilen genlerin belirlenmesinde kullanılan yöntemde R. Hope ve Festival çilek çeşitlerine ait yaprak örneklerinde elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. RT-PCR analizleri “oransal kantifikasyon” yöntemine göre yürütülmüştür. Sonuçlar, 143 baz çiftine sahip 18S primeri internal kontrol olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Tasarlanan 55 primer çiftinden ancak 26 adeti RT-PCR çalışmalarında sonuç vermiştir. R. Hope çeşidinde “LMW heat shock protein mRNA” geninin 45°C'deki ifadesi 35°C'ye göre 4582,09 kat artarak en yüksek düzeyde ifade edilmiştir (Çizelge 4.1., Şekil 4.2.). Yine R. Hope çeşidinde “*Fragaria x ananassa* mRNA for TCTP protein” geninin anlatımı 35°C'de 0,40 kat iken, 45°C'de 0,02 kat ile en düşük ifade edilen gen olmuştur (Çizelge 4.1., Şekil 4.3.). Festival çeşidinde ise “18.1 kDa class I heat shock protein-like” geninin anlatımı 35°C'ye göre 45°C'de 337 kat artarak Festival çeşidi için anlatımı en yüksek gen olmuştur (Çizelge 4.2., Şekil 4.2.). Buna karşın “*Fragaria x ananassa* FRAA1B.1 gene for Major strawberry allergen Fra a 1-B, cultivar Honeoye” geninin anlatımı 35°C'de 0,42 kat iken 45°C'de 0,01 kat olmuştur (Çizelge 4.2., Şekil 4.3.). Her iki çeşitte de anlatımı artan ve azalan ortak genler olmasına karşın bu genlerin ifadesindeki artış ve azalış miktarlarının farklı olduğu da belirlenmiştir. R. Hope çeşidinde anlatımı en çok artan “LMW heat shock protein mRNA” geninin anlatımı 4582,09 kat iken bu artış Festival çeşidinde aynı gen için sadece 66,66 kat olmuştur. Ayrıca Festival çeşidinde en yüksek anlatıma sahip olan “18.1 kDa class I heat shock protein-like” geni sadece 337 kat artmıştır. Yürütülen analizlerin sonuçlarına göre R. Hope çeşidinde yüksek sıcaklık stresi sırasında anlatımı artan gen sayısı 14 iken Festival çeşidinde 13'tür. Bu genlerin 11'i her iki çeşitte de aynıdır. Festival çeşidinde anlatımı azalan 8 adet gen belirlenmişken bu sayı R. Hope çeşidinde 7'dir. Her iki çeşit için de 5 genin anlatımı ortak olarak azalmıştır (Şekil 4.4.).

**Çizelge 4.1.** R. Hope çilek çeşidinde sıcaklıklara göre anlatımı azalan ve artan genlerin değişimi

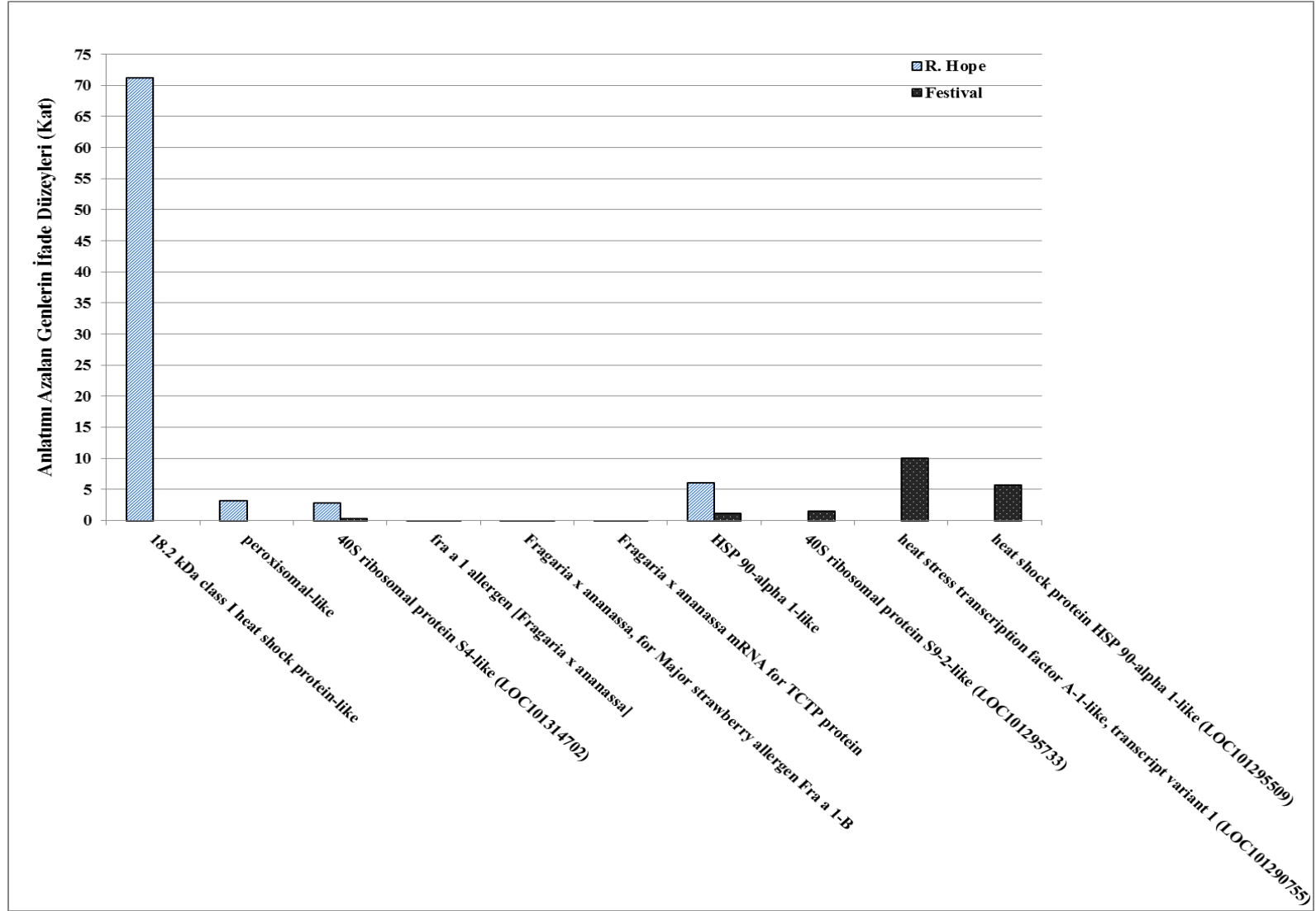
Sınıflandırma	Primer Adı	R. Hope	
		35°C	45°C
Anlatımı artan	tyrosine--tRNA ligase-like	92,36	184,65
	18.2 kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 3	79,15	401,35
	17.3 kDa class I heat shock protein-like	0,04	1,04
	18.2 kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 2	158,28	2032,32
	18.2 kDa class I heat shock protein-like (LOC101298584)	236,59	872,15
	40S ribosomal protein S9-2-like (LOC101295733)	0,27	1,47
	heat stress transcription factor A-1-like, transcript variant 1 (LOC101290755)	0,51	30,62
	18.1 kDa class I heat shock protein-like	0,18	0,30
	heat shock protein HSP 90-alpha 1-like (LOC101295509)	0,46	1735,54
	LMW heat shock protein mRNA	130,56	4582,09
	17.5 kDa class I heat shock protein-like	57,91	749,69
	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3-like	36,47	183,66
	18.2 kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 2 (LOC101314220)	57,87	446,98
	18.5 kDa class I heat shock protein-like(LOC101303492)	139,69	777,77
	Anlatımı azalan	18.2 kDa class I heat shock protein-like	94,08
peroxisomal-like		3,65	3,38
40S ribosomal protein S4-like (LOC101314702)		8,09	3,01
fra a 1 allergen [Fragaria x ananassa]		1,23	0,12
Fragaria x ananassa FRAA1B.1 gene for Major strawberry allergen Fra a 1-B, cultivar Honeoye		0,09	0,03
Fragaria x ananassa mRNA for TCTP protein		0,40	0,02
HSP 90-alpha 1-like		46,98	6,21

**Çizelge 4.2.** Festival çilek çeşidinde sıcaklıklara göre anlatımı azalan ve artan genlerin değişimi

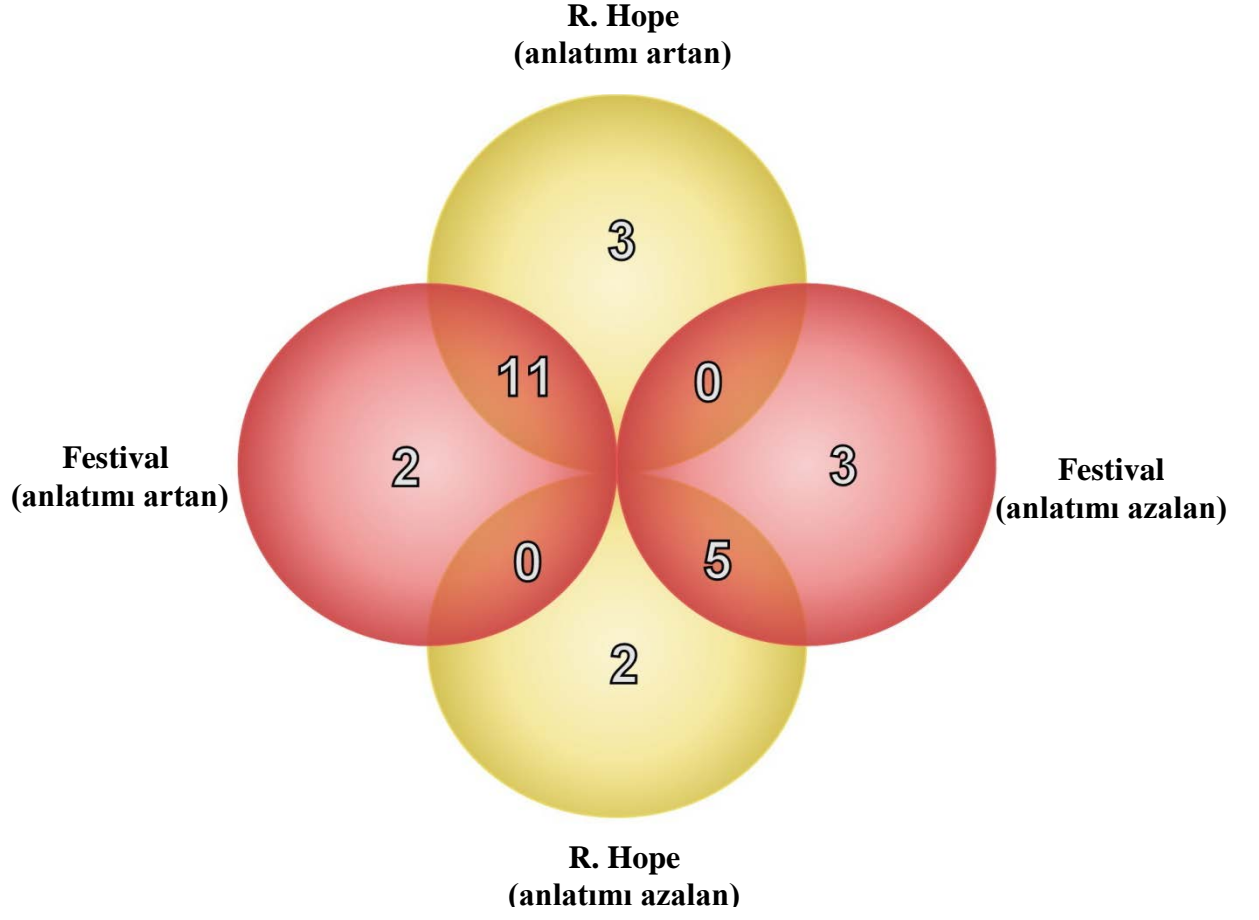
Sınıflandırma	Primer Adı	Festival	
		35°C	45°C
Anlatımı artan	18.2 kDa class I heat shock protein-like	37,28	66,18
	tyrosine--tRNA ligase-like	44,43	45,73
	17.3 kDa class I heat shock protein-like	1,46	7,94
	18.2 kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 2	16,49	289,46
	18.2 kDa class I heat shock protein-like (LOC101298584)	14,02	54,46
	peroxisomal-like	3,71	37,03
	18.1 kDa class I heat shock protein-like	0,42	337,07
	LMW heat shock protein mRNA	56,52	66,66
	17.5 kDa class I heat shock protein-like	10,57	84,17
	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3-like	7,01	83,97
	18.2 kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 2 (LOC101314220)	7,32	85,45
	18.5 kDa class I heat shock protein-like(LOC101303492)	13,21	174,37
	18.2 kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 3	9,14	108,48
	Anlatımı azalan	40S ribosomal protein S9-2-like (LOC101295733)	5,50
heat stress transcription factor A-1-like, transcript variant 1 (LOC101290755)		77,98	10,19
heat shock protein HSP 90-alpha 1-like (LOC101295509)		64,92	5,88
40S ribosomal protein S4-like (LOC101314702)		0,53	0,45
fra a 1 allergen [Fragaria x ananassa]		0,10	0,01
Fragaria x ananassa FRAA1B.1 gene for Major strawberry allergen Fra a 1-B, cultivar Honeoye		0,42	0,01
HSP 90-alpha 1-like		6,71	1,28
Fragaria x ananassa mRNA for TCTP protein		0,60	0,14



Şekil 4.2. R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresi sırasında anlatımı artan genlerin ifade düzeyleri



Şekil 4.3. R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinde yüksek sıcaklık stresi sırasında anlatımı azalan genlerin ifade düzeyleri



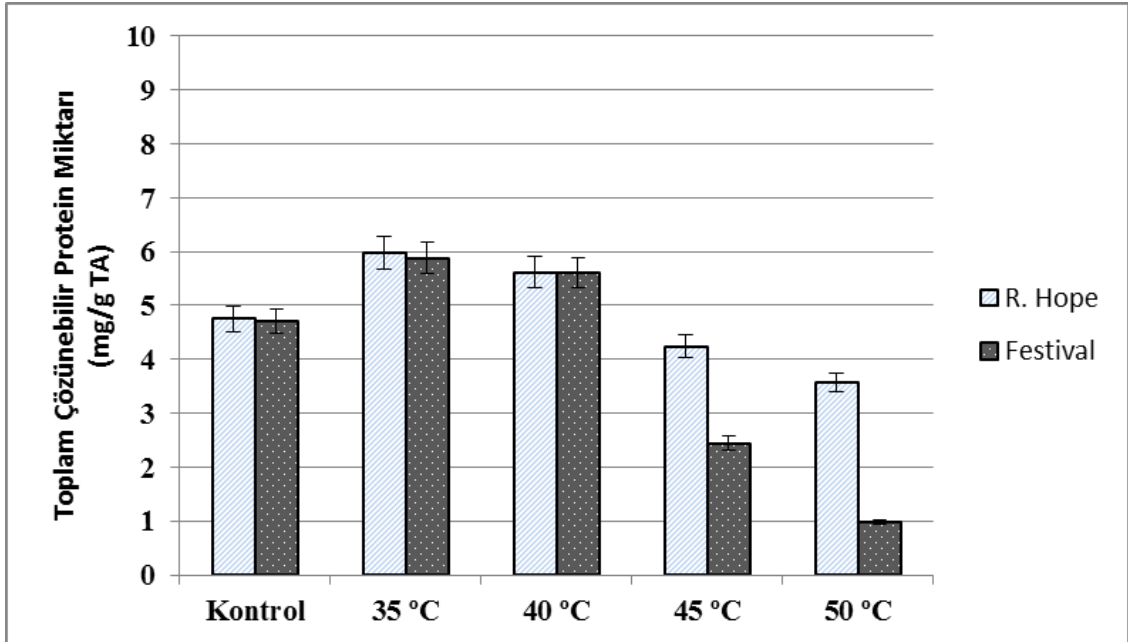
**Şekil 4.4.** Yüksek sıcaklık stresine cevapta farklı ifade edilen genlerin Venn diyagramında gösterimi. Kırmızı venn Festival, Sarı venn R. Hope çeşidi için anlatımı artan ve azalan genleri göstermektedir.



