

Badem Genotiplerinde Soğuğa Tolerans Genlerinin (PDCBF1 ve PDCBF2) Gen İfade Profillerinin Belirlenmesi

Yeşim OKAY¹, Başak ÖZDEMİR^{2*}, Canan YÜKSEL ÖZMEN³, Ali ERGÜL⁴

¹Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara; ORCID: 0000-0003-1491-2564

²Dr., T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Ankara; ORCID: 0000-0001-5303-3154

³Dr., Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara; ORCID: 0000-0002-4421-1358

⁴Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara; ORCID: 0000-0002-1205-268X

ÖZ

Ilıman iklim meyve türlerinden olan badem (*Prunus dulcis*) yetiştiriciliğinde ilkbahar geç donları üretimi kısıtlayan ve türün yetiştirilme ekolojisini belirleyen stres koşullarının başında gelmektedir. Bitkilerde soğuğa tolerans konusundaki seleksiyonlar çoğunlukla fenolojik gözlemlere dayandırılmaktadır. Türe ait çeşitlerde genetik varyasyon düşük olmakla birlikte toleransta da farklılıklar görülmekte, bunun temelinde ise bireyler arası genetik mekanizma farklılığı rol oynamaktadır. Bu çalışmada, çiçeklenme süresi bakımından farklılık gösteren yabancı badem türleri (*Amygdalus arabica*, *A. orientalis*), yerel ve ticari badem çeşitleri de dahil olmak üzere 16 badem genotipinde, soğuğa toleransta anahtar düzenleyici olduğu düşünülen CBF genlerinin (PdCBF1, PdCBF2) real-time PCR ile gen ifade analizleri gerçekleştirilmiş ve soğuğa toleranslılıkla ilgili genotipler arası karşılaştırmalar yapılmıştır. Analizler sonucunda, hem PdCBF1 hem de PdCBF2 geninde en fazla gen ifade artışı Bertina çeşidinde (sırası ile 99.63 kat ve 78.62 kat) olurken, en fazla gen ifade azalışı ise Ferraduel çeşidinde (sırası ile -59.30 ve -77.70 kat) tespit edilmiştir. Diğer yandan, Gülcan 2, Ferraduel ve Primorski çeşitlerinde ise her iki gen bakımından da gen ifade azalışı gözlemlenmiş olup, bu genotiplerin soğuğa toleranslı olabilecekleri düşünülmektedir. Çalışma bulgularının bademde soğuğa tolerans ile ilgili yapılacak gen düzeyindeki diğer çalışmalara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Prunus dulcis*, badem, soğuğa tolerans, gen ifadesi, real-time PCR

Determination of Gene Expression Profiles of Cold Tolerance Genes (PDCBF1 and PDCBF2) in Almond Genotypes

ABSTRACT

In the cultivation of almond (*Prunus dulcis*), which is one of the temperate climate fruit species, late spring frosts are the leading stress conditions that limit production and determine the growing ecology of the species. Not only genetic variation is low in cultivars belonging to the species, but also differences in tolerance are observed. Genetic mechanism differences between individuals play a role on the basis of this. In this study, gene expression of CBF genes (PdCBF1, PdCBF2), which is thought to be a key regulator of cold tolerance, was determined by Real-Time PCR in 16 almond genotypes, including local and commercial almond varieties of wild almond species (*Amygdalus arabica*, *A. orientalis*) that differ in flowering time. As a result of the analysis, the highest gene expression increases in both PdCBF1 and PdCBF2 genes was detected in Bertina cultivar (99.63-fold and 78.62-fold, respectively) while the highest gene expression decrease was detected in Ferraduel cultivar (-59.30-fold and -77.70-fold, respectively). On the other hand, a decrease in gene expression was observed in Gülcan 2, Ferraduel, and Primorski cultivars in terms of both genes, and it is thought that these genotypes may be cold tolerant.

Keywords: *Prunus dulcis*, almond, cold tolerance, gene expression, real-time PCR

GİRİŞ

Badem erken çiçeklenen bir meyve türü olup, genellikle ilkbahar geç donlarından olumsuz etkilenmektedir. Badem yetiştiriciliğinde erken çiçeklenme nedeniyle ortaya çıkan soğuk zararları ve çeşitlerin soğuğa dayanım toleranslarının farklılıklar göstermesi, bademde çiçeklenme ve soğuğa dayanım

mekanizmaları konularındaki çalışmalarını gündeme getirmiştir.

