



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FASULYE BİTKİSİNDEN *PVLEA5* GENİNİN KLONLANMASI VE TÜTÜN
BİTKİSİNE AKTARILARAK FONKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELİF SEDA ATABAY
(13210029)

Tezin Savuma Tarihi : 11.03.2016

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS

Bu Yüksek Lisans Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi
PYO.ZRT.1904.15.006 nolu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında
Elif Seda ATABAY Tarafından Hazırlanan

**FASULYE BİTKİSİNDEN *PVLEA5* GENİNİN KLONLANMASI VE
TÜTÜN BİTKİSİNE AKTARILARAK FONKSİYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından .../.../... tarihinde yapılan sınav ile
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

Başkan : **Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU**
Kastamonu Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS**
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

.../.../2016

Prof. Dr. Hüseyin DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde ve bu çalışmanın her aşamasında bilgi, öneri, deneyim ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımı izleyen ve yön veren danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Musa KAVAS'a,

Yüksek lisans süresince çalışmalarım sırasında beni motive eden, destek ve dualarıyla her zaman yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım Samuel Aduse POKU ve Gökhan GÖKDEMİR'e

Uzakta oldukları halde eksikliklerini hiç hissettirmeyen, varlıklarıyla hayatıma en değerli anlamları katan, her zaman beni destekleyen ve fedakarlıktan hiç kaçınmayan canım aileme,

Neşe ve motivasyon kaynaklarım, yeğenlerim Çağan ve Defne'ye sonsuz teşekkür ederim.

MART 2016

Elif Seda ATABAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xiii
ÖZET.....	xv
ABSTRACT	xvii
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1
1.1.1 Fasulye bitkisinin tarihçesi.....	2
1.1.2 Fasulye bitkisinin ekonomik önemi, dünya ve Türkiye’de üretimi	2
1.1.3 Fasulye bitkisinin iklim ve toprak istekleri.....	4
1.2 Bitkilerde Stres	5
1.2.1 Kuraklık stresi (Su stresi).....	6
1.2.2 Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkileri	7
1.2.2.1 Kuraklık stresinin mekanik etkileri.....	7
1.2.2.2 Kuraklık stresinin metabolik etkileri.....	7
1.2.2.3 Kuraklık stresinin oksidatif etkileri.....	8
1.2.3 Kuraklık stresinin fotosentez üzerindeki etkisi.....	8
1.2.4 Kuraklığa karşı geliştirilen uyum mekanizmaları	9
1.2.2 Tuz stresi	9
1.2.3 Bitkilerde tuz stresinin zararları	10
1.2.4 Bitkilerde tuz stresine karşı geliştirilen dayanıklılık mekanizmaları.....	11
1.3 LEA (Geç Embriyogenez Proteini) Proteinleri	12
1.3.1 LEA proteinlerinin sınıflandırılması.....	13
1.3.1.1 LEA I proteinleri	13
1.3.1.2 LEA II proteinleri.....	13
1.3.1.3 LEA III proteinleri	14
1.3.1.4 LEA IV proteinleri	15
1.3.1.5 LEA V proteinleri	15
1.3.1.6 LEA VI proteinleri	15
1.3.1.7 LEA VII proteinleri.....	15
1.3.2 LEA proteinlerinin yapısı ve özellikleri.....	16
1.3.3 LEA proteinlerinin fonksiyonları.....	17
1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile Bitkilere Gen Aktarımı	18
1.5 Çalışmanın Amacı	18
2 MATERYAL VE METOD.....	21
2.1 Bitki Materyali ve Doku Kültür Ortamı	21
2.2 Bakteri Suşları ve Plazmidler	21
2.3 Bakteri Büyüme Ortamı ve Kültür Şartları	21

2.4 Primer Dizaynı.....	21
2.5 Fasulye Bitkilerinin Yetiştirilmesi	22
2.6 Total RNA İzolasyonu.....	22
2.7 cDNA Sentezi.....	23
2.8 PCR.....	24
2.9 Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması	24
2.10 Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) <i>Lea5</i> Geninin Klonlanması	25
2.10.1 Koloni PCR	25
2.10.2 Plazmit izolasyonu ve dizileme.....	26
2.11 Bitki Ekspresyon vektörüne <i>Lea5</i> Geninin Klonlanması	27
2.11.1 Plazmit izolasyonu	28
2.12 İpk Vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e (AGL1) Transformasyonu... 29	
2.12.1 Kompetan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) bakterilerinin hazırlanması.....	29
2.12.2 Elektrokompentan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) bakterilerine İpk vektörünün transformasyonu	29
2.12.3 Koloni PCR	30
2.13 <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Tütün Transformasyonu	31
2.13.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (AGL1) bakterilerinin büyütülmesi	31
2.13.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile tütün yaprak disklerinin inokülasyonu.. 31	
2.14 Aday Transgenik Tütünlerde Analizler	32
2.14.1 Aday transgenik tütün bitkilerinde moleküler analizler	32
2.14.1.1 T1 tütün bitkilerinden DNA izolasyonu	32
2.14.1.2 <i>Lea5</i> ve <i>HptII</i> genlerine özel primerlerle PCR.....	33
2.14.1.3 Mendel ayrılma (segregasyon) analizi	33
2.14.2 Aday transgenik tütün bitkilerinde fizyolojik analizler.....	33
2.14.2.1 Tuz stresi çalışmaları.....	34
2.14.2.3 Kuraklık stresi çalışmaları.....	34
3 BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
3.1 cDNA Sentezi ve Gradient PCR.....	35
3.2 Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) <i>Lea5</i> Geninin Klonlanması	35
3.3 Bitki İfade Vektörüne <i>Lea5</i> Geninin Klonlanması.....	36
3.4 İpk Vektörünün <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 'e (AGL1) Transformasyonu..... 37	
3.5 Etkili Higromisin Miktarının Belirlenmesi	39
3.6 <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Tütün Transformasyonu	39
3.7 <i>Lea5</i> Geninin Aday T1 Transgenik Bitkilerindeki İfade Analizleri.....	42
3.7.1 Moleküler analizler	42
3.7.1.1 Mendel analizi	42
3.7.1.2 Aday transgenik tütün bitkilerinde PCR analizleri	43
3.7.2 Aday transgenik tütün bitkilerinde fizyolojik analizler.....	44
3.7.2.1 Higromisin analizi	44
3.7.2.2 Tuz Stresi Analizi.....	45
3.7.2.3 Kuraklık Stresi Analizi	48
4 SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Dünya kuru fasulye üretiminin sayısal verileri.....	3
Çizelge 1.2. Türkiye’de kuru fasulye ekim alanı ve üretim verileri	4
Çizelge 1.3. Çevresel stres faktörleri	5
Çizelge 2.1. <i>Lea-5</i> genine özel dizayn edilen primer dizileri	22
Çizelge 2.2. cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler ve miktarları.....	23
Çizelge 2.3. cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler ve miktarları.....	23
Çizelge 2.4. <i>Lea5</i> genini PCR’la çoğaltmak için kullanılan bileşenler ve miktarları	24
Çizelge 2.5. Gateway klonlama sistemi ile oluşturulacak giriş vektörü için kullanılacak bileşenler ve miktarları.....	25
Çizelge 2.6. Koloni PCR için kullanılacak bileşenler ve miktarları	26
Çizelge 2.7. Koloni PCR koşulları.....	26
Çizelge 2.8. Bitki ifade vektörüne <i>Lea5</i> genini klonlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	27
Çizelge 2.9. Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları	28
Çizelge 2.10. Koloni PCR şartları.....	28
Çizelge 2.11. <i>VirD</i> , <i>HptII</i> ve <i>Lea5</i> genlerine özel sentezletirilmiş primer dizileri...	30
Çizelge 2.12. Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	30
Çizelge 2.13. Koloni PCR şartları.....	30
Çizelge 2.14. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	33
Çizelge 2.15. <i>Lea5</i> , <i>HptII</i> ve <i>VirD</i> genlerini çoğaltmak için gereken PCR koşulları	33
Çizelge 3.1. T1 döllerinin Mendel Kalıtım Analizleri.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Dünya kuru fasulye üretiminde ülkelerin sıralaması	3
Şekil 1.2. Türkiye’de kuru fasulye ekim alanlarının sayısal verileri	4
Şekil 3.1. pENTR™/D-TOPO- <i>Lea5</i> vektörü	35
Şekil 3.2. <i>Lea5</i> genine özel primerlerle yapılan koloni PCR’in elektroforez sonucu	36
Şekil 3.3. LR-klonaz enzimi yardımıyla giriş vektörü ve hedef vektör ile oluşturulan <i>PvLea-5</i> genini taşıyan bitki ifade vektörü (pIPKb004 - <i>PvLea5</i>)	36
Şekil 3.4. <i>Lea5</i> -pIPKb004 vektörünün <i>E.coli</i> ’ye transformasyonundan sonra <i>HptII</i> primerleriyle yapılan koloni PCR’in elektroforez sonucu.....	37
Şekil 3.5. <i>Lea5</i> -pIPKb004 vektörünün <i>E.coli</i> ’ye transformasyonundan sonra <i>Lea5</i> primerleriyle yapılan koloni PCR’in elektroforez sonucu.....	37
Şekil 3.6. pIPKb004- <i>Lea5</i> vektörünün AGL1 hücrelerine transformasyonundan sonra <i>Lea5</i> primerleri ile yapılan koloni PCR’in elektroforez sonucu.....	38
Şekil 3.7. pIPKb004- <i>Lea5</i> vektörünün AGL1 hücrelerine transformasyonundan sonra <i>HptII</i> primerleri ile yapılan koloni PCR’in elektroforez sonucu	38
Şekil 3.8. pIPKb004- <i>Lea5</i> vektörünün AGL1 hücrelerine transformasyonundan sonra <i>VirD</i> primerleri ile yapılan koloni PCR’in elektroforez sonucu.....	38
Şekil 3.9. 30 ve 50 mg/ml higromisin içeren MS ortamında tütün eksplantı ve tohumlarının gelişimi.....	39
Şekil 3.10. <i>A.tumefaciens</i> ile gen aktarımı yapılmış ve besi yerinde (MS + BA (1mg/L) + NAA (0.1mg/L)) 3 gün inkübe edilmiş tütün eksplantları	40
Şekil 3.11. Gen aktarımı yapılmış tütünlerin MS besi ortamında (BA (1mg/l), NAA (0.1mg/l), Higromisin (50mg/l) ve Timentin (160mg/l)) 4-5 hafta sonra oluşturduğu kalluslar	40
Şekil 3.12. Gen aktarımı yapılmış kalluslardan elde edilen sürgünlerin köklendirme ortamına (MS + Higromisin (50mg/l) +Timentin (160mg/l)) alındıktan sonra ki gelişimleri (Gen aktarımından yaklaşık 5-6 hafta sonra).....	41
Şekil 3.13. Gen aktarımı yapılmış kalluslarda oluşan bitkilerin köklendirme ortamına (MS + Higromisin (50mg/l) +Timentin (160mg/l)) alındıktan sonra ki gelişimleri (Gen aktarımından yaklaşık 8 hafta sonra).....	41
Şekil 3.14. Aday transgenik tütün hatları	42
Şekil 3.15. Aday transgenik tütün DNA’larına <i>Lea5</i> primerleri ile yapılan PCR sonucu.....	43
Şekil 3.16. Aday transgenik tütün DNA’larına <i>HptII</i> primerleri ile yapılan PCR sonucu.....	44
Şekil 3.17. Aday transgenik tütün DNA’larına <i>VirD</i> primerleri ile yapılan PCR sonucu.....	44
Şekil 3.18. 50 mg/ml higromisin içeren MS ortamında büyüyen transgenik olmayan ve transgenik olan bitkilerin gelişimleri	45
Şekil 3.19. 150 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları	45

Şekil 3.20. 150 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkileri.....	46
Şekil 3.21. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları	46
Şekil 3.22. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 7 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkileri.....	47
Şekil 3.23. 150 mM tuz içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması	47
Şekil 3.24. 200 mM tuz içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması	48
Şekil 3.25. . 200 mM mannitol bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları	48
Şekil 3.26. 200 mM mannitol bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkileri.....	49
Şekil 3.27. 200 mM mannitol içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması	49

KISALTMALAR

PEG	: Polyethylene glycol
MDA	: Malondialdehyde
NAA	: Naphthalene acetic acid
BA	: Benzylaminopurine
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
NaCl	: Sodium chloride
cDNA	: Complementary DNA
MS	: Murashige-Skoog basal salt medium
YEB	: Yeast Extract Broth
LB	: Luria Broth
LEA	: Late Embryogenesis Abundance
PCR	: Polymerase Chain Reaction
<i>HptII</i>	: Hygromycin phosphotransferase gene
FAO	: Food and Agricultural Organisation

FASULYE BİTKİSİNDEN *PVLEA5* GENİNİN KLONLANMASI VE TÜTÜN BİTKİSİNE AKTARILARAK FONKSİYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Tuzluluk hem ülkemizde hem de dünyada bitkisel üretimi sınırlayan önemli faktörlerden bir tanesidir. Topraktaki tuzluluk problemi bitkilerin bütün yaşam evrelerinde etkili olmakla birlikte bu etki çiçeklenme ve tohum oluşumunda daha belirgin olmaktadır. Fasulye bitkisi insanların beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Fakat bu bitki abiyotik stres faktörlerinden tuz stresine karşı oldukça duyarlıdır. Yapılan çalışmalarda tuz stresinin fasulyenin çimlenme ve gelişiminde olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle günümüzde tuza dayanıklı tür ve çeşitlerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalara oldukça önem verilmektedir. Özellikle fasulye gibi tuz stresine karşı hassas olan türlerde dayanıklı genotiplerin belirlenip geliştirilmesi gerekmektedir. Tuza toleranslı fasulye (İspir) genotipine ait olan transkriptom (RNA-seq) analizleri sonucunda, LEA proteinlerini kodlayan genlerin yüksek oranda ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında yüksek oranda ifade olan genlerden *Lea5* geni klonlanmış ve *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla tütün bitkisine aktarılmıştır. Elde edilen aday transgenik bitkilerle moleküler ve fonksiyonel analizler yapılmıştır. Kuraklık uygulaması mannitol (200mM) ve tuz stresi ise NaCl (150 mM ve 200 mM) içeren MS besi yerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu ortamlarda çimlendirilen T1 ve kontrol tütün bitkileri karşılaştırıldığında, stres uygulanan T1 bitkilerinin kök ve sürgünlerinin daha iyi geliştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, transgenik tütün hatlarındaki *PvLea5* geni varlığı yapılan PCR analizleriyle doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Agrobacterium tumefaciens*, Fasulye, *Lea5*, Tuz stresi, Tütün.

CLONING OF *PVLEA5* GENE FROM COMMON BEAN AND EVALUATION OF ITS FUNCTION IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS

ABSTRACT

Soil salinity is one of the most important factor limiting the agricultural productivity both in Turkey and World. While the problem of soil salinity is effective in whole growth cycle of plants, this effect is more pronounced in the flowering and seed formation. Common bean plants has a significant role in human nutrition. But these plants are very sensitive to salt stress from abiotic stress factors. It was determined that salt stress has negative effect on germination and development of common bean according to studies. Therefore quite emphasis is given to studies on the identification of salt tolerant species and varieties today. Especially in species which are sensitive to salt stress, such as common beans should be identified and developed the resistant genotypes. The results of the analysis of transcriptome (RNA-seq) data belonging to salt-tolerant common bean genotype (ISPIR) showed that the genes encoding LEA proteins has been differentially expressed. One of the differentially expressed genes, *Lea5*, has been cloned and transferred to tobacco plants by *Agrobacterium tumefaciens* in this thesis. Molecular and physiological analysis had been conducted with putative transgenic plants. Drought and salt stress treatment were carried out by using MS medium containing mannitol (200 mM) and NaCl stress (150 mM and 200 mM), respectively. It has been observed that roots and shoots of T1 plants are better developed when compared to control plants under these stress conditions. Moreover, the presence of *PvLea5* gene in transgenic lines has been confirmed with PCR analysis.

Key Words: *Agrobacterium tumefaciens*, Common bean, *Lea5*, Salt Stres, Tobacco.

1 GİRİŞ

Dünyadaki en geniş familyalar arasında bulunmakta olan baklagiller (*Leguminosae*) yaklaşık 700 cins ve 19.000 türe sahiptir. Neredeyse dünyanın her tarafında yetişmekte olan baklagiller hem insan hem de hayvanların beslenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ekim alanı ve üretim bakımından tahıllardan sonra gelen yemeklik baklagiller bitkisel proteinlerin başlıca kaynağıdır (Yemeklik baklagil çalıştay, 2014). Dünyada yıllardır tarımı yapılan yemeklik tane baklagiller lisin, lösin, izolösin gibi temel aminoasitler bakımından zengindirler (Şehirali, 1988). Besin değerleri açısından önemli olmalarının yanı sıra üretiminin yapıldıkları toprağa da köklerinde nodozite oluşturan *Rhizobium* bakterileri sayesinde havada bulunan serbest azotu bağlayarak azotça zenginleştirmektedirler (Özdemir, 2002). İhtiyaç duydukları azotun yaklaşık olarak %70'ini bu şekilde karşılamaktadırlar (Ceyhan, 2007). Yetiştirildikleri toprağı kökleri sayesinde havalandırarak toprağı fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak iyileştirmesi sayesinde toprak verimliliğini de korumaktadır (Şehirali, 1988).

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

Yemeklik baklagillerden olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) hem taze sebze hem de kuru tane olarak tüketilmektedir. *Fabaceae* (Baklagiller) familyasının Papilionoideae alt familyasından *Phaseolus* cinsine bağlı bir türdür. Başlıca türleri *Phaseolus acitufolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L. ve *P. vulgaris* L. dir (Freytag ve Debouck 2002).

Yüksek protein içeriğiyle insan beslenmesinde önemli protein kaynağı olmakla birlikte, bitki atıkları da yem sanayisinde de kullanılmaktadır (Smith ve Huyser, 1987). Tanelerinde %22-30 gibi yüksek protein içeriğine sahip olmasından dolayı gelişmekte olan ülkelerin önemli yemeklik tane baklagillerinden biridir. Karbonhidrat, potasyum, kalsiyum, fosfor, magnezyum ve vitamin açısından da zengin olduğundan dolayı önemli bir kültür bitkisidir (Akçin, 1988). Dünyada insan beslenmesinde bitkisel proteinler %22'si ve karbonhidratların %7'si yemeklik

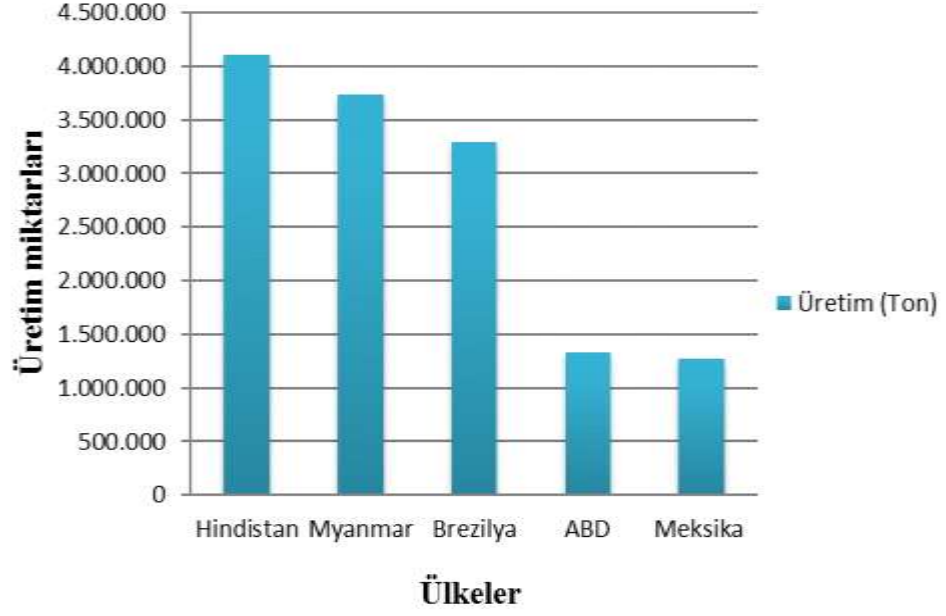
baklagiller sağlandığından dolayı beslenme açısından protein ve karbonhidrat ihtiyacını karşılamak için konserve ve dondurulmuş gıda sanayisinde de fasulye önemli olarak kullanılan bir bitkidir. Yemeklik olarak en yaygın yetiştiriciliği yapılan fasulye türü *Phaseolus vulgaris* L. dir (şehirali, 1988).