### 4.3. Proteomiks çalışmaları

#### 4.3.1. Toplam çözünebilir protein miktarı

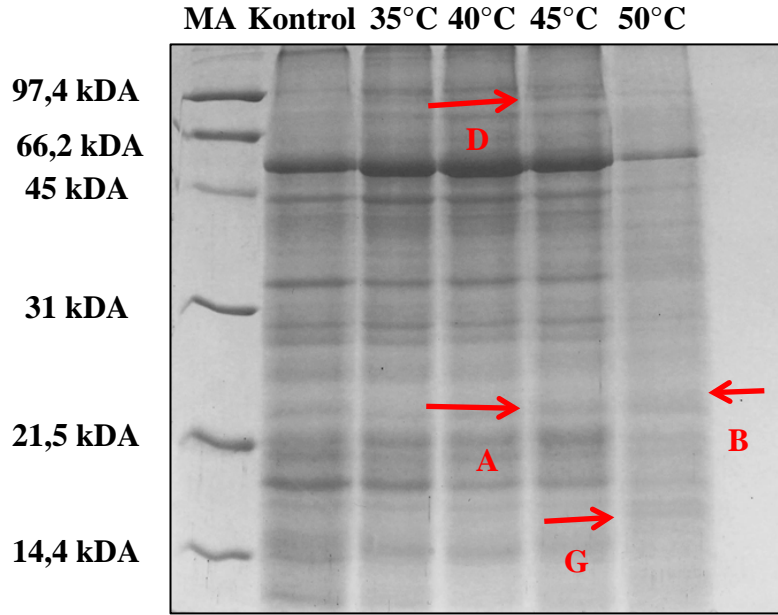
Yüksek sıcaklıkların R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin toplam çözünebilir protein miktarlarına olan etkisi Şekil 4.5’de verilmiştir. Buna göre her sıcaklık derecesinde R. Hope çeşidinin toplam çözünebilir protein miktarının Festival çeşidine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki çeşit için de protein miktarlarının en yüksek olduğu sıcaklık 35°C, en düşük olduğu sıcaklık ise 50°C’dir. 35°C’de R. Hope çeşidinin toplam çözünebilir protein miktarı 5,98 mg/g TA iken Festival çeşidinin protein miktarı 5,87 mg/g TA olmuştur. 40°C’de her iki çeşit için protein miktarı hemen hemen aynı düzeyde iken (R.Hope 5,62 mg/g TA; Festival 5,59 mg/g TA) 45°C ile birlikte R. Hope çeşidinin protein miktarı 4,24 mg/g TA’a Festival çeşidinin ise 2,45 mg/g TA’a düşmüştür. 50°C’de ise R. Hope çeşidinin toplam çözünebilir protein miktarı 3,57 mg/g TA iken Festival çeşidinin protein miktarı 0,97 mg/g TA olmuştur.



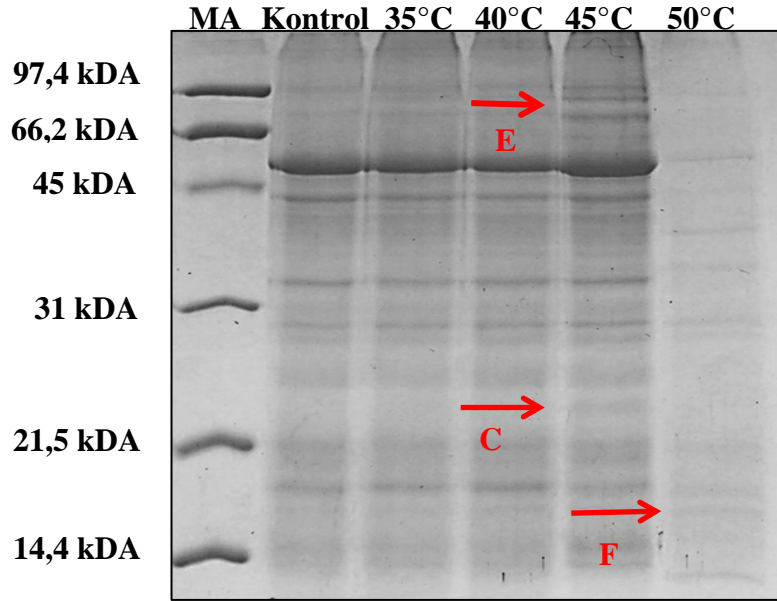
Şekil 4.5. Yüksek sıcaklık uygulamalarına bağlı olarak R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin toplam çözünebilir protein miktarları. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  ss'lerini göstermektedir.

### 4.3.2. SDS-PAGE

R. Hope ve Festival çilek çeşitlerinin yüksek sıcaklıklara bağlı olarak değişen protein profilleri Şekil 4.6 ve 4.7’de verildiği gibidir. Yüksek sıcaklık uygulamalarına göre değişen protein bantları çıplak göz ve kuvvetli ışık altında yapılan gözlemler ardından belirlenmiştir. Sıcaklıklara göre değişiklik gösteren pek çok protein bandı belirlenmesine rağmen stres ile birlikte değişen bantlara odaklanılmıştır. Buna göre her iki çeşit arasında farklı olduğu gözlenen, kontrol örneği veya daha düşük sıcaklıklarda varken daha yüksek sıcaklıklarda gözlenmeyen ya da 50°C’de görünürken daha düşük sıcaklıklarda bulunmayan bantlar sıcaklık stresi ile ilişkilendirilerek seçilmiştir. Belirlenen bantlara ait protein dizi analizleri BGI Tech (Hong Kong, China) tarafından yapılmıştır.



**Şekil 4.6.** R. Hope çilek çeşidine ait SDS-PAGE profilinde belirlenen polimorfik bantlar (MA: Moleküler ağırlık standardı (kDA)).



**Şekil 4.7.** Festival çilek çeşidine ait SDS-PAGE profilinde belirlenen polimorfik bantlar(MA: Moleküler ağırlık standardı (kDA)).

Protein dizi analizleri MS/MS Ion analizi ile gerçekleştirilmiştir ve elde edilen peptid dizileri SwissProt proteomik veritabanında araştırılarak benzer peptidler belirlenmiştir. Dizi analiz sonuçlarına göre belirlenen pek çok protein arasından SDS-PAGE sonuçları ile örtüşen aday proteinler belirlenmiştir (Çizelge 4.3, 4.4).

**Çizelge 4.3.** Dizi analiz sonuçlarına göre R. Hope çeşidine ait tanımlanan muhtemel proteinler

Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
A	Translationally-controlled tumor protein homolog OS=Frangaria ananassa	19	4,37	41
<b>1 MLVYQDLLSG DELLSDSFPY KEIQNGVLWE VDGK</b> WVVQGA VDVDIGANPS <b>51 AEGADADADE GVDDQTVKVV DIVDTRFRLQE QPPFDKKQFV TWVKRYIKLL</b> <b>101 TPKLEGEQQE TFKKNIEGAT KFLLSKLSDL QFFVGESMGD DTSLVFASYK</b> <b>151 EGATDPIFIY FAHGLKEVKC</b>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
B	Translationally-controlled tumor protein homolog OS=Frangaria ananassa	19	4,37	40
<b>1 MLVYQDLLSG DELLSDSFPY KEIQNGVLWE VDGK</b> WVVQGA VDVDIGANPS <b>51 AEGADADADE GVDDQTVKVV DIVDTRFRLQE QPPFDKKQFV TWVKRYIKLL</b> <b>101 TPKLEGEQQE TFKKNIEGAT KFLLSKLSDL QFFVGESMGD DTSLVFASYK</b> <b>151 EGATDPIFIY FAHGLKEVKC</b>				

Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDa)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
D	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=Solanum lycopersicum	71	5,08	47
<p>1 MAGK<b>GEGPAI GIDLGTTYSC VGVWQHDRVE IANDQGNRT</b> TPSYVGF TDS  51 ERLIGDAAKN <b>QVAMNPINTV FDAKRLIGRR</b> FSDASVQSDM KLWPFKVIPG  101 PGDKPMIVVN YKGEEK<b>QFSA EEISSMVLK</b> MKEIAEAFLG <b>TTVKN</b>AVVTV  151 PAYSNDSQRQ ATK<b>DAGVISG LNMRIINEP TAAAIAYGLD KK</b>ATSVGEKN  201 <b>VLIFDLGGGT FVSLLTIEE GIFEVKATAG DTHLGGEDFD</b> NRMVNHFVQE  251 <b>FKRKNK</b>KDIT GNPRALRRLR TACERAKR<b>TL SSTAQTTIEI</b> D<b>SLYEGIDFY</b>  301 STIT<b>RARFEE LNMDLFRKCM</b> EPVEKCLRDA KMDK<b>STVHDV VLVGGSTRIP</b>  351 <b>KVQQLLQDFF</b> NGKELCK<b>SIN PDEAVAYGAA VQAAILS</b>GEG NEKVQD<b>LLLL</b>  401 <b>DVTPLSLGLE TAGGVMTVLI PRNTTIPTKK</b> <b>EQVFSTYSDN QPGVLIQVYE</b>  451 <b>GERTRTRDNN LLGKFELSGI PPAPRGVPQI</b> TVCFDIDANG TLN<b>VSAEDKT</b>  501 TGQKNK<b>ITIT NDGRLSKEE IEK</b>MVQEA<b>EK YKSEDEEHKK KVEAKNALEN</b>  551 <b>YAYNMR</b>NTIK DEKIASKLSA D<b>DRTKIEDAI EQAIQWLDGN</b> QLAEAE<b>EFEF</b>  601 <b>KMKELES</b>LCN <b>PIAKMYQGA GGDMDDEGPA</b> PSGGGAGPKI <b>EEVD</b></p>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDa)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
G	Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=Solanum lycopersicum	71	5,08	60
<p>1 MAGK<b>GEGPAI GIDLGTTYSC VGVWQHDRVE IANDQGNRT</b> TPSYVGF TDS  51 ERLIGDAAKN <b>QVAMNPINTV FDAKRLIGRR</b> FSDASVQSDM KLWPFKVIPG  101 PGDKPMIVVN YKGEEK<b>QFSA EEISSMVLK</b> MKEIAEAFLG <b>TTVKN</b>AVVTV  151 PAYSNDSQRQ ATK<b>DAGVISG LNMRIINEP TAAAIAYGLD KK</b>ATSVGEKN  201 <b>VLIFDLGGGT FVSLLTIEE GIFEVKATAG DTHLGGEDFD</b> NRMVNHFVQE  251 <b>FKRKNK</b>KDIT GNPRALRRLR TACERAKR<b>TL SSTAQTTIEI</b> D<b>SLYEGIDFY</b>  301 <b>STITRARFEE LNMDLFRKCM</b> EPVEKCLRDA KMDK<b>STVHDV VLVGGSTRIP</b>  351 <b>KVQQLLQDFF</b> NGKELCK<b>SIN PDEAVAYGAA VQAAILS</b>GEG NEKVQD<b>LLLL</b>  401 <b>DVTPLSLGLE TAGGVMTVLI PRNTTIPTKK</b> <b>EQVFSTYSDN QPGVLIQVYE</b>  451 <b>GERTRTRDNN LLGKFELSGI PPAPRGVPQI</b> TVCFDIDANG TLN<b>VSAEDKT</b>  501 TGQKNK<b>ITIT NDGRLSKEE IEK</b>MVQEA<b>EK YKSEDEEHKK KVEAKNALEN</b>  551 <b>YAYNMR</b>NTIK DEKIASKLSA D<b>DRTKIEDAI EQAIQWLDGN</b> QLAEAE<b>EFEF</b>  601 <b>KMKELES</b>LCN <b>PIAKMYQGA GGDMDDEGPA</b> PSGGGAGPKI <b>EEVD</b></p>				

**Çizelge 4.4.** Dizi analiz sonuçlarına göre Festival çeşidine ait tanımlanan muhtemel proteinler

Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
C (1)	Small heat shock protein, chloroplastic, HSP22 OS=Petunia hybrida	27	8,78	23
<p>1 MACKTLTCSA SPLVSNQVVS ATSRNKNKT TTAPFVCFP YSKCSVRKPA  51 SRLVAQATGD NKDTSVDVHV SNNNQGGNNQ GSAVERRPR <b>MALDVSPFGL</b>  101 <b>LDPMSPMRTM</b> RQMMDTMDRL FEDTMTFPGS RNRGTGEIRA <b>PWDIKDDENE</b>  151 <b>IKMRFDMPGL SKEEVKVSVE DDVLVIK</b>GEH KKEESGKDDS WGRNYSSYDT  201 RLSLPDNDK DKVKAELKNG VLLISIPKTK VEKKVTDVEI K</p>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
C (2)	Translationally-controlled tumor protein homolog OS=Fragaria ananassa	19	4,37	41
<p>1 <b>MLVYQDLLSG DELLSDSFPY KEIQNGVLWE VDGK</b>WVVQGA VDVDIGANPS  51 AEGADADADE GVDDQTVK<b>VV DIVDTFRLQE QPPFDKKQFV TWVKRYIKLL</b>  101 TPK<b>LEGEQQE TFKK</b>NIEGAT KFLLSKLSDL QFFVGESMGD DTSLVFASYK  151 EGATDPIFIY FAHGLKEVKC</p>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
C (3)	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic OS=Solanum tuberosum	36	5,84	42
<p>1 MAASLQAAAT LMQPTKVGGV SARNNLQLRS SQSVSKAFGL EPSASRL<b>LSCS</b>  51 <b>LQTDLK</b>DFAQ KCTDAAKIAG FALATSALVV SGANAEGVPK <b>RLTFDEIQSK</b>  101 TYMEVK<b>GTGT ANQCPTIDGG VDSFAFKPGK</b> YNAKKFCLEP TSFTVKAEGV  151 SKNSAPDFQK TKLMTR<b>LTYT LDEIEGPFV SPDGTVKFEE KD</b>GIDYAAVT  201 <b>VQLP</b>GGERV<b>P FLFTIKQLVA SGK</b>PESF<b>SVD FLVPSYRGSS FLD</b>PKGRGGS  251 <b>TGYD</b>NA<b>VALP AGGR</b>GDEEEL QKENVKNTAS LTGKITFTVT KSNPQTGEVI  301 GVFE<b>SIQPSD TDLGAKTPKD VKIQGIWY</b>AQ LES</p>				

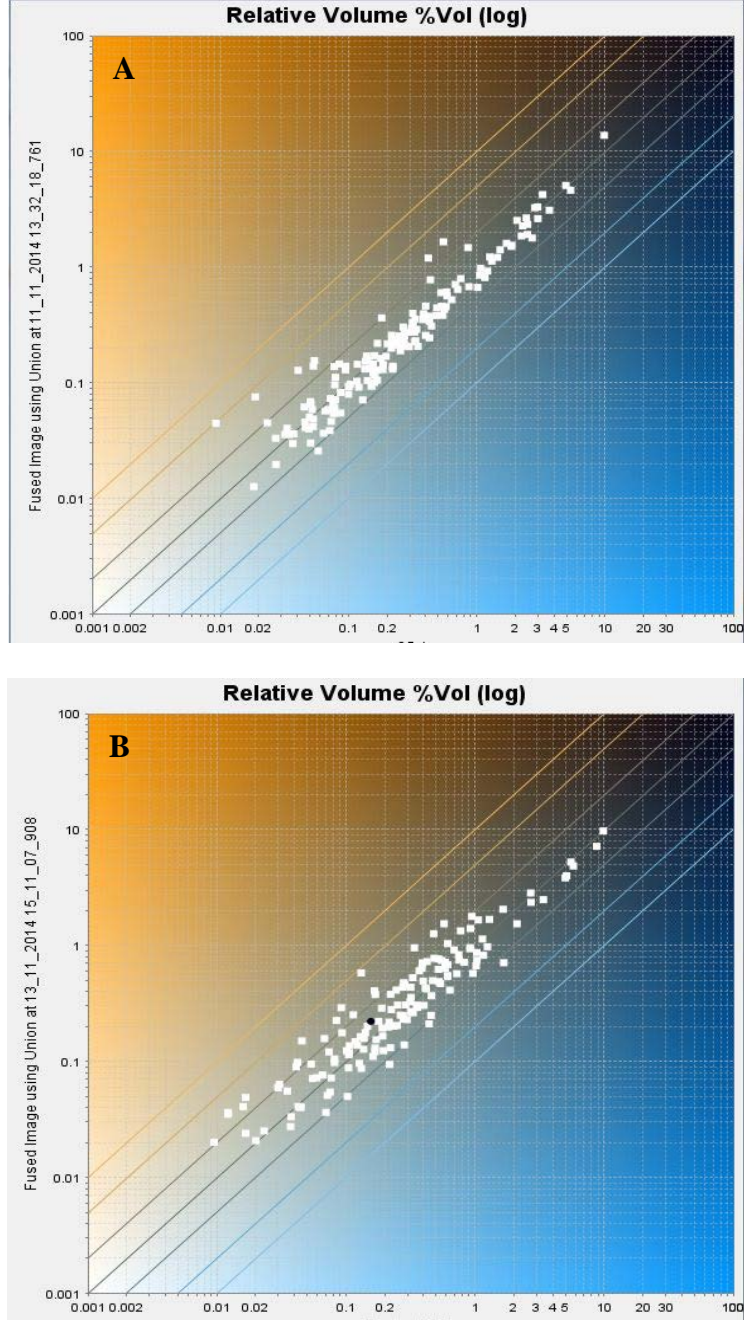
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
E (1)	Calmodulin-2 OS=Arabidopsis thaliana GN=CAM2 PE=1 SV=1	17	4,11	67
<b>1 MADQLTDDQI SEFK</b> <b>EAFSLF DKDGDGCITT</b> KELGTVMRS <b>L GQNPTAEALQ</b> <b>51 DMINEVDADG NGTIDFPEFL NLMARKMKDT DSEEELKEAF RVFDKDQNGF</b> <b>101 ISAAELRHVM</b> TNLGEKLTDE EVDEMIKEAD <b>VDGDGQINYE EFKVMMMAK</b>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
E (2)	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Frangaria ananassa	52	6,04	41
<b>1 VGFKAGVKDY KLTYYPDYE TKD</b> <b>TDILAAF RVTPQPGVPP EEAGAAVAE</b> <b>51 SSTGTWTTVW TDGLTSLDRY</b> KGRCYHIEPV PGEESQFIAY VAYPLDLFEE <b>101 GSVTNMFTSI VGNVFGFKAL RALRLEDLRI PTAYVKTFQG PPHGIQVERD</b> <b>151 KLNKYGRPLL GCTIKPKLGL SAKNYGRAVY ECLRGGLDFT KDDENVNSQP</b> <b>201 FMRWRDRFLF CAEAIYK</b> SQA ETGEIKGHYL NATAGTCEDM MKRAVFAREL <b>251 GVPIVMHDYL TGGFTANTTL AHYCRDNGLL LHIHRAMHAV</b> <b>IDRQKNHGMH</b> <b>301 FRVLAKALRM SGGDHIHAGT VVGKLEGERE ITLGFVDLLR DDFIEKDRSR</b> <b>351 GIYFTQDWVS LPGVLPVASG GIHVWHMPAL TEIFGDDSVL QFGGGTLGHP</b> <b>401 WGNAPGAVAN R</b> <b>VALEACVQA R</b> NEGRDLARE GNDIIREACK <b>WSPELAAACE</b> <b>451 VWKEIKFEFE AMDTL</b>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
F (1)	60S ribosomal protein L23 OS=Arabidopsis thaliana GN=RPL23A PE=2 SV=3	15	10,48	70
<b>1 MSKRGRGGTS GNKFR</b> <b>MSLGL PVAATVNCAD NTGAKNLYII SVKGIKGRLN</b> <b>51 RLPSACVGDM V</b> <b>MATVKKGKP DLRK</b> <b>KVLPV IVRQRKPWRR KDGVMFYFED</b> <b>101 NAGVIVNPKG</b> EMK <b>GSAITGP IGKECADLWP RIASAANAIV</b>				

Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
F (2)	Profilin OS=Fragearia ananassa	14	4,63	38
<p>1 MSWQTYVDDH LMCEIEGNHL SAAAIIGQDG SVWAQSATFP QLKPEEVTGI  51 VR<b>DFDEPGTL APTGLYLG GT KYMVIQGE PG AVIRGKKGPG GVTVK</b>KTTLA  101 LLIGIYDEPM TPGQCNMIVE <b>RLGDYLVEQG L</b></p>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
F (3)	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=Fragearia ananassa	52	6,04	33
<p>1 VGFKAGVKDY <b>KLTYYPDYE TKDTDILAAF RVTPQPGVPP EEAGAAVA AE</b>  51 <b>SSTGTWTTVW TDGLTSLDR</b>Y KGRCYHIEPV PGEESQFIAY VAYPLDLFEE  101 GSVTNMFTSI VGNVFGFKAL RALRLEDLRI <b>PTAYVKTFQG PPHGIQVERD</b>  151 KLNKYGRPLL GCTIKPKLGL SAKNYGRAVY <b>ECLRGGDLFT KDDENVNSQP</b>  201 FMRWRDR<b>FLF CAEAIYKSQA</b> ETGEIKGHYL NATAGTCEDM MKRAVFAREL  251 <b>GVPIVMHDYL TGGFTANTTL AHYCRDNGLL LHIHRAMHAV IDRQKNHGMH</b>  301 FRVLAKALRM SGGDHIHAGT VVGKLEGERE <b>ITLGFVDLLR DDFIEKDRSR</b>  351 GIYFTQDWVS LPGVLPVASG GIHVWHMPAL TEIFGDDSVL QFGGGTGLGHP  401 WGNAPGAVAN <b>RVALEACVQA RNEGRDLARE GNDIIREACK WSPELAAACE</b>  451 VWKEIK<b>FEFE AMDTL</b></p>				
Bant	Protein Adı	Nominal Kütle (kDA)	pI değeri	Protein Dizi Eşleşme Oranı (%)
F (4)	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic OS=Solanum lycopersicum	35	5,91	29
<p>1 MAASLQAAAT LMQPTKVGVR NNLQLRSAQS VSKAFGVEQG SGRLTCSLQT  51 EIKELAQKCT DAAKIAGFAL ATSALVVSGA NAEGVPK<b>RLT YDEIQSK</b>TYM  101 EVKGTGTANQ CPTIEGGVGS FAFKPGKYTA <b>KKFCLEPTSF TVKAEGVSKN</b>  151 SAPDFQKTKL MTR<b>LTYTLDE IEGPFEVSPD GTVKFEEKDG IDYAAVTVQL</b>  201 <b>PGGERVPFLF TIK</b>QLVASGK PESFSGEFLV PSYRGSSFLD <b>PKGRGGSTGY</b>  251 <b>DNAVALPAGG</b> RGDEEELQKE NVKNTASLTG KITLSVTQSK PETGEVIGVF  301 ESIQPSDSDL GAKVPKDVKI QGIWYAQLE</p>				

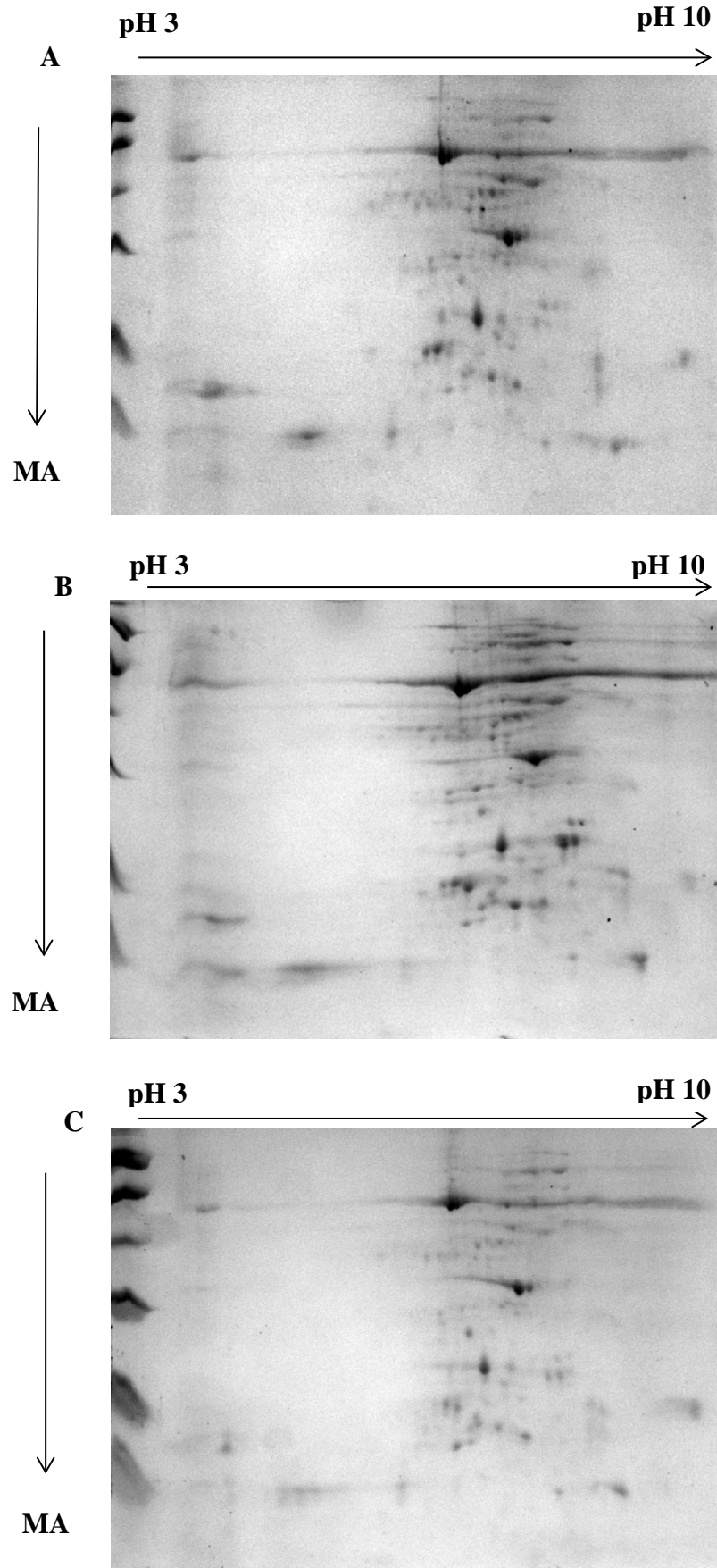
### 4.3.3. 2D-PAGE

R. Hope ve Festival ilek çeşitlerine ait yaprak örneklerinde toplam proteinler her bir sıcaklık derecesine göre SDS-PAGE profilinde belirlenmiştir. Stres proteinlerinin eksenlerdeki dağılımını gösteren R. Hope ve Festival çeşitlerine ait serpm eizim (scatter plot) grafikleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Belirlenen sıcaklık derecelerine ait bu proteinler (35, 40 ve 45°C) izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre 2D-PAGE yöntemi ile tekrar ayrıştırılmıştır (Şekil 4.9 ve 4.11). Her bir jel üzerinde protein noktalarının seçimi ve jellerin birbiri ile kıyaslanması parlak bir ışık kaynağı üzerinde çıplak göz ile yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar proteomik jel analiz programı olan Delta2D (Decodon, Germany) ile onaylanmıştır. Programa yüklenen jeller uygun olduğu Şekilde gruplandırılmıştır ve jellere ait istatistiksel analizler yine aynı program tarafından yapılmıştır. Buna göre yapılan kümelenme analizlerinde (cluster analysis) R. Hope çeşitinde toplam 174 protein noktası belirlenmiştir. Bunlardan 147’sinin anlamlı (%84), 27’sinin ise anlamsız (%16) olduğu tespit edilmiştir. Festival çeşitinde ise belirlenen 150 protein noktasından 76’sı anlamlı (%51) ve 74 tanesi anlamsız (%49) bulunmuştur. Ayrıca Şekil 4.10 ve 4.12’de farklı ifade olduğu belirlenen her bir protein noktasının ifade grafikleri Ek-2’de verilmiştir.

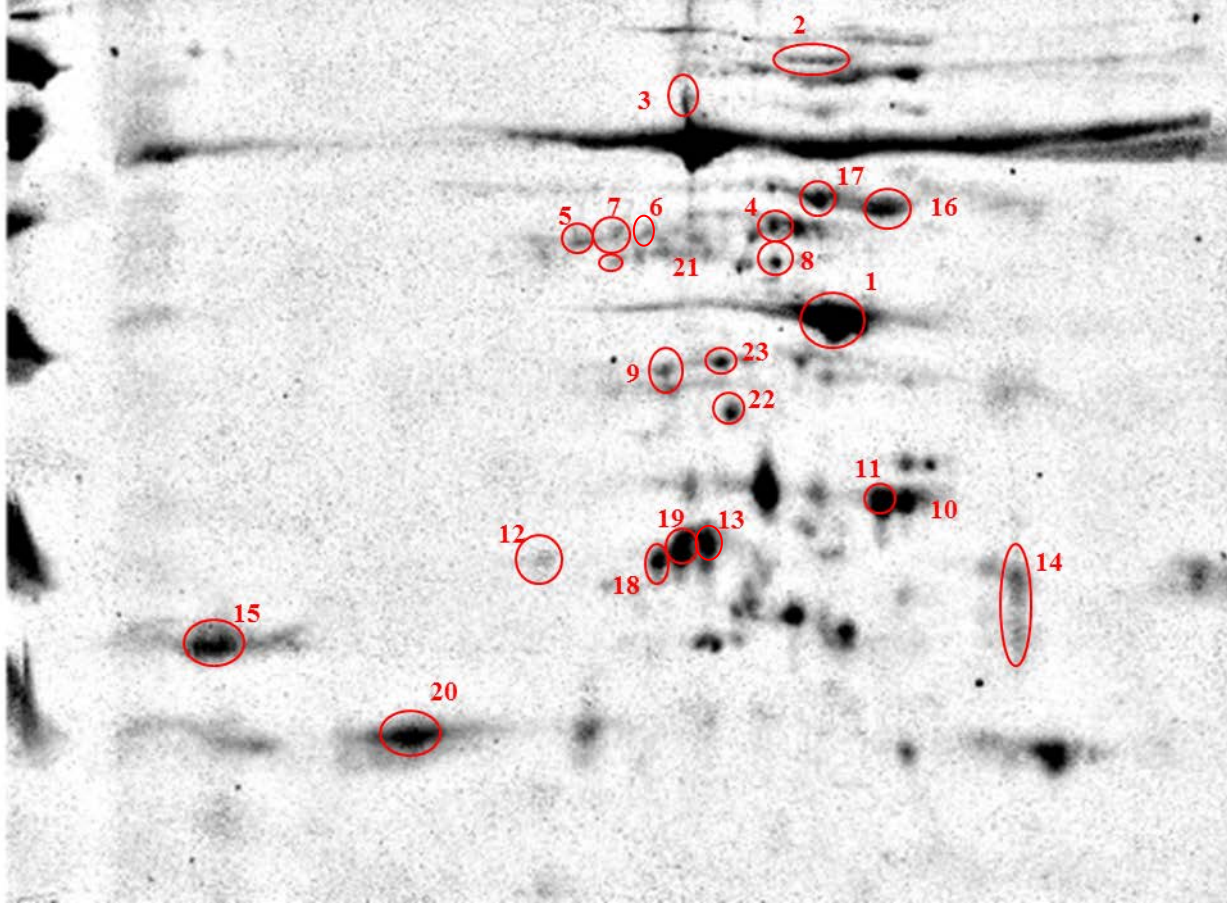




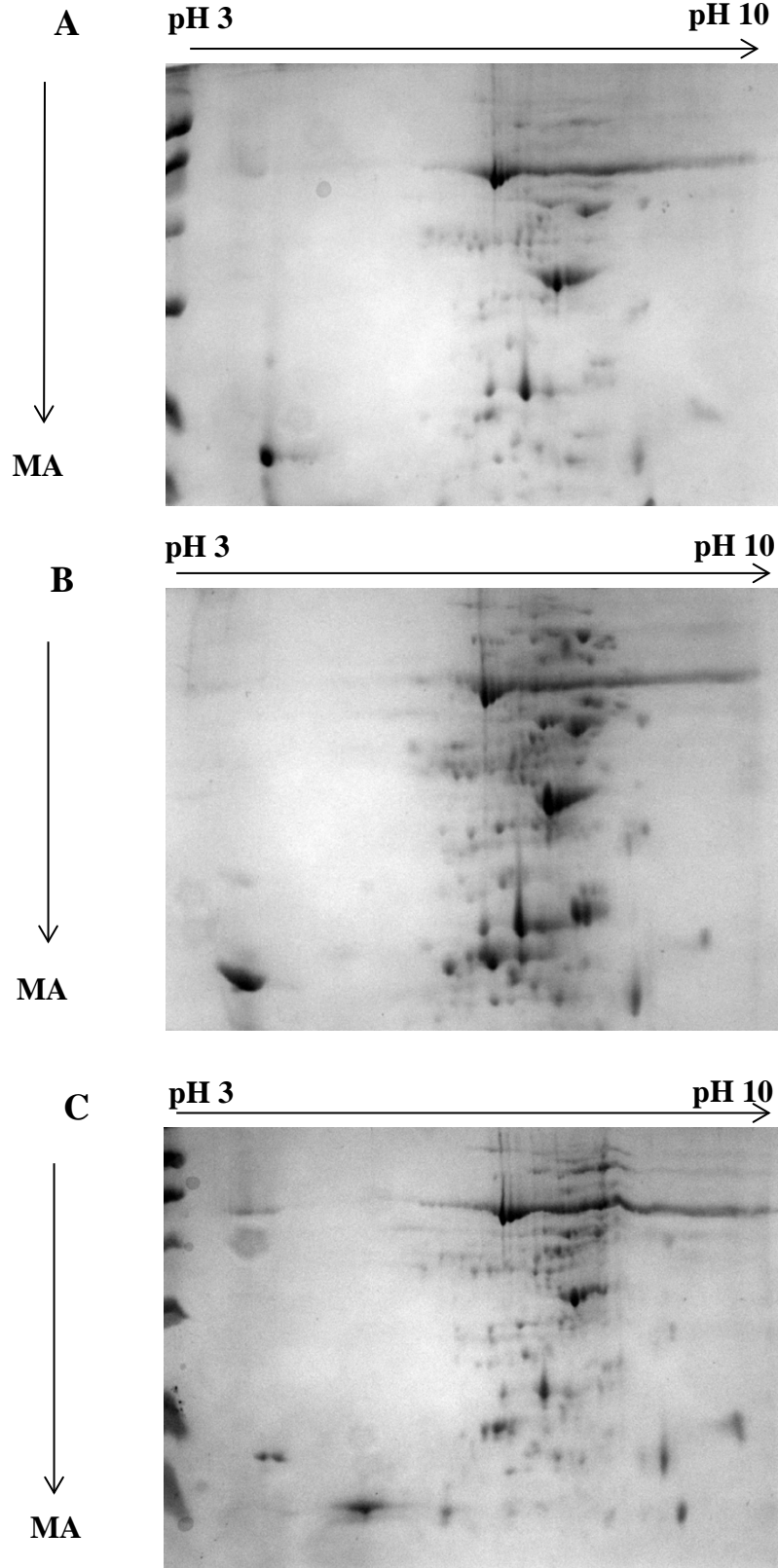
**Şekil 4.8.** R. Hope (A) ve Festival (B) çilek çeşitlerine ait yaprak proteinlerinin 2D jel görüntüsünde serpmе çizim grafikleri. Y eksenі stres grubu proteinleri, X eksenі ise kontrol grubu (35°C) proteinleri temsil etmektedir.



