

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORGANİK KOŞULLARDA YETİŞTİRİLMİŞ FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris L.*)  
ANLATIMI ARTAN GENLERİN SSH YÖNTEMİYLE İZOLASYONLARI

ÖZLEM TURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT

İSTANBUL, 2015

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORGANİK KOŞULLARDA YETİŞTİRİLMİŞ FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.)  
ANLATIMI ARTAN GENLERİN SSH YÖNTEMİYLE İZOLASYONLARI**

Özlem TURAN tarafından hazırlanan tez çalışması 26.11.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Yrd. Doç. Dr. ŞENAY VURAL KORKUT  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Eş Danışman**

Arş. Gör. Dr. Esra YÜCA  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Arş. Gör. Dr. Esra YÜCA  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Şener AKINCI  
Marmara Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL  
Ahi Evran Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2012-01-07-KAP02 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Tez çalışmam boyunca her daim yanımda olan, benden yardımlarını, sevgisini ve en önemlisi desteğini esirgemeyen, bilgileriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT' a,

Laboratuvara ilk girdiğim andan itibaren beni cesaretlendiren ve bilgilerini esirgemeyen değerli eş danışman hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Esra YÜCA'ya,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR' e,

En zor anlarımızda birlikte çalıştığım, desteğini ve dostluğunu hep hissettiğim arkadaşım Sayın Arş. Gör. Mine KUÇAK'a,

Biyoinformatik analizler esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Munise YURTSEVER'e,

Bana sağladığı çalışma olanağından dolayı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim elemanlarına,

Tez çalışmam süresince her zaman bana destek olan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde yüksek lisans yapan arkadaşım Gözde ZEYTUN ve doktora yapan arkadaşım Serpil DEMİR'e,

Sevgisiyle, desteğiyle her zaman yanımda olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım arkadaşım Özlem KULAK'a,

Beni bugünlere getiren, hayatımın her alanında beni cesaretlendiren ve her zaman desteklerini arkamda hissettiğim kardeşim Özkan TURAN, annem Ayten TURAN ve babam Genç Osman Kemal TURAN'a,

Buraya isimlerini yazamadığım hayatımın her anında bana inanan herkese

Saygı ve sevgilerimi sunarım.

KASIM, 2015

Özlem TURAN

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ .....	ix
KISALTMA LİSTESİ .....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1    Literatür Özeti .....	1
1.2    Tezin Amacı .....	2
1.3    Hipotez .....	3
BÖLÜM 2	
FASULYE VE ORGANİK TARIM .....	4
2.1    Fasulye ( <i>Phaseolus Vulgaris</i> L.) .....	4
2.1.1    Taksonomi .....	4
2.1.2    Tarihçesi, Besin Olarak ve Ekonomik Olarak Önemi.....	4
2.2    Organik Tarım .....	6
2.2.1    Türkiye’de Organik Tarım .....	6
2.2.2    Organik Tarımın Avantajları.....	8
2.3    Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH) .....	9
2.4    cDNA Kütüphanesi .....	12
2.5    Biyoinformatik Analizlerle EST ( Expressed Sequences Tags) Oluşturulması	12
2.6    GenBank.....	13
BÖLÜM 3	