C-tekrar bağlama faktörleri (CBF'ler), soğuğa toleranslılıkla ilişkili bileşenler olarak değerlendirilmekte olup [1, 2, 3, 4], CBF genlerinin soğuğa toleransta anahtar düzenleyici olduğu düşünülmektedir. CBF1, 2 veya 3 genlerinin yüksek gen ifadesinin *Arabidopsis thaliana* türünde don toleransının artırılmasına yönelik olduğu belirtilmiş

*Sorumlu yazar / Corresponding author: basakcnr87@hotmail.com

[5], CBF'nin COR genlerinin ifadesini başlattığı ve bu genlerin bitkinin soğuğa toleransının gelişiminde temel rol oynadığı ifade edilmiştir [6]. CBF genleri, soğuğa duyarlı (COR) genlerin promotörlerine bağlanmakta ve bu genlerin transkripsiyonunu teşvik ederek bitkilerde soğuğa toleransın artmasına neden olmaktadır. CBF genlerinin ifadesi düşük sıcaklık koşullarında oluşmakta ve COR genlerinin ifadesini aktive etmektedir. Bitkiler normal gelişme sıcaklıklarından düşük sıcaklığa geçtikçe, CBF ve COR genlerinin gen ifadeleri önemli ölçüde ve hızlı bir şekilde (yaklaşık 15 dakika içinde) artış göstermiştir [7]. Önceki çalışmalar arabidopsisteki her bir CBF geninin artan ifade düzeylerinin soğukla ilişkili genlerin ifadesini başlattığını ve düşük sıcaklık uyarısı olmadan soğuğa toleransı artırdığını göstermiştir [7, 9, 8].

Bu çalışmada, çiçeklenme süresi bakımından farklılık gösteren yabancı badem türleri (*Amygdalus arabica*, *A. orientalis*), yerel ve ticari badem çeşitleri de dahil olmak üzere toplam 16 badem genotipinde, soğuğa toleranslılıkla ilişkili olduğu bilinen *Prunus dulcis* C-tekrar bağlama faktörleri genlerinden PdCBF1 ve PdCBF2 genlerinin, gen ifade analizleri real-time PCR tekniği ile incelenmiş ve bu genotiplerin soğuğa toleranslılıkla ilişkili genlerin ifade (ekspresyon) profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitkisel Materyal ve Bitki Yetiştirme

Bitkisel materyal olarak; Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü (Gaziantep-Türkiye) koleksiyon parselinde bulunan badem genotipleri kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan badem genotipleri

| No | Genotip ve Çeşitler | Çeşit türü | Çiçeklenme özelliği |
|----|----------------------|------------|---------------------|
| 1 | <i>A. arabica</i> | Yabancı | Erken |
| 2 | <i>A. orientalis</i> | Yabancı | Erken |
| 3 | Akbadem | Yerli | Erken |
| 4 | Araban 96 | Yerli | Geç |
| 5 | Araban 136 | Yerli | Geç |
| 6 | Bertina | Yabancı | Geç |
| 7 | Garrigues | Yabancı | Erken |
| 8 | Gülcan 2 | Yerli | Geç |
| 9 | Ferraduel | Yabancı | Geç |
| 10 | Ferragnes | Yabancı | Geç |
| 11 | Nurlu | Yerli | Erken |
| 12 | Primorski | Yabancı | Geç |
| 13 | Supernova | Yabancı | Geç |
| 14 | Yavuzeli 102 | Yerli | Geç |
| 15 | 17-4 | Yerli | Erken |
| 16 | 48-1 | Yerli | Erken |

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne (Ankara-Türkiye) getirilen genotiplere ait dallar,

hava üfleyicilerle havalandırılan Hoagland besin solüsyonu [10] içerisine konularak, iklim odası koşullarında (25°C'de 16/8 saat gündüz/gece fotoperiyotta) sürmeye bırakılmıştır [11].

Soğuk Stresi Örnekleme ve Uygulaması

Referans çeşitlerde (Bertina, Ferragnes, 48-1, Nurlu) CBF1 ve CBF2 genlerinin gen ifade analizlerindeki ön analizler sonucu, 6. saat zaman aralığı soğuk stresi zamanı (time-point) olarak seçilmiştir. Çiçeklenme zamanının son gününde toplanan pembe tomurcuklar, kontrol örnekleri olarak kullanılmıştır. Tüm genotiplerin tomurcukları soğuk uygulaması kapsamında 3 tekerrürlü olarak steril kâğıt peçetelerde muhafaza edilerek -2°C'de 6 saat soğuk stresine maruz bırakılmıştır.

Real-Time PCR ile Gen İfade Analizleri

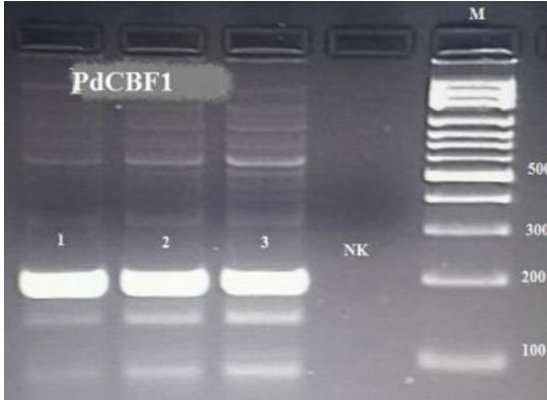
•*RNA izolasyonu:* Tomurcuklarda, SV Total RNA İzolasyon kiti (Promega Cat no: Z3100) kullanılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. RNA kalite ve miktar ölçümleri, %1'lik agaroz jel elektroforezi ve Nanodrop (ND 1000) spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

•*Kullanılan aday genlere ve primerlere ait bilgiler:* PdCBF1 (Badem, NCBL (National Center for Biotechnology Information) gen bankası aksesyon kodu: JQ317157.1), PdCBF2 (Badem, NCBL gen bankası aksesyon kodu: JQ317158.1) aday genleri [12, 13] kullanılmış olup, bu aday genlere yönelik primerler ise Primer 3 programı ile dizayn edilmiştir.