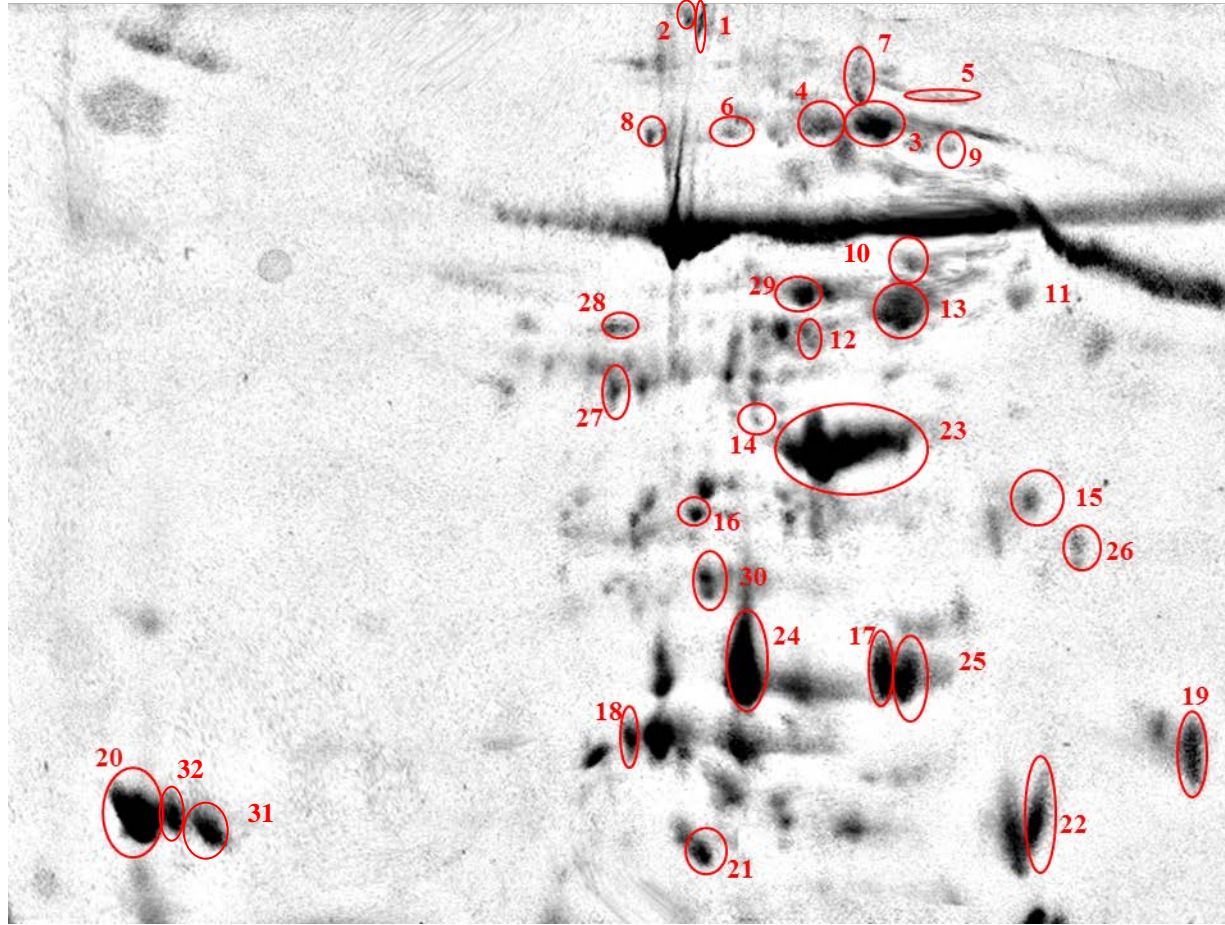
**Şekil 4.9.** R. Hope çilek çeşidinde yaprak proteinlerine ait 2D jel görüntüleri (A: 35°C, B: 40°C, C: 45°C)



Şekil 4.10. R. Hope çilek çeşidine ait 2D jellerinin (35, 40 ve 45°C) üst üste çakıştırılarak elde edilmiş görüntüsü (fused image)



**Şekil 4.11.** Festival çilek çeşidinde yaprak proteinlerine ait 2D jel görüntüleri (A: 35°C, B: 40°C, C: 45°C)



**Şekil 4.12.** Festival çilek çeşidine ait 2D jellerinin (35, 40 ve 45°C) üst üste çakıştırılarak elde edilmiş görüntüsü (fused image)

Çeşitlerin SDS-PAGE profilleri ve 2D-PAGE profilleri karşılaştırıldığında izole edilen SDS-PAGE bantlarının muhtemelen 2D-PAGE’de hangi noktaları işaret ettiği belirlenmiştir. R. Hope çeşidine ait bantlar A, B, D ve G olmak üzere Şekil 4.6.’da işaretlenmiştir. R. Hope çeşidinde 45 ve 50°C’lik örneklerden izole edilen aynı moleküler ağırlığa sahip (23kDa) A ve B bantlarının dizi analizi sonucunda muhtemel olarak “Translationally-controlled tumor protein homolog OS=*Fragaria ananassa*” olabileceği görülmüştür. Bu bantlar 2D-PAGE ile tekrar ayrıştırıldığında işaret ettiği muhtemel protein spotunun 15 numaralı spot olabileceği görülmektedir (Şekil 4.10.). Aynı çeşide ait 45°C’lik örnekten izole edilen ve 75kDa civarındaki D bandının ise dizi analizi sonucunda “Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=*Solanum lycopersicum*” olabileceği belirlenmişken, 2D-PAGE’de 10 ve 11 numaralı protein noktalarını işaret edebileceği tespit edilmiştir. Aynı çeşitte G bandı ile temsil edilen protein bandının dizi analizi sonucunda “Heat shock cognate 70 kDa protein 2 OS=*Solanum lycopersicum*” olabileceği öngörülürken 2D-PAGE’de tekrar ayrıştırıldıktan sonra 2 numaralı spotu işaret edebileceği tespit edilmiştir. Festival çeşidine ait olan bantlar SDS-PAGE üzerinde C, E ve F olacak şekilde işaretlenmiştir (Şekil 4.7.). Festival çeşidinde 45 °C’den izole edilen tahmini 23 kDa’luk protein bandı dizi analizi sonuçlarına göre üç olasılığı işaret etmektedir. Bu bant 2D-PAGE ile tekrar ayrıştırıldığında bu üç olasılıktan biri olan “Small heat shock protein, chloroplastic, HSP22” için işaret edilen muhtemel protein noktaları ise 17 ve 25’dir (Şekil 4.12). Bantın ikinci olasılığı olan “Translationally-controlled tumor protein homolog OS=*Fragaria ananassa*” proteinin 2D-PAGE’de işaret ettiği muhtemel protein noktası ise 18 numaradır. Aynı bantın üçüncü olasılığı olan “Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic OS=*Solanum tuberosum*” proteini 2D-PAGE’de muhtemelen 24 numaralı protein noktasını işaret etmektedir. Festival çeşidinde 45°C’lik örnekten izole edilen ve 75 kDa civarında olduğu bilinen protein bandı için de iki protein adayı bulunmaktadır. Dizi analizi sonuçlarına göre bu proteinlerden biri olan “Calmodulin-2 OS=*Arabidopsis thaliana*” 2D-PAGE’de ayrıştırıldığında bulunabileceği muhtemel protein noktasının 18 numaralı nokta olabileceği belirlenmiştir. Aynı protein bandı için ikinci aday olan “Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Fragment) OS=*Fragaria ananassa*” ise 2D-PAGE’de 32 numaralı protein noktası ile temsil edilebileceği öngörülmüştür.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında yüksek sıcaklıklara toleranslı R. Hope ve duyarlı Festival çilek çeşitleri kullanılarak bu çeşitlerin yüksek sıcaklık stresine verdikleri cevapların genomik ve proteomik seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. Analizlere, bu tez çalışmasının temeli ve en kritik noktası olan toplam RNA izolasyonu ile başlanmış, sonrasında protein çalışmaları ile desteklenmiştir.

RNA çalışmaları aşamasında istenilen miktar ve kalitede RNA elde etmede çilek bitki dokularına özgü karşılaşılan bazı zorluklar, yöntem üzerindeki yoğun çalışmalarla aşılmıştır. Yüksek kalitede RNA izolasyonu gen ifadesi çalışmalarında ilk ve en önemli adımdır. Ancak, belirli dokularda bulunan yüksek miktardaki polifenol ve polisakkaritler RNA ekstraksiyonunu oldukça zorlaştırarak yürütülen protokollerde değişiklik yapılmasını zorunlu hale getirmektedir (Vasanthaiah ve ark. 2008). Çilek, polifenol ve polisakkarit bileşikleri gibi sekonder metabolitler açısından oldukça zengindir. Çileğin sahip olduğu lezzet, doku ve tat gibi karakteristik özellikler ve birçok uçucu ve organoleptik bileşiklerin bütünü bir sonucudur (Maarse 1991). Olgun bir çilekte birçok kimyasal grupta sınıflandırılacak, asitler, aldehydler, ketonlar, alkoller, esterler, laktonlar, sülfür grupları, asetaller, furanlar, fenoller, epoksiler ve alkanlar (Zabetakis ve Holden 1997) gibi 300'den fazla uçucu bileşik tanımlanmıştır. Bu grupların bireysel uçucuları taze ağırlıkta 10-100 ppm gibi çok küçük miktarlarda bulunmasına rağmen çilek meyvesinin lezzetinde belirgin etkiye sahiptirler. Bu koşullar altında RNA izolasyonunun yüksek verimde tamamlanabilmesi için özel protokoller geliştirilmiştir (Mazzara ve James 2000, Cai ve ark. 2008, Yu ve ark. 2012, Christou ve ark. 2014). RNA ekstraksiyonunun miktar ve kalitesi bitki moleküler biyoloji çalışmalarında hem önemli bir işlem hem de RNAi, cDNA sentezi, PCR çoğaltımı, cDNA kütüphanesi oluşturulması, mRNA saflaştırılması, Northern blot hibritlemesi, DD-RT-PCR gibi birçok deney içinde sınırlayıcı bir etkidir (Yu ve ark. 2012). Bununla birlikte bazı bitki dokularından RNA elde etmek, sekonder metabolit yapısında olan yüksek miktardaki polisakkarit ve polifenol bileşiklerinin RNA'ya bağlanarak ya da birlikte çökerek düşük RNA verimi elde edilmesi nedeniyle oldukça zordur. Belirtildiği üzere farklı araştırmacıların da karşılaştığı RNA izolasyonundaki teknik

sorunlar ile bu tez çalışmasında da karşılaşılmıştır. Bu sorunun nedenleri araştırılarak, literatür taramaları sonucunda çilek bitkisinin sahip olduğu aroma maddelerinin, polisakkaritler ve polifenoller gibi sekonder metabolitlerin bu soruna neden olabileceği kanısına varılmıştır.

Çilek bitkisinden RNA izole edilirken SDS, CTAB ve guanidinium tiosiyonat türevleri gibi çeşitli solüsyonlar da kullanılmaktadır (Yu ve ark. 2012). Benzer şekilde polifenol ve polisakkarit bakımından zengin bir başka tür olan elmada, çam ağacı için kullanılan protokolde yapılan modifikasyonlarla elma RNA izolasyonunda tüm dokular için uygulanabilen, liyofilizasyona gerek duyulmayan, fenollerini elemine edebilecek ve ekstraksiyon aşamasını kolaylaştırabilecek, santrifüj sıklığını azaltabilecek ve ultrasantrifüj aşamasını tamamen ortadan kaldıracak yeni bir protokol geliştirilmiştir (Gasic ve ark. 2004). Ancak bu çalışmada, RNA izolasyonu yapılırken hem daha verimli hem de daha pratik olması sebebiyle kitler tercih edilmiştir. Toplam RNA izolasyonunda yaşanan sorun, pek çok yöntem modifikasyonundan sonra çilek bitkisi yapraklarında etkin sonuç verdiği belirtilen PowerPlant® RNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA) sayesinde aşılabılmıştır. Ancak bu sorun çilekte yüksek kalitede ve miktarda RNA elde edebilmek için yapılacak farklı çalışmalara ışık tutmuştur ve bu konudaki çalışmalar ayrıca yürütülmektedir. Tez çalışmasına başlarken farklı ifade edilen genlerin belirlenmesinde “farklılıkların gösterimi” (differential display) yönteminin kullanılması öngörülmüştür ancak varılan noktada tez çalışmasının genetik analizler kısmında yöntem değişikliğine gidilerek bu konudaki etkin sonuçlara qRT-PCR analizleri ile ulaşılmıştır.

Farklı ifade edilen genlerin belirlenmesinde diferansiyel hibridizasyon gibi geleneksel yöntemlerde, iki örneğin toplam cDNA kütüphanesi içindeki hibridizasyon motifleri karşılaştırılmaktadır. Burada da yüksek miktardaki transkriptlerin var oluşu amaç dışı kopyaların olduğuna ve böylece düşük verimliliğe işaret etmektedir. Bu sorun kısmen normalizasyon ve çıkarma işlemi ile giderilebilmektedir. Yine de hibridizasyon sinyalinin az miktarda çoğalması nedeniyle birçok düşük miktarda bulunan farklı ifade edilen genler kaçırılmaktadır (Maniatis ve ark. 1982, Hedrick ve ark. 1984, Wang ve Brown 1991).



Çevresel streslerin etkileri sadece fiziksel ve kimyasal ölçümler kullanılarak basitçe hesaplanamaz. Bunun yanı sıra hücrelerin bu stres etkenlerine karşı olan davranışları fizyolojik olarak da incelenmelidir (Takeda ve ark. 2003). Bu anlamda strese cevapta görev alan gen ifadelerinin çalışılması hücrelerin bu stresler sonucunda nasıl etkilendiğinin izlenmesinde kullanılan bir araçtır. DNA-cDNA microarray, differential display (farklılıkların gösterimi) ve RT-PCR teknikleri gibi yeni yöntemler sayesinde biyolojik süreçlerde yaşanan değişimler alternatif gözlem desteği sağlamaktadır. Birçok araştırmacıya göre RT-PCR teknikleri şu an için düşük miktardaki mRNA'ların belirlenmesinde kullanılan en hassas yöntemdir ve farklı uygulamalar için kullanılabilir (Nicot ve ark. 2005, Mauriat ve ark. 2008, Schmidt ve Delaney 2010, Bustamante ve ark. 2014). Bu çalışmada qRT-PCR analizleri sonucunda yüksek sıcaklıklara toleranslı olan R. Hope çeşidinde sıcaklıkla birlikte ifadesi artan transkriptlerin başında “*LMW heat shock protein mRNA*” (4582,09 kat) gelirken bunu “*heat shock protein HSP90-alpha 1-like*” (2032,32 kat) ve “*18.2kDa class I heat shock protein-like, transcript variant 2*” (1735,54 kat) takip etmiştir. Yüksek sıcaklığa duyarlı Festival çeşidinde ise “*18,1kDa class-1 heat shock protein like*” (337,07 kat) ve “*18,2 kDa class-1 heat shock protein like, transcript variant 2*” (289,46 kat) transkriptlerinin artışı dikkat çekmiştir. QRT-PCR sonuçlarına göre ısı şoku proteinlerinin gen ifadelerinde kuvvetli bir artış söz konusudur. Ancak toleranslı ve duyarlı çeşitler arasında transkriptlerin ifade miktarları arasında dikkat çekici bir fark göze çarpmaktadır. Bu durum R. Hope çeşidinin yüksek sıcaklığa toleransının ve strese karşı verdiği cevabın etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmadakine benzer şekilde, *Arabidopsis*'te *At5g52310 (LTI/COR78)* geninin indüksiyonunun köklerde soğuk stresinde 250 kattan fazla, ozmotik streste 40 kat ve tuz stresinde 57 kat arttığı, *At-HSP17.6* ve *At-HSP18.2* genlerinin yüksek sıcaklık stresinde sırasıyla 34,200 ve 22,800 kat, *Nicotiana tabacum* L.'de *Nt-L25* ve aktin genleri olan *Nt-ACT9* ve *Nt-ACT66*'in anlatımları sırasıyla 100, 200 ve 225 kat ve yine *Arabidopsis*'te *ATST4a*'nın aşırı ifadesinin kontrole göre ~1000 kat fazla olduğu ayrıca lahanada yüksek sıcaklık ile birlikte toleranslı ve duyarlı çeşitte transkript miktarının değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Kreps ve ark. 2002, Volkov ve ark. 2003, Sandhu ve Neff 2013, Park ve ark. 2013). Bu konuda farklı araştırmacıların yaptıkları çalışmaların sonuçlarında da görüldüğü gibi herhangi bir stres etmeninin ardından ifade edilen genlerin

anlatımlarındaki değişiklik ile bitkilerin bu streslere karşı verdikleri cevap arasında sıkı ve doğrudan bir bağlantı bulunmaktadır.