MATERYAL VE METOD .....	14
3.1 Bitki Materyali.....	14
3.2 Besiyerleri .....	14
3.2.1 <i>E.coli</i> Büyütme Besiyeri .....	14
3.3 Tamponlar ve Solüsyonlar .....	15
3.4 Moleküler Markırlar .....	16
3.5 Enzimler .....	16
3.6 Kitler.....	17
3.7 Vektör ve Bakteri Suşları.....	17
3.8 Oligonükleotidler .....	17
3.9 Programlar .....	18
3.9.1 Chromas.....	18
3.9.2 BioEdit.....	18
3.9.3 BLAST .....	18
3.9.4 CAP3.....	19
3.10 Bitki Büyütme Koşulları.....	19
3.11 Bitki Örneklerinin Toplanması .....	19
3.12 RNA İzolasyonu .....	19
3.12.1 Bitkilerden Total RNA İzolasyonu.....	19
3.12.1.1 Homojenizasyon.....	20
3.12.1.2 Faz Ayrımı.....	20
3.12.1.3 RNA Çöktürme.....	20
3.12.1.4 RNA Yıkama .....	20
3.12.1.5 RNA'yı Yeniden Çözündürme .....	20
3.12.2 Total RNA İçin Cleanup Uygulanması.....	21
3.12.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	21
3.12.3.1 UV Spektrofotometre İle Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	21
3.12.3.2 Nanodrop ile Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	21
3.12.4 RNA'nın Denatüre Edici Formaldehit Jel Üzerinde Analizi.....	21
3.12.4.1 Jelin Hazırlanması.....	21
3.12.4.2 RNA Örneklerinin Hazırlanması.....	22
3.13 Total RNA'dan mRNA İzolasyonu .....	22
3.13.1 mRNA Miktarının Belirlenmesi.....	22
3.13.1.1 Spot Testi İle mRNA Miktarının Belirlenmesi.....	22
3.13.1.2 Nanodrop İle mRNA Miktarının Belirlenmesi.....	23
3.14 cDNA Sentezi.....	23
3.14.1 cDNA Sentez Primerinin Bağlanması.....	23
3.14.2 Birinci Zincir cDNA Sentezi .....	24
3.14.3 İkinci Zincir cDNA Sentezi.....	24
3.14.4 cDNA Uçlarının Kütleştirilmesi .....	24
3.14.5 Tester ve Driver cDNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi .....	25
3.15 <i>RsaI</i> Kesimi.....	25
3.16 Adaptör Ligasyonu .....	26
3.17 Birinci Hibridizasyon .....	28
3.18 İkinci Hibridizasyon .....	29
3.19 Birinci PCR Amplifikasyonu .....	30

3.19.1 Birinci PCR Amplifikasyonunun Agaroz Jel Üzerinde Analizi.....	31
3.20 İkinci PCR Amplifikasyonu.....	31
3.20.1 İkinci PCR Amplifikasyonunun Agaroz Jel Üzerinde Analizi .....	32
3.21 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması .....	32
3.21.1 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Analizi .....	32
3.21.2 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Spektrofotometrede Miktar Analizi..	32
3.22 Birinci PCR ve İkinci PCR Amplifikasyonlarının Tekrarlanması.....	33
3.23 cDNA' ların pGEM®-T Easy Vektörüne Ligasyonu .....	33
3.24 <i>E.coli'</i> ye Transformasyon .....	34
3.25 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması .....	35
3.26 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi.....	35
3.27 Biyoinformatik Analizler.....	35
<b>BÖLÜM 4</b>	
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>36</b>
4.1 Bitkilerin Büyütülmesi.....	36
4.2 Total RNA'ların Spektrofotometre Ölçümü .....	37
4.3 Total RNA'ların Nanodrop Ölçümü .....	39
4.4 Total RNA Analizi.....	41
4.5 mRNA Spot Testi .....	42
4.6 mRNA Nanodrop Analizi .....	43
4.7 cDNA'nın Jel Üzerinde Görüntülenmesi .....	43
4.8 1. PCR Amplifikasyonu PCR' larının Agaroz Jel Üzerinde Analizi .....	44
4.9 2. PCR Amplifikasyonu PCR' larının Agaroz Jel Üzerinde Analizi .....	45
4.10 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Analizi.....	46
4.11 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Spektrofotometrede Miktar Analizi.....	47
4.12 Rekombinant Hücrelerin Belirlenmesi.....	47
4.13 Beyaz Kolonilerin Seçilmesi ve Kolonilerin Analize Gönderilmesi .....	48
4.14 Biyoinformatik analizler .....	48
4.14.1 BLAST Analizleri.....	48
4.14.2 BLAST sonuçları .....	51
4.14.3 Konsensus Dizilerin BLAST Sonuçları.....	69
4.14.4 Kontik Dizilerin BLAST Sonuçları .....	82
4.14.5 BLAST Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	84
4.15 Öneriler .....	88
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>90</b>
<b>EK-A</b>	
<b>TOTAL RNA NANODROP SONUÇLARI.....</b>	<b>96</b>
<b>EK-B</b>	
<b>mRNA NANODROP SONUÇLARI .....</b>	<b>98</b>