•*Homolog gen bölgelerinin (aday gen primerlerinin) PCR'da çoğaltılması:* PdCBF1 ve PdCBF2 gen bölgelerinin mRNA dizilimlerine yönelik dizayn edilen primerler ile çeşitli ön PCR optimizasyon (PCR koşulları: 200 ng DNA 6 µl, 5X Buffer 5 µl, 0.5 mM dNTP 1 µl, MgCl₂ (25 mM) 2.5 µl, İleri Primer (10 pmol) 2 µl, Geri Primer (10 pmol) 2 µl, Taq Polimeraz (5 ünite) 0.3 µl olacak şekilde toplam 25 µl) reaksiyonları (Touch down PCR; 94°C'de 3 dk., 94°C'de 1 dk., 65-56°C arasında 1 dk. 45 s, 72°C'de 2 dk., 72°C'de 10 dk. olmak üzere toplam 25 döngü) gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 100 bç (baz çifti) DNA Ladder (Solis Biodyne-100 bç Ladder) eşliğinde yaklaşık 45 dakika yürütülmüş ve her bir gen bölgesine ait beklenen büyüklüğe (bç) sahip bantlar (Şekil 1) UV görüntüleme sistemi (Uvitek, UK) altında steril bisturi yardımıyla kesilmiş, darası alınan steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere konulmuştur.

•*PCR ürünlerinin pürifikasyonu:* Pürifikasyon amaçlı, Wizard SV Gel ve PCR Clean-Up System (Promega, Cat No: A9280), kit kullanılmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünlerinde dizi analizi, hizmet

alımını (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara-Türkiye) şeklinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. PdCBF1 primerlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde 3 reaksiyonda (1, 2 ve 3 no.lu bant) PCR amplifikasyonları (M: marker, NK: negatif kontrol)

•*Dizi analizi sonrasında homolog gen bölgelerinden badem spesifik real-time PCR primerlerinin oluşturulması:* Elde edilen dizilerden NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yardımı ile yeniden primer dizaynı yapılarak, badem spesifik real-time PCR primerleri oluşturulmuştur. Real-time PCR reaksiyonlarında kontrol gen (housekeeping gen) olarak ise badem Actin (NCBI gen bankası kodu: KT202283.1) geni kullanılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Real-time PCR analizlerinde kullanılan primer bilgileri (İ: ileri primer, G: geri primer)

| Gen | Primer Dizisi (5'...3') | Primer bağlanma sıcaklığı (°C) | Amplikon uzunluğu (bp) |
|--------|--|--------------------------------|------------------------|
| PdCBF1 | İ:GCTCGGGACTTATCCGACG G:GGGAAGTTGAGGCAGGCAAG | 52 | 93 |
| PdCBF2 | İ:AGGATATGGCTCGGGACGTTA G:GCTTCCCTCTAAACGCCAATC | 50 | 83 |
| PdAct | İ:AGCGGGAAATTGTCGTGAT G:AAGAGAACTTCTGGGCACCG | 58 | 172 |

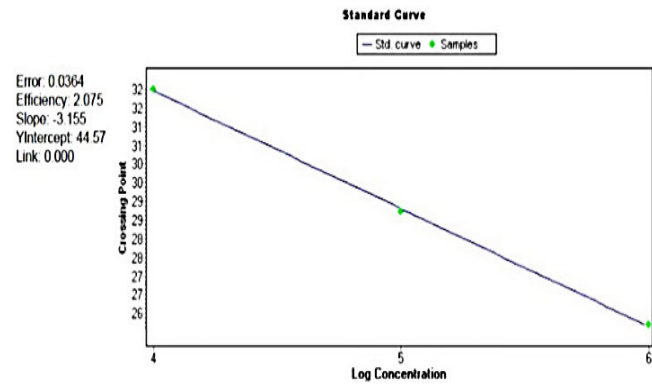
•*Real-time PCR reaksiyonlarına ait primer optimizasyonu ve standart eğrilerin oluşturulması:* cDNA sentezi için Eurx NG Dart (RT marka, Cat no: E0801) cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Her bir primer için, ön Real-Time PCR denemeleri ile optimum amplifikasyon gösteren (primer bağlanma sıcaklığı, cDNA ve primer miktarı vb.) reaksiyon koşulları belirlenmiştir (Çizelge 3).