Organizmalar belirli bir protein grubu olan ve ısı şoku proteini olarak bilinen HSP'leri yüksek sıcaklıklara ve diğer birçok strese cevap olarak sentezlerler (Medina Escobar ve ark. 1998). Moleküler şaperonlar, hücrede hem normal şartlarda hem de olağan üstü durumlarda organizmanın normal süreçlerinin devamlılığını sağlayan anahtar bileşenlerdir, ancak bitkilerdeki işlevleri hakkında pek az şey bilinmektedir. Normal şartlar altında protein katlanmasından, düzeninden, translokasyonundan ve degradasyonundan, stres koşullarında ise protein ve membranların stabilizasyonundan ve proteinlerin doğru katlanmasından sorumludur (Wang ve ark. 2004). Farklı bitki organlarında stres koşullarında çoğunlukla ifade edilen proteinler genetik olarak mühendisliği yapılacak strese toleranslı bitkilerin tasarlanmasında değerli bilgiler sağlamaktadır. İfade olunan mRNA'lar ve sorumlu olan proteinler arasındaki korelasyonu belirli organlarda incelemek zor olduğu kadar proteomiks teknikleri genomdaki transle edilmiş bölgelerin fonksiyonel analizini sağlayan en iyi yöntemlerden biridir (Komatsu ve Hossain 2013). Bu tez çalışmasında toleranslı ve duyarlı çeşitlerin yüksek sıcaklık stresi ile değişen protein profilleri SDS-PAGE ve 2D-PAGE gibi proteomiks yöntemleri ile incelenmiştir ve izole edilen protein bantlarında MS/MS iyon taraması ile muhtemel proteinler işaret edilmiştir. Toleranslı R. Hope çeşidinden izole edilmiş bantların dizi analizi sonuçları A ve B bantları için "*Translationally-controlled tumor protein homolog*", D ve G bantları için ise "*Heat shock cognate 70 kDa protein*"inini işaret etmektedir. Duyarlı olan Festival çeşidinde ise her bant için birden fazla olası protein işaret edilmiştir. C bandı için "*Small heat shock protein, chloroplastic, HSP22*", "*Translationally-controlled tumor protein homolog*" ve "*Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic*" olası proteinler olarak belirlenirken, E bandı için "*Calmodulin-2*" ve "*Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)*" muhtemel proteinler olarak görülmüştür. F bandı için ise "*60S ribosomal protein L23*", "*Profilin*", "*Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment)*" ve "*Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic*" proteinleri aday olarak belirlenmiştir. Toleranslı çeşidin yüksek sıcaklık stresi ile doğrudan alakalı protein adayı içermesi (*Heat shock cognate 70 kDa protein*) buna

karşılık duyarlı çeşidin daha çok yapısal proteinleri [(60S ribosomal protein L23, Ribulose biphosphate carboxylase large chain (Fragment), Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic)] ve ikincil derecede sıcaklığa toleransa katkı sağlayan protein adaylarını (Calmodulin-2, Small heat shock protein, chloroplastic, HSP22, Translationally-controlled tumor protein homolog, Profilin) içermesi iki çeşidin yüksek sıcaklıklara verdiği tepkinin farklılığını ortaya koymaktadır. Pek çok araştırmacı HSP70 ve TCTP proteinin strese cevapta merkezi rol oynadığını (Woo ve Hawes 1997, Wang 2004, Berkowitz ve ark. 2008, Kim ve ark. 2012, Hoepflinger ve ark. 2013) ancak calmodulin-2, profilin ve küçük molekül ağırlıklı proteinlerin daha çok sinyal algılayıcı ve strese cevapta yardımcı olarak rol oynadıklarını belirlemiştir (Klein ve Ferguson 1987, Braam 1992, Gong ve ark. 1997, Ranty ve ark. 2006, Zhang ve ark. 2009, Moon ve ark. 2007, Hyun ve Kim 2011, Sun ve ark. 2013).

Tüm sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde önceki çalışmalarla toleranslı olarak bilinen R. Hope çeşidinin yüksek sıcaklık stresine cevabı, duyarlı olan Festival çeşidine göre transkript ve protein seviyesinde farklı bulunmuştur. Transkript seviyesinde, yüksek miktarda ifade edilen genlerin R. Hope çeşidine toleranslı olma özelliği sağladığı belirlenmiştir. Ancak, Festival çeşidinin yüksek sıcaklık stresine toleransında sHSP genlerinin tek başına miktarının artması yeterli olmayıp bu çeşidin duyarlı olmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Protein seviyesinde ise HSP70 gibi sıcaklık stresine cevapta doğrudan görev alan proteinlerin toleranslı olan R. Hope çeşidinde bulunması bu proteinin çilekte yüksek sıcaklığa cevapta önemli rol oynadığını göstermektedir. Belirtildiği üzere Festival çeşidine ait protein adaylarının yüksek sıcaklık stresine verilen cevapta sınırlı seviyede etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışması çilekte yüksek sıcaklıklara toleranslı ve duyarlı çeşitlerin farklılıklarının genler düzeyinde belirlendiği ilk çalışma olup, elde edilen veriler ileride bu konuda yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynak niteliğindedir. Ayrıca, elde edilen gen ve protein adayları ileride yapılacak çalışmalarda özgün birer markır özelliği taşıyabileceği gibi strese toleranslı tür ve çeşitlerin geliştirilmesinde de fayda sağlayacaktır. Bu veriler gelecekte, belirlenmiş olan gen ifadelerinin stres koşullarındaki

davranışlarını incelemek amacıyla SNP (tek nükleotid polimorfizmi) ve mikroarray gibi ileri teknikler kullanılarak daha detaylı çalışmalar yapılmasına olanak tanımaktadır.

Yüksek sıcaklıklara toleranslı ve duyarlı iki çilek çeşidinde yüksek sıcaklık ile anlatımı değişen genler ve proteinlerin etkileri sonucunda elde edilen ve yorumlanan bulgular özet olarak vurgulanmıştır. Buna göre;

- **Hücrel zararlanmanın yüksek sıcaklıklar ile birlikte duyarlı olan çeşitte toleranslı olana göre daha fazla arttığı**
- **Toplam çözünebilir protein sentezinin artan sıcaklıklarla birlikte engellendiği**
- **Sıcaklık artışı ile birlikte bazı proteinlerin sentezi artarken bazılarının ise azaldığı**
- **R. Hope çeşidinin yüksek sıcaklık stresine cevabının duyarlı olan Festival çeşidine göre transkript ve protein seviyesinde farklı bulunduğu**
- **HSP70 gibi sıcaklık stresine cevapta doğrudan görev alan proteinlerin ve HSP90- $\alpha$ 1-like transkriptinin toleranslı olan R. Hope çeşidinde anlatımının artması bu protein ve transkriptin çilekte yüksek sıcaklığa cevapta etkin görevinin olduğu**
- **Festival çeşidine ait anlatımı artan transkriptlerin sHSP'leri kodladığı ancak bu protein adaylarının ise yüksek sıcaklık stresine birinci dereceden cevap verememesi nedeniyle strese sınırlı seviyede cevap verebildiği**
- **Yüksek sıcaklıklar ile birlikte alerjen genlerinin anlatımında azalma olduğu**

**belirlenmiştir.**

## KAYNAKLAR

- Aharoni, A., O'Connell, A.P. 2002.** Microarray gene expression analysis during strawberry achenes and receptacle maturation. *J. Exp. Bot.*, 53: 2073-2087.
- Aharoni, A. 2004.** Functional genomics in strawberry. *Acta Hort.*, 649: 29-33.
- Albrecht, V., Weinl, S., Blazevic, D., D'Angelo, C., Batstic, O., Kolukisaoglu, Ü., Bock, R., Schulz, B., Harter, K., Kudla, J. 2003.** The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 36: 457-470.
- Alves, J.D., VanToai, T.T., Kaya, N. 1998.** Differential Display: A Novel PCR-based method for gene isolation and cloning. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10(2): 161-164.
- Anderson, J.A. 2002.** Catalase activity, hydrogen peroxide content and thermotolerance of pepper leaves. *Scientia Hort.*, 95: 277-284.
- Anonim, 2014.** Küresel iklim değişikliği ve Türkiye.  
[http://www.wwf.org.tr/ne\\_yapiyoruz/ayak\\_izinin\\_azaltilmasi/iklim\\_degisikligi\\_ve\\_enerji/iklim\\_degisikligi/kuresel\\_iklim\\_degisikligi\\_ve\\_turkiye/](http://www.wwf.org.tr/ne_yapiyoruz/ayak_izinin_azaltilmasi/iklim_degisikligi_ve_enerji/iklim_degisikligi/kuresel_iklim_degisikligi_ve_turkiye/)(Erişim tarihi: 24.10.2014).
- Archbold, D.D., Clements, A.M. 2002.** Identifying heat tolerant *Fragaria* accessions using chlorophyll fluorescence. Proceedings of 4th International Strawberry Symposium, ISHS 2002, *Acta Hort.*, 567: 341-344.
- Arora, R., Wisniewski, M.E., Scorza, R. 1992.** Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* L. Batsch). 1. Seasonal changes in cold hardiness and polypeptides of bark and xylem tissues. *Plant Physiology*, 99(4): 1562-1568.
- Arora, R., Wisniewski, M.E. 1994.** Cold acclimation in genetically related (sibling) deciduous and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) (ii. a 60-kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins). *Plant Physiology*, 105: 95-101.
- Arora, R., Rowland, L.J., Panta, G.R. 1997.** Chill-responsive dehydrins in blueberry: Are they associated with cold hardiness or dormancy transitions? *Physiologia Plantarum*, 101: 8-16.
- Baniwal, K.S., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S. K., Nover, L., Port, M., Scharf, K-D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., von Koskull-Döring, P. 2004.** Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.*, 29(4): 471-487.

**Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S., Masle, J. 2008.** Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 20: 3430-3447.

**Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., Sharma, K.K. 2008.** Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospects and prospects. *Plant Cell Rep.*, 27: 411-424.

**Bitá, C.E., Gerats, T., 2013.** Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific Fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4(273): 1-18.

**Bösl, B., Grimminger, V., Walter, S. 2006.** The molecular chaperone Hsp 104 - a molecular machine for protein disaggregation. *J. Struct. Biol.*, 156: 139-148.

**Braam, J. 1992.** Regulated expression of the calmodulin related TCH genes in cultured *Arabidopsis* cells: Induction by calcium and heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 89: 3213-3216.

**Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

**Bustamante, M., Jin, J., Casagran, O., Nolan, T., Riechmann, J.L. 2014.** Gene expression analysis by quantitative real-time PCR for floral tissues. Eds.: Riechmann, J.L., Wellmer, F. *Methods in molecular biology*, Springer Science+Business Media, New York, USA, pp: 363-382.

**Cai, B., Zhang, J., Gao, Z., Qu, S., Tong, Z., Mi, L., Qiao, Y., Zhang, Z. 2008.** An improved method for isolation of total RNA from the leaves of *Fragaria* spp. *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 24(6): 875-877.

**Candat, A., Paszkiewicz, G., Neveu, M., Gautier, R., Logan, D.C., Avelange-Macherel, M.H., Macherela, D. 2014.** The Ubiquitous Distribution of Late Embryogenesis Abundant Proteins across Cell Compartments in *Arabidopsis* Offers Tailored Protection against Abiotic Stress. *The Plant Cell*, 26: 3148–3166.

**Chauhan, H., Khurana, N., Nijhavan, A., Khurana, J.P., Khurana, P. 2012.** The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination and imparts tolerance to heat stress. *Plant, Cell and Environment*, 35: 1912–1931.

**Chen, T.H.H., Murata, N. 2011.** Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment*, 34: 1–20.

**Chen, L., Zhong, H-Y., Kuang, J-F., Li, J-G., Lu, W-J., Chen, J-Y. 2011.** Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, 234: 377–390.

- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., Yu, D. 2012.** The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819: 120–128.
- Christou, A., Georgiadou, E.C., Filippou, P., Manganaris, G.A., Fotopoulos, V. 2014.** Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene*, 537: 169–173.
- Christou, A., Filippou, P., Manganaris, G.A., Fotopoulos, V. 2014.** Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporins. *BMC Plant Biology*, 14:42.
- Czechowski, T., Bari, R.P., Stitt, M., Scheible, W.R., Udvardi, M.K. 2004.** Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, 38: 366-379.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J-X., Srivastava, R., Rothstein, S.J., Howell, S.H. 2011.** Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(17): 7247–7252.
- Dong, Q-L., Liu, D-D., An, X-H., Hu, D-G., Yao, Y-X., Hao, Y-J. 2011.** MdVHP1 encodes an apple vacuolar H<sup>+</sup>-PPase and enhances stress tolerance in transgenic apple callus and tomato. *Journal of Plant Physiology*, 168: 2124–2133.
- Else, M., Atkinson, C. 2010.** Climate change impacts on UK top and soft fruit production. *Outlook on Agriculture*, 39: 257-262.
- Ergin, S. 2012.** Yüksek sıcaklık stresinin çilek bitkisinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile protein metabolizmasına etkileri. *Doktora Tezi*, U Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.
- Escobar-Galvis, M.L., Marttila, S., Håkansson, G., Forsberg, J., Knorpp, C. 2001.** Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86-kilodalton protein. *Plant Physiology*, 126: 69-77.
- Evrard, A., Kumar, M., Lecourieux, D., Lucks, J., von Koskull-Doring, P., Hirt, H. 2013.** Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ*, 1:e59; DOI 10.7717/peerj.59.
- Folta, K.M., Davis, T. M. 2006.** Strawberry genes and genomics. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 25: 1–17.
- Folta, K.M., Dhingra, A. 2006.** Invited Review: Transformation of Strawberry: The Basis For Translational Genomics in Rosaceae. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 42: 482–490.

**Frank, G., Pressman, E., Ophir, R., Althan, L., Shaked, R., Freedman, M., Shen, S., Firon, N. 2009.** Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. *Journal of Experimental Botany*, 1-18.

**Gao H., Brandizzi F., Benning C., Larkin R.M. (2008).** A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 16398–16403.

**Gasic, K., Hernandez, A., Korban, S.S. 2004.** RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(4): 437-438.

**Giorno, F., Wolters-Arts, M., Grillo, S., Scharf, K-D., Vriezen, V.H., Mariani, C. 2010.** Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *Journal of Experimental Botany*, 61(2): 453–462.

**Ghanem, M.E., Albacete, A., Smigocki, A.C., Frebört, I., Pospisilova, H., Martinez-Andujar, C., Acosta, M., Sanchez-Bravo, J., Lutts, S., Dodd, I.C., Perez-Alfocea, F. 2011.** Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(1): 125–140.

**Gong, M., Li, Y-J., Dai, X., Tian, M., Li, Z-G. 1997.** Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings. *J. Plant Physiol.*, 150: 615-621.

**Guo, J., Wu, J., Ji, Q., Wang, C., Luo, L., Yuan, Y., Wang, Y., Wang, J. 2008.** Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and *Arabidopsis*. *J. Genet. Genomics*, 35: 105–118.

**Gülen, H. 2000.** Ayva ve armutlarda anaç/kalem ilişkilerinin izoenzim analizleriyle araştırılması. *Doktora tezi*. Çukurova Üniv. Fen Bil. Ens., Adana, 136 s.

**Gülen, H., Eris, A. 2003.** Some physiological changes in strawberry (*Fragaria ananassa* ‘Camarosa’) plants under heat stress. *Journal of Hort. Science and Biotech*, 78(6): 894-898.

**Gülen, H., Eris, A. 2004.** Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science*, 166: 739-744.

**Gülen, H., Ergin, S., Kesici, M., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N. 2011.** Çilekte yüksek sıcaklığa bağlı çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranı. Uluslararası Katılımlı I. Ali Numan Kırış Tarım Kongresi ve Fuarı, Cilt I, sayfa, 817-822, 27-30 Nisan, Eskişehir.



- Hale, M.G., Orcutt, D.M. 1987.** The Physiology of Plants Under Stress, p.206.
- Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A., Davis, M.M. 1984.** Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, 308: 149-153.
- Hellman, E.W., Travis, J.D. 1988.** Growth inhibition of strawberry at high temperatures. *Adv. Strawberry Prod.*, 7: 36-38.
- Hoepflinger, M.C., Reitsamer, J., Geretschlaeger, A.M., Mehlmer, N., Tenhaken, R. 2013.** The effect of translationally controlled tumour protein (TCTP) on programmed cell death in plants. *BMC Plant Biology*, 13: 135-144.
- Hong, S.W., Vierling, E. 2001.** Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.*, 27: 25-35.
- Hong, B., Ma, C., Yang, Y., Wang, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Gao, J. 2009.** Over-expression of AtDREB1A in chrysanthemum enhances tolerance to heat stress. *Plant Mol Biol.*, 70: 231–240.
- Hossain, Z., Nouri, M.Z., Komatsu, S. 2012.** Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. *J. Proteome Res.*, 11: 37-48.
- Huang, B., Rachmilevitch, S., Xu, J. 2012.** Root carbon and protein metabolism associated with heat tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 63(9): 3455–3465.
- Huey, R.B., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C., Hoang, A., Kingsolver, J. G. 2002.** Plants versus animals: Do they deal with stress in different ways? *Integ. and Comp. Biol.*, 42: 415–423.
- Husaini, A.M., Abdin, M.Z. 2008.** Development of transgenic strawberry (*Fragaria vesca* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science*, 174: 446-455.
- Hwang, J.E., Hong, J.K., Lim, C.J., Chen, H., Je, J., Yang, K.A., Kim, D.Y., Choi, Y.J., Lee, S.Y., Lim, C.O. 2010.** Distinct expression patterns of two Arabidopsis phytocystatin genes, AtCYS1 and AtCYS2, during development and abiotic stresses. *Plant Cell Rep*, 29: 905–915.
- Hyun, T.K., Kim, J-S. 2011.** Genomic identification of putative allergen genes in woodland strawberry (*Fragaria vesca*) and mandarin orange (*Citrus clementina*). *Plant Omics Journal*, 4(7): 428-434.
- Jagadish, S.V.K., Muthurajan, R., Oane, R., Wheeler, T.R., Heuer, S., Bennett, J., Craufurd, P.Q. 2010.** Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61(1): 143–156.