1.1.1 Fasulye bitkisinin tarihçesi

Müler 1881 yılında fasulyenin Avustralya; Rein ise 1887 yılında fasulyenin Afrika kökenli olduğunu bildirilmesine rağmen Gentry (1968) kültür fasulyesinin yabani ve kültür formlarının evrimini inceledikten sonra kültür fasulyesinin anavatanının Orta Amerika ülkeleri olduğunu belirlemiştir. Meksika’da çok eski yıllardan beri fasulye tarımı yapılmaktadır. Amerika kıtasının keşfedilmesinden sonra İspanyollar aracılığıyla Avrupa’ya ve daha sonra da Asya’ya geçtiği düşünölmektedir. Ölkemize ne zaman ve ne şekilde geldiği kesin olarak bilinmemektedir ancak en az 250 yıldan beri tüketildiği tahmin edilmektedir (Kütevin ve Türkeş 1987).

1.1.2 Fasulye bitkisinin ekonomik önemi, dünya ve Türkiye’de üretimi

Fasulye dünyada ekim ve üretim bakımından önemli bir yere sahiptir. 2014 yılında FAO verilerine bakıldığında dünya kuru fasulye üretiminin 25.093.616 ton olduğu görölmektedir. Ekim alanı ve üretim açısından Asya kıtası, tane verimi açısından ise Amerika kıtası ilk sırada yer almaktadır. Dünya’da en çok üretimi Hindistan’da yapılmakta ve Myanmar, Brezilya, ABD ve Meksika diğer önemli kuru fasulye üreticisi ülkelerdir (FAO, 2014).

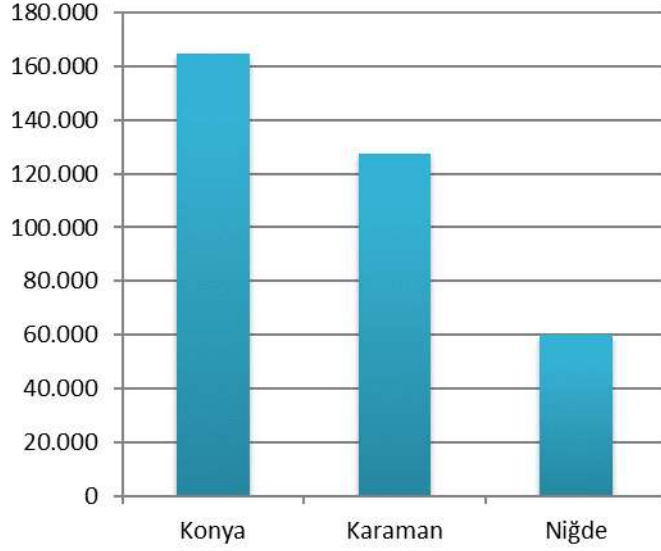


Şekil 1.1. Dünya kuru fasulye üretiminde ülkelerin sıralaması (FAO, 2014)

Çizelge 1.1 Dünya kuru fasulye üretiminin sayısal verileri (FAO, 2014)

Sıra	Ülke	Üretim (Ton)
1	Hindistan	4.110.000
2	Myanmar	3.737.320
3	Brezilya	3.294.586
4	ABD	1.324.760
5	Meksika	1.273.957

Ülkemizde ise 2014 yılında 215.000 ton kuru fasulye üretilmiştir ancak önemli ülkeler arasında yer alamamaktadır. Bu yüzden üretimi arttırmak için yapılan ve yapılacak araştırmalar çok önemli olmaktadır.



Şekil 1.2 Türkiye’de kuru fasulye ekim alanlarının sayısal verileri (TUİK, 2014)

Çizelge 1.2 Türkiye’de kuru fasulye ekim alanı ve üretim verileri (TUİK, 2014)

Sıra	İl	Ekilen Alan(dekar)	Üretim (ton)
1	Konya	164.897	61.158
2	Karaman	127.300	39.564
3	Niğde	60.040	16.928

1.1.3 Fasulye bitkisinin iklim ve toprak istekleri

Ülkemizin neredeyse bütün bölgelerinde yetiştirilebilen fasulye iklim isteği bakımından ılıman iklim bitkisidir. Çimlenme için gerekli optimum toprak sıcaklıkları 15-20 °C’dir. 15 °C’ nin altında tohum çimlenmesi yavaşlamaktadır. 10 °C’ nin altında ve 35 °C’ nin üstündeki sıcaklıklarda çok az ya da hiç çimlenme görülmemektedir. Toprak sıcaklığı düşük ve toprakta nemi yüksek olursa, ekimi yapılan tohumlar su alır, fakat çimlenme için yeterli sıcaklık olmadığından bozulur (Akçin,1988). Optimum sıcaklık ve nem koşulları sağlandığında ekimden 7-10 gün sonra çıkış görülmektedir. Sıcaklıklar daha düşük olursa bu süre 20-25 güne uzabilmektedir. Vejetasyon süresi 70-140 gün arasındadır ve bitkinin erkenci veya geçici, sarılıcı veya bodur olması yanında bölgenin koşullarına bağlı olarak da bu süre de değişiklik olmaktadır. Çiçeklenme süresi çeşitlere göre farklılık göstermektedir.

Toprak nemi yeterli değilse çiçeklenme süresinde kısılma görülmekte ve çiçeklenme azalmaktadır. Çiçeklenme döneminde sıcaklık 20-25 °C olduğunda optimum meyve tutumu ve gelişimi görülmektedir. Sıcaklık 30 °C'nin üzerinde olursa çiçekler dökülmekte ve dolayısıyla verimde azalma görülmektedir. Tane oluşumu ise 10 °C'nin altındaki sıcaklıklar da engellenmektedir. Fasulye kumlu topraklarda orta ağır topraklara kadar farklı toprak tiplerinde yetişebilmektedir. Ph'sı 7.0 - 8.0 olan, tuzluluk, asit ve alkali problemi olmayan verimli topraklarda fasulye iyi yetişmektedir (Kütevin ve Türkeş, 1987; Freytag ve Debouck, 2002).

1.2 Bitkilerde Stres

Bitkilerde büyümeyi, metabolizmayı ve gelişmeyi olumsuz yönde etkileyen maddeler stres olarak kabul edilmektedir. Stres bitki toleransı ile de yakından ilişki içerisindedir (Özcan ve ark., 2001). Çevre ile doğaları gereği devamlı ilişki halinde olan canlılar, çevrede uygun olmayan koşullar meydana gelmesi durumunda adaptasyon noksanlığına bağlı olarak stres koşullarına maruz kalmaktadırlar. Stres, bitkinin yaşayabilmesi, ürün verebilmesi, biyokütle birikimi ve özümleme ile ilişkili olarak açıklanması gereken bir kavramdır (Büyük ve ark., 2012). Bitkilerin maruz kaldıkları stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Levitt, 1972). Biyotik faktörler; enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu meydana gelen faktörleridir. Abiyotik faktörler ise su, sıcaklık, radyasyon, kimyasal maddeler, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleridir (Lichtenhaler, 1996; Büyük ve ark., 2012).

Çizelge 1.3. Çevresel stres faktörleri (Larcher, 1995)

Stres Faktörleri	
Biyotik Stres Faktörleri	Abiyotik Stres Faktörleri
Bitkiler	Sıcaklık
Mikroorganizmalar	Su
Hayvanlar	Mineraller
Antropogenik etkiler	Gazlar
	Mekanik etkiler
	Radyasyon

Tarım alanlarının yaklaşık % 45'i kuraklık, yaklaşık %6'sı da tuzluluk ile karşılaştıklarından dolayı dünyada tarımsal üretimi kısıtlayan en önemli abiyotik stres faktörleri kuraklık ve tuzluluktur (Asraf ve Foolad, 2007).

Stres faktörlerinin yol açtığı zararlar bitkiden bitkiye değişiklik gösterebilmektedir. Bitkiler hareket edemedikleri için yaşamları boyunca stres faktörlerine maruz kalabilme ihtimali yüksek olduğundan dolayı bitkilerin stres ile ilgili mekanizmalarının bilinmesi ve strese karşı dayanıklı olan türlerin geliştirilmesi çok büyük önem taşımaktadır (Kadioğlu, 2004).

1.2.1 Kuraklık stresi (Su stresi)

Kuraklık dünyada ki tarım alanlarında en fazla görülen stres faktörü olduğundan dolayı bitkisel üretimi sınırlandıran önemli bir etkidir (Blum, 1986). Bitki gelişimi için gerekli olan suyun toprakta yetersiz olması durumunda bitkilerin gelişimini kısıtlayacak kadar yağışsız geçen süre kuraklık olarak tanımlanmaktadır (Levitt, 1980).

Transplasyon sonucunda bitkinin kaybettiği su toprakta yeteri kadar su bulunması durumunda karşılanabilmektedir. Eğer ihtiyaç duyulan su topraktan karşılanamazsa bitki tolerans mekanizmaları çalışmaz ve su kaybından dolayı su stresi görülür. Transplasyonla kaybedilen su, topraktan alınacak sudan fazla olduğunda bitkinin iletim borularında negatif basınç meydana gelmekte dolayısıyla bitkinin organlarında su için rekabet ortaya çıkmaktadır. Toprak içerisindeki su çok azaldığında toprak kolloidleri, köklerin emme gücünden daha kuvvetli olduğundan bitki suyu alamamakta ve kökte ve yapraklarda solma meydana gelmektedir (Kocaçalışkan, 2003). Bu nedenle toprakta bulunan suyun azalması bitkinin strese girmesine neden olan en önemli etkidir. Genel olarak kuraklığın su yetersizliği ve kuruma olarak iki tipi bulunmaktadır.

1. Bitkilerde stomalarının kapanması ve gaz değişiminin azalmasına neden olan orta düzeydeki su kaybı ile su yetersizliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle stomaların kapanması ile bitkilerin karbondioksit alımı yetersiz olmaktadır.
2. Bitkinin metabolizmasının ve hücrelerinin yapısının bozularak hücredeki reaksiyonların durmasına neden olacak kadar aşırı su kaybı ile kuruma meydana gelebilmektedir (Smirnoff ve Cumbes, 1989).

1.2.2 Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkileri

1.2.2.1 Kuraklık stresinin mekanik etkileri

Bitkilerin hücrelerinde belirgin miktarda su kaybı gerçekleşmesi ile turgor kaybı ortaya çıkmaktadır (Levitt, 1980). Bitkide su kaybı olduğunda hücre özsuyunun konsantrasyonu yükselmektedir. Bu nedenle protoplazmada dehidrasyonun artmasına neden olmaktadır. Hücrede su kaybı olduğundan protoplast hücre çeperinden ayrılmakta ve stres altındaki plazma membranı ve tonoplastta oluşan çökme yırtılmalara, zarları üzerinde bulunan hidrolitik enzimlerin serbest bırakılmasına ve dolayısıyla sitoplazmanın otolizine neden olmaktadır. Oluşan bu zarar sonucunda hücresel metabolizma kalıcı olarak bozulmakta ve bitkide büyümenin yavaşlamasına neden olmaktadır (Özcan ve ark., 2004; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Alexieva ve ark. (2001), buğdayda 7 gün boyunca, bezelyede ise 10 gün boyunca %10 PEG 6000 ile kuraklık stresi uygulamışlardır. Bitkilerdeki değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Kontrol bitkileriyle karşılaştırılan strese maruz kalmış bezelye ve buğdayda yaş ve kuru ağırlıklarında kayıplar gözlenmiştir.

Türkan ve ark. (2005), polyethylene glycol (PEG) ile fasulye (*Phaseolus vulgaris*) ve tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) türlerine 14 gün boyunca kuraklık stresi uygulamışlardır. Kuraklık stresine verdikleri tepkilerini gözlemlemişlerdir. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*)'nin tepary bean (*Phaseolus acutifolius*)'ne göre kök ve gövde kuru ağırlıkları bakımından daha fazla etkilendiği görülmüştür. Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*)'nin fasulye (*Phaseolus vulgaris*)'e göre kuraklık stresine daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

Nouri-Ganbalani ve ark. (2009), buğday genotiplerine kuraklık stresi uygulamışlardır. Buğday bitkilerinde, bitki uzunluğunda, dane sayısında, 1000 dane veriminde ve toplam verimde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Genotipler arasında strese farklı tepkiler görüldüğünü belirtmişlerdir.

1.2.2.2 Kuraklık stresinin metabolik etkileri

Suyun, hücreden kaybı durumunda normal regülasyon devam edemeyeceğinden metabolizma bozulmaktadır. Çünkü hücre içeriğinin büyük bir kısmını oluşturması, taşıyıcı olması, hücresel reaksiyonlar ve işlevler için çözücü rolü oynaması gibi suyun birçok önemli fonksiyonel özellikleri bulunmaktadır. Hücrede su kaybına bağlı olarak gerçekleşen iyon-birikimi, membran bütünlüğünün ve proteinlerin

yapısının bozulmasına neden olarak hücreye zarar verebilmektedir. Ayrıca su kaybı sonucunda; proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin su ile ilişkileri bozulabilmekte ve dolayısıyla proteinlerin denatürasyonlarına ve enzim inhibisyonlarına yol açabilmektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Sivritepe ve ark. (2008) PEG 8000 ile kiraz bitkilerine kuraklık stresi uygulamışlardır. *İn vitro* koşullarda yapılan çalışmada, kuraklık stresi altında yetiştirilen bitkilerde yeşil aksam kuru ağırlığında azalma görülmüş, MDA konsantrasyonunda ise artış belirlenmiştir.

1.2.2.3 Kuraklık stresinin oksidatif etkileri

Bitkilerde kuraklık stresi altında süperoksit molekülü (O_2^-), singlet oksijen, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi artmaktadır. Bitkilerde hüresel ROT konsantrasyonunun artması ile antioksidan savunma sistemleri ve ROT üretimi arasındaki denge bozularak, zincirleme reaksiyonlar şeklinde organizmada ROT artışı sonucu bitkiler oksidatif strese girmektedir. Stres altında ROT üretiminin artışı lipitlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asit hasarına, enzim inhibisyonuna, programlı hücre ölümü (apoptozis) aktivasyonuna ve hücrelerin ölümüne kadar birçok önemli hasara neden olabilmektedirler (Smirnoff, 1993; Sgherry ve ark., 1996).

1.2.3 Kuraklık stresinin fotosentez üzerindeki etkisi

Kuraklık sırasında fotosentez büyük ölçüde azalmaktadır. Orta düzeydeki su yetersizliği stomaların kapanmasına bağlı olarak sınırlanırken, genellikle daha uzun süreli ve daha şiddetli streslerde ortaya çıkan stomalar dışındaki sınırlamalardır.

Kuraklık stresine karşı oluşturulan en erken verilen tepkilerden birisi, kloroplastlara CO_2 difüzyonunu sınırlandıran stomaların kapanmasıdır. Hidrolik (yaprak su potansiyeli, hücre turgoru) ve kimyasal sinyaller (absisik asit) kuraklık meydana geldiğinde bitkilerin stomalarını kapatmalarına neden olan başlıca iki etkendir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Fotosentez, stomalar dışında kloroplastik faktörler nedeniyle de azalmaktadır. Fotosentez genel olarak kloroplastlarda meydana gelmektedir. Kloroplastların özellikle stoma bölgesinde CO_2 'yi fikse eden ve indirgeyerek organik bileşiklere dönüşmesini sağlayan rübuloz bifosfat karboksilaz (RuBPCase) gibi enzimlerin etkinliği azalmakta, dolayısıyla CO_2 fiksasyonu zarar görmektedir. Fotosentez ilk

başta stomatal faktörler tarafından azaltılmakta ise de, kuraklık stresinin sürmesi ve artmasıyla kroplast ve enzim aktivitesi strese uğramakta, bu nedenle fotosentez stomalar dışındaki faktörler tarafından azaltılmaktadır (Çırak ve Esenal, 2003).

Kurak stresine dayanıksız olan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) ve dayanıklı olan *Vigna unguiculata*'nın kuraklık stresine verdikleri tepkiler karşılaştırılmıştır. Fasulye (*Phaseolus vulgaris*)'in kuraklık stresinde stoma geçirgenliğinde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca Fasulye (*Phaseolus vulgaris*)'in *Vigna unguiculata*'ya göre stomalarını daha hızlı kapattığı gözlemlenmiştir (Cruz de Carvalho ve ark., 1998).

1.2.4 Kuraklığa karşı geliştirilen uyum mekanizmaları

Stresten kaçınma ve stres toleransı, kurak şartlar altında bitkilerin yaşamlarına devam etmesini sağlayan başlıca iki savunma mekanizmasıdır (Levitt, 1980; Laffray ve Louguet, 1990; Cruz de Carvalho ve ark., 1998). Stresten kaçınma mekanizması, yalnızca orta şiddetteki su yetersizliğinde ortaya çıkan stres durumunda bitkilerin hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Bitki dokularında suyu depolayarak uzun süre hayatta kalabilen sukkulent bitkiler kaçınma mekanizmasına örnektir (Salisbury, 1992). Stres tolerans mekanizması ise koruyucu mekanizmalarını çalıştırarak çok daha şiddetli su yetersizliğinde meydana gelen stres durumunda bitkilerin hayatta kalabilmelerini sağlamaktadır. Yaprak yüzeyinde küçülme, toprağın nemli tabakalarına doğru köklerin gelişmesi ve stomaların kapanması, kuraklığa karşı savunmada bitkide görülen değişimlerdir. Kuraklık stresine karşı bitkilerin yapraklarının büyümesinin engellendiği ve yeni yaprak oluşumunun kısıtlandığı görülmektedir (Mahajan ve Tuteja, 2005). Bazı bitkilerde strese tepki olarak yaprak yüzeylerinin tüylerle kaplandığı görülmektedir. Ayrıca yaprak yüzeyinde oluşan kütikula tabakası, güneş ışınlarını yansıtarak sıcaklığın etkisini azaltır ve böylece transpirasyon hızı da düşürülmüş olur (Göksoy ve Turan, 1991).

1.2.2 Tuz stresi

Abiyotik stres faktörlerinden olan tuzluluk yeryüzünde yaşam boyunca karşılaşılmış olan ilk kimyasal faktörlerden biridir (Özcan ve Gürel, 2001). Tuzlu topraklar genellikle saturasyon ekstraktında 4 mmhos.cm⁻¹'den fazla tuz bulunduran topraklardır (Karanlık, 2001). Tuzluluk, kapillarite yoluyla çözünebilir tuzların taban suyu ile birlikte yükselerek toprak yüzeyine çıkması ve yükselen suyun buharlaşması sonucu tuzun toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır (Ergene, 1982). Özellikle yarı

kurak ve kurak alanlarda meydana gelmektedir (Ashraf, 1999). Topraktaki çözünebilir tuzun konsantrasyonunun bitki büyümesi ve gelişmesini engelleyecek kadar artması durumunda sorunlar meydana gelmektedir. Toprak bünyesindeki tuzun konsantrasyonu yükseldikçe bitkinin su alımını engellemeye başlar. Eğer bitkinin faydalanacağı su miktarını düşürmeye başlarsa bitki de tuz stresi ortaya çıkar (Levitt, 1980). Klorürler (NaCl, MgCl₂, CaCl₂), nitratlar (KNO₃, Na₂NO₃), sülfatlar (Na₂SO₄, MgSO₄), karbonatlar ve bikarbonatlar (Na₂CO₃, CaCO₃, NaHCO₃) ve boratlar tuzluluğun ortaya çıkmasına neden olan bileşiklerdir (Munns ve Termaat, 1986).

1.2.3 Bitkilerde tuz stresinin zararları

Tarımsal üretimi kısıtlayan en önemli etkenlerden biri tuz stresidir (Demiral ve Türkan, 2004). Sıcaklık, sulama, gübreleme ve nem gibi etmenler tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkisini değiştirebilmektedir (Kantar ve Elkoca, 1998).