Real-time PCR reaksiyonları hazırlanırken, her bir primere yönelik standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla, seçilen bir kontrol cDNA'sından 6 logaritmik konsantrasyonda (1/10, 1/100 gibi) olmak üzere seri seyreltmeler hazırlanmıştır. Real-Time PCR cihazına ait analiz programı ile her bir primer

için optimize edilen koşullar kullanılarak ayrı ayrı standart eğriler (efficiency: 1.7-2 ve slope değeri -3.3'e yakın olacak şekilde) çizilmiştir (Şekil 2).

Çizelge 3. PdCBF1 primerine ait örnek optimizasyon koşulları (TM: primerin optimize edilen bağlanma sıcaklığı)

| İçerik | Hacim (V/V, µl) |
|-------------------------|-----------------|
| cDNA | 1.25 |
| İleri Primeri (10 pmol) | 1 |
| Geri Primeri (10 pmol) | 1 |
| SyberGreen | 2.5 |
| TM | 52°C |
| Toplam Hacim | 5.75 |



Şekil 2. PdCBF1 primerine ait örnek standart eğri grafiği

•*Örneklerin real-time PCR cihazında yürütülmesi:* Her bir primere ait cDNA'lar ile SYBR Green Master Mix ve primer çifti karışımı real-time PCR cihazına ait 384'lük plakalara yerleştirilerek, 1500 rpm'de 2 dk. santrifüj edilmiş ve ilgili primerin optimize edilen sıcaklığı ve optimize real-time PCR programı seçilerek örnekler (3 teknik tekrarlı) yürütülmüştür. Reaksiyon sonunda amplifikasyon eğrileri ile birlikte, her bir örneğe ait Ct değerleri (cycle threshold, döngü eşik değeri) değerleri sayısal olarak elde edilmiştir. Reaksiyonlarda, dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti amaçlı erime eğrisi (melting curve) analizleri de gerçekleştirilmiştir.

•*Elde edilen real-time PCR verilerine ait istatistik analizleri:* Nispi ifade seviyeleri; 2-ΔΔCT (delta delta-Ct veya ddct) metoduna göre, p≤0.05 anlamlılık düzeyinde hesaplanmış olup örnekler için Ct değerleri Actin (PdAct) kontrol geninin ifade değeri ile normalize edilmiştir [14].

BULGULAR

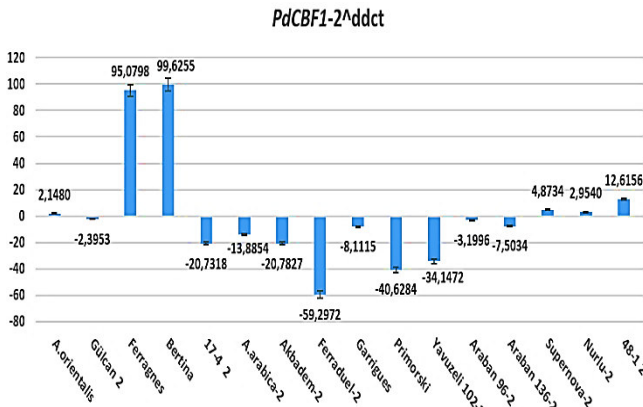
PdCBF1 gen ifadesi

Soğuğa tolerans açısından PdCBF1 geninin ifade analizinde, *A.orientalis*, Bertina, Ferragnes, Nurlu,

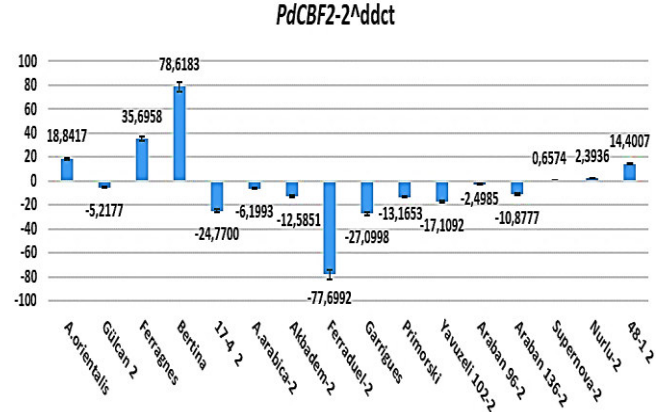
Supernova ve 48-1 çeşit ve genotiplerinde farklı katsayılar da gen ifade artışı belirlenmiştir. İfade seviyesi azalan çeşit ve genotipler ise Akbadem, *A.arabica*, Araban 96, Araban 136, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 2, Primorski, Yavuzeli 102 ve 17-4 olmuştur ($p \leq 0.05$ 'e göre istatistik olarak önemlidir). Genotipler arasında en fazla gen ifade artışı Bertina çeşidinde (99.63 kat) olurken, onu sırasıyla Ferragnes (95.08 kat), 48-1 (12.62 kat), Supernova (4.87 kat), Yavuzeli 24 (4.00 kat), Nonpareil (3.53 kat), Nurlu (2.95 kat), *A.orientalis* (2.15 kat) izlemiştir. En fazla gen ifade azalışı ise Ferraduel çeşidinde (-59.30 kat) tespit edilirken, onu sırasıyla Primorski (-40.63 kat), Yavuzeli 102 (-34.15 kat), Akbadem (-20.78 kat), 17-4 (-20.73 kat), *A.arabica* (-13.89 kat), Garrigues (-8.11 kat), Araban 136 (-7.50 kat), Araban 96 (-3.20 kat) ve Gülcan 2 (-2.40 kat) izlemektedir ($p \leq 0.05$) (Şekil 3).