- Johnson, S., Lim, F-L., Finkler, A., Fromm, H., Slabas, A.R., Knight, M.R. 2014.** Transcriptomic analysis of Sorghum bicolor responding to combined heat and drought stress. *BMC Genomics*, 15: 456.
- Kesici, M. 2009.** Bazı Çilek (*Fragaria x ananassa*) Çeşitlerinin Yüksek Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, U Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.
- Kesici, M., Ergin, S., Gulen, H., Turhan, E., Ipek, A., Koksall, N. 2013.** Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars. *Not Bot Horti Agrobo.*, 41(1):1-6.
- Kim, Y-M., Han, Y-J., Hwang, O-J., Lee, S. S., Shin, A-Y., Kim, S. Y., Kim, J-II. 2012.** Overexpression of Arabidopsis translationally controlled tumor protein gene AtTCTP enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure. *Mol. Cells.*, 33: 617-626.
- Klein, J.D., Ferguson, I.B. 1987.** Effect of high temperature on calcium uptake by suspension-cultured pear fruit cells. *Plant Physiol.*, 84: 153-156.
- Kobayashi, M., Katoh, H., Takayanagi, T., Suzuki, S. 2010.** Characterization of thermotolerance-related genes in grapevine (*Vitis vinifera*). *Journal of Plant Physiology*, 167: 812–819.
- Komatsu, S., Hossain, Z. 2013.** Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Frontiers in Plant Science*, 4(71): 1-9.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., Klaus-Dieter, S. 2007.** Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 310–316.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H-S., Zhu, T., Wang, X; Harper, F. 2002.** Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, 130: 2129–2141.
- Kumakura, H., Shishido, Y. 1994.** The effect of daytime, nighttime and mean diurnal temperatures on the growth of Morioka-16 strawberry fruit and plants. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 62: 827-832.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 658-685.
- Laino, P., Shelton, D., Finnie, C., De Leonardis, A.M., Mastrangelo, A.M., Svensson, B., Lafiandra, D., Masci, S. 2010.** Comparative proteome analysis of metabolic proteins from seeds of durum wheat (cv. Svevo) subjected to heat stress. *Proteomics*, 10: 2359–2368.

- Larkindale, J., Knight, M.R. 2002.** Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.*, 128: 682-695.
- Law, R.D., Crafts-Brandner, S. 1999.** Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-Biphosphate Carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology*, 120: 173-181.
- Ledesma, N.A., Kawabata, S., Sugiyama, N. 2004.** Effect of high temperature on protein expression in strawberry plants. *Biologia Plantarum*, 48(1): 73-79.
- Ledesma, N., Sugiyama, N. 2005.** Pollen quality and performance in strawberry plants exposed to high-temperature stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130(3): 341-347.
- Ledesma, N.A., Nakata, M., Sugiyama, N. 2008.** Effect of high temperature stress on the reproductive growth of strawberry cvs. 'Nyoho' and 'Toyonoka'. *Scientia Horticulturae*, 116: 186-193.
- Lee, J.H., Hubel, A., Schoffl, F. 1995.** Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant J.*, 8: 603-612.
- Lee, D-G., Ahsan, N., Lee, S-H., Kang, K.Y., Bahk, J.D., Lee, I-J., Lee, Lee, B-H. 2007.** A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 7: 3369-3383.
- Levitt, J. 1980.** Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, p.497.
- Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W., Yu, D. 2010.** Functional characterization of Arabidopsis thaliana WRKY39 in heat stress. *Mol. Cells*, 29: 475-483.
- Li, Z., Palmer, W.M., Martin, A.P., Wang, R., Rainsford, F., Jin, Y., Patrick, J.W., Yang, Y., Ruan, Y-L. 2011.** High invertase activity in tomato reproductive organs correlates with enhanced sucrose import into, and heat tolerance of, young fruit. *Journal of Experimental Botany*, 1-12.
- Li, S., Liu, J., Liu, Z., Li, X., Wu, F., He, Y. 2014.** Heat-induced tas1 target1 mediates thermotolerance via heat stress transcription factor A1a-directed pathways in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26: 1764-1780.
- Lievens, S., Goormachtig, S., Holsters, M. 2001.** A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. *Nucleic Acid Research*, 29(17): 3459-3468.
- Lim, C.C., Krebs, S.L., Arora, R.A. 1999.** 25-kDa dehydrin associated with genotype and age-dependent leaf freezing-tolerance in Rhododendron: a genetic marker for cold hardiness? *Theor. Appl. Genet.* 99: 912-920.

- Lim, C.J., Yang, K.A., Hong, J.K., Choi, J.S., Yun, D.J., Hong J.C., Chung, W.S., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O. 2006.** Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. *J. Plant Res.*, 119: 373-383.
- Liu, H-H., Tian, X., Li, Y-J., Wu, C-A., Zheng, C-C. 2008.** Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14: 836-843.
- Llop-Tous, I., Dominguez-Puigjaner, E., Vendrell, M. 2002.** Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature. *Journal of Experimental Botany*, 53(378): 2283-2285.
- Lohmann, C., Eggers-Schumacher, G., Wunderlich, M., Schöffl, F. 2004.** Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genomics*, 271: 11-21.
- Löw, D., Brandle, K., Nover, L., Forreiter, C. 2000.** Cytosolic heat-stress proteins Hsp17,7 class I and Hsp17,3 class II of tomato act as molecular chaperons in vivo. *Planta*, 211: 575-582.
- Luhua, S., Hegieb, A., Suzukia, N., Shulaeva, E., Luo, X., Cenariub, D., Mab, V., Kaob, S., Limb, J., Gunay, M.B., Oosumid, T., Leed, S.C., Harperb, J., Cushmanb, J., Golleryc, M., Girked, T., Bailey-Serresd, J., Stevensone, R.A., Zhue, J-K., Mittler, R. 2013.** Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiologia Plantarum*, 148: 322-333.
- Ma, C., Haslbeck, M., Babujee, L., Jahn, O., Reumann, S. 2006.** Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat-shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes. *Plant Physiol.*, 141: 47-60.
- Maarse, H. 1991.** Volatile compounds in foods and beverages. New York, USA: Marcel Dekker; pp: 483-546.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboi, E., Hamida, J.B., Branlard, G. 2003.** Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics*, 3: 175-183.
- Majoul, T., Bancel, E., Triboi, E., Hamida, J.B., Branlard, G. 2004.** Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics*, 4: 505-513.
- Malik, M.K., Slovin, J.P., Hwang, C.H., Zimmerman, J.L. 1999.** Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, Hsp 17,7, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal*, 20(1): 89-99.

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982.** Molecular cloning: A laboratory Manual. Ed.: Sambrook, J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 545 pp.
- Manning, K. 1998.** Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, 205: 622-631.
- Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., Wuytsvinkel, O.V. 2008.** Towards a systematic validation of references in Real-Time RT-PCR. *The Plant Cell*, 20: 1734–1735.
- Mazzara, M., James, D. J. 2000.** The influence of photoperiodic growth condition on isolation of RNA from strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) tissue. *Molecular Biotechnology*, 15(3): 237-241.
- McKersie B.D., Leshem, Y.Y. 1994.** Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, 256 pp.
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Valpuesta, V., Munoz-Blanco, J. and Caballero, J.L. 1997.** Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Anal. Biochem.*, 248: 288-296.
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Munoz-Blanco, J., Caballero, J.L. 1998.** Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology*, 36: 33-42.
- Merewitz, E.B., Gianfanga, T., Huang, B. 2011.** Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an ipt gene for cytokinin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 1-23.
- Mishra, S.K. 2002.** In the complex family of heat stress transcription factors HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.*, 16: 1555–1565.
- Misra, S., Wu, Y., Venkataraman, G., Sopory, S.K., Tuteja, N. 2007.** Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *The Plant Journal*, 51: 656–669.
- Mittler, R. 2006.** Abiotic stress, the field environment and stress combination. *TRENDS in Plant Science*, 11(1): 15-19.
- Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S-S., Kim, D.H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O., Yun, D.J. 2003.** NDP kinase 2 interacts with two oxidative stressactivated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(1): 358-363.

- Moon, D.H., Salvatierra, G.R., Caldas, D.G.G., Gallo de Carvalho, M.C.C., Carneiro, R.T., Franceschini, L.M., Oda, A.S., Labate, C.A. 2007.** Comparison of the expression profiles of susceptible and resistant *Eucalyptus grandis* exposed to *Puccinia psidii* Winter using SAGE. *Functional Plant Biology*, 34: 1010–1018.
- Mori, T. 1998.** The effect of temperature during flower bud formation on achene number and fresh weight of strawberries. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 62: 781-788.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. and Iba, K. 2000.** Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science*, 287: 476–479.
- Nakamoto, H., Vigh, L. 2007.** The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol. Life Sci.*, 64: 294-306.
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2012.** NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819: 97–103.
- Nam, Y.W., Tichit, L., Leperlier, M., Cuerq, B., Marty, I. and Lelievre, J.M. 1999.** Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.*, 39: 629-636.
- NDong, C., Ouellet, F., Houde, M., Sarhan, F. 1997.** Gene expression during cold acclimation in strawberry. *Plant Cell Physiol.*, 38(7): 863-870.
- Neff, M.M., Nguyen, S.M., Malancharuvil, E.J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. 1999.** BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:15316-23; PMID:10611382; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.26.15316>
- Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S., Weissa, D. 2005.** Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell*, 17: 1829–1838.
- Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D. 2005.** Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress *Journal of Experimental Botany*, 56(421): 2907–2914.
- Nie, W.F., Wang, M.M., Xia, X.J., Zhou, Y-H., Shi, K., Chen, Z., Yu, J.Q. 2013.** Silencing of tomato RBOH1 and MPK2 abolishes brassinosteroid-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and stress tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 36(4): 789–803.
- Nover, L., Bharti, K., Döring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., Scharf, K.D. 2001.** *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factor do we need? *Cell Stress Chaperones*, 6: 177-189.
- Okie, W.R. 2004.** Register of new fruit and nut varieties list 42. *Hort. Science*, 39(6): 1509-1523.

**Özdemir, E., Gündüz, K., Serçe, S. 2007.** Yeni bazı çilek çeşitlerinin Amik Ovası koşullarına uyumu. Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Cilt 1. Sayfa, 20-22. 04-07 Eylül, Erzurum.

**Panchuk, I.I., Volkov, R.A., Schöffl, F. 2002.** Heat stress-and heat shock transcription factor dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 129: 838-853.

**Park, H.J., Jung, W.Y., Lee, S.S., Song, J.H., Kwon, S-Y., Kim, H.R., Kim, C.W., Ahn, J.C., Cho, H.S. 2013.** Use of Heat Stress Responsive Gene Expression Levels for Early Selection of Heat Tolerant Cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 11871-11894.

**Parry, M.L., Canziani, O.F., Palutikof, J.P. et al. 2007.** Climate Change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability. contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007.

**Peleg, Z., Walia, H., Blumwald, E. 2012.** Integrating genomics and genetics to accelerate development of drought and salinity tolerant crops. *Plant Biotechnology and Agriculture Prospects for the 21<sup>th</sup> century*, 271-286.

**Pérez-Clemente, R.M., Vives, V., Zandalinas, S.I., López-Climent, M.F., Muñoz, V., Gómez-Cadenas, A. 2013.** Biotechnological Approaches to Study Plant Responses to Stress. *BioMed Research International*, 2013: 10, Article ID 654120.

**Ranty, B., Aldon, D., Galaud, J-P. 2006.** Plant calmodulins and calmodulin-related proteins. *Plant Signaling&Behavior*, 1(3): 96-104.

**Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R. 2000.** Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290:2105-2110.

**Rivero, R.M., Mestre, T.C., Mittler, R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F., Martinez, V. 2014.** The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell and Environment*, 37: 1059–1073.

**Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. 2004.** When defense pathways collide. The response of arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134: 1683–1696.

**Rushton, P.J., Somssich, I.E. 1998.** Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(4): 311–315.

**Qu, A.L., Ding, Y.F., Jiang, Q., Zhu, C. 2013.** Molecular mechanisms of the plant heat stress response, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.104>

**Queitsch, C., Hong, S-W., Vierling, E., Lindquist, S. 2000.** Heat shock 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12: 479-492.

**Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006.** Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(49): 18822–18827.

**Salentijn, E. M.J., Aharoni, A., Schaart J.G., Boone, M.J., Krens, F.A. 2003.** Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiol. Plant*, 118:571-578.

**Sandhu, K.S., Neff, M.M. 2013.** The Arabidopsis gene ATST4a is not a typical brassinosteroids catabolic gene. *Plant Signaling & Behavior*, 8:e26847; PMID: 24169228; <http://dx.doi.org/10.4161/psb.26847>

**Sargent, D.J., Davis, T.M., Tobutt, K.R., Wilkinson, M.J., Battey, N.H., Simpson, D.W. 2004.** A genetic linkage map of microsatellite, genespecific and morphological markers in diploid *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 1385–1391.

**Sargent, D.J., Clarke, J., Simpson, D.W., Tobutt, K.R., Arus, P., Monfort, A., Vilanova, S., Denoyes-Rothan, B., Rousseau, M., Folta, K.M., Bassil, N.V., Battey, N.H. 2006.** An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.*, 112: 1349–1359.

**Schmidt, G.W., Delaney, S.V. 2010.** Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*, 283: 233–241.

**Schneider, S.H., Semenov, S., Patwardhan, A., Burton, I., Magadza, C.H.D., Oppenheimer, M., Pittock, A.B., Rahman, A., Smith, J.B., Suarez, A., Yamin, F. 2007:** Assessing key vulnerabilities and the risk from climate change. Climate change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 779-810.

**Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carnici, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., 2001.** Monitoring the expression pattern of 1300 arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full length cDNA microarray. *Plant Cell*, 13: 61-72.

**Singh, K.B., Foley, R.C., Onate-Sanchez, L., 2002.** Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 430-436.

**Song, X., Liu, G., Duan, W., Liu, T., Huang, Z., Ren, J., Li, Y., Hou, X. 2014.** Genome-wide identification, classification and expression analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese cabbage. *Mol Genet Genomics*, 289:541–551.



- Strik, B.C. 1985.** Flower bud initiation in strawberry cultivars. *Fruit Var. J.*, 39: 5-9.
- Su, P-H., Li, H-M. 2008.** Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, 146: 1231–1241.
- Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., Maule, A.J. 2009.** The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21: 642–654.
- Sun, W., Bernard, C., van de Cotte, B., Montagu, M.V., Verbruggen, N. 2001.** At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal*, 27(5): 407-415.
- Sun, T., Li, S., Haiyun, R. 2013.** Profilin as a regulator of the membrane-actin cytoskeleton interface in plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4(512): 1-7.
- Suzuki, N., Miller, G., Sejima, H., Harper, J., Mittler, R. 2013.** Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in Arabidopsis thaliana plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. *Journal of Experimental Botany*, 64(1): 253–263.
- Şahin-Çevik, M. 2005.** Mikroarray teknolojisi ve bitkilerde uygulama alanları. Süleyman Demirel Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9-3.
- Takeda, T., Tamura, M., Ohtaki, M., Matsuoka, H. 2003.** Gene expression in cultured strawberry cells subjected to hydrodynamic stress. *Biochemical Engineering Journal*, 15: 211-215.
- Tyagi, A., Chandra, A. 2006.** Isolation of stress responsive Psb A gene from rice (*Oryza sativa* L.) using differential display. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 43: 244-246.
- Vasanthaiah, H.K.N., Katam, R., Sheikh, M.B. 2008.** Efficient protocol for isolation of functional RNA from different grape tissue rich in polyphenols and polysaccharides for gene expression studies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11: (3): 1-8.
- Verheul, M.J., Sønsteby, A., Grimstad, S.O. 2007.** Influences of day and night temperatures on flowering of *Fragaria x ananassa* Duch., cvs. Korona and Elsanta, at different photoperiods. *Scientia Horticulturae*, 112: 200–206.
- Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Schöffl, F. 2003.** Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany*, 54 (391): 2343-2349.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007.** Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199-223.

- Waters, E.R., Lee, G.J., Vierling, E. 1996.** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.*, 47: 325-338.
- Wan, J.S., Sharp, S.J., Poirier, G.M.-C., Wagaman, P.C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.-L., Galindo, J.E., Huvar, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Erlander, M.G. 1996.** Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat. Biotechnol.*, 14: 1685-1691.
- Wang, Z., Brown, D.D. 1991.** A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 11505-11509.
- Wang, S.Y., Camp, M.J. 2000.** Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Sci. Hortic.*, 85: 183-199.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. 2003.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. 2004.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5): 244-252.
- Wang, S.Y., Lin, H.S. 2006.** Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Scientia Hort.*, 108: 35-42.
- Wang, L.-C., Wang, Tsai, M.-C., Chang, K.-Y., Fan, Y.-S., Yeh, C.-H., Wu, S.-J. 2011.** Involvement of the Arabidopsis HIT1/AtVPS53 tethering protein homologue in the acclimation of the plasma membrane to heat stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(10): 3609–3620.
- Weber, C., Nover, L., Fauth, M. 2008.** Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant Journal*, 56: 517–530.
- Wheeler, T., Kay, M. 2010.** Food crop production, water and climate change in the developing World. *Outlook on Agriculture*, 39(4): 239-243.
- Woo, H.H., Hawes, M.C. 1997.** Cloning of genes whose expression is correlated with mitosis and localized in dividing cells in root caps of *Pisum sativum* L. *Plant Mol Biol.*, 35: 1045-1051.
- Wu, X., Shiroto, Y., Kishitani, S., Ito, Y., Toriyama, K. 2009.** Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Rep.*, 28:21–30.
- Wu, Q.S. 2011.** Mycorrhizal efficacy of trifoliolate orange seedlings on alleviating temperature stress. *Plant Soil Environ.*, 57(10): 459-464.
- Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L. 2006.** Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and

ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exper. Botany*, 56: 274-285.