EK-C

BLASTN VE BLASTP SONUÇLARI ..... 99

ÖZGEÇMİŞ ..... 120

## SİMGE LİSTESİ

---

dF	Dilüsyon faktörü
ds	Çift zincirli
ha	Hektar alan
g	Gram
kb	Kilobaz
L	Litre
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
U	Unit
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/ hacim
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram

## KISALTMA LİSTESİ

---

ARF	ADP ribozilasyon faktörü
BLAST	Dizi homolojisi arama motoru
°C	Sentigrat derece
CBL	Kalsinorin B benzeri
CIPK	CBL etkileşen protein kinaz
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
EST	Anlatımı yapılan dizi işaretleri (Expressed Sequences Tags)
IPTG	İzopropil $\beta$ -D- tiogalaktozit
LB	Luria Broth
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Ortam Reaksiyonu
PS	Fotosistem
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika
RT	Revers Transkriptaz enzimi
SOB	Super Optimal Broth
SSH	Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu
TCTP	Translasyon kontrol tümör proteini
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D- galaktozit

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Türkiye’de organik tarımın kurumsal ve yasal gelişimi ..... 7
Şekil 2. 2	Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu..... 11
Şekil 2. 3	cDNA kütüphanesi ve EST oluşturulması ..... 12
Şekil 3. 1	pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi ..... 33
Şekil 4. 1	Yetiştirilmiş fasulye bitkisi..... 36
Şekil 4. 2	Organik yetiştirilmiş 1. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu ..... 39
Şekil 4. 3	Organik yetiştirilmiş 2. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu ..... 39
Şekil 4. 4	Konvansiyonel yetiştirilmiş 1. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu..... 40
Şekil 4. 5	Konvansiyonel yetiştirilmiş 2. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu..... 40
Şekil 4. 6	Organik koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin yapraklarından izole edilen total RNA örnekleri jel görüntüsü..... 41
Şekil 4. 7	Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin yapraklarından izole edilen total RNA örnekleri jel görüntüsü ..... 42
Şekil 4. 8	mRNA spot testi ..... 43
Şekil 4. 9	cDNA jel görüntüsü ..... 44
Şekil 4. 10	Birinci PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü ..... 45
Şekil 4. 11	İkinci PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü..... 46
Şekil 4. 12	Saflaştırılmış PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü..... 47
Şekil 4. 13	Organik yapraktan elde edilen cDNA’nın klonlanması sonucu elde edilen koloniler..... 48
Şekil 4. 14	BLASTN analiz sonucunun NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü ..... 49
Şekil 4. 16	Konsensus dizilerin BLAST sonuçlarının kategorileri..... 87
Şekil 4. 17	Çıkarılan cDNA kütüphanesinin moleküler fonksiyonu sınıflandırılması ... 88