PdCBF2 gen ifadesi

Soğuğa tolerans açısından PdCBF2 geninin ifade analizine göre *A.orientalis*, Bertina, Bozkurt, Ferragnes, Nurlu ve 48-1 çeşit ve genotiplerinde ifade artışı belirlenmiştir. İfade seviyesi azalan çeşit ve genotipler ise; Akbadem, *A.arabica*, Araban 96, Araban 136, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 2, Primorski, Yavuzeli 102 ve 17-4 olarak belirlenmiştir. Genotipler arasında en fazla ifade artışı Bertina çeşidinde (78.62 kat) olurken, onu sırasıyla Ferragnes (35.70 kat), *A.orientalis* (18.84 kat), 48-1 (14.40 kat) ve Nurlu (2.39 kat) izlemiştir. En fazla ifade azalışı ise Ferraduel çeşidinde (-77.70 kat) tespit edilirken, onu sırasıyla Garrigues (-27.10 kat), 17-4 (-24.77 kat), Yavuzeli 102 (-17.11 kat), Primorski (-13.17 kat), Akbadem (-12.59 kat), Araban 136 (-10.88 kat), *A.arabica* (-6.20 kat), Gülcan 2 (-5.22 kat) izlemiştir ($p \leq 0.05$) (Şekil 4).



Şekil 3. CBF1 geninde gen ifade seviyeleri (ifade katsayıları, $p \leq 0.05$)



Şekil 4. CBF2 geninde gen ifade seviyeleri (gen ifade katsayıları, $p \leq 0.05$)

PdCBF1 ve PdCBF2 gen ifadeleri açısından değerlendirme

PdCBF1 ve PdCBF2 genleri birlikte değerlendirildiğinde ise gen ifadesi artan çeşit ve genotipler *A.orientalis*, Bertina, Ferragnes, Nurlu ve 48-1 olurken, gen ifadesi azalanlar Akbadem, *A.arabica*, Araban 96, Araban 136, Ferraduel, Garrigues, Gülcan 2, Primorski, Yavuzeli 102 ve 17-4 olarak belirlenmiştir.

Orta geç ve geç çiçeklendiği bilinen Bertina ve Ferragnes çeşitlerinde PdCBF1 ve PdCBF2 genlerinin her ikisinde de ifade artışı görülmüştür. PdCBF1 genindeki ifade artışı sırasıyla 99,63 ve 95,08 kat olarak belirlenirken, PdCBF2 geninde sırasıyla 78,62 ve 35,70 kat ifade artışı tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Bu durum hem PdCBF1 hem de PdCBF2 geni bakımından, en yüksek ifade artışı gösteren Bertina çeşidinin ifade artışları ile soğuğa toleranslığı arttırmaya yönelik diğer genotiplere oranla daha yüksek derece savunma yaptığı ve bu nedenle de bu çeşidin diğer genotiplere göre soğuğa daha hassas çeşit olabileceği durumunu ortaya çıkarabilir [11].

Bu grupta yer alan Gülcan 2, Ferraduel ve Primorski çeşitlerinde ise her iki gen bakımından da ifade azalışlarının olduğu ve soğuğa toleranslı olabilecekleri görülmektedir. Bu çeşitlerde PdCBF1 genindeki ifade azalışı sırasıyla -2,40, -59,30 ve -40,63 kat; PdCBF2 genindeki ifade azalışı ise sırasıyla -5,22, -77,70 ve -13,17 kat olarak belirlenmiştir.

Erken çiçeklendiği belirtilen 48-1 ve Nurlu çeşitlerinde PdCBF1 ve PdCBF2 genlerinin her ikisinde de ifade artışı görülmüştür. PdCBF1 genindeki ifade artışı sırasıyla 12,62 ve 2,95 kat olarak belirlenirken; PdCBF2 genindeki ifade artışı sırasıyla 14,10 ve 2,39 kat ifade artışı tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Bu grupta yer alan 17-4, Garrigues ve Akbadem çeşitlerinde ise her iki gen bakımından da ifade azalışlarının olduğu görülmektedir. Bu

çeşitlerde PdCBF1 genindeki ifade azalışı sırasıyla -20.73, -8.11 ve -20.78 kat; PdCBF2 genindeki ifade azalışı ise sırasıyla -24.77, -27.10 ve -12.59 kat olarak belirlenmiştir.