**Xue, G-P., Drenth, J., McIntyre, L. 2014.** TaHsfA6f is a transcriptional activator that regulates a suite of heat stress protection genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) including previously unknown Hsf targets. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/eru462.

**Yamaguchi-Shinozaki, K., Kasuga, M., Liu, Q., Nakashima, K., Sakuma, Y., Abe, H., Shinwari, Z. K., Seki, M., Shinozaki, K., 2002.** Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*, 1-8.

**Yamanouchi, U., Yano, M., Lin, H., Ashikari, M., Yamada, K. 2002.** A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein. *PNAS*, 99(11): 7530–7535.

**Yokotani, N., Ichikawa, T., Kondou, Y., Matsui, M., Hirochika, H., Iwabuchi, M., Oda, K. 2008.** Expression of rice heat stress transcription factor *OsHsfA2e* enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, 227:957–967.

**Yu, D., Tang, H., Zhang, Y., Du, Z., Yu, H., Chen, Q. 2012.** Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (*Fragaria×ananassa*) *Journal of Agricultural Science*, 4(7): 51-56.

**Zabetakis, I., Holden, MA. 1997.** Strawberry flavor: analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74: 421–434.

**Zhang, J., Klueva, N.Y., Wang, Z., Wu, R., David Ro, T-H., Nguyen, H.T. 2000.** Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 36: 108–114.

**Zhang, W., Zhou, R.G., Gao, Y.J., Zheng, S.Z., Xu, P., Zhang, S.Q., Sun, D.Y. 2009.** Molecular and genetic evidence for the key role of *AtCaM3* in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 149: 1773–1784.

**Zhang, X., Allan, A.C., Yi, Q., Chen, L., Li, K., Shu, Q., Su, J. 2011.** Differential gene expression analysis of yunnan red pear, *Pyrus pyrifolia*, during fruit skin coloration. *Plant Mol Biol Rep.*, 29: 305–314.

**Zhang, Y., Mao, L., Wang, H., Brocker, C., Yin, X., Vasiliou, V., Fei, Z., Wang, X. 2012.** Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS ONE*, 7(2). e32153. doi:10.1371/journal.pone.0032153.

**Zhang, Y., Xu, L., Zhu, X., Gong, Y., Xiang, F., Sun, X., Liu, L. 2013.** Proteomic analysis of heat stress response in leaves of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Mol Biol Rep.*, 31:195–203.

**Zhao, T., Liang, D., Wang, P., Liu, J., Ma, F. 2012.** Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Mol Genet Genomics*, 287: 423–436.

## EKLER

### EK-1

#### QRT-PCR'da Kullanılan Primerler

1	TCTP-F TCTP-R	ATTGGTGCAAATCCTTCTGC GAGGTTGCTCCTGGAGTCTG
2	AKR-F AKR-R	CAAGCCTGGGAAGTTGAGTC GTGAGGCCAAGTCTCTGAGC
3	Fra.a1b-F Fra.a1b-R	ACACCAAGGGAGATGTCTGAG TGGGTGGTCCTTGAGGTATC
4	HSP90 $\alpha$ 1-like-F HSP90 $\alpha$ 1-like-R	GGATGCGAAATTCAAAGGAA ATTCCACCTCACCTCAGTG
5	peroxisomal-F peroxisomal-R	GGAAGGTGGGAAAGAGGAAG TTTTCCGGCAACTCAATTTC
6	17,3kDa HSP-like-F 17,3kDa HSP-like-R	AAGAAGAAGCCCGACCACTT AATGTTACCCGCATCTGAGC
7	17,5kDa HSP-like-F 17,5kDa HSP-like-R	ACAAGTGGCATAGGGTGGAG TAAGCACCCGTTCTTCATC
8	18,1kDa HSP-like-F 18,1kDa HSP-like-R	ACGTAGTCGTGGCAAGTTCC ACCTCCTGCTTGGGGATAGT
9	18,2kDa HSP-like-F 18,2kDa HSP-like-R	GAACAGCAACAGCATCTTCG TTCTCGCGAGGGAAAGTAGA
10	LOC101300322-F LOC101300322-R	GAACAGCAACAGCATCTTCG TCGCGAGGGAAAGTAGAGAG
11	transcriptvariant2-F transcriptvariant2-R	GGAGGCTCATGTCTTCAAGG TGTGCCACTTGTCGTTCTTC
12	LOC101298584-F LOC101298584-R	AGAAGCCCATGTGTTCAAGG TGCCACTTGTCGTTCTTGTC
13	transcriptvariant3-F transcriptvariant3-R	GGAGGCTCATGTCTTCAAGG TGTGCCACTTGTCGTTCTTC
14	transcriptvariant1-F transcriptvariant1-R	GAAGAACGACAAGTGGCACA GGGCACAGTCACAGTAAGCA

15	LOC101314220-F LOC101314220-R	GAAGAACGACAAGTGGCACA GGGCACAGTCACAGTAAGCA
16	transcriptvariant1*-F transcriptvariant1*-R	GGAGGCTCATGTCTTCAAGG TGTGCCACTTGTCGTTCTTC
17	LOC101303492-F LOC101303492-R	TCTCCCGGGTCCTAGAAAGT TGAAGTGATGGGTGCTGAAG
18	LOC101300604-F LOC101300604-R	CATGAAAACCTCGGCCTTTGT CACCTGTGCATCTTCGACCT
19	LOC101314702-F LOC101314702-R	CATCAAGAGCAGGGAGAAGC ACTCACCCATGGCTTTGTTC
20	LOC101295733-F LOC101295733-R	CACATCGACTTTGCCATCAC ATCTTCCTCATCGCCATCAC
21	LOC101311478-F LOC101311478-R	ATGCAAGGATGCTTTTGACC CTTGTTCTGACCCTCCTCCA
22	40S2LOC101311455-F 40S2LOC101311455-R	ACAGGCGAGAGGTTTGAAGA TGATCAGGGGAAGACACTCC
23	40S1LOC101311455-F 40S1LOC101311455-R	AGGGAGTGTCTTCCCCTGAT CAACCAAACATGACGTTGC
24	40S2LOC101309913-F 40S2LOC101309913-R	ACAAATTGGGTGGTGCATTT CCTCACGGTATGTCAGAGCA
25	40S1LOC101309913-F 40S1LOC101309913-R	ACAAATTGGGTGGTGCATTT CCTCACGGTATGTCAGAGCA
26	LOC101295509-F LOC101295509-R	ATGGATGCGAAATTCAAAGG ATTCCACCTCACCTCAGTG
27	LOC101314807-F LOC101314807-R	GCCATCAGTGAGGGAACAGT TTCCTCCCTTCATGAACCAC
28	RNApseudo5like-F RNApseudo5like-R	CTAGGAAGGGGGACTTCAGG GTGTTGGTGGTGCTGTCATC
29	IMP3like-F IMP3like-R	AGCAGATGAACCCGAATGAC CTTTCAAGCTTTGCCTGGTC

30	LOC101306542-F LOC101306542-R	GTTTAGGCACTTTGGGTTTCG TGGGAACTGTTGGCCTTAAC
31	LOC101293311-F LOC101293311-R	TTTGTGGGAGGACCAATCAT CCTCCACTCGATTTTTGAGC
32	LOC101303425-F LOC101303425-R	TTGTTCGCAGAACACTTCAGG AACCGACCCACATCTTTCAG
33	LOC101301096-F LOC101301096-R	TGCCACCAGTTTCATAGCAG GGTGGTGTGGTGAGAGAGGT
34	LOC101303661-F LOC101303661-R	CGAAGAAAGCTGCTGAAACC GGAGGTTGCAAGGAAAATGA
35	YqxC-like-F YqxC-like-R	GTGGCGGCATTGTAAGAGAT TATTTCCCTCAGCACCCCTTG
36	LMWHSP-F LMWHSP-R	GGAGGCTCATGTCTTCAAGG TGTGCCACTTGTCGTTCTTC
37	LOC101304080-F LOC101304080-R	GCTGCAGGCATATGCTAGTG CTTGTTCTGCTGCATTGCTC
38	LOC101299242-F LOC101299242-R	GAAAAGAGCGAGGGAGGAAG ACCCTCTGATTGGCTCTGTG
39	LOC101301353-F LOC101301353-R	CCACCGCCAAGAGTACTAGC CTTCTTCGAATGCAGCAGTG
40	LOC101307517-F LOC101307517-R	GAGGAAGACGACGACCAAAG AAAATGCTTGCGCTTTCCT
41	LOC101301205-F LOC101301205-R	AGGTGATCTCGTCCAACCTCG CTCAACCGCTCATTCTCCTC
42	LOC101302160-F LOC101302160-R	TCAGGTTTGAATGCCAATGA ACCAGATGCATGCCCTTTAC
43	LOC101290755-2-F LOC101290755-2-R	GGCTGAAGCTGGAACCTATGC AGAAGACATGCTTCGGTGCT
44	LOC101297339-2-F LOC101297339-2-R	TTGAGGTGGGTGAATTAGGC GCATTTCCACAACAAACGTG

45	LOC101297339-1-F LOC101297339-1-R	TGGAGCAAAGCAAACAACAG GTGTTGAGCTGCCTGACAAA
46	LOC101302336-F LOC101302336-R	GCCACTCATTGCTCTTCTCC TGTCTTCGATTCCCTCCATC
47	LOC101307359-F LOC101307359-R	GCTTTCCTGCAGCAGCTAGT AGTTTCACCACCACCAAAGC
48	LOC101302973-F LOC101302973-R	ATTTTGTGGAGCGGCTAATG TGGTCTCCACAATCACCAA
49	LOC101311435-F LOC101311435-R	GGATCGAATTTTGGGGTTTT TCATCCATCCAAACTCACCA
50	LOC101295258-F LOC101295258-R	GCCCGACTTCAACAGAAGAG GCCCTTCCACATAAGGATCA
51	LOC101290970-F LOC101290970-R	ATCCCACAGAGTTTGCCAAG CTGCTCAGGATCAACCTTCC
52	LOC101304412-F LOC101304412-R	TGATGATGAGCATGGAGGAC GAAGCTGTTGTTGGCTCTCC
53	LOC101311180-F LOC101311180-R	ACTCTCCGGTGATGAGCTTC TGCTCCTTGAACAACCCACT
54	Fra.a1a-F Fra.a1a-R	CCCTTGGTGTGGTACTTGCT CTGAGCGACAACATCGAGAA
55	FA_SEa0007H10r-F FA_SEa0007H10r-R	CATGAGCTTGGTGTTTTGGA CAAGCAGCAAGACGTACCAA



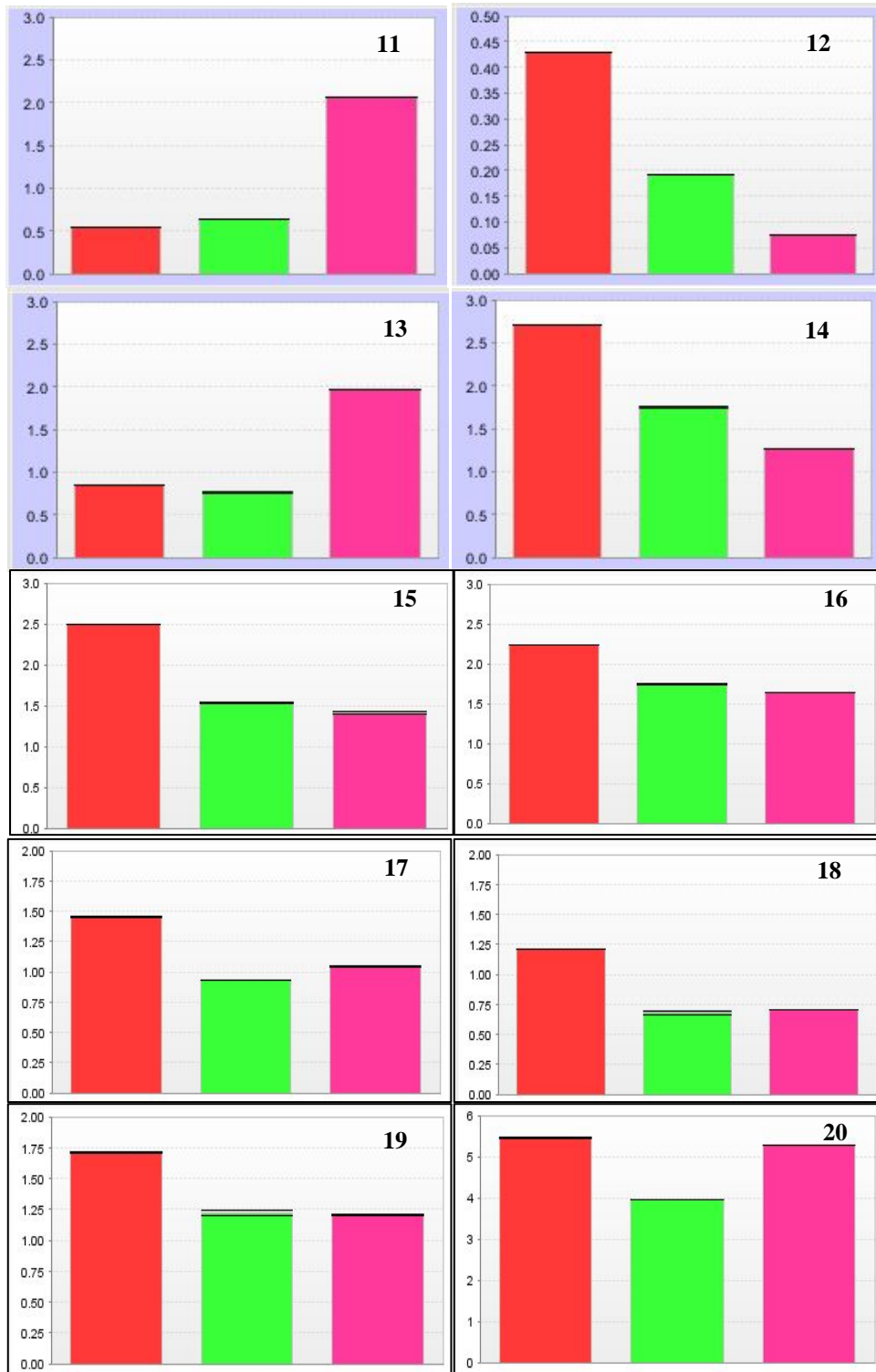
## EK-2

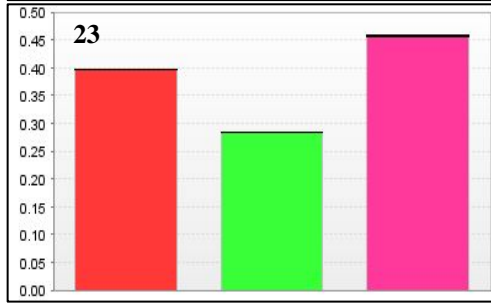
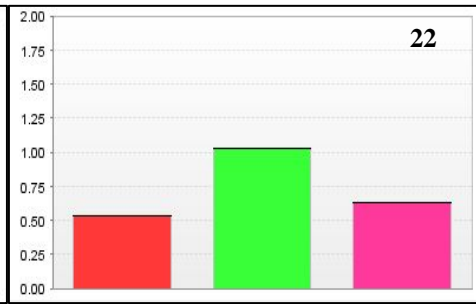
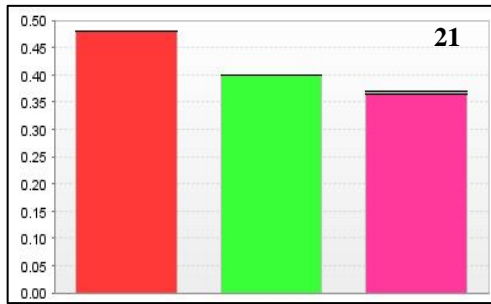
### 2D-PAGE protein noktalarının ifade seviyesi grafikleri