Genellikle bitkilerde tuz stresine sodyum tuzları neden olmaktadır. Tuza duyarlılıklarına göre bitkiler halofitler ve glikofitler olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonunda yaşayabilen bitkiler halofit bitkilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonlarından etkilenerek zarar gören bitkiler ise glikofit bitkilerdir. *Salicornia herbacea* L. ve *Atriplex vesicaria* Heward ex Benth. halofit bitkilerdir. *Aster tripolium* L. ve *Plantago lanceolata* L. ise glikofit bitkilerdir. Yüksek bitkilerin ise nerdeyse hepsi glikofitler grubunda yer almakta ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip topraklarda yaşamamaktadırlar (Levitt, 1980; Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz, 1998; Yaşar, 2003; Ashraf, 2004; Kuşvuran, 2004).

Bitkilerde tuzun zararlı etkileri değişik şekillerde görülebilmekte ve bitkiyi morfolojik ve anatomik olarak etkileyebilmektedir. Tuzun bitkiler üzerinde iyon toksisitesi (birincil tuz zararı), ozmotik stres ve beslenmeyle ilgili (sekonder tuz zararı) zararlı etkileri bulunmaktadır (Levitt, 1980). Bu etkiler oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olabilir (Zhu, 2002).

Tuzluluk sorunu ile karşılaşan bitkiler transpirasyonu azaltıp su kaybını önlemek için yaprak alanlarını daraltarak ve stomalarını kapatarak bünyesinde bulunan suyun kaybını engellemeye çalışmaktadır. Fakat fotosentez için gerekli olan CO₂'nin alınımı da kısıtlandığı için bitkinin büyümesi ve gelişmesi de gerilemektedir (Karanlık, 2001; Yaşar, 2003).

Bitkilerin kök bölgesinde bulunan tuz konsantrasyonu arttığı zaman verim ve kaliteyi olumsuz olarak etkileyebilmektedir (Yurtseven, 1999). Tuz stresinden özellikle köklerdeki solunum etkilenmektedir (Özcan ve Gürel, 2001).

Tuz stresi bitkinin ölümüne neden olabildiği gibi tolerans durumuna bağlı olarak büyümeyi engellemekte, kloroza ve nekrotik lekelerin oluşumuna, bidöllenme bozukluklarına, meyvelerin küçük kalmasına, verim ve kalitenin azalmasına neden olabilmektedir (Hasegawa ve ark., 1986).

Tuz stresi uygulanan mısır bitkilerinin, bitki boyu ile toplam yaş ve kuru ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir (Çiçek ve Çakırlar, 2002).

Buğday da (*Triticum aestivum* L.) NaCl stresi tohum çimlenmesinde azalmaya neden olmaktadır (Kabar ve Kocaçalışkan, 1990).

Ueda ve ark., (2004)'a göre ozmotik ve iyonik stresten dolayı arpa bitkisinin büyümesinde gerileme tespit edilmiştir.

1.2.4 Bitkilerde tuz stresine karşı geliştirilen dayanıklılık mekanizmaları

Tuz stresinden korunabilmek için bitkiler kendilerine savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Toksik düzeydeki Na iyonuna karşı dört farklı mekanizma ile tepki vermektedir.

Bitkiler stres oluşturabilecek düzeyde tuzluluk sorunu ile karşılaştıklarında kök hücrelerindeki Na pompaları ile fazla miktardaki Na'u ortama geri vermekte ve böylece hücre içi Na seviyesini dengede tutmaya çalışmaktadırlar (Schubert ve Lauchli 1990).

Bitkinin Na'u vakuollerde biriktirerek zararının engellenmesi de önemli tepki mekanizmalarındandır. Tuz stresine dayanıklı olan bitkilerin, dayanıklı olmayanlara göre daha az miktarda Na ve Cl'yi bünyelerine aldıkları, Na ve Cl'yi vakuollerinde depolayıp hücrede meydana gelecek yıkımları önleyerek tuzun oluşturacağı zarardan korumaktadırlar (Munns, 2002). Domates bitkisine Na'un vakuollerde birikiminden sorumlu bir genin aktarılmasıyla oluşan transgenik domateslerde tuzun özellikle yaşlı yaprakların vakuollerinde biriktiği, meyvede ise çok düşük seviyede biriktiği gözlemlenmiştir (Zhang ve Blumwald, 2001).

Diğer bir mekanizma da hücre zarı geçirgenliğidir. Tuza dayanıklılık sağlayan bitkiler tuz stresini önlemek için Na ve K'un hücre zarından geçmesini engelleyerek bu iyonları ya hiç hücre içerisine almaz ya da enerji kullanarak hücre dışına pompalamaktadır (Cheeseman, 1988).

Pljakoff-Mayber ve Gale (1975)'in yaptığı çalışmada tuza toleransı yüksek olduğu bilinen arpanın, tuzun köklerden yeşil aksama doğru iletilirken engeller bulunmakta, köklerdeki bu engeller sayesinde Na ve Cl yeşil aksama iletilmediğini tespit etmiştir.

Tuzdan sakınının diğer bir mekanizması ise bitkinin hızlı büyümesiyle birim hacimde alınan tuzun bünyede azaltılmasıdır. Tuz stresinde, hızlı büyüyen bitkilerin tür ve çeşitlerinin, aynı şartlarda yetiştirilen daha yavaş büyüyen çeşitlerden daha avantajlı olduğu belirtilmiştir. Hızlı büyümeyle yapraklarda azaltılan tuzun konsantrasyonu tolere edilebilmektedir (Tal, 1983).

1.3 LEA (Geç Embriyogenez Proteini) Proteinleri

İlk olarak tohum embriyolarında tespit edilen LEA proteinlerinin bitkilerde strese karşı koruyucu fonksiyonlarının olduğu düşünülmektedir (Holmberg ve Bulow 1998). LEA proteinleri ilk olarak pamuk tohumlarında embriyo gelişiminin son aşamalarında keşfedilmiştir (Dure ve ark., 1981; Galau ve ark.,1986) Bitkilerde kuruma (desiccation) gerçekleştiğinde LEA proteinlerinin çoğu tohum gelişiminin son aşamalarında embriyo dokularında yüksek konsantrasyonda birikmektedir (Baker ve ark., 1988; Hand ve ark., 2011). Embriyo, çimlenmesi için enerji sağlamak için kuru kütle artışı ile hücrel genişleme aşaması geçirmektedir. LEA proteinleri dehidrasyon, osmotik stres veya düşük sıcaklık stresine maruz kalan vejetatif dokularda birikmektedir (Bies-Ethewe ve ark., 2008; Hundertmark ve Hinch, 2008). LEA ailesi üyelerinin bitkiler aleminde yaygın olduğu görülmüştür. İlk tanımlanmasından bu yana damarsız bitkilerden damarlı bitkilere kadar yüzlerce LEA protein izole edilmiştir. Sadece kapalı ve açık tohumlu bitkilerde değil aynı zamanda damarlı tohumlu bitkilerde (ör: *Selaginella*) (Alpert, 2005; Oliver ve ark., 2000) de eğrelti otlarında (Reynolds ve Derek, 1993), kara yosunlarında (ör: *Tortula*, *Physcomitrella*) (Oliver ve Solomon, 2004) ve su yosunlarında (Honjoh ve ark., 1995) bulunmuştur. Bazı LEA benzeri genlerin sadece ABA veya diğer çevresel stresler tarafından uyarıldığı görülmüştür (Battaglia ve ark., 2008; Hand ve ark., 2011). Ayrıca bazı mikroorganizmalarda (Garay ve ark., 2000; Stacy ve ark., 1999), böceklerde ve kabuklularda (Hand ve ark., 2011; Hoekstra ve ark., 2001; Tunnacliffe ve Wise, 2007) mantarlarda (Abba ve ark., 2006; Borovskii ve ark., 2000),

protozoalarda, rotiferalarda, nematodlarda (Solomon ve ark., 2000; Browne ve ark., 2004) tespit edilmiştir.

LEA proteinlerinin çoğu hidrofilitir. Alanin, glutamik asit, glisin ve treonin gibi aminoasitler bakımından zenginken, sistein ve triptofan gibi aminoasitler bakımından yoksundurlar (Dure, 1997). Bu yüzden, hidrofilinler olarak bilinen ve hiperosmotik şartlara karşı yanıtta rol oynayan geniş bir hidrofilitik protein grubu olan dehidrin proteinlerinin üyeleridir (Garay-Arroyo ve ark., 2000). Farklı LEA protein grupları, su kaybını azaltmak üzere suyun bağlanması, protein ve membranların kararlılığının devamlılığının sağlanması ve aktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasına kadar birçok fonksiyona sahiptir (Close, 1997). Enzimler, lipidler ve mRNA'lar gibi makromoleküllerin korunmasında da görevlidirler. Ayrıca hücrel ve dokuya özgü yerleşim özellikleri göstermektedirler (Nylander ve ark., 2001). Genelde genç fidelerin kurummasına, tuza ve dona karşı dayanıklılıkta da LEA proteinleri görev almaktadır.

1.3.1 LEA proteinlerinin sınıflandırılması

LEA proteinleri spesifik domainleri temel alınarak altgruplara sınıflandırılmıştır (Dure ve ark., 1989).

1.3.1.1 LEA I proteinleri

LEA I grubu pamuk tohumunu D-19 ve D-132 proteinini içermektedir (TRKEQ [L/M] G [T/E] EGY [Q/K] EMGRKGG [L/E]). Bu motif bitki türlerinde birden dörde kadar art arda dizilmiş birçok kopya bulundurmaktadır (Galau ve ark., 1986; Campos ve ark., 2013). Buğday Em proteinleri ve mısır EmB564 ve EMB5 proteinleri de bu gruba dahildir (Amara ve ark., 2012; Wu ve ark., 2013). Glisin ve yüklü aminoasitler bakımından zengindirler. LEA I proteini *Bacillus subtilis* (Stacy ve ark., 1999) ve kabuklulardan *Artemia franciscana* da tespit edilmiştir. LEA I proteinlerinin molekül ağırlığının 11.5 kDa olduğu tespit edilmiştir (Büyük, 2014).

1.3.1.2 LEA II proteinleri

Dehidrinler olarak bilinen LEA II grubu ilk olarak pamuk embriyolarında D-11 ailesi olarak belirlenmiştir. LEA II proteini LEA proteinleri içinde en fazla özelliği olan gruptur. LEA II proteinlerinin ayırt edici bir özelliği lizin aminoasidince zengin 15 rezidüye sahip motife ve tek bir polipeptid içinde 11 kopyası bulunan K-segmenti

adında EKKGIMDKIKEKLP (Campbell ve Close, 1997) olarak korunmuş dizilere sahiptirler. Bu grupta ek olarak N ucunun yakınında genellikle art arda dizilmiş 35 kopyalar halinde DEYGNP (Battaglia ve ark., 2008) konsensüs sekansı ile Y domaini olarak bulunan motif, bitki ve bakterilerdeki şaperonlarda bulunan nükleotid bağlama domainine benzer bir amino asit sekansına sahiptir. S segmenti olarak adlandırılmış protein fosforilasyonu için Ser rezidülerini içeren bir bölgeye sahiptir (Campbell ve ark., 1998). Az korunmuş motifler, σ -segmentleri genellikle polar amino asitlerce zengin ve K-segmentleri arasında dağıtılmıştır (Dure ve ark., 1989; Close, 1996). Buğday dehidrin DHN-5'in K segmentleri laktat dehidrogenaz ve β -glukosidazın *in vitro* aktivitelerinin korunması için gereklidir (Drira ve ark., 2013). Tek bir polipeptid de farklı motiflerin varlığı ve sıralanması LEA II proteinlerinin 5 altgrupta sınıflandırılmasına imkan sağlamaktadır (Scott ve Close, 1997; Vaseva ve ark., 2013). Yalnızca K segmenti içeren proteinler K altgrubundadır. Ek olarak SK-, YK-, YSK- ve KS- altgruplarında bulunmaktadır (Shih ve ark., 2008). LEA II proteinlerinin moleküler ağırlığı ortalama 18.3 kDa'dır (Büyük, 2014).

1.3.1.3 LEA III proteinleri

LEA III proteinleri 11 aminoasitlik bir tekrar motifi ile tanımlanmışlardır. Bu protein grubunun moleküler ağırlığında farklılıklar vardır ve bu genellikle 11 bazlık motifindeki tekrar sayısının bir sonucudur. 11 bazlık motifindeki değişkenlik LEA III protein grubunun 3A pamuk D-7 LEA proteini ve 3B pamuk D-29 LEA proteini olarak iki alt grupta sınıflandırılmasına yol açmıştır. İlk grup (3A), oldukça korunmuştur. Bitki LEA III proteinlerine benzer gruplar mantar, mikroorganizma ve hayvanlar aleminde de tanımlanmıştır. Bu proteinler *Deinococcus radiodurans* (Battista ve ark., 2001), *Haemophilus influenza* (Dure, 2001) ve *Caenorhabditis elegans* (CeLEA-1) gibi prokaryotlarda da bulunmuş ve ifadeleri sıcaklık ve osmotik stres şartları altında bu nematodların hayatta kalmaları ile ilişkilendirilmiştir (Gal ve ark., 2004). *Steinernema feltiae* (Solomon ve ark., 2000), *Aphelencus avenae* (Browne ve ark., 2004), *Philodina roseola* (Tunnacliffe ve ark., 2010), *Polypedilum vanderplanki* (Wise ve Tunnacliffe, 2004), *A. franciscana* (Hand ve ark., 2007) gibi organizmalarda da LEA III proteini tespit edilmiştir. LEA III proteinlerinin ortalama moleküler ağırlığı 25.5 kDa olarak tespit edilmiştir (Büyük, 2014).

1.3.1.4 LEA IV proteinleri

LEA IV proteinleri damarlı ve damarsız bitkiler dahil olmak üzere bitkiler aleminde en yaygın görülen proteinlerdir. Bu gruptaki proteinlerin özelliği N ucunda bulunan konsensüs dizisidir (AQEKAEKMTA [R/H] DPXKEMAHK [E/K] [A/E] [K/R]) (Battaglia ve ark., 2008). Ancak 4 tane ek motif birçok LEA IV proteinini ayırt ettirebilmektedir ve iki alt gruba ayırmıştır. İlk alt (4A grubu) grup küçük proteinlerden oluşmaktadır (80 - 124 rezidü uzunluğunda). Diğer alt grup ise (4B grubu) 108-180 uzunluğunda rezidüler bulundurmaktadır. Pamuk D-113 proteini ilk olarak bu grupta tespit edilmiştir (Carrillo ve ark., 2010). D-113 proteini domates Le25, soya fasulyesinde GmPM1 ve GmPM16, *Arabidopsis*'te AtLEA4-1 ve AtLEA4-5 ve fasulyede PvLEA-18 olmak üzere farklı çeşitlerde belirlenerek izole edilmiştir. Molekül ağırlığı ortalama 12.6 kDa'dır (Büyük, 2014).

1.3.1.5 LEA V proteinleri

LEA V proteinleri ilk olarak pamukta D-34, D-73 ve D-95 proteinleri olarak tanımlanmıştır (Baker ve ark., 1988; Cuming, 1999). Hidrofobik rezidülerinin büyük oranını LEA V proteinleri içermektedir. Bu proteinler kaynadıktan sonra çözünmemektedir. Bu proteinlerin globüler konformasyona sahip oldukları öne sürülmüştür (Baker ve ark., 1988; Dure ve ark., 1989; Galau ve ark., 1986). Mısır Rab28 (Pla ve ark., 1991), havuç ECP31 (Kiyosue ve ark., 1992) ve *Medicago trunculata* MtPM25'te (Boucher ve ark., 2010) LEA V proteinlerinin homologları tespit edilmiştir. Moleküler ağırlıkları ortalama 18.1 kDa'dır. Hidrofobik olması nedeniyle hidrofilik olan LEA I,II,III ve IV'ten ayrılmaktadır (Büyük, 2014).

1.3.1.6 LEA VI proteinleri

LEA VI proteinleri ilk olarak fasulyede tespit edilmiştir (Colmenero ve ark., 1997). Günümüze kadar bu ailenin 36 geni damarlı bitkilerde tanımlanmıştır. Bu grubun proteinleri küçük boyutludur (yaklaşık 7-14 kDa) (Büyük, 2014).

1.3.1.7 LEA VII proteinleri

ASR proteinleri LEA ailesinin üyeleri olarak kabul edilmiş küçük ve ısıya dayanıklı yapıya sahiptir (Maskin ve ark., 2007; Silhavy ve ark., 1995). Bu genin grubu tohumlu türlerin yanı sıra monokotil ve dikotillerin çeşitli türlerinde tespit edilmiştir (Silhavy ve ark., 1995).

1.3.2 LEA proteinlerinin yapısı ve özellikleri

LEA proteinlerinin biyokimyasal özelliklerinin çoğu hidrofilik yapısından ve amino asit bileşimi temel alınarak ortaya çıkmaktadır. Onların yüksek hidrofilik ve yüksek glisin içeriği, sitozin ve triptofan oranının düşüklüğü veya eksikliği ve bazı amino asit rezidülerinin (Ala, Glu, Lys/Arg, and Thr gibi) üstünlüğü gibi önemli benzerliklerine rağmen farklı protein gruplarının üyeleri arasında bulunamamıştır (Baker ve ark., 1988; Dure, 1993; Shih ve ark., 2008). Yüksek sıcaklıklarda çözünürlüğünü devam ettirmesi LEA proteinlerinin özelliklerindedir.

Çeşitli gruplar arasında LEA proteinlerinin büyüklükleri 5'ten 77 kDa kadar değişebilmektedir. Onlar asit, nötr veya bazik olabilmektedirler. CD (Circular dichroism), NMR (nuclear magnetic resonance) veya FTIR (Fourier transform IR) spektroskopisi kullanılarak bazı LEA proteinlerinin ikincil yapıları belirlenmiştir. LEA I, II ve III proteinlerinin en %50'sinin katlanmamış yapıda oldukları tahmin edilmektedir. D-95 (LEA V) proteinlerinin 3 boyutlu yapısı tespit edilmiştir.

LEA proteinleri bitkilerde sitoplazma, çekirdek, kloroplast, endoplazmik retikulum, mitokondri, plazma membranı, peroksizom ve vakuol de bulunduğu tespit edilmiştir (Tunnacliffe ve Wise, 2007). Farklı gruplardan LEA proteinleri kuru tohumlarda embriyo gelişim sırasında birikmektedirler. Grup I LEA proteinleri bitkilerde çoğunlukla tohumlarda bulunmakta ve vejetatif dokularda stres koşulları tarafından uyarılmamaktadır. LEA I proteinleri tohum gelişimi sırasında birikmekte ve embriyoya özgü LEA proteini olarak kabul edilmektedir (Manfre ve ark., 2006; Manfre ve ark., 2009).

Grup II LEA proteinleri tohumun kuruması sırasında ve su eksikliğine yanıt olarak düşük sıcaklık, kuraklık veya tuzluluk tarafından uyarıldığında birikmektedir (Nylander ve ark., 2001; Brini ve ark., 2007). Bu grubun çoğu tüm dokularda su eksikliği sırasında birikmektedir. Bazı dehidrinler düşük sıcaklık uygulamasında yanıt olarak fazla birikmektedir fakat tuz veya kuraklıkta bu şekilde olmamaktadır (Rorat ve ark., 2006). Birçok LEA II proteinleri sitoplazma da bazıları da çekirdekte birikmektedir. Bazı dehidrinler mitokondri, plazma membranı, endoplazmik retikulum ve vakuol çevresi dahil olmak üzere diğer hücre bölümlerinde de bulunabilmektedir (Danyluk ve ark., 1998; Houde ve ark., 1992; Borowskii ve ark., 2002; Heyen ve ark., 2002).