Her iki gen açısından da ifade azalışı gösteren genotipler Araban 96, Araban 136 ve Yavuzeli 102 olmuştur. Bu genotiplerde PdCBF1 genindeki ifade azalışı sırasıyla -3.20, -7.50, -34.15 ve -4.83 kat, PdCBF2 genindeki ifade azalışı ise sırasıyla -2.50, -10.88 ve -17.11 olarak belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Genel olarak genotipler arasında ifade azalışı görülmektedir. 16 genotipin 10 tanesinde her iki soğuk geni ifadesi azalış (%62,5) gösterirken, 6 genotipte ifade artışı (%37,5) belirlenmiştir (Şekil 3, 4).

TARTIŞMA

Soğuk stresi bitkilerin coğrafi dağılımını sınırlar ve bitki büyümesini, gelişimini ve verimini etkilemektedir. Buna karşın bitkiler, soğuk stresine uyum sağlamak için karmaşık biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar, etkili soğuk stresine uyum için bir dizi transkripsiyon faktörü ve protein tarafından düzenlenmektedir [15]. Buna karşın CBF genleri bitkilerin maksimum donma toleransını elde etmek için soğuğa uyum sağlamada baskın rol oynamakta [16] olup, farklı birçok bitki türünde bu genlerin soğuk stresine yönelik gen ifadesine araştırmaları yapılmaktadır.

Örneğin; Çayır salkım otunda (*Poa pratensis* L.) PpCBF3 gen ifade değişimi soğuk stresi tarafından başlatılmış olup, bu gen kuraklık stresinden etkilenmemiştir [17]. Aynı çalışmada PpCBF3-transgenik arabidopsis bitkilerinde ise soğuk toleransında geç çiçeklenmeyle ve yavaş gelişimle birlikte bu gen pozitif yönde bir artış göstermiştir. Başka bir çalışmada [18] ise, yabani kavak (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa*) bitkilerinden alınan yaprak ve gövde örnekleri 1 hafta boyunca soğuk oda koşullarında (2°C 16 saat fotoperiyot) tutulduktan sonra, 4 CBF paralog (bir tek genomda gen ikilemesi ile oluşmuş, fonksiyonları farklılaşmış benzer genler) geninin (mevcut kinetik durumları çalışılmıştır. Bu genlerden, özellikle PtCBF1-4 genlerinin yaprakta, PtCBF1 ve PtCBF3 genlerinin ise gövdede önemli oranda gen ifadesinin arttığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, PtCBF1 gen ifade seviyeleri her iki doku tipinde de soğuk uygulamasından sonra 6. saatte artış göstermiş ancak sonraki saatlerde ifadesi azalmıştır. PtCBF3 gen ifadesi ise, soğuk başlangıcından hemen sonra hızlı şekilde artarak 3. saatte en yüksek seviyeye ulaşmış, 6. saat içinde ise başlangıç seviyesine dönmüştür. PtCBF2 ve PtCBF4 genleri ise yaprak

dokusunda fazla, gövdede zayıf olarak indüklenmiştir. PtCBF2 gen ifadesi yaprakta soğuk uygulamasından sonra 9. saatte, gövdede 3 ile 6 saat arası en yüksek seviyeye ulaşmıştır. PtCBF4 ifadesinin ise 3. saatte yüksek düzeye çıktığı belirtilmiştir. Bu durum soğuk stresinde, CBF gen paralog genlerinin farklı mekanizmalara yönelik gen ifade değişimlerinin farklı dokularda farklı seviyelerde gerçekleştiğini göstermektedir. Kısa süreli (2 saat) soğuk uygulamasının farklı bitki türlerindeki CBF gen ifade değişimlerine yönelik yapılan (kontrollü çevre koşulları altında) diğer araştırmalarda [18, 19, 20, 21, 22, 13], CBF geninin kısa süreli soğuk stresinde de genellikle ifade artışı gösterdiği vurgulanmıştır. Sıcaklık azalmasından hemen sonra, CBF geninin hızlı bir şekilde ifade artışı gösterdiği ve bu zamanın genellikle 2. saat ve sonrasında olduğu belirtilen bu çalışmalar, soğuk uygulaması süresinin (kısa/uzun süre) CBF gen ifade artışı durumunda etken role sahip olmadığını gösterir niteliktedir.

Bademe yakın tür olan *Prunus mume* (Japon kayısı) da kısa süreli (30 dk.) düşük sıcaklık (2°C) uygulaması sonrası farklı sürelerde toplanan (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 ve 168 saat sonra) yapraklarda, özellikle 8-12 saat sonra PmCBF genlerinin ifadelerinin arttığı gözlemlenmiştir [23]. Aynı türde yapılan diğer çalışmada ise, Guo vd. [23]'e benzer şekilde 2°C düşük sıcaklıkta, 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 120 saatlerde toplanan genç sürgünlerde CBF genlerinde (PmhCBFa, PmhCBFb, PmhCBFc) ifade artışı 2. saatte görülmüş olup, özellikle 12. saat soğuk uygulamasında ise, CBF genlerinde ifade artışı en yüksek seviyeye ulaşmıştır [24].