R. Hope çeşidine ait 2D-PAGE protein noktalarının ifade seviyesi grafikleri

■ : 35°C ■ : 40°C ■ : 45°C

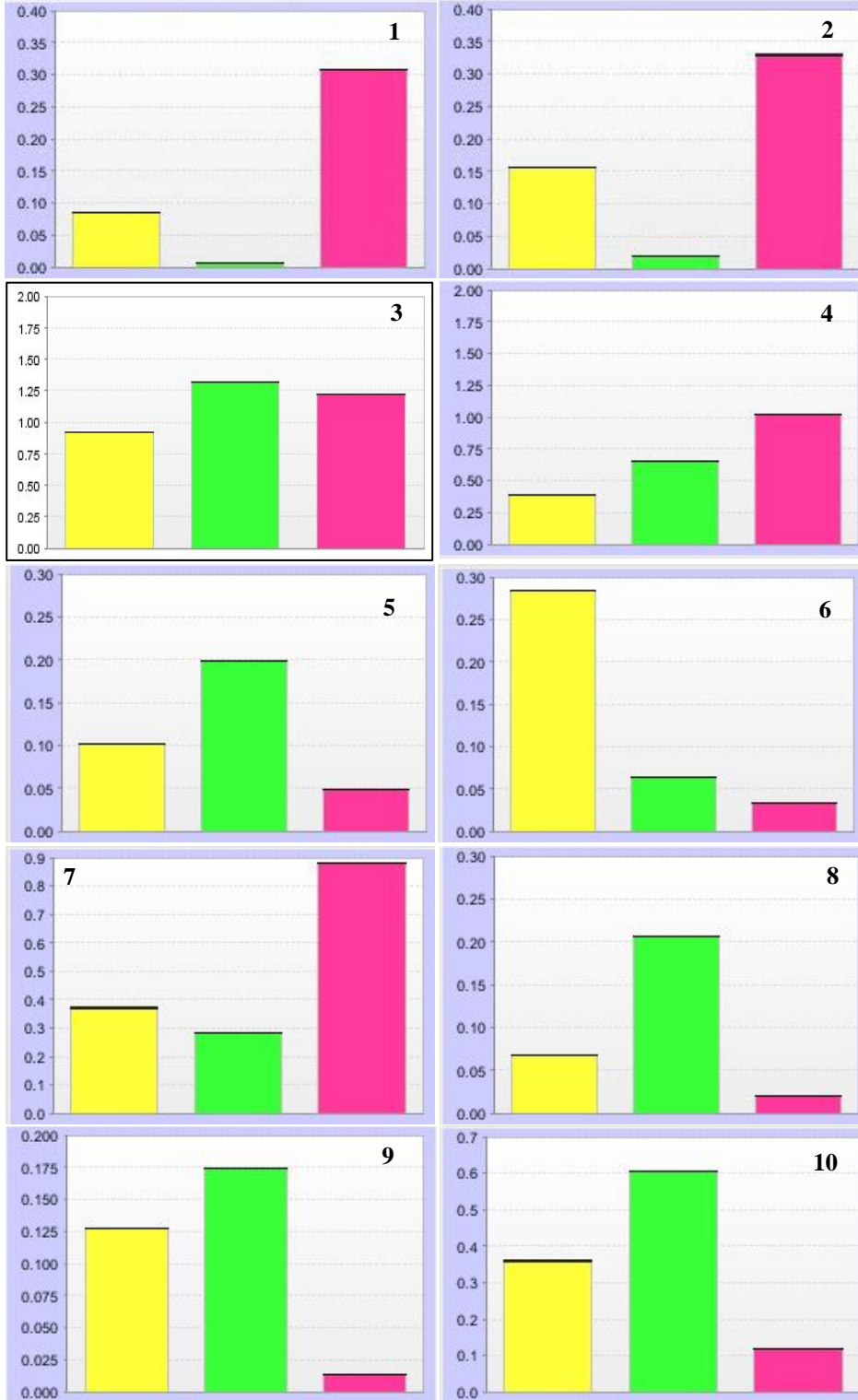


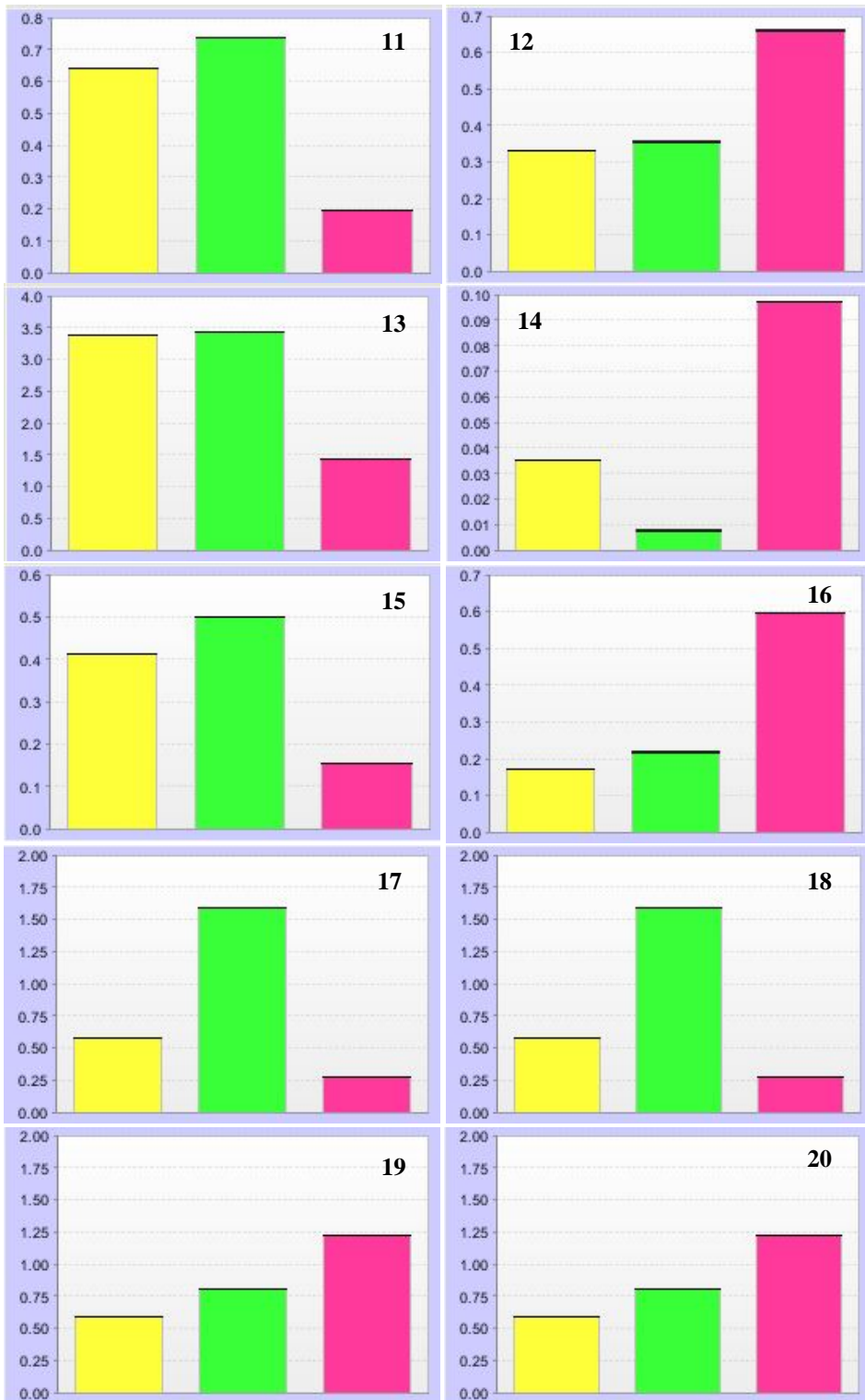


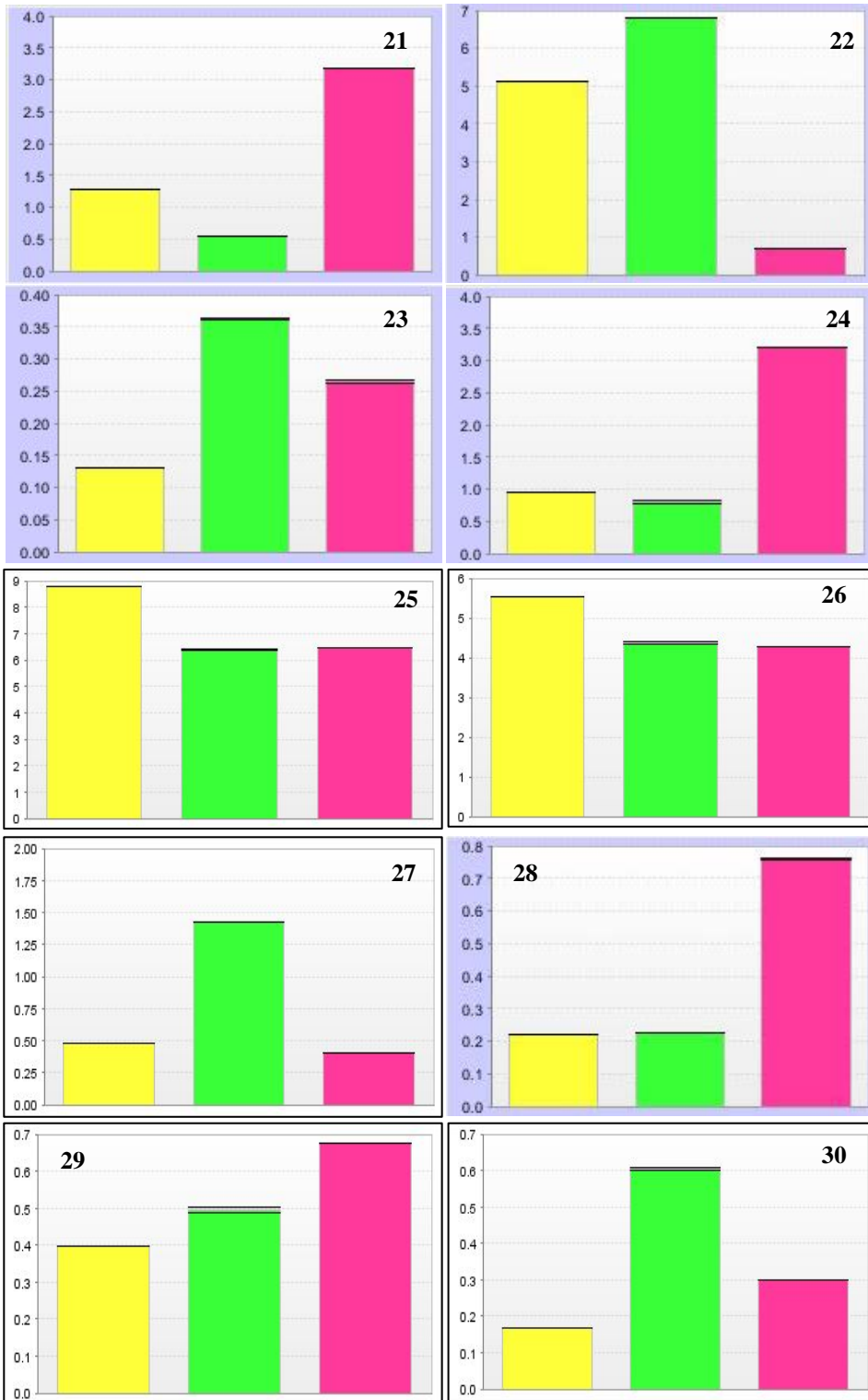


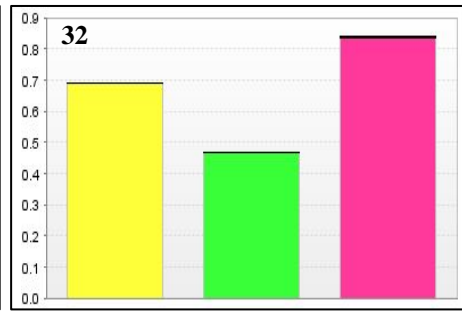
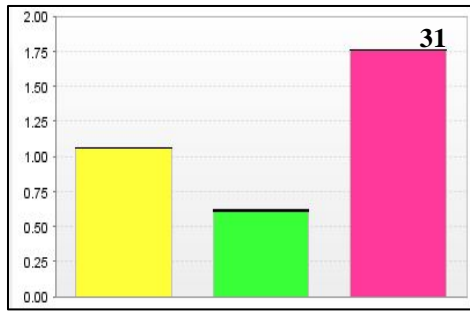
Festival çeşidine ait 2D-PAGE protein noktalarının ifade seviyesi grafikleri

■ : 35°C ■ : 40°C ■ : 45°C









**EK-3****İnteraksiyon Tablosu**

Bağımlı Değişken: Zararlanma

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Önem Derecesi
Düzeltilmiş Model	33967,985(a)	7	4852,569	64,984	,000
Kesişme	15191,701	1	15191,701	203,442	,000
Çeşit	776,629	1	776,629	10,400	,000
Uygulama	30989,208	3	10329,736	138,333	,000
Çeşit * Uygulama	2155,327	3	718,442	9,621	,000
Hata	3210,949	43	74,673		
Toplam	51108,270	51			
Düzeltilmiş Toplam	37178,934	50			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Bağımlı Değişken: Protein Miktarı

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Önem Derecesi
Düzeltilmiş Model	72,215(a)	9	8,024	50148,991	,000
Kesişme	574,131	1	574,131	3588320,333	,000
Çeşit	6,202	1	6,202	38760,333	,000
Uygulama	57,284	4	14,321	89505,542	,000
Çeşit * Uygulama	8,729	4	2,182	13639,604	,000
Hata	,003	20	,000		
Toplam	646,349	30			
Düzeltilmiş Toplam	72,218	29			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Müge KESİCİ ZENGİN  
Doğum Yeri ve Tarihi : BURSA /1983  
Yabancı Dili : İngilizce, Almanca  
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)  
Lise : Özel Tan Lisesi / 2000  
Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2006  
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2009  
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Uludağ Üniversitesi / 2010-....  
İletişim (e-posta) : mkesici@uludag.edu.tr  
Yayınları :

**Kesici, M., Ergin, S., Gulen, H., Turhan, E., Ipek, A., Koksal, N. 2013.** Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars. Not Bot Horti Agrobo 41(1):1-6.

**Kesici, M., Cansev, A. 2013.** Changes in antioxidant enzyme activities during cold-acclimation in sweet cherry cultivars grafted on different rootstocks. J. Food Agr. Environ. 11(1): 522-527.

**Ergin, S., Kesici, M., Gülen, H. 2012.** Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Peroxidase Activities in Strawberry Plants Under Heat Stress. J.Agric.Fac.HR.U. 16(1):25-35.

**Ergin, S., Gulen, H., Turhan, E., İpek, A., Koksal, N., Kesici, M. 2012.** Protein in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) under heat stress. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 September, 2012, Istanbul, New Biotechnology, Abstract Book, p, 22.

**Zaimoglu, Z., Gulen, H., Bostan Budak, D., Ergin, S., Kesici, M. 2012.** The assessment of the behavior of nanoparticles in environmental systems for sustainable development. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 September, 2012, Istanbul, New Biotechnology, Abstract Book, p, 220.

**Cansev, A., Kesici, M., Ergin, S., Gulen, H. 2012.** Effects of high temperature stress on total phenolic content and antioxidant capacity in strawberry plants. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 September, 2012, Istanbul, New Biotechnology, Abstract Book, p, 120.

**Kesici, M., Cansev, A., Ergin, S., Gulen, H. 2012.** Protein and peroxidase activity in strawberry plants under the combined effects of drought, low and high temperature. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 September, 2012, Istanbul, New Biotechnology, Abstract Book, p, 185.

**Zaimoglu, Z., Koksal, N., Basci, N., Kesici, M., Gulen, H. and Budak, F. 2011.** Antioxidative enzyme activities in Brassica juncea L. and Brassica oleracea L. plants under chromium stress. J. Food Agr. Environ. 9(1): 676-679.

- Barut, E., Gülen, H., Cansev, A. ve Kesici, M. 2011.** Bursa ilinin meyve üretim potansiyeli. TMMOB Bursa İl Koordinasyon Kurulu Bursa 3. Kent Sempozyumu, 29-30 Nisan 2011, Bursa, Bildiriler Kitabı, 82-87.
- Gülen, H., Cansev, A., Kesici, M., Ergin, S., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N. 2011.** Çilek yaprak dokularının toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi. Uluslar arası Katılımlı I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir, Bildiriler Kitabı, Cilt I, 817-822.
- Gülen, H., Kesici, M., Ergin, S., Demir, S., Zaimoğlu Z., Eriş, A. 2011.** Kadmiyum uygulamalarının çilek bitkisindeki peroksidaz izoenzim aktivitesine etkisi. Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-8 Ekim 2011, Şanlıurfa, Özet Kitabı, 5.
- Barut, E., Gülen, H., Cansev, A., Ergin, S., Kesici, M. 2011.** Marmara bölgesi meyveciliği. Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-8 Ekim 2011, Şanlıurfa, Özet Kitabı, 9
- Gülen, H., Ergin, S., Kesici, M., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N. 2011.** Çilekte yüksek sıcaklığa bağlı çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranı. Uluslar arası Katılımlı I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir, Bildiriler Kitabı, Cilt I, 811-815.
- Gülen, H., Turhan, E., İpek, A. Köksal, N., Ergin, S., Kesici, M., Eriş, A. 2011.** Çilek bitkisinin yüksek sıcaklığa toleransında moleküler değişimler. Uluslar arası Katılımlı I. Ali Numan Kırac Tarım Kongresi, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir, Özetler Kitabı, 103.
- İpek, A., Gülen, H., Akçay, M. E., İpek, M., Ergin, S., Eriş, A. 2010.** Bazı yerel kiraz çeşitlerimizde S-allellerinin PCR yöntemi ile belirlenmesi. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya, Bildiri Özetleri, p.6.
- Çetinkaya, C., Kesici, M., Ergin, S., Gülen, H. 2010.** Kuraklık ve geri kazanım uygulamalarında bazı çilek çeşitlerinin prolin ve peroksidaz aktivitesi. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya, Bildiri Özetleri, p.13.
- Gülen, H., Atlar, S., Kesici, M., Köksal, N. 2009.** Soğuğa Alıştırma Uygulamasının Çilek Bitkisinin Düşük Sıcaklığa Toleransına Etkisi. III. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu. 1:49.
- Gülen, H., Cansev, A., Kesici, M., Atlar, S., Aydoğan, Ç. 2009.** Düşük Sıcaklık Uygulamasının Çilek Bitkisindeki Bazı Fenotipik Özelliklere Etkisi. III. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu. 1:48.
- Gülen, H., Turhan, E., İpek, A., Köksal, N., Cansev, A., Kesici, M., Eriş, A. 2007.** Bazı Çilek Çeşitlerinde Yüksek Sıcaklığa Toleransın Belirlenmesi. V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 4-7 Eylül 2007, Erzurum, Bildiriler Kitabı, Cilt 1, 32-36.