Bitkilerdeki grup III LEA proteinlerinin düşük sıcaklıkta, tuzlulukta ve kuraklıkta olgun tohumlarda biriktiği ifade ve transkriptomik analizlerde görülmüştür (Cattivelli ve Bartels, 1990). LEA III proteinlerinin ifadesinin stres koşullarında veya gelişim safhaları sırasında ABA tarafından düzenlendiği belirtilmiştir (Curry ve ark., 1991; Ried ve Walker-Simmons, 1993). Pamuk LEA III D-7 proteini olgun pamuk embriyolarında yaklaşık 200 mM'a kadar birikmektedir (Roberts ve ark., 1993). Tohum çalışmalarında LEA III proteinlerinin vakuollerde ve sitoplazmada depolandığı belirlenmiştir (Marttila ve ark., 1996).

LEA IV grubu proteinleri bazı sınıflandırmalarda kısmen grup III'te yer almaktadır. Pamuk D-113 yaklaşık 300 mM olarak embriyo dokularında homojen şekilde dağılmış olarak bulunmaktadır (Robert ve ark., 1993). Daha sonra benzer proteinlerin su eksikliğine yanıt olarak vejetatif dokularda biriktiği belirlenmiştir. Domates bitkisinde LEA IV transkriptlerinin (LE25) ABA ve su eksikliğine yanıt olarak yapraklarında biriktiği tespit edilmiştir (Cohen ve ark., 1991). *Arabidopsis*'in vejetatif dokularında su eksikliği uygulandığında LEA IV proteinlerinin transkriptlerinin biriktiği görülmüştür.

LEA V proteinlerinin transkriptleri soğuk, tuzluluk, kuraklık, yaralanma ve UV ışığı gibi stres şartlarına yanıt olarak ve tohum gelişiminin son aşamalarında biriktiği tespit edilmiştir (Kiyosue ve ark., 1994; Zegzouti ve ark., 1999). Mısırdaki RAB28, olgun kuru embriyoların çekirdeklerinde birikmektedir (Niogret ve ark., 1996). *Medicago trunculata* MtPM25 kuraklık tarafından uyarılmaktadır (Boudet ve ark., 2006).

1.3.3 LEA proteinlerinin fonksiyonları

LEA proteinleri ve onların stres dayanıklılık genlerinin ifadesi ve aralarındaki ilişkiyi gösteren birçok kaynak bulunmaktadır. Birçok çalışma tuz ve ozmotik stres sırasında LEA proteinlerinin koruma sağladığını göstermektedir. Transgenik yaklaşımlar tütün, *Arabidopsis*, pirinç, mısır, buğday, marul ya da lahanada farklı türlerden LEA proteinlerinin aşırı ifadesini abiyotik strese dayanıklı fenotipler geliştirmek için üretildiğini göstermiştir (Leprince ve Buitink, 2010). Ancak LEA proteinlerinin moleküler fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Bugüne kadar LEA proteinleri stabilizatör, antioksidanlar, hidrasyon tamponları, membran koruyucuları ve iyon şelatörleri olarak görev almıştır (Tunnacliffe ve Wise, 2007).

1.4 *Agrobacterium tumefaciens* ile Bitkilere Gen Aktarımı

Rhizobiaceae familyasından olan *Agrobacterium*, toprakta yaşayan gram negatif bakteri olup genellikle bitkiyi kök boğazında meydana gelen yaralardan enfekte etmekte ve kök boğazında bulunan hücrelerdeki kontrolsüz bölünmeler tümör oluşumuna neden olmaktadır. *A. tumefaciens*'ten bazı genlerin bitkiye geçmesi sonucunda tümör oluştuğu tespit edilmiştir. *A. tumefaciens*'te kromozom DNA'sının dışında halkasal bir DNA molekülü bulunmaktadır. Bitkilerde tümör oluşumuna neden olduğu için bu plazmit DNA'sı Ti (tumor inducing) plazmit olarak adlandırılmıştır. Ti plazmiti taç tümör (crown gall) olarak adlandırılan farklılaşmamış hücre topluluklarını meydana getirmektedirler (Simpson ve ark., 1986). *A. tumefaciens* bitki dokularına yaralı olduğu yerden giriş yaptığında bitkide fenolik bileşikler üretilmektedir. Fenolik bileşiklerin uyarıcı fonksiyonuyla Ti plazmitinin üzerinde bulunan T-DNA sağ ve sol sınırlardan (25 bç'lik) kesilip bitki hücrelerine iletilmektedir. İletilen T-DNA bitki kromozomlarına entegre olmaktadır (Chilton vd. 1980). T-DNA'nın kromozomlara entegrasyonundan sonra T-DNA'da var olan tümör oluşumunu sağlayan genler aktifleşmektedir. Bu genlerin ürettikleri oksin ve sitokinin gibi hormonlar hücrelerdeki hormon dengesini bozmakta ve hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bölünmesine neden olarak tümör oluşturmaktadır (Bevan ve ark. 1983).

T-DNA bölgesinde opin sentezleyen genlerin T-DNA'nın bitki hücresine transferinde fonksiyonları bulunmamaktadır. Bu genlerin enzimler aracılığıyla kesilerek yerine yabancı genlerin klonlanması gen aktarımını etkilememektedir. Bu yüzden istenilen hedef genler bu bölgeye yerleştirildiğinde *A. tumefaciens* aracılığı ile bitki hücrelerine aktarılabilirler (Özcan ve ark., 2001).

1.5 Çalışmanın Amacı

Tüm dünyada etkili olan tuzluluk problemi ülkemizde de karşılaşılmakta olan en ciddi sorunlar arasında yer almaktadır. Tuzluluk problemi hem tarımsal alanları hem de tuzluluk sorunu bulunan arazilerde tarımı yapılan bitkileri olumsuz yönde etkilemektedir (Yılmaz ve ark., 2011). Tuza dayanıklı bitki türlerinin belirlenmesi tuzluluk sorunu olan alanları değerlendirmede oldukça önem kazanmaktadır. Fasulye bitkisi dünya da önemli bir yere sahiptir. Fakat bu bitki tuzluluk stresine karşı oldukça duyarlıdır (Marchner, 1995). Yapılan araştırmalarda fasulye bitkisinin hem

çimlenme hem de gelişiminde tuz stresinin olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir (Güvenç ve Kantar, 1996, Demir ve Demir, 1996, Elkoca, 1997, Karanlık, 2001) . Bu nedenle günümüzde tuzluluk problemine çözüm olarak tuza dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalara oldukça önem verilmektedir. Özellikle fasulye gibi tuz stresine karşı dayanıklı olmayan türlerde dayanıklı genotiplerin belirlenip geliştirilmesi gerekmektedir.

Veri bankalarında yer alan ve tuza toleranslı İspir fasulye genotipine ait olan transkriptom (RNA-seq) verilerinin analizleri sonucunda, yüksek oranda ifade edilmekte olan LEA proteinlerini kodlayan genler tespit edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında yüksek oranda ifade olan genlerden *Lea5* geni klonlanarak tütün bitkisindeki ifadesi değerlendirilecektir. Klonlama sonucunda varsayılan *PvLea5* geninin varlığı ve fonksiyonel olduğu tespit edilirse fasulye bitkisinde abiyotik strese dayanıklılığı sağlayan mekanizmanın bir parçası çözümlenmiş olacaktır. Ayrıca bu geni taşıyan fasulye genotipinin ıslah materyali olarak kullanılmasına olanak sağlayacaktır.

2 MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali ve Doku Kùltür Ortamı

Transformasyon deneylerinde *Nicotiana tabacum* L. cv. Petite havana kullanılmıştır. Mikrosantrifùj tùp içerisindeki tùtùn tohumlarının ùzerine %20'lik sodyum hipoklorit eklerek 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tohumlar 5 kere steril destile su ile yıkanarak hormonsuz MS bùyùme ortamına (MS (4.4 g/L) + Sùkroz (30 g/L) + Fitajel (2.8 g) ph:5.8) ekilmiştir. 25 °C'de fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan bitki bùyùme kabininde imlendirilmiřlerdir. 4 haftada bir alt kùltùre alınan hormonsuz MS besi yerinde çimlendirilmiş dayanıklı bitkiler transgenik tùtùn bitkilerinin elde edilmesi için kullanılmıştır.

2.2 Bakteri Suşları ve Plazmidler

Transformasyon alışmalarında *E.coli* (*Escherichia coli*) (Dh5 α) ve *A. tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) (AGL1) bakterileri ile pIPKb004 ve pENTR™/D-TOPO plazmitleri kullanılmıştır.

2.3 Bakteri Bùyùme Ortamı ve Kùltür şartları

E.coli ve *A. tumefaciens* hùcrelerine klonlama aşamalarında bùyùmeleri için LB ve YEB bùyùme ortamları kullanılmıştır.

2.4 Primer Dizaynı

Aşağıda verilen primerler NCBI'dan elde edilen sekanslara gùre dizayn edilmiştir. Forward primerin 5' ucuna Gateway klonlama sisteminde bulunan giriş vektùrùyle uyumlu olan CACC bùlgesi eklenmiştir.

Çizelge 2.1 *Lea-5* genine özel dizayn edilen primer dizileri

<i>Lea-5</i>	
Forward Primer	5'- CACCGTTATGTCTCGTTCTCTCT-3'
Reverse Primer	5'- CTACGGTGGTGATTTGAACTT-3'

Primerler Vector NTI, Primer 3 ve GENTLE programları kullanılarak dizayn edilmiştir.

2.5 Fasulye Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Fasulye tohumları %5'lik sodyum hipokloritte 5 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar 5 kez steril su ile yıkanmıştır. Tohumlar steril vermikülit bulunan saksılara ekilerek Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. 25 °C'de fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık olan iklim kabininde Hoagland çözeltisi ile sulanarak büyütülmüştür. Fasulyeler ekildikten 16 gün sonra 150 mM NaCl bulunan Hoagland çözeltisi ile sulanarak tuz stresi uygulanmıştır. Stres uygulandıktan 9 gün sonra yaprak ve kök örnekleri alınarak RNA izolasyonu için -80 °C'de saklanmıştır.

2.6 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonuna başlamadan önce kullanılacak olan saf su, porselen havanlar, mikrosantrifüj tüpler, pipet uçları, pensler ve diğer tüm malzemeler 2 kere otoklavlanarak steril edilmiştir. Porselen havan ve mikrosantrifüj tüpler kullanılmadan önce sıvı azot ile muamele edilmiştir.

RNA izolasyonu için QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit kullanılmıştır. 100 mg bitki örneği sıvı azot ile muamele edilmiş porselen havanda sıvı azotla ezilmiştir. Ezilmiş bitki örneği sıvı azotla soğutulmuş 2 ml lik mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Tüpteki örnek üzerine 450 µl tampon RLT eklenmiş ve iyice vortekslenmiştir. Örnek QIAshredder spin kolona eklenerek 2 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır. Süpernatantın yarısı kadar etanol eklenmiş ve pipetle iyice karıştırılmıştır. Örnek RNeasy spin kolona eklenmiş ve 15 sn 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Örneklerden DNA'ları uzaklaştırmak için DNaz uygulaması yapılmıştır. RNeasy spin kolona 350 µl tampon RW1 eklenmiştir ve 15 sn 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım

uzaklaştırılmıştır. 10 µl DNaz I stok solüsyonu üzerine 70 µl tampon RDD eklenmiş ve hazırlanan 80 µl DNaz RNeasy spin kolondaki örnek üzerine eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 350 µl tampon RW1 eklenmiş ve 15 sn 12000 rpm de santrifüj edilmiştir.

500 µl tampon RPE kolona eklenmiştir ve 15 sn 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. 500 µl tampon RPE kolona eklenmiş ve 2 dakika 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılarak kolon 1 dakika maksimum hızda boş santrifüj edilerek kolonda kalan etanol atılmıştır. Kolon 1.5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Kolonun tam merkezine 40 µl RNaz'ı uzaklaştırılmış su eklemiştir. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika 12000 rpm' de santrifüj edilmiştir. RNA tekrar kolona eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

2.7 cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Çizelge 2.2'de verilen bileşenler sırasıyla buz üzerinde bulunan steril 0.5 ml lik mikrosantrifüj tüp içerisine eklenmiştir.

Çizelge 2.2 cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Yaprak (µl)	Kök (µl)
RNA (Total RNA)	1 µg (0.92)	1 µg (2.03)
Primer (Oligo (dT)₁₈ Primer)	1	1
H₂O	10.08	8.97
Toplam	12	12

Karışım çok kısa santrifüj edildikten sonra buz üzerine alınarak üzerine sırasıyla çizelge 2.3'te verilen bileşenler eklenmiştir.

Çizelge 2.3 cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler ve miktarları

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

3-4 sn santrifüj edildikten sonra 1 saat 42 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 70 °C’de 5 dk inkübe edilmiş ve -20 °C’de saklanmıştır.

2.8 PCR

Lea5 genini çoğaltmak için Q5 DNA Polimeraz ve gene özel primerler kullanılmıştır. PCR şartlarını optimize etmek için farklı bağlanma sıcaklıkları kullanılarak gradient PCR yapılmıştır (55 °C, 58.8 °C, 60.7°C, 62.6 °C). Çizelge 2.4’teki bileşenler PCR tüpüne koyularak tablo da verilen koşullarla PCR yapılmıştır.

Çizelge 2.4 *Lea5* genini PCR’la çoğaltmak için kullanılan bileşenler ve miktarları

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

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde 80 voltta 45 dakika yürütülmüştür.

2.9 Kompetan *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan *E.coli* hücrelerini hazırlamak için Mix & Go *E. coli* Transformation Kit kullanılmıştır. 50 ml’lik falkon tüp içerisine 10 ml LB besin ortamına *E.coli* (Dh5α) bakterisi ekilerek 37 °C’de bir gece büyütülmüştür. 500 ml’lik erlen içerisine 50 ml ZymoBroth ortamı koyularak büyütülen bakteriden 0.5 ml eklenmiş ve OD₆₀₀ = 0.4 - 0.6 ya ulaşınca kadar 37°C’de 200 rpm’de inkübe edilmiştir. 2.5 ml wash buffer (2X) ve 2.5 ml competent buffer (2X) falkon tüplerin içerisine koyulmuş ve üzerine 2.5 ml dilution buffer eklenerek buz üzerinde soğutulmuştur. Büyüyen bakteriler buz üzerine alınmıştır. 10 dk 4 °C’de 3000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet üzerine 5 ml soğuk Wash Buffer (1X) eklenip nazikçe pelletin çözünmesi sağlanmıştır. 10 dk 4 °C’de 3000 rpm de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılıp üzerine 5 ml soğuk competent buffer (1X) eklenerek nazikçe pellet çözülüp buz üzerine alınmıştır. Önceden sıvı azotta soğutulmuş olan steril 1.5 ml lik

mikrosantrifüj tüplere hazırlanan kompetan bakterilerden 50 µL eklenmiş -80 °C’de saklanmıştır.

2.10 Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) *Lea5* Geninin Klonlanması

Lea5 geni Gateway giriş vektörüne pENTR™/D-TOPO Cloning Kit (Invitrogen) kullanılarak klonlanmıştır. Ligasyon için 0.5 ml lik mikrosantrifüj tüp içerisine çizelge 2.5’teki bileşenler koyularak karıştırılmış ve 25 °C’de 10 inkübe edilmiştir.

Çizelge 2.5. Gateway klonlama sistemi ile oluşturulacak giriş vektörü için kullanılacak bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µL)
PCR ürünü	2
Tuz çözeltisi	1
TOPO vektör	1
H ₂ O	2

2 µL ligasyon ürünü Mix & Go *E. coli* Transformation Kiti ile hazırlanmış olan kompetan *E.coli* bakterine eklenmiş ve 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Bakterilerin üzerine oda sıcaklığında ki SOC besin ortamından 250 µL eklenmiş ve 1 saat 37 °C’de 200 rpm de çalkalanarak inkübe edilmiştir. *Lea5* geninin klonlanmış olduğu bakterileri seçmek için katı LB besin ortamına kanamisin (50mg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. 1 saat inkübasyondan sonra önceden 37 °C’de ısıtılmış katı LB ortamına (kanamisin (50mg/ml)) 100 µL bakteri yayılmış ve 1 gece 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

2.10.1 Koloni PCR

Lea5 geninin kompetan *E.coli* bakterilerinin içinde bulunan giriş vektörüne klonlanıp klonlanmadığını doğrulamak için koloni PCR yapılmıştır. Kanamisin (50mg/ml) bulunan LB katı besin ortamında bir gece önceden büyütülmüş bakterilerden tek koloniler seçilmiştir. *Lea5* geninin çoğaltılması için dizayn edilmiş primerler (F: *Lea5*: 5’- CACCGTTATGTCTCGTCTCTCT-3’ ve R: *Lea5*: 5’- CTACGGTGGTGATTGAACTT-3’) ile seçilen kolonilere PCR yapılmıştır. PCR tüplerinin içerisine aşağıdaki çizelge 2.6’de verilen bileşenler eklenip ve her tüpe 1 tane seçilen koloniden alınan bakteri eklenerek PCR yapılmıştır (Çizelge 2.7) (2X PCR Master mix Solution (i-Taq)).

Çizelge 2.6 Koloni PCR için kullanılacak bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
Master mix	10
F primer	1
R primer	1
Su	18

Çizelge 2.7 Koloni PCR koşulları

<i>Lea5</i>		
	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyonu	95°C	4 dk
Denatürasyon	95°C	30 sn
Bağlanma	54°C	30 sn
Uzama	72°C	20 sn
Son Uzama	72°C	5 dk

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde 80 voltta 45 dakika yürütüldükten sonra pozitif kolonilerden 2 tanesi dizileme için seçilmiştir.

2.10.2 Plazmit izolasyonu ve dizileme

Pozitif kolonilerden plazmid izolasyonu yapmak için 10 ml sıvı LB besin ortamına kanamisin (50mg/ml) antibiyotiği eklendikten sonra 37 °C’de 200 rpm de 1 gece çalkalanarak inkübe edilmiştir. Plazmid izolasyonu için GeneJET Plazmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. 1 gece önceden büyütülmüş olan bakterilerden 3 ml’si 12000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak pelletin üzerine 250 µL resuspension solution eklenmiş ve pellet iyice çözülene kadar vortekslenmiştir. Örneklerin üzerine 250 µL Lysis Solution eklenip karıştırılmıştır. 350 µL Neutralization Solution eklenip karıştırılmış ve 12000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant GeneJET spin kolona eklenmiş ve 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılıp kolonun üzerine 500 µL Wash Solution (etanol ile seyreltilmiş) eklenip 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiş ve bu aşama 1 kez daha tekrar edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra 12000 rpm de 1 dk boş santrifüj edilerek Wash Solution içerisinde bulunan etanol kalıntıları kolondan atılmıştır. GeneJET spin kolon 1.5 ml lik steril mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. 50 µL steril saf su

kolonun tam merkezine eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 12000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir.

Elde edilen plazmidler dizileme analizine gönderilmiştir. Dizileme MedSanTek firması tarafından M13 F: GTAAAACGACGGCCAG ve M13 R: CAGGAAACAGCTATGAC dizileme primerleri kullanılarak ABI 310 Capillary dizileme sistemi ile yapılmıştır.

2.11 Bitki Ekspresyon vektörüne *Lea5* Geninin Klonlanması

Gateway® LR Clonase® kitiyle *Lea5* geni ifade vektörüne klonlanmıştır (Invitrogen). pIPKb004 vektörü iki tane 35S promotörü ve seçici antibiyotik geni olan *HptII*'yi içeren IPK (The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research)'den elde edilmiş *Agrobacterium* aracılığıyla transformasyon için oluşturulmuş bitki ifade vektörüdür. Dizileme sonucu doğrulanan plazmitler ile ifade vektörünü oluşturmak için LR reaksiyonu yapılmıştır. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpe çizelge 2.8'de verilen bileşenler eklenerek karıştırılmış ve 2-3 saniye santrifüj edilmiştir.