Bademde CBF genine yönelik dış koşullarda yapılan gen ifade çalışmasında; Eylül ayından Şubat ortasına kadar 15 gün ara ile soğuğa maruz kalan 3 farklı badem ağacında, yeşil tomurcuk, pembe tomurcuk ve tam çiçek örnekleri toplanmıştır. Gen ifade analizlerinde, PdCBF1, PdCBF2 ve PdDHN genleri soğuklama süresince ifade olmuştur [12]. Aynı çalışmada, her iki yılda da vejetatif tomurcuk patlamasıyla kış döneminde gen ifadesinde azalmanın görüldüğü ifade edilmektedir. Bu süreçteki PdCBF1, PdCBF2 ve PdDHN ifade seviyeleri sonbahardaki soğuğa alışma süresine oranla çok daha düşük olmuştur. Bu durum soğuk sinyal yolağının çiçek tomurcuğu patlamasından sonra PdCBF genleri ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Tomurcuk patlamasından sonra, sıcaklıklar hala düşük seviyedeyken çiçek tomurcuklarında ve boğumlarda PdCBF1 ve PdDHN1 genlerinde keskin bir şekilde gen ifade azalışı bulunmuştur [12]. Bu çalışmada, CBF1 geninin ifadesi 16 genotip arasından 6

genotipte (*A.orientalis*, Bertina, Ferragnes, Nurlu, Supernova ve 48-1) artış göstermiştir ($p \leq 0.05$).

In vitro koşulda, Verdeal erken çiçeklenen badem çeşidinde sürgün ucu soğuk uygulaması sonrasında ise; 1. saat sonrası PdCBF2 gen ifadesi artarken, 2. saat sonrasında ise PdCBF1 geni ifadesi artmıştır. Aynı çalışmada 8. saat sonrasında ise hem PdCBF2 hem de PdCBF1 genlerinin ifadesi artış göstermiştir [13]. Daha önce yapılan CBF geni çalışmaları ile [13, 23] uyumlu olarak; çalışmamızda tüm genotiplerde PdCBF1 ve PdCBF2 genlerinin ifade artışları ($p \leq 0.05$) 6. saatte başlamış olup, PdCBF1 geninin ifade artışı 2,15 kat (*Amygdalus orientalis*) ile 99,63 kat (Bertina) arasında görülürken, PdCBF2 geninin ifade artışı 2,39 kat (Nurlu) ile 78,62 kat (Bertina) arasında görülmüştür.

Bir başka çalışmada, erken ve geç çiçeklenen badem genotiplerine ait pembe tomurcuklar 0°C ve -2°C 'de 2 saat boyunca soğuk uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Erken çiçeklenen genotiplerde -2°C 'de PdCBF1 gen ifadesinde görülen artış, geç çiçeklenen genotiplere oranla daha düşük belirlenmiştir. PdCBF1 geninin ifadesinin 2 saat sonunda azaldığı belirtilmiştir [25]. Bu çalışmayla uyumlu olarak çalışmamızda da orta geç ve geç çiçeklendiği bilinen Bertina ve Ferragnes çeşitleri ile erken çiçeklendiği bilinen Nurlu ve 48-1 çeşitlerinde her iki gen (CBF1 ve CBF2) bakımından ifade artışı ($p \leq 0.05$) görülmüştür.

Bu çalışmada yer alan badem genotiplerinde soğuk toleransına yönelik CBF geni ile ilişkili daha önce yapılmış bir araştırma bulgusu bulunmamaktadır. Bu nedenle bu genle ilişkili olarak çeşitlerin soğuğa toleranslılık düzeyleri hakkında net bir karşılaştırma yapılamamıştır. CBF genlerinin, soğuğa duyarlı (COR) genlerin promotörlerine bağlanması ve bunların transkripsiyonunu teşvik ederek bitkilerde soğuğa toleransın artmasına neden [7, 5, 24] doğrultusunda; bulgularımızda CBF gen ifadesinde azalış görülen genotiplerin soğuğa toleranslı oldukları düşünülmektedir. Diğer bir deyişle hassas genotiplerde soğuğa tolerans mekanizmasının düzenlenmesi CBF genlerinin ifade artışı ile sağlanmaktadır. Farklı türlerde CBF genine yönelik yapılan benzer gen ifadesi çalışmaları da [2, 21, 26, 27, 11] bu durumu desteklemektedir. Bu doğrultuda; Ferraduel, Garrigues, 17-4, Yavuzeli 102, Primorski, Akbadem, Araban 136, *A.arabica*, Araban 96, Gülcan 2 çeşit ve genotiplerinde gen ifade azalışının görülmesi, soğuk uygulamalarından bu çeşit ve genotiplerin daha az etkilendiğini ve bu nedenle soğuğa toleranslı olarak kabul edilebilecekleri yaklaşımını göstermektedir. CBF genlerinin gen ifade sonuçlarının, soğuğa toleranslılık durumunun daha net şekilde ortaya konulması için

detaylı fizyolojik soğuk zararı çalışmalarına da gerek duyulmaktadır.