Çizelge 2.8. Bitki ifade vektörüne *Lea5* genini klonlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
Giriş vektörü (150ng)	1
pIPKb004 vektörü (310ng)	0.5
TE tamponu (pH:8.0)	6.5
LR Clonase™ II enzimi	2

25 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra reaksiyonu sonlandırmak için 1 µL proteinaz K eklenerek vortekslendi ve 37 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. 1 µL ligasyon ürünü Mix & Go E. coli Transformation Kit'i ile hazırlanmış olan kompetan *E.coli* bakterine eklenerek ve 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Bakterilerin üzerine oda sıcaklığında ki SOC besin ortamından 250 µL eklenmiş ve 1 saat 37 °C'de 200 rpm de çalkalanarak inkübe edilmiştir. pIPKb004 vektörünün bulunduğu bakteri kolonilerini seçmek için LB besin ortamına spektinomisin (100mg/ml) antibiyotiği eklenmiştir. 1 saat inkübasyondan sonra önceden 37 °C'de ısıtılmış katı LB besin ortamına (spektinomisin (100mg/ml)) 100 µL bakteri yayılmış ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kolonileri seçmek için *Lea5* genine ve *HptII* genine özel primerlerle PCR yapılmıştır. PCR tüplerinin içerisine çizelge 2.9 de verilen bileşenler eklenip ve her tüpe 1 tane seçilen

koloniden alınan bakteri eklenerek PCR yapılmıştır. (2X PCR Master mix Solution (i-Taq))

Çizelge 2.9 Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	<i>Lea5</i> (µl)	<i>HptII</i> (µl)
Master Mix	10	10
10 µM F primer	1	1
10 µM R primer	1	1
dH₂O	8	8

Çizelge 2.10 Koloni PCR şartları

	<i>Lea5</i>		<i>HptII</i>	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95°C	4 dk	95°C	4 dk
Denatürasyon	95°C	30 sn	95°C	30 sn
Bağlanma	54°C	30 sn	54°C	30 sn
Uzama	72°C	20 sn	72°C	45 sn
Son uzama	72°C	5 dk	72°C	5 dk

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde 80 voltta 45 dakika yürütüldükten sonra pozitif kolonilerden 1 tanesi tütün transformasyonu için seçilmiştir.

2.11.1 Plazmit izolasyonu

Pozitif kolonilerden seçilmiş olan bakterilerden plazmid izolasyonu yapmak için 10 ml sıvı LB besin ortamına spektinomisin (100mg/ml) antibiyotiği eklendikten sonra 37 °C’de 200 rpm de 1 gece çalkalanarak inkübe edilmiştir. Plazmit izolasyonu için GeneJET Plazmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. 1 gece önceden büyütülmüş olan bakterilerden 3 ml’si 12000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak pelletin üzerine 250 µL resuspension solution eklenmiş ve pellet iyice çözülene kadar vortekslenmiştir. Örneklerin üzerine 250 µL Lysis Solution eklenip ve karıştırılmıştır. 350 µL Neutralization Solution eklenip karıştırılmış ve 12000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant GeneJET spin kolona eklenmiş ve 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılıp kolonun üzerine 500 µL Wash Solution (etanol ile seyreltilmiş) eklenip 12000 rpm de 1 dk santrifüj edilmiş ve bu aşama 1 kez daha tekrar edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra 12000 rpm de 1 dk boş santrifüj edilerek Wash Solution içerisinde bulunan etanol

kalıntıları kolondan atılmıştır. GeneJET spin kolon 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. 50 µL steril saf su kolonun tam merkezine eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 12000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiştir.

2.12 İpk Vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*'e (AGL1) Transformasyonu

2.12.1 Kompetan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterilerinin hazırlanması

Elektrokompetan agro hücrelerini hazırlamak için Mersereau ve ark., (1990) ve Shen ve Forde (1989) protokolleri uygulanmıştır. Yarı boş *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) 5 ml sıvı LB besin ortamına ekilerek 1 gece 28 °C'de 200 rpm de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra 500 ml LB besin ortamına büyüyen bakteriler eklenerek 28 °C'de 250 rpm de çalkanarak büyütülmüştür. Bakteriler OD₆₀₀:0.5-0.8'e ulaştığında buz üzerine alınmıştır. Bakteriler 4000 g de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 10 ml soğuk steril H₂O eklenmiştir. Pellet pipetle dikkatli bir şekilde çözülerek üzerine 500 ml soğuk steril H₂O eklenmiştir. 4000 g de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu aşama bir kere daha tekrar edilmiştir. Pelletin üzerine 50 ml soğuk steril H₂O eklenerek pipetle dikkatli bir şekilde çözülmüştür. 4000 g de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pelletin üzerine 5 ml %10 luk soğuk steril gliserol eklenerek pellet pipetle çözülmüştür. Elektrokompetan hücreler daha önceden sıvı azotta soğutulmuş kuru buz üzerine alınmış 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüplere 50 µL olacak şekilde eklenerek -80 °C'de saklanmıştır.

2.12.2 Elektrokompetan *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterilerine İpk vektörünün transformasyonu

Lea5 geninin bulunduğu pIPKb004 vektörü *A. tumefaciens* (AGL1) bakterilerine elektroporasyon (Biorad) cihazı ile transforme edilmiştir. Elektroporasyon cihazında kullanılacak olan küvetler buz üzerine alınarak soğutulmuştur. Daha önceden hazırlanıp -80 °C'de bulunan elektrokompetan hücreler buz üzerine alınmıştır. 50 µL bakteri üzerine 3 µL izole edilmiş olan plazmit (80 µL) eklenerek elektroporasyon cihazının küvetine koyulmuştur. Elektroporasyon cihazıyla plazmitlerin aktarıldığı hücrelere 1 ml YEB besin ortamı eklendikten sonra 3 saat 28 °C'de 200 rpm de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra spektinomisin (100 mg/ml), carbenicilin

(50 mg/ml) ve rifampisin(10 mg/ml) antibiyotikleri bulunan katı YEB besin ortamına 100 µL bakteri yayılarak 28 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

2.12.3 Koloni PCR

İki gün sonra büyüyen bakterilere koloni PCR yapılarak tütün transformasyonu için kullanılacak olan pozitif koloniler belirlenmiştir. *Lea5*, *HptII* ve *VirD* genlerine özel primerler ile PCR yapılmıştır.

Çizelge 2.11 *VirD*, *HptII* ve *Lea5* genlerine özel sentezletirilmiş primer dizileri

	Forward primer	Reverse primer
<i>Vir D</i>	5'-CCGCTTATCAAAGCAGCG AC-3'	5'-TCTGGAGGCACAACCGATTC -3'
<i>HptII</i>	5'-GATGTAGGAGGGCGTGG ATA -3'	5'-ATAGGTCAGGCTCTCGCTGA- 3'
<i>Lea5</i>	5'-CACCGTTATGTCTCGTTCT CTCT-3'	5'CTACGGTGGTGATTTGAACTT -3'

Çizelge 2.11’de verilen bileşenler tüplere koyularak seçilmiş kolonilerden alınan bakteriler eklenmiştir. Çizelge 2.12’de verilen koşullara göre PCR yapılmıştır.

Çizelge 2.12 Koloni PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)		
	<i>Lea5</i>	<i>HptII</i>	<i>VirD</i>
Master mix	10	10	10
F primer	1	1	1
R primer	1	1	1
Su	1	1	1

Çizelge 2.13 Koloni PCR şartları

	<i>Lea5</i>		<i>HptII</i>		<i>VirD</i>	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95°C	4 dk	95°C	4 dk	95°C	4 dk
Denatürasyon	95°C	30 sn	95°C	30 sn	95°C	30 sn
Bağlanma	54°C	30 sn	56°C	30 sn	58°C	30 sn
Uzama	72°C	20 sn	72°C	45 sn	72°C	1 dk
Son uzama	72°C	5 dk	72°C	5 dk	72°C	5 dk

PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde 80 voltta 45 dakika yürütülmüştür. Pozitif koloniler tütüne gen aktarımında kullanılmıştır.

2.13 *Agrobacterium* Aracılığıyla Tütün Transformasyonu

2.13.1 *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterilerinin büyütlmesi

Lea5 geninin bulunduğu pIPKb004 vektörüne sahip *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) bakterileri tütün transformasyonunda kullanılmıştır. Agro hücreleri karbenisilin (100 mg/L), spektinomisin (100 mg/L) ve rifampisin (10 mg/L) antibiyotiklerini içeren 50 ml sıvı YEB ortamında 28°C'de 200 rpm de 1 gün süreyle büyütlmüştür.

2.13.2 *Agrobacterium tumefaciens* ile tütün yaprak disklerinin inokülasyonu

8 hafta boyunca *in vitro* koşullarda katı MS (MS (4.4gr/L), fitajel (2.8gr/L) ve sükroz (30gr/L) pH:5.8) ortamında büyütlmüştür olan tütün yaprakları transformasyon için kullanılmıştır. Tütün yapraklarından 0,5 cm çapında diskler kesilerek 1 gün önceden büyütlmüştür olan bakteri kültürü (OD₆₀₀:0.5-0.8) içerisinde 30 dakika süreyle bekletilerek inokülasyon sağlanmıştır. İnokulasyondan sonra eksplantlar katı MS (MS, BA(1mg/L), NAA (0.1mg/L)) ortamına alınarak 3 gün süreyle karanlık şartlarda ko-kültüvasyona bırakılmışlardır. Ko-kültüvasyondan sonra tütün disklerinin üzerinde üremiş olan fazla bakterileri uzaklaştırmak için timentin (160mg/L) bulunan sıvı MS ortamında yıkanarak steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Daha sonra eksplantlar, bakteri gelişimini önlemek için timentin (160mg/L), sadece gen aktarılmış bitkilerin gelişimini sağlamak için ise higromisin (50 mg/L) içeren rejenerasyon (MS, BA(1mg/L), NAA (0.1mg/L)) ortamına alınmıştır. Rejenerasyon ortamına alınan eksplantlar 16sa/8sa periyodunda bitki büyüme kabininde kallus oluşturmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. 4-5 hafta sonra kallusların üzerinde gelişen higromisine (50 mg/L) dayanıklı transgenik sürgün adayları timentin (160mg/L) ve higromisin (50 mg/L) içeren köklendirme (MS) ortamına alınmıştır. Kalluslardan elde edilen sürgünlerin kök oluşturması için alınmış olduğu seçici besi yerinde (MS, higromisin (50 mg/L), timentin (160mg/L)) yaklaşık 8 hafta sonra rejenere olan aday transgenik tütünler steril edilmiş toprağa alınarak seraya aktarılmıştır.

2.14 Aday Transgenik Tütünlerde Analizler

Transforme edilen genin aktarılmış olup olmadığını ve ifade edilip edilmediğini doğrulamak için aday transgenik tütünlere hem moleküler hem de fizyolojik yöntemler kullanılarak analizler yapılmıştır.

2.14.1 Aday transgenik tütün bitkilerinde moleküler analizler

2.14.1.1 T1 tütün bitkilerinden DNA izolasyonu

Tütün bitkilerinden genomik DNA izolasyonunu yapmak için ZR plant/Seed DNA MiniPrep™ kit (Zymo research) kullanılmıştır. İzolasyona başlamadan önce Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters (yeşil kapaklı) ucunda bulunan kısım açılıp tüp üzerine yerleştirildikten sonra 3 dakika 8000 g de santrifüj edilmiştir. 150 mg yaprak örneği kesilerek küçük parçalara ayrılmış ve ZR BashingBead™ Lysis tüpe koyulmuştur. Üzerine 750 µl Lysis Solution eklenmiştir. Tüpler 10 dakika vortekslenmiş ve sonrasında 12000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Zymo-Spin™ IV Spin Filter (turuncu kapaklı) tüp üzerine alınarak 400 µl süpernatant filtreye üzerine eklenmiştir. Tüpler 7000 g de 1 dk santrifüj edilmiştir. Tüp içerisinde bulunan sıvının üzerine 1200 µl Plant/Seed DNA Binding Buffer eklenmiş ve karıştırılmıştır. Karışımın 800 µl'si alınarak tüp üzerine koyulmuş olan Zymo-Spin™ IIC kolonuna eklenerek 10000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atılarak karışımdan kalan 800 µl örnek tekrar kolon üzerine eklenerek 10000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra kolona 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklenerek 10000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım atıldıktan sonra kolon üzerine 500 µl Plant/Seed DNA Wash Buffer eklenerek 10000 g de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüp üzerine alınmış ve kolonun tam merkezine 50 µl DNA Elution Buffer eklenmiştir. 10000 g de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Elde edilen 50 µl DNA izolasyona başlamadan önce hazırlanmış ve 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpe alınmış olan Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters (yeşil kapaklı) üzerine eklenerek 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. DNA'lar -80 °C'de saklanmıştır.

2.14.1.2 *Lea5* ve *HptII* genlerine özel primerlerle PCR

T1 aday transgenik bitkilerinden ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinden izole edilmiş DNA'lara çizelge 3.14'te verilen bileşenler ve PCR koşulları (çizelge 3.15) kullanılarak *Lea5*, *HptII* ve *VirD* genlerine özel primerlerle PCR yapılmıştır.

Çizelge 2.14 PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)		
	<i>Lea5</i>	<i>HptII</i>	<i>VirD</i>
Master mix	10	10	10
F primer	1	1	1
R primer	1	1	1
Su	1	1	1

Çizelge 2.15 *Lea5*, *HptII* ve *VirD* genlerini çoğaltmak için gereken PCR koşulları

	<i>Lea5</i>		<i>HptII</i>		<i>VirD</i>	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	95°C	4 dk	95°C	4 dk	95°C	4 dk
Denatürasyon	95°C	30 sn	95°C	30 sn	95°C	30 sn
Bağlanma	54°C	30 sn	56°C	30 sn	58°C	30 sn
Uzama	72°C	20 sn	72°C	45 sn	72°C	1 dk
Son uzama	72°C	5 dk	72°C	5 dk	72°C	5 dk

2.14.1.3 Mendel ayrılma (segregasyon) analizi

T1 tohumlarının Mendel ayrılma (segregasyon) analizi için mikrosantrifüj tüplere alınan aday transgenik ve kontrol (wild type) tütün tohumları %20'lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmış ve bu süre sonrasında 5 kere steril su ile yıkanmıştır. Steril edilen tohumlar higromisin (50mg/L) bulunan katı MS ortamında 25 °C'de 8 saat aydınlık /16 saat karanlık fotoperiyodundaki iklim kabininde büyütülmüştür. Mendel kalıtımında beklenen 3:1 oranı ($\chi^2 \leq 3.841$) =0.95 Ki kare analizi ile belirlenmiştir.

2.14.2 Aday transgenik tütün bitkilerinde fizyolojik analizler

Lea5 geninin ifade edilip edilmediğini belirlemek için aday transgenik tütün tohumlarına fizyolojik analizler yapılmıştır. Tuz stresi (NaCl) ve kuraklık stresi

(mannitol) uygulanan aday transgenik tohumların çimlenme ve büyümeleri gözlemlenmiştir.

2.14.2.1 Tuz stresi çalışmaları

Kontrol (Wild type) tütün bitkilerinin tuz toleranslarını belirlemek için tohumlar 50 mM, 100 mM, 150 mM ve 200 mM NaCl bulunan MS ortamına ekilmiştir. Tohumların çimlenme ve büyüme performansları gözlemlenmiştir. Bitkiler için letal konsantrasyonlar belirlenerek bu veriler aday transgenik tohumların analizleri için kullanılmıştır.

2.14.2.3 Kuraklık stresi çalışmaları

Kuraklık stresi çalışmaları 200 mM mannitol içeren katı MS ortamı üzerinde büyüyen aday transgenik ve transgenik olmayan (wild-type) tohumlarla gerçekleştirilmiştir.

2.14.3 İstatistiksel analizler

Veriler Microsoft Excel ve ki-kare analizi kullanılarak incelenmiştir

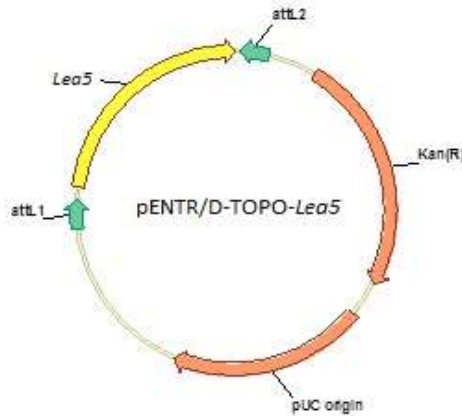
3 BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 cDNA Sentezi ve Gradient PCR

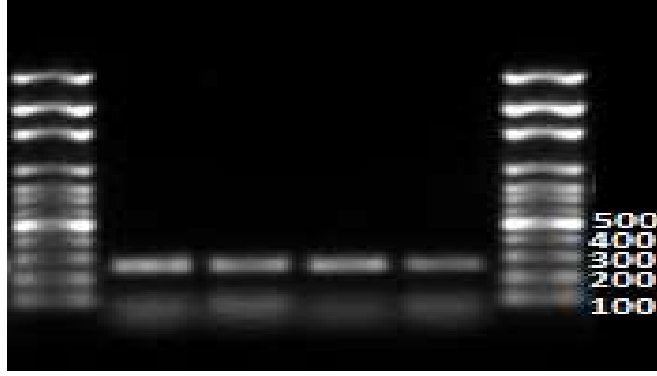
Lea5 geni, tuz stresi (150mM) uygulanmış olan fasulye bitkisi RNA'sından sentezlenmiş cDNA'dan PCR yapılarak elde edilmiştir. *Lea5* genini çoğaltmak için farklı sıcaklıklar (55 °C, 58.8 °C, 60.7°C, 62.6 °C.) kullanılarak yapılan gradient PCR sonucunda optimum bağlanma sıcaklığının 63 °C olduğu belirlenmiştir.

3.2 Giriş Vektörüne (pENTR™/D-TOPO) *Lea5* Geninin Klonlanması

Lea5 geni Gateway klonlama sistemi kullanılarak giriş vektörüne (pENTR™/D-TOPO) klonlanmıştır. *Lea5* geninin giriş vektörüne doğru yönde girmesi için forward primerinin 5' ucuna CACC nükleotidleri eklenmiştir. Gateway klonlama prosedürüne göre giriş vektörü oluşturulduktan sonra Mix & Go *E. coli* Transformation Kit ile hazırlanmış olan kompetan *E.coli* hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyondan sonra *Lea5* geninin bulunduğu bakterileri seçmek için kanamisin (50mg/ml) bulunan katı LB ortamına yayılan bakteriler 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Genin aktarılıp aktarılmadığını tespit etmek için *Lea5* genine özel primerlerle koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek pozitif koloniler belirlenmiştir.



Şekil 3.1. pENTR™/D-TOPO-*Lea5* vektörü

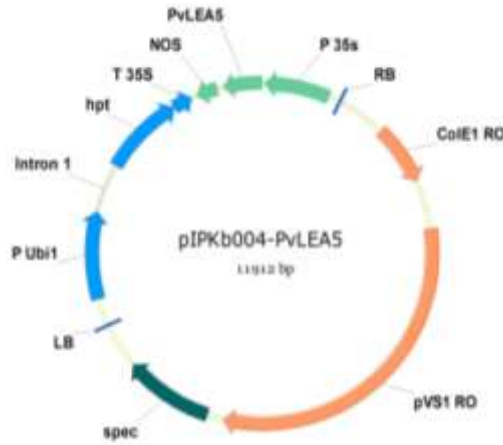


Şekil 3.2. *Lea5* genine özel primerlerle yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu

PCR sonucunda belirlenen pozitif kolonilerden 2 tanesi plazmit izolasyonunda (GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific)) kullanılmıştır. İzole edilen plazmitler dizileme analizine gönderilmiştir.

3.3 Bitki İfade Vektörüne *Lea5* Geninin Klonlanması

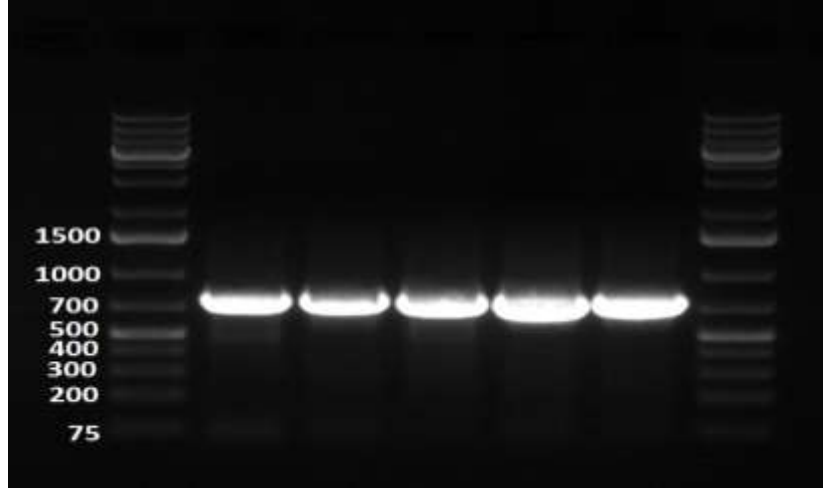
Dizileme analizi sonucunda doğrulanan plazmit bitki ifade vektörü olan pIPKB004 vektörüne Gateway klonlama sisteminin son aşaması olan LR reaksiyonu ile aktarılmıştır.



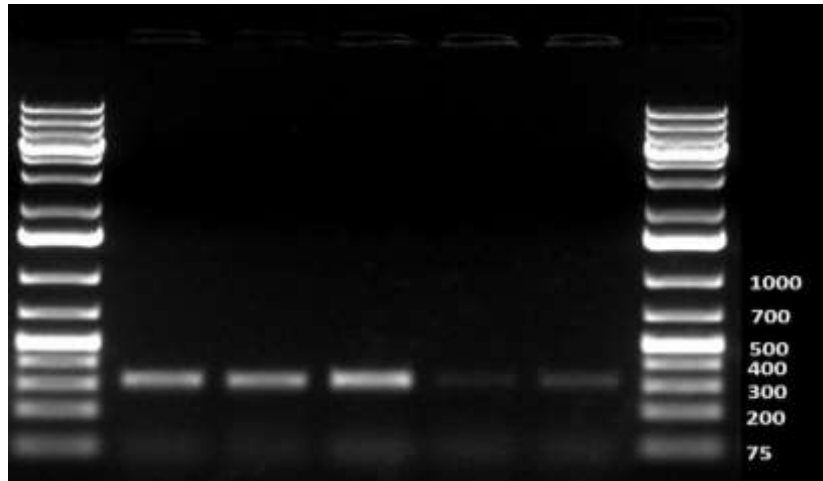
Şekil 3.3. LR klonaz enzimi yardımıyla giriş vektörü ve hedef vektör ile oluşturulan *PvLea5* genini taşıyan bitki ifade vektörü (pIPKB004-*PvLea5*)

LR ile oluşturulan vektör kompetan *E.coli* hücrelerine transforme edilerek spektinomisin (100 mg/L) bulunan katı LB ortamda 37 °C'de 1 gece inkübasyondan

sonra *Lea5* ve *HptII* genlerine özel primerlerle koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1 lik agaroz jelde yürütüldükten sonra pozitif koloniler belirlenmiştir.



Şekil 3.4. *Lea5*-pIPKb004 vektörünün *E.coli*'ye transformasyonundan sonra *HptII* primerleriyle yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu



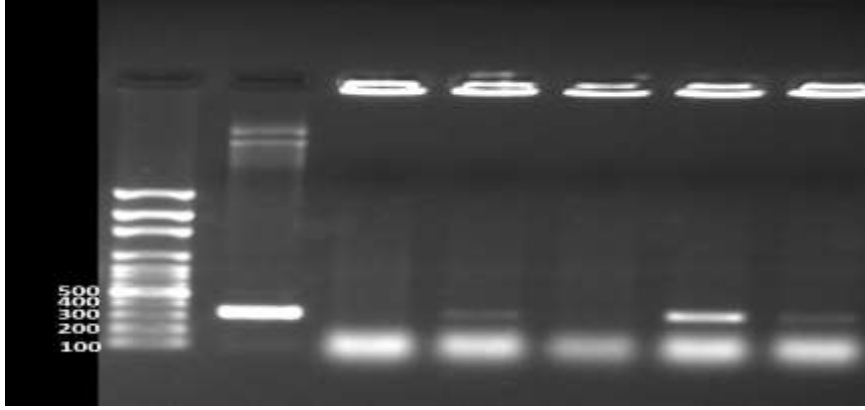
Şekil 3.5. *Lea5*-pIPKb004 vektörünün *E.coli*'ye transformasyonundan sonra *Lea5* primerleriyle yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu

Seçilen pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu (GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) yapılmıştır.

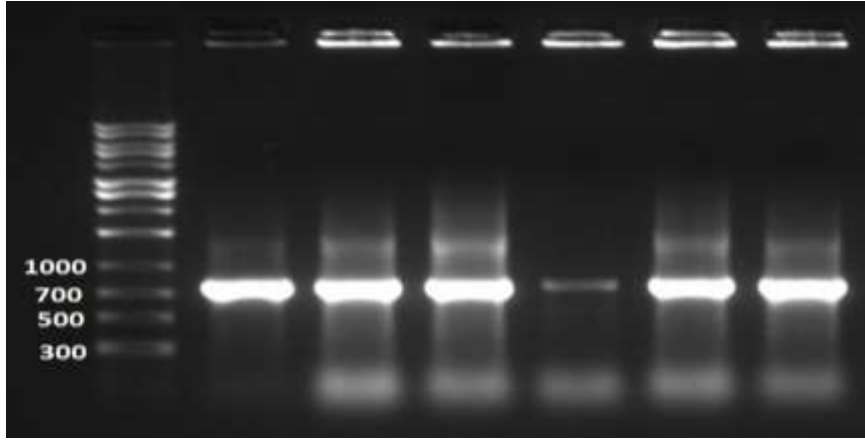
3.4 Ipk Vektörünün *Agrobacterium tumefaciens*'e (AGL1) Transformasyonu

Lea5 genini içeren pIPKB004 vektörü elektroporasyon cihazı ile elektrokompentan *Agrobacterium tumefaciens*'e (AGL1) hücrelerine aktarılmıştır. Spektinomisin (100 mg/ml), karbenisilin (50 mg/ml) ve rifampisin (10 mg/ml) antibiyotiklerini bulunduran YEB ortamında 28 °C'de büyütüldükten sonra oluşan koloniler seçilerek

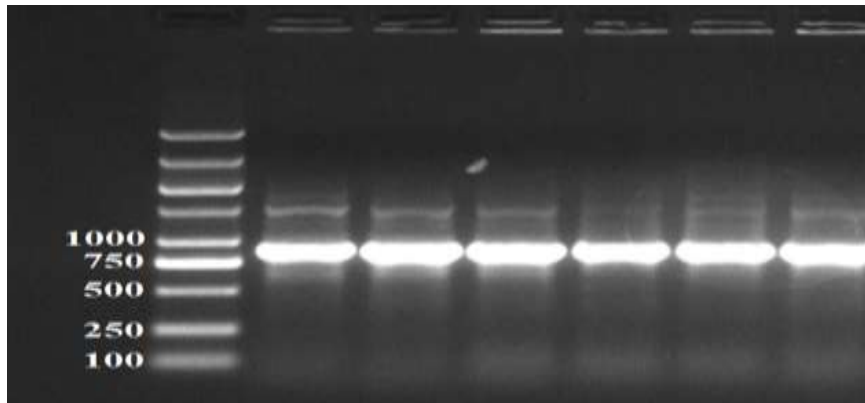
Lea5, *HptII* ve *VirD* genlerine özel primerlerle koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünleri agaroz jel de yürütüldükten sonra *Lea5* geninin *Agrobacterium* (AGL1) hücrelerine başarılı bir şekilde aktarıldığı belirlenmiştir.



Şekil 3.6. pIPKb004-*Lea5* vektörünün AGL1 hücrelerine transformasyonundan sonra *Lea5* primerleri ile yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu



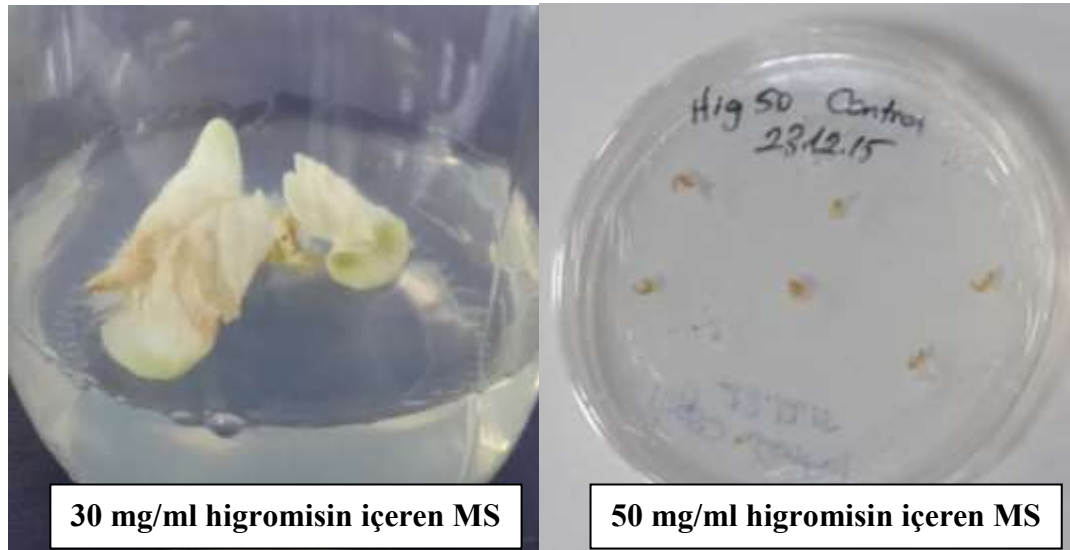
Şekil 3.7. pIPKb004-*Lea5* vektörünün AGL1 hücrelerine transformasyonundan sonra *HptII* primerleri ile yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu



Şekil 3.8. pIPKb004-*Lea5* vektörünün AGL1 hücrelerine transformasyonundan sonra *VirD* primerleri ile yapılan koloni PCR'ın elektroforez sonucu

3.5 Etkili Higromisin Miktarının Belirlenmesi

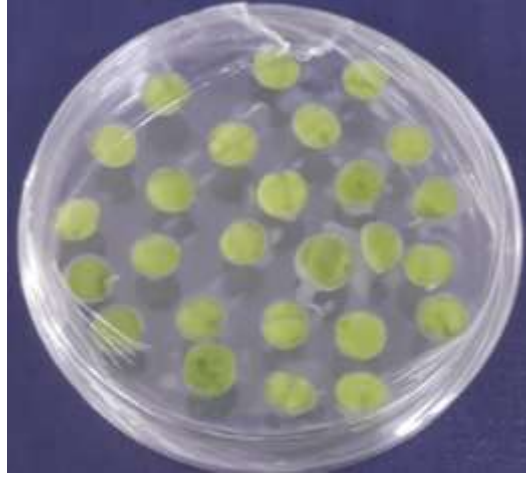
E. coli'ye ait bir gen olan higromisin fosfotransferaz (hpt) gen transferi çalışmalarında kullanılan vektörlerde bulunan ve genellikle protein sentezini inhibe eden seçici işaret genidir. Hücrenin metabolik hızı, ortamı, büyüme şartları ve hücre tipine bağlı olarak higromisin konsantrasyonları değişebilmektedir. Genellikle seçim için kullanılan konsantrasyon memeli hücrelerinde 200 mg/L, bakteri ve bitki hücreleri için 20-200 mg/L ve mantarlar için ise 200-1000 mg/L dir (AG Scientific, 2005). Bu çalışmada hem transgenik hem de transgenik olmayan tütün eksplantları 30 ve 50 mg/ml higromisin konsantrasyonunda test edilmiştir. Her iki konsantrasyonda transgenik olmayan bitkilerin seçim de etkili olmuştur.



Şekil 3.9. 30 ve 50 mg/ml higromisin içeren MS ortamında tütün eksplantı ve tohumlarının gelişimi

3.6 *Agrobacterium* Aracılığıyla Tütün Transformasyonu

Koloni PCR sonucunda belirlenmiş pIPKb004-*Lea5* vektörüne sahip *A. tumefaciens* (AGL1) bakterileri tütün transformasyonunda kullanılmıştır. Agro hücreleri seçici antibiyotiklerin bulunduğu (karbenisilin (100 mg/L), spektinomisin (100 mg/L) ve rifampisin (10 mg/L) sıvı YEB ortamında 28 °C'de büyütülmüştür. *In vitro* koşullarda büyütülmüş 8 haftalık tütün bitkisinden elde edilen yaprak diskleri bakteri ile muamele edilerek transformasyon yapılmıştır. Katı MS (MS, BA(1mg/L), NAA (0.1mg/L)) ortamına alınan eksplantlar 3 gün boyunca karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir.



Şekil 3.10. *A.tumefaciens* ile gen aktarımı yapılmış ve besi yerinde (MS + BA (1mg/L) + NAA (0.1mg/L)) 3 gün inkübe edilmiş tütün eksplantları

Bu süre sonrasında timentin (160mg/L) içeren sıvı MS ortamında fazla bakterilerden arındırılan eksplantlar bakteri gelişimini önlemek için timentin (160mg/L), gen aktarılmış bitkilerin gelişimini sağlamak için ise higromisin (50 mg/L) içeren rejenerasyon (MS, BA(1mg/L), NAA (0.1mg/L)) ortamına alınmıştır. Yaklaşık 5 hafta sonra oluşan sürgünler köklendirme (MS, higromisin (50 mg/L), timentin (160mg/L)) ortamına alınmışlardır.



Şekil 3.11. Gen aktarımı yapılmış tütünlerin MS besi ortamında (BA (1mg/l), NAA (0.1mg/l), Higromisin (50mg/l) ve Timentin (160mg/l)) 4-5 hafta sonra oluşturduğu kalluslar



Şekil 3.12. Gen aktarımı yapılmış kalluslardan elde edilen sürgünlerin köklendirme ortamına (MS + Higromisin (50mg/l) +Timentin (160mg/l)) alındıktan sonra ki gelişimleri (Gen aktarımından yaklaşık 5-6 hafta sonra)

8 hafta sonra rejenerere olan aday transgenik tütünler (40 hat) seraya alınmıştır.



Şekil 3.13. Gen aktarımı yapılmış kalluslarda oluşan bitkilerin köklendirme ortamına (MS + Higromisin (50mg/l) +Timentin (160mg/l)) alındıktan sonra ki gelişimleri (Gen aktarımından yaklaşık 8 hafta sonra)



Şekil 3.14. Aday transgenik tütün hatları

3.7 *Lea5* Geninin Aday T1 Transgenik Bitkilerindeki İfade Analizleri

3.7.1 Moleküler analizler

3.7.1.1 Mendel analizi

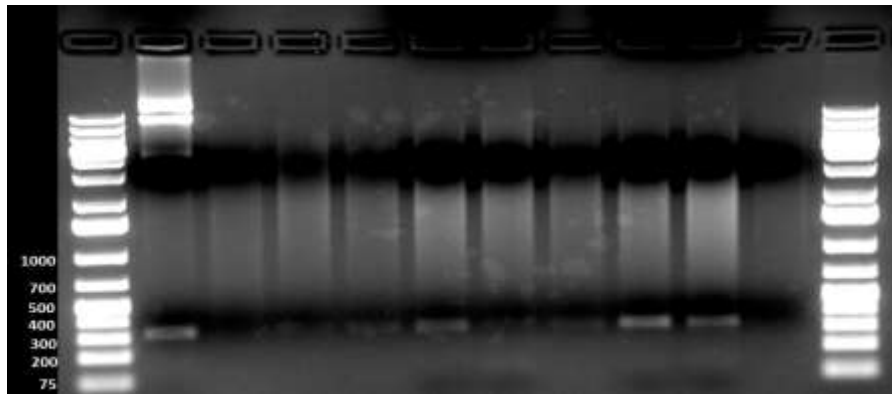
Aday transgenik tütün bitkilerinden elde edilen tohumlara yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. 40 aday transgenik hattan 10 tanesi seçilmiş ve 50 mg/ml higromisin antibiyotiği bulunan seçici MS ortamına ekilmiştir. Bu deney üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Mendel kalıtım analizi 8 hafta sonra transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinde, hayatta kalan bitkilere karşı kalmayan bitkilerin sayısı $p(\chi^2 \leq 3.841) = 0.95$ formülü temel alınarak hesaplanmış ve değerlendirilmiştir (Kavas, 2011).

Çizelge 3.1. T1 döllerinin Mendel Kalıtım Analizleri

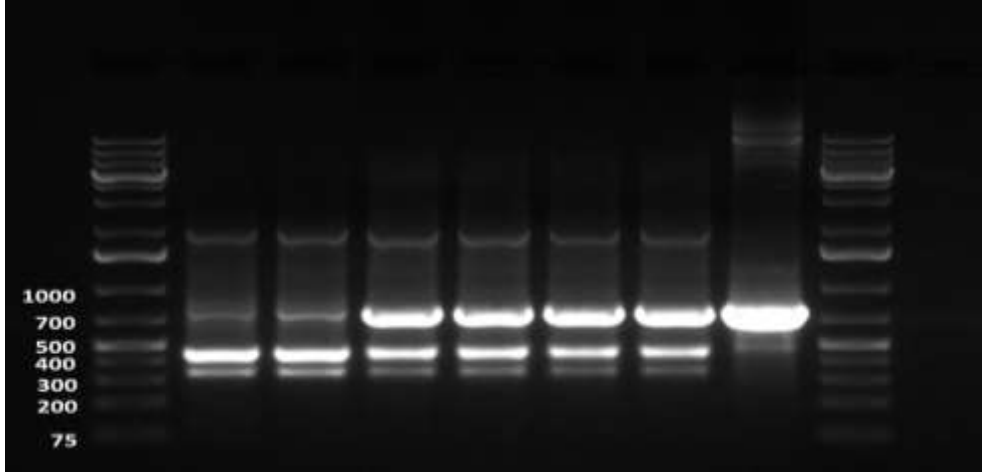
Hat	Toplam tohum yüzdesi	Çimlenen tohumların yüzdesi	χ^2	Sonuç
Transgeik olmayan (wild-type) tütün	%100	%0	300	Kabul edilmedi
2	%100	%80	1.333	Kabul edildi
5	%100	%70	1.333	Kabul edildi
6	%100	%90	12	Kabul edilmedi
10	%100	%90	12	Kabul edilmedi
12	%100	%90	12	Kabul edilmedi
14	%100	%80	1.333	Kabul edildi
15	%100	%80	1.333	Kabul edildi
16	%100	%90	12	Kabul edilmedi
20	%100	%100	33.33	Kabul edilmedi
21	%100	%85	5.33	Kabul edilmedi

3.7.1.2 Aday transgenik tütün bitkilerinde PCR analizleri

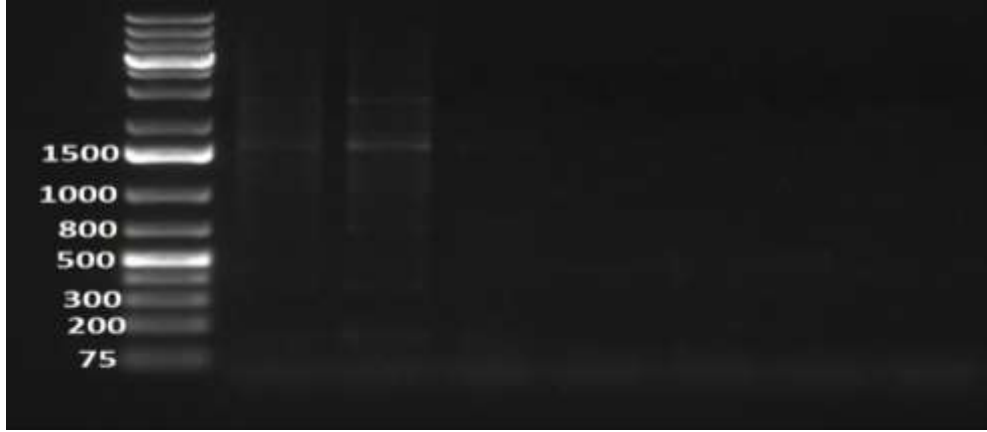
T1 aday transgenik bitkilerinden rastgele seçilen 8 hata DNA izolasyonu yapılmıştır. *Lea5*, *HptIII* ve *VirD* genlerine özel primerler ile elde edilen DNA'lara PCR yapılmıştır. PCR sonucunda 7 hatta *Lea5* geninin ve 7 hatta *HptIII* geninin bulunduğu tespit edilmiştir. *Lea5* geninin bulunduğu transgenik tütün bitkilerine başarıyla aktarıldığı tespit edilmiştir. Bu hatların hiç birinde *VirD* geninin bulunmadığı gözlemlenmiş ve transgenik bitkilerde *Agrobacterium* kontaminasyonu olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.15. Aday transgenik tütün DNA'larına *Lea5* primerleri ile yapılan PCR sonucu