Bu çalışma, gelecekteki CBF genleri ile ilgili olarak transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyon çalışmalarına yeni bilgiler sağlayabilecek ve ayrıca farklı badem genotiplerinde bu genler ile ilişkili soğuk stresi toleransının anlaşılmasına katkı sağlayacak faydalı veriler sunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 17L0447001, 2019 numaralı projenin bir bölümüdür. Teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Gilmour, S.J., Fowler, S.G., Thomashow, M.F. 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2 and CBF3 have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 54:767-781.
2. Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van, Buskirk, H.A., Fowler, S.G., Thomashow, M.F. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant Journal* 41:195-211.
3. Park, S., Lee, C.M., Doherty, C.J., Gilmour, S.J., Kim, Y. vd. 2015. Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low temperature regulatory network. *Plant Journal* 82(2):193-207.
4. Shi, Y., Ding, Y., Yang, S. 2015. Cold Signal Transduction and Its Interplay with Phytohormones During Cold Acclimation. *Plant Cell Physiology* 56(1):7-15.
5. Owens, C.L., Thomashow, M.F., Hancock, J.F., Iezzoni, A.F. 2002. CBF1 Orthologs in Sour Cherry and Strawberry and the Heterologous Expression of CBF1 in Strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:489-494.
6. Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2012. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms* 1819:86-96.
7. Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F. 1998. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal* 16(4):433-442.

8. Thomashow, M.F. 2001. So, what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology* 125:89-93.
9. Medina, J., Bagues, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., Salinas, J. 1999. The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* 119:463-470.
10. Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The after-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular* 347:1-32.
11. Özdemir, B., Okay, Y., Sarıkamış, G., Özmen, Y., Kibar, U. 2021. Crosstalk between flowering and cold tolerance genes in almonds (*Amygdalus* spp.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 45(4):484-494.
12. Barros, P.M., Gonçalves N., Nelson J.M., Saibo N.J.M., Oliveira M.M. 2012-a. Functional characterization of two almond C-repeat binding factors involved in cold response. *Tree Physiology* 32:1113-1128.
13. Barros, P.M., Gonçalves N., Nelson J.M., Saibo N.J.M., Oliveira M.M. 2012-b. Cold acclimation and floral development in almond bud break: insights into the regulatory pathways. *Journal of Experimental Botany* 63(12):4585-4596.
14. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4):402-8.
15. Hwarari, D., Guan, Y., Ahmad, B., Movahedi, A., Min, T., Hao, Z., Yang, L. 2022. ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3):1549.
16. Song, Y., Zhang, X., Li, M., Yang, H., Fu, D., Lv, J., Yang, S. 2021. The direct targets of CBFs: in cold stress response and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 63(11):1874-1887.
17. Zhuang, W., Gao, Z., Wang, L., Zhong, W., Ni, Z., Zhang, Z. 2013. Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA4 in Japanese apricot flower bud dormancy release. *Journal of Experimental Botany* 64:4953-4966.
18. Benedict, C., Skinner, J.S., Meng, R., Chang, Y., Bhalarao, R., Huner, N.P., Finn, C.E., Chen, T.H., Hurry, V. 2006. The CBF1-dependent low temperature signaling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant and Cell Environment* 29:1259-1272.
19. El Kayal, W., Navarro, M., Marque, G., Keller, G., Marque, C., Teulieres, C. 2006. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *J. Exp. Bot.* 57:2455-2469.
20. Welling, A., Palva, E.T. 2008. Involvement of CBF transcription factors in winter hardiness in birch. *Plant Physiol.* 147:1199-1211.
21. Navarro, M., Marque, G., Ayax, C., Keller, G., Borges, J.P., Marque, C., Teulieres, C. 2009. Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. *J. Exp. Bot.* 60:2713-2724.
22. Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T., Macarasin, D. 2011. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta* 233:971-983.
23. Guo, C., Zhang, J.Q., Peng, T., Bao, M.Z., Zhang, J.W. 2014. Structural and expression analyses of three PmCBFs from *Prunus mume*. *Biologia Plantarum* 58:247-255.
24. Peng, T., Guo, C., Yang, J., Xu, M., Zuo, J., Bao, M. and Zhang, J. 2016. Overexpression of a Mei (*Prunus mume*) CBF gene confers tolerance to freezing and oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 126, 373-385.
25. Alisoltani, A., Shiran, B., Fallahi, H., Ebrahimie, E. 2015. Gene regulatory network in almond (*Prunus dulcis* Mill.) in response to frost stress. *Tree Genetics and Genomes* 11(5):1-15.
26. Liang, L., Zhang, B., Yin, X., Xu, C., Sun, C., Chen, K., 2013. Differential Expression of the CBF Gene Family During Postharvest Cold Storage and Subsequent Shelf-Life of Peach Fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31:1358-1367.
27. Jiao, Y., Shen, Z., Yan, J. 2017. Transcriptome analysis of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) stigma in response to low-temperature stress with digital gene expression profiling. *Journal Plant Biochemistry and Biotechnology* 26(2):141-148.