Şekil 3.16. Aday transgenik tütün DNA'larına *HptII* primerleri ile yapılan PCR sonucu

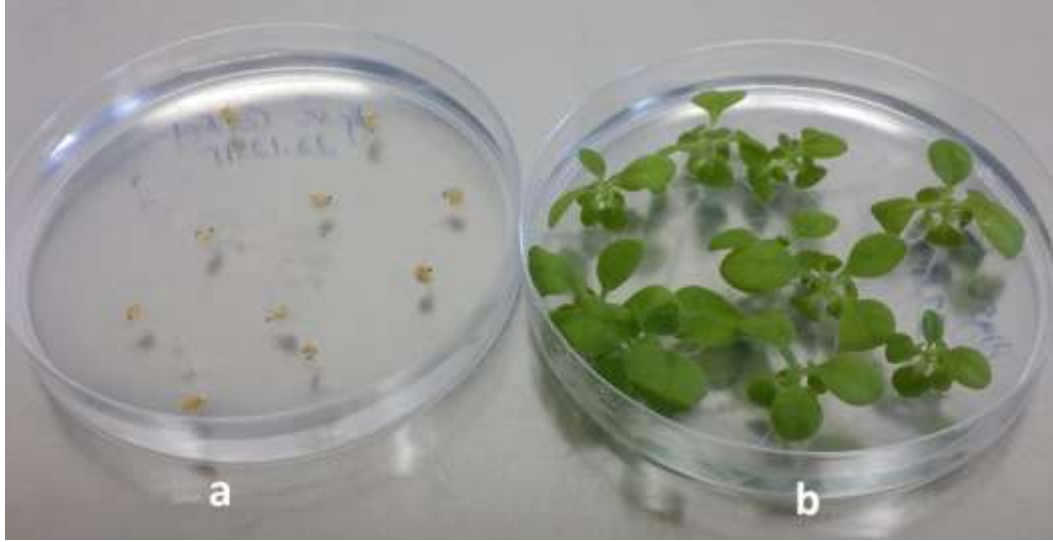


Şekli 3.17. Aday transgenik tütün DNA'larına *VirD* primerleri ile yapılan PCR sonucu

3.7.2 Aday transgenik tütün bitkilerinde fizyolojik analizler

3.7.2.1 Higromisin analizi

T1 transgenik bitkilerinin ve transgenik olmayan kontrol bitkilerinin tohumları 50 mg/ml higromisin içeren MS ortamında büyütülmüştür. 4 hafta süre sonunda kontrol bitkilerinin öldüğü transgenik bitkilerin ise hayatta kaldığı gözlemlenmiştir. Transgenik bitkiler higromisin antibiyotiğinin kontrol bitkilerini öldüren konsantrasyonda yaşamaya devam etmiş ve normal gelişimlerine devam etmişlerdir. Çünkü transgenik bitkiler higromisine dayanıklılık sağlayan *HptII* (hygromycin resistance gene) genini bulundurmaktadırlar.



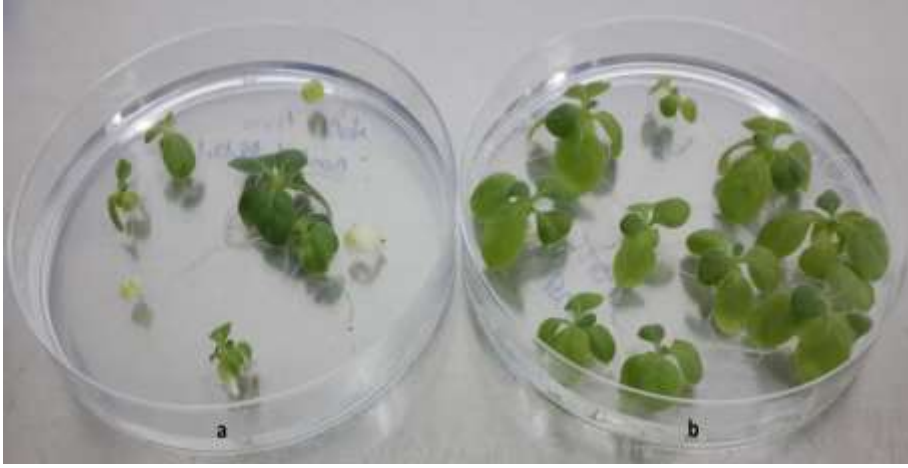
Şekil 3.18. 50 mg/ml higromisin içeren MS ortamında büyüyen transgenik olmayan ve transgenik olan bitkilerin gelişimleri (a: Kontrol tütün bitkileri, b: Transgenik tütün bitkileri (5. Hat))

3.7.2.2 Tuz Stresi Analizi

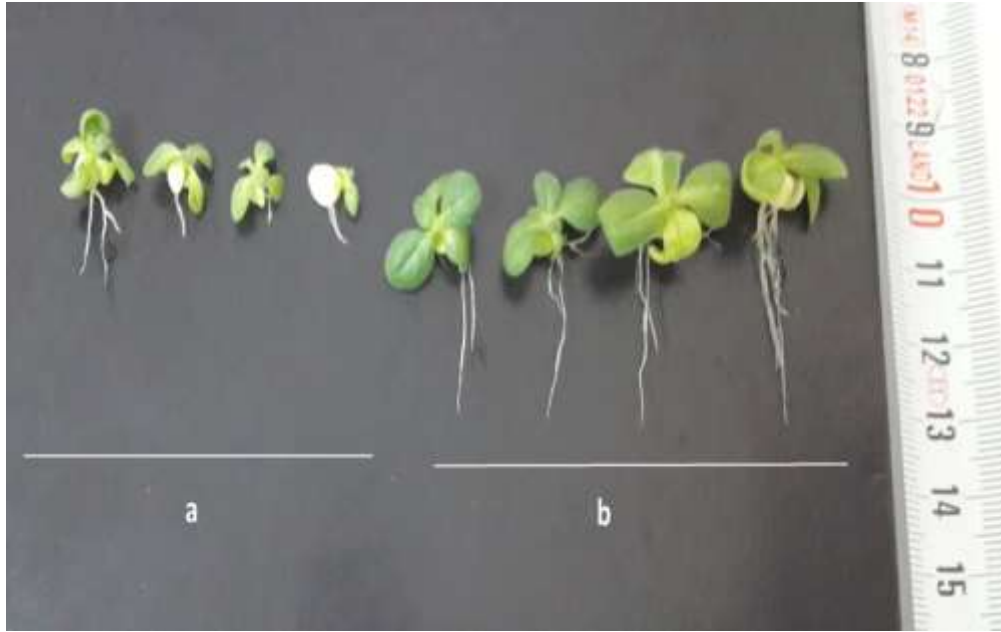
Transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkileri üzerinde tuz stresinin etkileri 150 mM ve 200 mM NaCl içeren MS ortamında büyüyen tohumlarla test edilmiştir. 150 ve 200 mM NaCl içeren ortamda 8 hafta büyüyen kontrol (wild-type) tütün bitkileri ve aday transgenik bitkiler karşılaştırıldığında transgenik bitkilerin kök ve yapraklarının kontrol bitkilerine göre daha iyi geliştiği gözlemlenmiştir.



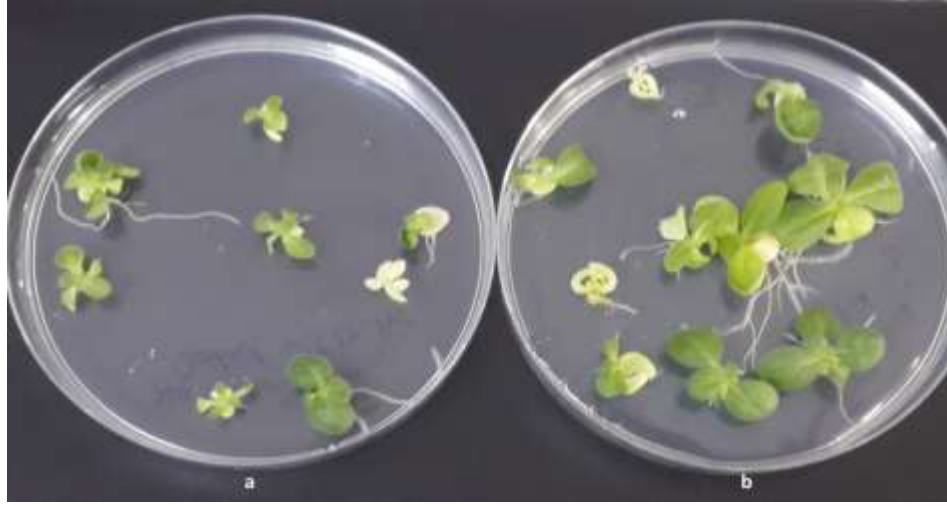
Şekil 3.19. 150 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları (a: Kontrol tütün bitkileri, b: Transgenik tütün bitkileri (5. Hat))



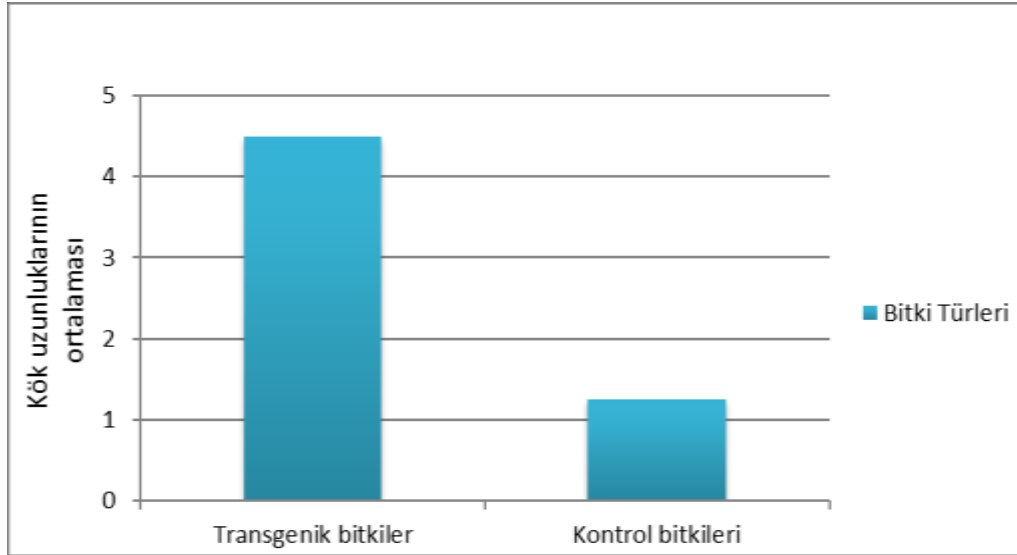
Şekil 3.20. 150 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkileri (a: Kontrol tütün bitkleri, b: Transgenik tütün bitkileri (5. Hat))



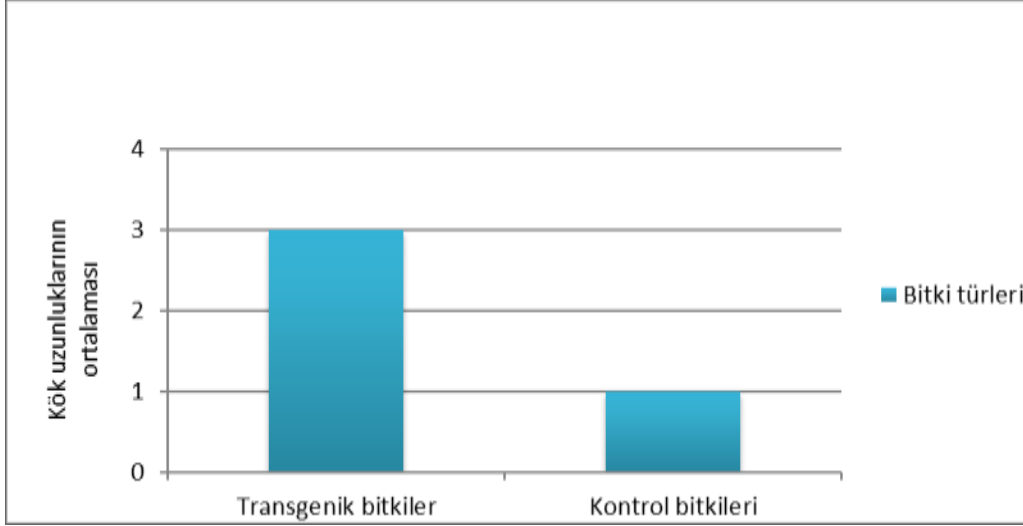
Şekil 3.21. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları (a: Kontrol tütün bitkileri, b: Transgenik tütün bitkileri)



Şekil 3.22. 200 mM NaCl bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wld-type) tütün bitkileri (a: Kontrol tütün bitkileri, b: Transgenik tütün bitkileri (5. Hat))



Şekil 3.23. 150 mM tuz içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması



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

3.7.2.3 Kuraklık Stresi Analizi

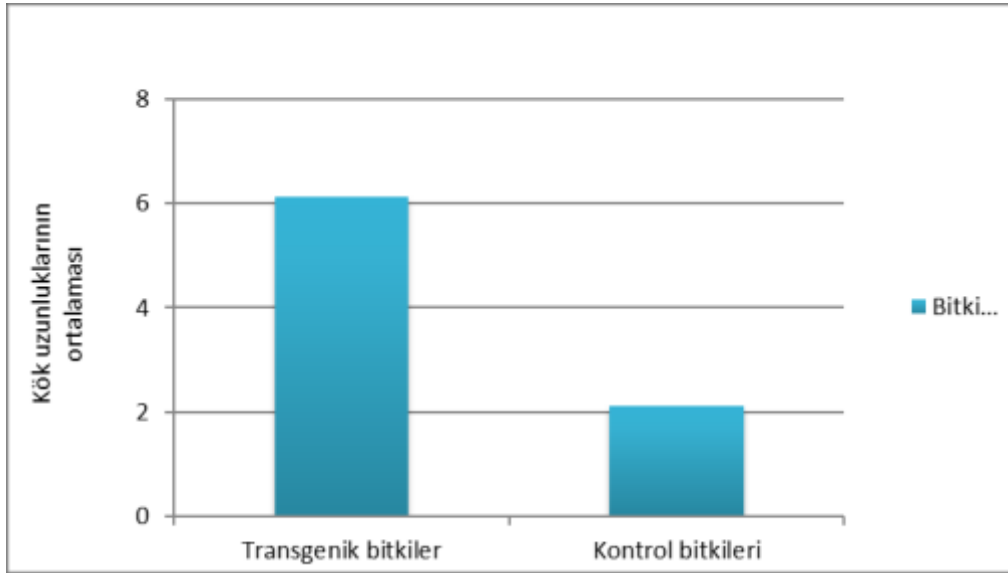
Transgenik ve transgenik olmayan kontrol bitkileri üzerinde kuraklık stresinin etkileri 200 mM mannitol içeren MS ortamında büyüyen tohumlarla test edilmiştir. 200 mM mannitol içeren ortamda 8 hafta büyüyen kontrol (wild-type) tütün bitkileri ve aday transgenik bitkiler karşılaştırıldığında transgenik bitkilerin kök ve yapraklarının kontrol bitkilerine göre daha iyi geliştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.25. 200 mM mannitol bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkilerinin kök uzunlukları (a: Transgenik tütün bitkileri, b: Kontrol tütün bitkileri (5. Hat))



Şekil 3.26. 200 mM mannitol bulunan MS ortamında 8 hafta büyüyen transgenik ve kontrol (wild-type) tütün bitkileri (a: Transgenik tütün bitkileri, b: Kontrol tütün bitkileri (5. Hat))



Şekil 3.27. 200 mM mannitol içeren MS üzerinde 8 hafta büyüyen tütün bitkilerinin kök uzunluklarının ortalaması

4 SONUÇ

Bu çalışmanın amacı fasulye bitkisinde var olduğu düşünölen *Lea5* genini tütün bitkilerine klonlayarak varlığını ve fonksiyonunu tespit etmektir. *Lea5* genini klonlamak için Gateway klonlama sistemi kullanılmıştır. Bu gen ilk önce pENTR/D-TOPO giriş vektörüne daha sonra da bitki ifade vektörü olan pIPKB004 vektörüne aktarılmıştır. *Lea5* genini içeren ifade vektörü *Agrobacterium* suşu olan AGL1 hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır. Genin aktarılmış olduğu *Agrobacterium* hücreleri ile tütün bitkilerine transformasyon yapılarak aday transgenik hatlar (40 hat) elde edilmiştir. Elde edilen aday transgenik bitkilere Mendel kalıtımı (segregasyon), higromisin, tuz stresi ve kuraklık stresi testleri yapılmıştır. Bu deneylerin sonucunda transgenik tütün bitkilerine *Lea5* geninin başarıyla klonlanmış olduğu tespit edilmiştir. Bu transgenik hatların hem tuz stresine hem de kuraklık stresine karşı dayanıklı olduğu fonksiyonel analizler sonucunda belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akçin, A., 1988. Yemelik tane baklagiller. Selçuk Üniv. Zir. Fak. Yayın No: 8, 41-189, Konya.
- Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli, Karanov E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24: 1337-134.
- Amara, I., Odena, A., Oliveira, E., Moreno, A., Masmoudi, K., Pagès, M. and Goday, A., 2012. Insights into Maize LEA Proteins: From Proteomics to Functional Approaches. *Plant Cell Physiology*, 53, 312-329.
- Ashraf, M., 1999. Interactive effect of salt (NaCl) and nitrogen form on growth, water relations and photosynthetic capacity of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Annals of Applied Biology*, 135, 509–513.
- Ashraf, M., 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199, 361-376.
- Asraf, M., and Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 206-216.
- Baker, J., Steele, C. and Dure, L., 1988. sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11, 277-291.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A.A., 2008. The enigmatic lea proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148, 6-24.
- Battista, J., Park, M.J. and McLemore, A., 2001. Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *deinococcus radiodurans* r1 to desiccation. *Cryobiology*, 43, 133-139.
- Bies-Etheve, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R. and Delseny, M., 2008. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (Late Embryogenesis Abundant) Protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67, 107-124.
- Blum A, 1986. Breeding crop varieties for stress environments, *Critical Reviews in Plant*.
- Borovskii, G., Stupnikova, I., Antipina, A., Vladimirova, S. and Voinikov, V., 2002. Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and aba treatment. *BMC Plant Biology*, 2, 5.
- Borovskii, G.B., Stupnikova, I.V., Antipina, A.I., Downs, C.A. and Voinikov, V.K., 2000. Accumulation of dehydrin-like-proteins in the mitochondria of cold-treated plants. *Journal of Plant Physiology*, 156, 797-800.
- Boucher, V., Buitink, J., Lin, X., Boudet, J., Hoekstra, F.A., Hundertmark, M., Renard, D. and Leprince, O., 2010. MtPM25 is an atypical hydrophobic late

- embryogenesis-abundant protein that dissociates cold and desiccation-aggregated proteins. *Plant, Cell & Environment*, 33, 418-430.
- Boudet, J., Buitink, J., Hoekstra, F., Rogniaux, H., Larre, C., Satour, P. and Leprince, O., 2006. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiology*, 140, 1418-1436.
- Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pagès, M. and Masmoudi, K., 2007. Overexpression of wheat dehydrin dhn-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 11, 2017-2026.
- Browne, J.A., Dolan, K.M., Tyson, T., Goyal, K., Tunnacliffe, A. and Burnell, A.M., 2004. Dehydration-Specific Induction of Hydrophilic Protein Genes in the Anhydrobiotic Nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell*, 3, 966-975.
- Büyük, İ., Aydın, S. ve Aras, S., 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (2), 97-110.
- Büyük, İ., 2014. Tuz ve Kuraklık Stresi Altında Geliştirilmiş Farklı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Çeşitlerinde *Lea-3* Geni mRNA İfade Seviyelerinin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemiyle İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara.
- Campbell, S.A. and Close, T.J., 1997 Dehydrins: Genes, Proteins, and Associations with Phenotypic Traits. *New Phytologist*, 137, 61-74.
- Campbell, S.A., Crone, D.E., Ceccardi, T.L. and Close, T.J., 1998. A ca. 40 kDa Maize (*Zea mays* L.) Embryo Dehydrin Is Encoded by the Dhn2 Locus on Chromosome 9. *Plant Molecular Biology*, 38, 417-423.
- Campos, F., Cuevas-Velazquez, C., Fares, M., Reyes, J.L. and Covarrubias, A.A., 2013. Group 1 LEA Proteins, an Ancestral Plant Protein Group, Are Also Present in Other Eukaryotes, and in the Archeae and Bacteria Domains. *Molecular Genetics & Genomics*, 288, 503-517.
- Cattivelli, L. and Bartels, D., 1990. Molecular Cloning and Characterization of Cold-Regulated Genes in Barley. *Plant Physiology*, 93, 1504-1510.
- Ceyhan E., 2007. Yemeklik Tane Baklagiller Ders Notları Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü,42070 Selçuklu / KONYA. <http://www.ziraatube.com/ders-notlari/tarla-bitkileri/ydb.pdf> Ziyaret tarihi: 08.01.2016
- CHEESMAN, J., 1988. Mechanisms of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Phys.*, 7: 547-550.
- Close, T., 1996. Dehydrins: Emergence of a Biochemical Role of a Family of Plant Dehydration Proteins. *Physiologia Plantarum*, 97, 795-803.
- Cohen, A., Plant, Á.L., Moses, M.S. and Bray, E.A., 1991. Organ-Specific and Environmentally Regulated Expression of Two Abscisic Acid-Induced Genes of Tomato. *Plant Physiology*, 97, 1367-1374.
- Colmenero-Flores, J.M.C., Garcarrubio, F. and Covarrubias, A.A., 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA Clones Responsive to Water

- Deficit: Identification of a Novel Late Embryogenesis Abundant-Like Protein. *Plant Molecular Biology*, 35, 393-405.
- CRUZ DE CARVALHO, M.H., LAFFRAY, D., LOUGUET, P., 1998. Comparison of Physiological Responses of *Phaseolous vulgaris* and *Vigna unguiculata* Cultivars when Submitted to Drought Conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 40: 197-207.
- Cuming, A., 1999. LEA Proteins. In: Casey, R. and Shewry, P.R., Eds., *Seed Proteins*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 753-780.
- Curry, J., Morris, C.F. and Walker-Simmons, M.K., 1991. Sequence Analysis of a cDNA Encoding a Group 3 LEA mRNA Inducible by ABA or Dehydration Stress in Wheat. *Plant Molecular Biology*, 16, 1073-1076.
- ÇIRAK, C., ESENDAL, E., 2006, Soyada Kuraklık Stresi. *Omü Zir. Fak. Dergisi*, 21(2): 231-237.
- Çiçek, N. and Çakırlar, H., 2002. The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 28(1-2): 66-74.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N. and Sarhan, F., 1998. Accumulation of an Acidic Dehydrin in the Vicinity of the Plasma Membrane during Cold Acclimation of Wheat. *The Plant Cell Online*, 10, 623-638.
- Demir, İ., Demir, K., 1996. Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Beş Değişik Fasulye Çeşidinde Çimlenme, Çıkış ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. GAP 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, 7-12 Mayıs 1996, Şanlıurfa, s. 335-342.
- Demiral, T., Türkan, İ., 2004. Does Exogenous Glycinebetaine Affect Antioksidative System of Rice Seedlings Under NaCl Treatment, *Journal of Plant Physiology*, 161: 1089-1100.
- Drira, M., Saibi, W., Brini, F., Gargouri, A., Masmoudi, K. and Hanin, M., 2013. The K-Segments of the Wheat Dehydrin DHN-5 Are Essential for the Protection of Lactate Dehydrogenase and β -Glucosidase Activities in Vitro. *Molecular Biotechnology*, 2, 643-650.
- Dure, L., 1993. A Repeating 11-Mer Amino Acid Motif and Plant Desiccation. *The Plant Journal*, 3, 363-369.
- Dure, L., 2001. Occurrence of a Repeating 11-Mer Amino Acid Sequence Motif in Diverse Organisms. *Protein and Peptide Letters*, 8, 115-122.
- Dure, L., Crouch, M., Harada, J., Ho, T.H., Mundy, J., Quatrano, R., Thomas, T. and Sung, Z., 1989. Common Amino Acid Sequence Domains among the LEA Proteins of Higher Plants. *Plant Molecular Biology*, 12, 475-486.
- Dure, L., Greenway, S. and Galau, G., 1981. Developmental Biochemistry of Cotton Seed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations as Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis. *Biochemistry*, 20, 4162-4168.
- Elkoca, E., 1997. Fasulye (*Phaseolous vulgaris* L.)'de Tuza Dayanıklılık Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Ellialtıoğlu, S. ve Tıprıdamaz, R., 1998. Doku Kültürünün Tuz Stresine Dayanıklılıktaki Kullanımı. Bitkilerde stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu, 70- 81, Bornova-Izmir.
- Ergene, A., 1982. Toprak Bilgisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:267, Ders Kitapları Serisi No:42, Erzurum.
- Freytag, G.F. and Debouck, D.G., 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. *Sida Botanical Miscellany*, 23, 1–300.
- Gal, T., Glazer, I. and Koltai, H., 2004. An LEA Group 3 Family Member Is Involved in Survival of *C. elegans* during Exposure to Stress. *FEBS Letters*, 577, 21-26.
- Galau, G.A., Hughes, D.W. and Dure, L., 1986. Abscisic Acid Induction of Cloned Cotton Late Embryogenesis-Abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 7, 155-170.
- Garay-Arroyo, A. Colmenero-Flores, J., Garcıarrubio, A. and Covarrubias, A.A., 2000. Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eukaryotes Are Common during Conditions of Water Deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 5668-5674.
- Gksoy, A.T. ; Turan, Z.M., 1991. Kuraklığın Bitki Fizyolojisi ve Morfolojisi zerine Etkileri. *U.Å.Z.F. Dergisi*, No: 8, s. 189-199, Bursa.
- Gven, İ., Kantar, F., 1996, Tuza dayanıklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(11), 144-153.
- Hand, S., Jones, D., Menze, M. and Witt, T., 2007. Life without Water: Expression of Plant LEA Genes by an Anhydrobiotic Arthropod. *Journal of Experimental Zoology*, 307A, 62-66.
- Hand, S.C., Menze, M.A., Toner, M., Boswell, L. and Moore, D., 2011. LEA Proteins during Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review of Physiology*, 73, 115-134.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Handa, A.V., 1986. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort. Sci.*, 21: 1317-1324.
- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F. and Randall, S.K., 2002. The Calcium-Binding Activity of a Vacuole-Associated, Dehydrin-Like Protein Is Regulated by Phosphorylation. *Plant Physiology*, 130, 675-687.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. and Buitink, J., 2001. Mechanisms of Plant Desiccation Tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 431-438.
- Holmberg, N. and Bulow, L., 1998. Improving Stress Tolerance In Plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 3(2), 61-66.
- Honjoh, K.I., Yoshimoto, M., Joh, T., Kajiwara, T., Miyamoto, T. and Hatano, S., 1995. Isolation and Characterization of Hardening-Induced Proteins in *Chlorella vulgaris* C-27: Identification of Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Plant and Cell Physiology*, 36, 1421-1430.
- Houde, M., Dhindsa, R.S. and Sarhan, F., 1992. A Molecular Marker to Select for Freezing Tolerance in Gramineae. *Molecular and General Genetics*, 234, 43-48.

- Hundertmark, M. and Hinch, D.K., 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) Proteins and Their Encoding Genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118.
- Kabar, K., Kocaçalışkan, İ., 1990. Buğday tohumlarının çimlenmesinde tuzluluk (NaCl), polifenol oksidaz ve büyüme düzenleyicileri arasındaki etkileşimler. *Doğa Türk Botanik Dergisi*. V 14. N 3: 235-245.
- Kadioğlu, A., 2004. *Plant Physiology, Practice Guide*. Trabzon, Turkey.
- Kalefetoglu, T. and Ekmekçi, Y. 2005. The effect of drought on plants and tolerance mechanisms. *G. U. Journal of Science*, 18 (4), 723- 740.
- KANTAR, F., ELKOCA, E., 1998. Kültür Bitkilerinde Tuza Dayanıklılık [Salt resistance in crop plants, Turkish]. *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Der.* 29(1):163-174.
- Karanlık, S., 2001. Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık Ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Adana.
- Kavas M., 2011. Development of salt resistant transgenic plants by using TANHX1 and TASTR genes. Phd thesis Middle East Technical University.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K., 1994. Characterization of Two cDNAs (ERD10 and ERD14) Corresponding to Genes That Respond Rapidly to Dehydration Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 35, 225-231.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Higashi, K., Satoh, S., Kamada, H. and Harada, H., 1992. Isolation and Characterization of a cDNA That Encodes ECP31, an Embryogenic-Cell Protein from Carrot. *Plant Molecular Biology*, 19, 239-249.
- Kocaçalışkan, I., 2003. *Bitki Fizyolojisi*. DPÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Yayını, 420.
- Kusvuran, S., 2004. Kavunda (*Cucumis melo* L.) Tuz Stresine Toleransın Belirlenmesinde Antioksidant Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonundan Yararlanma Olanakları. Ankara Üniversitesi Fen Bil. Enst., Yüksek Lisans Tezi, 104, Ankara.
- Kütevin, Z. ve Türkeş, T., 1987. *Sebzecilik ve Genel Sebze Tarımı Prensipleri ve Pratik Sebzecilik Yöntemleri*, İnkilap Kitabevi, İstanbul.
- LAFFRAY, D. VE LOUGUET, P., 1990. Stomatal Response and Drought Resistance. *Bulletin De La Societe Botanique De France* 137: 47-60.
- Larcher, W., 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, 506, Berlin.
- Leprince, O. and Buitink, J., 2010. Desiccation Tolerance: From Genomics to the Field. *Plant Science*, 179, 554-564.
- Levitt J., 1980. *Response of Plants to Environmental Stresses*. Academic Pres. Orlando
- Levitt, J., 1972. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, New York.
- Lichtenhaler, H.K., 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.

- Mahajan, S., and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139–158.
- Manfre, A., Lanni, L. and Marcotte, W., 2006. The Arabidopsis Group 1 Late-Embryogenesis Abundant Protein ATEM6 Is Required for Normal Seed Development. *Plant Physiology*, 140, 140-149.
- Manfre, A.J., LaHatte, G.A., Climer, C.R. and Marcotte, W.R., 2009. Seed Dehydration and the Establishment of Desiccation Tolerance during Seed Maturation Is Altered in the Arabidopsis thaliana Mutant Atem6-1. *Plant and Cell Physiology*, 50, 243-253.
- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, 657-680
- Marttila, S., Tenhola, T. and Mikkonen, A., 1996. A Barley (*Hordeum vulgare* L.) LEA3 Protein, HVA1, Is Abundant in Protein Storage Vacuoles. *Planta*, 199, 602-611.
- Maskin, L., Frankel, N., Gudesblat, G., Demergasso, M.J., Pietrasanta, L.I. and Iusem, N.D., 2007. Dimerization and DNA-Binding of ASR1, a Small Hydrophilic Protein Abundant in Plant Tissues Suffering from Water Loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352, 831-835.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239-250.
- Munns, R. and Termaat, A., 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13; 143-160.
- Niogret, M.F., Culiáñez-Macià, F.A., Goday, A., Albà, M.M. and Pagès, M., 1996. Expression and Cellular Localization of Rab28 mRNA and Rab28 Protein during Maize Embryogenesis. *The Plant Journal*, 9, 549-557.
- Nouri-Ganbalani A, Nouri-Ganbalani G, Hassanpanah D., 2009. Effects of drought stress condition on the yield and yield components of advanced wheat genotypes in Ardabil, Iran. *J. Food, Agric. Environ.*, 7(3&4): 228-234
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T. and Welin, B.V., 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, 45, 263–279.
- Oliveira, E., Amara, I., Bellido, D., Odena, M.A., Dominguez, E., Pages, M. and Goday, A., 2007. LCMSMS Identification of Arabidopsis thaliana Heat-Stable Seed Proteins: Enriching for LEA-Type Proteins by Acid Treatment. *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 1485-1495.
- Oliver, R.P. and Solomon, P.S., 2004. Does the Oxidative Stress Used by Plants for Defence Provide a Source of Nutrients for Pathogenic Fungi? *Trends in Plant Science*, 9, 472-473.
- Olvera-Carrillo, Y., Campos, F., Reyes, J.L., Garcarrubio, A. and Covarrubias, A.A., 2010. Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154, 373-390.
- ÖZCAN S., BABAOĞLU, M., GÜREL, E., 2004. Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.

- Özcan, S., Uranbey, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., 2001. Agrobacterium aracılığıyla gen transferi. Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M. (eds), Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, 112-159, Konya.
- Özdemir S., 2002. Yemelik Baklagiller, 142, Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- Pla, M., Gómez, J., Goday, A. and Pagès, M., 1991. Regulation of the Abscisic Acid-Responsive Gene *rab28* in Maize Viviparous Mutants. *Molecular and General Genetics*, 230, 394-400.
- PLJAKOFF-MAYER, A. ve GALE, J., 1975. *Plant in Salin Environments*. Springer-Verlag, Berlin, .213.
- Reynolds, T.L.B. and Derek, J., 1993. Abscisic Acid Enhances the Ability of the Desiccation-Tolerant Fern *Polypodium virginianum* to Withstand Drying. *Journal of Experimental Botany*, 44, 1771-1779.
- Ried, J.L. and Walker-Simmons, M.K., 1993. Group 3 Late-Embryogenesis-Abundant Protein in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, 102, 125-131.
- Roberts, J.K., DeSimone, N.A., Lingle, W.L. and Dure III, L., 1993. Cellular Concentrations and Uniformity of Cell-Type Accumulation of Two Lea Proteins in Cotton Embryos. *The Plant Cell Online*, 5, 769-780.
- Rorat, T., Szabala, B., Grygorowicz, W., Wojtowicz, B., Yin, Z. and Rey, P., 2006. Expression of SK3-Type Dehydrin in Transporting Organs Is Associated with Cold Acclimation in *Solanum* Species. *Planta*, 224, 205-221.
- Salisbury, F.B. and Ross, C.W., 1992. *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Co., California.
- Schubert, S. and Lauchli, A., 1990. Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. *Plant Soil*, 123, 205–209.
- Scott, A.C. and Close, T.J., 1997. Dehydrins: Genes, Proteins, and Associations with Phenotypic Traits. *New Phytologist*, 137, 61-74.
- Sgherry CLM, Pinzino C, Navari-Izzo F., 1996. Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O₂ -production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiol Plant*, 96: 446-52.
- Shih, M.D., Hoekstra, F.A. and Hsing, Y.I.E., 2008. Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Advances in Botanical Research*, 48, 212-240.
- Silhavy, D., Hutvágner, G., Barta, E. and Bánfalvi, Z., 1995. Isolation and Characterization of a Water-Stress-Inducible cDNA Clone from *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology*, 27, 587-595.
- Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., 2008. Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro, *Biol. Plant.*, 52(3): 573-576.
- Smirnoff N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*, 125: 27-58
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057–1060.

- Smith KJ, Huyser W., 1987 World distribution and significance of soybean. In: Wilcox JR (ed) Soybeans: improvement, production, and uses, 2nd edn. Agronomy 16:23-48
- Solomon, A., Salomon, R., Paperna, I. and Glazer, I., 2000. Desiccation Stress of Entomopathogenic Nematodes Induces the Accumulation of a Novel Heat-Stable Protein. Parasitology, 121, 409-416.
- Stacy, R.A.P., Nordeng, T.W., Francisco, A. and Aalen, R.B., 1999. The Dormancy Related Peroxiredoxin Anti-Oxidant, PER1, Is Localized to the Nucleus of Barley Embryo and Aleurone Cells. The Plant Journal, 19, 1-8.
- Şehirli, S., 1988. Yemelik Dane Baklagiller. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayın No: 1089. s.435. Ankara.
- TAL, M., 1983. Selection For Stress Tolerance. In "Handbook Of Plant Cell Culture" Vol. 1, Collier Macmillan Publishers, London, 461-487.
- Tunnacliffe, A. and Wise, M., 2007. The Continuing Conundrum of the LEA Proteins. Naturwissenschaften, 94, 791- 812.
- Tunnacliffe, A., Hinch, D., Leprince, O. and Macherel, D., 2010. LEA Proteins: Versatility of Form and Function. In: Lubzens, E., Cerda, J. and Clark, M., Eds., Dormancy and Resistance in Harsh Environments, Springer, Heidelberg, 91-108.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of droughttolerant *P. acutifolius* Gray and droughtsensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci., 168: 223-231.
- Ueda, A., Kathiresan, A., Inada, M., Narita, T. Y., Nakamura, T., Shi, W., Takabe, T. and Bennett, J., 2004. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. Journal of Experimental Botany 55: 2213-2218.
- Vaseva, I.I., Anders, I. and Feller, U., 2013. Identification and Expression of Different Dehydrin Subclasses Involved in the Drought Response of *Trifolium repens*. Journal of Plant Physiology, 171, 213-224.
- Wise, M.J. and Tunnacliffe, A., 2004. POPP the Question: What Do LEA Proteins Do? Trends in Plant Science, 9, 13- 17.
- Wu, X., Gong, F. and Wang, W., 2013. Functional Assignment to Maize Group 1 LEA Protein EMB564 within the Cell Nucleus Using Computational Analysis. Bioinformation, 9, 276-280.
- Yaşar, F., 2003. Tuz Stresi Altındaki Patlıcan Genotiplerinde Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin in vitro ve in vivo Olarak İncelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri, Doktora Tezi, 139, Van.
- Yemelik baklagil çalıştayı, Konya, 2014. <http://www.tarim.gov.tr/BUGEM/Belgeler/> (Ziyaret tarihi: 09.01.2016).
- Yurtseven, E., 1999. Sürdürülebilir tarım ve tuzluluk etkileşimi. VII. Kültürteknik Kongresi Bildirileri, 11-14 Kasım 1999, Kapadokya, 237-245.
- Zegzouti, H., Jones, B., Frasse, P., Marty, C., Maitre, B., Latché, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M., 1999. Ethylene- Regulated Gene Expression in Tomato Fruit:

Characterization of Novel Ethylene Responsive and Ripening-Related Genes Isolated by Differential Display. *The Plant Journal*, 18, 589-600.

Zhang, H.X., and E. Blumwald., 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19:765–768

Zhu, J.K., 2002, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 247-273.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif Seda ATABAY

Doğum Yeri ve Tarihi : KİLİS 24.01.1990

E-Posta : e.sedaatabay@gmail.com

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2009-2013)

Yayın Listesi : Musa Kavas, Mehmet Cengiz Baloğlu, Elif Seda Atabay, Ummugulsum Tanman Ziplar, Hayriye Yıldız Daşgan, Turgay Ünver Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH transcription factors in response to excess salt concentration, *Molecular Genetics and Genomics*, 7 / 2015, 10.1007/s00438-015-1095-6 [Uluslararası]

Konferans Bildirisi : Elif Seda ATABAY, Musa KAVAS, Tuza Toleranslı Fasulye Bitkisinden Klonlanan *LEA-5 (Late Embryogenesis Abundant-5)* Geninin Fonksiyonunun Transgenik Tütün Bitkisinde Değerlendirilmesi, 12 / 2015, Konya [Ulusal]

Projeler : Yaprak Açım Zamanını Bakımından Farklılık Gösteren Üç Fındık Çeşidinde Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri Kullanılarak Transkriptom Analizlerinin Gerçekleştirilmesi (Bursiyer)

Zeytin bitkisinden *OeMT2* ve *ER6* genlerinin klonlanması, tütün ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerine aktararak fonksiyonlarının değerlendirilmesi (BAP) (Araştırmacı)