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Fasulye bitkisinin taksonomisi ..... 4
Çizelge 2. 2	Fasulye içerisindeki mineraller..... 5
Çizelge 2. 3	Fasulye içerisindeki karbonhidrat, protein ve lipit miktarı ..... 5
Çizelge 2. 4	Türkiye’de yıllara göre organik tarım verileri..... 8
Çizelge 3. 1	Luria Broth bileşenleri ..... 14
Çizelge 3. 2	Super Optimal Broth bileşenleri..... 15
Çizelge 3. 3	Tampon ve çözeltilerin hazırlanması ..... 15
Çizelge 3. 4	Moleküler markırlar ..... 16
Çizelge 3. 5	Enzimler..... 16
Çizelge 3. 6	Kitler ..... 17
Çizelge 3. 7	Vektör ve bakteri suşları ..... 17
Çizelge 3. 8	Oligonükleotidler ..... 17
Çizelge 3. 9	mRNA örneklerine cDNA sentez primerinin bağlanması ..... 23
Çizelge 3. 10	mRNA örneklerinden birinci zincir cDNA sentezi..... 24
Çizelge 3. 11	mRNA örneklerinden ikinci zincir cDNA sentezi ..... 24
Çizelge 3. 12	cDNA örneklerinin <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi..... 26
Çizelge 3. 13	Adaptör ligasyonu için master karışım hazırlanması ..... 27
Çizelge 3. 14	Adaptör ligasyonu için reaksiyonların kurulması ..... 27
Çizelge 3. 15	Organik cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri ..... 28
Çizelge 3. 16	Konvansiyonel cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri..... 28
Çizelge 3. 17	Kontrol cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri ..... 28
Çizelge 3. 18	Organik koşullarda yetiştirilen fasulye cDNA’sı için karışım miktarları. 29
Çizelge 3. 19	Konvansiyonel koşullarda yetiştirilen fasulye cDNA’sı için karışım miktarları..... 29
Çizelge 3. 20	Kontrol cDNA’sı için karışım miktarları ..... 29
Çizelge 3. 21	Birinci PCR karışımı..... 30
Çizelge 3. 22	İkinci PCR karışımı ..... 31
Çizelge 3. 23	Ligasyon reaksiyonu bileşenleri ..... 34
Çizelge 4. 1	Organik koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin spektrofotometre sonuçları..... 37
Çizelge 4. 2	Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin spektrofotometre sonuçları..... 38
Çizelge 4. 3	Birleştirilmiş total RNA örneklerinin spektrofotometre sonuçları..... 38
Çizelge 4. 4	Nanodropta ölçülen mRNA miktarları ..... 43
Çizelge 4. 5	Saflaştırılmış PCR ürünlerinin miktarı ..... 47

Çizelge 4. 6	İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları .....	51
Çizelge 4. 7	Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları .....	70
Çizelge 4. 8	Kontik dizilerin BLASTX sonuçları .....	83

**ORGANİK KOŞULLARDA YETİŞTİRİLMİŞ FASULYEDE (*Phaseolus vulgaris* L.)  
ANLATIMI ARTAN GENLERİN SSH YÖNTEMİYLE İZOLASYONLARI**

Özlem TURAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şenay Vural KORKUT

Eş Danışman: Arş. Gör. Dr. Esra YÜCA

Fasulye, yemeklik tane baklagiller arasında ekim alanı ve üretim miktarı bakımından dünyada ilk sırayı almaktadır. 2013 yılı verilerine göre Dünya’da 21.365.119 ton, ülkemizde ise 632.301 ton fasulye üretilmiştir. Fasulye önemli bir besin kaynağı olmasının yanı sıra hayvan yemi olarak kullanılabilmesi ve azot fiksasyonu yapabilmesinden dolayı hem ekonomik açıdan hem de bilimsel araştırmalarda kullanılması açısından öneme sahiptir.

Çevre kirliliğinin önlenmesi, biyoçeşitliliğin korunması, fosil yakıtlarının tüketiminin azaltılması ve daha besleyici ürünlerin yetiştirilmesi gibi avantajları nedeniyle organik tarıma olan ilgi artmaktadır. Organik ürünlerin besin içerikleriyle ilgili yapılmış çalışmalar olmasına rağmen bunlara temel oluşturan moleküler farklılıkları ortaya çıkaran araştırma yok denecek kadar azdır.

Bu çalışmada, organik şartlarda yetiştirilmiş fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) konvansiyonel olarak yetiştirilmiş fasulyeden farklı anlatım yapan genlerin izolasyonu yapılmıştır. Baskılayıcı çıkarım hibridizasyon yöntemi kullanılarak, *Phaseolus vulgaris* yapraklarından cDNA çıkarımlı cDNA kütüphanesi kurulmuştur. Kütüphaneden 94 klon

için dizin analizi yaptırılmıştır. cDNA dizinlerinin EST dizinleri olarak değerlendirilebilmesi için biyoinformatik analizler yapılmıştır. Dizinler NCBI' a ait (National Center for Biotechnology Information) GenBank veritabanıyla BlastN, BlastP ve BlastX uygulaması kullanılarak karşılaştırılmıştır.

BLAST sonuçları incelendiğinde elde edilen cDNA dizilerinin Fruktoz aldolaz, Rubisco, tRNA ligaz, Hidrolaz, Işık düzenleyiciler, F-box, ADP-ribosilasyon, Protein kinaz, Tümör proteinleri, Isı şoku proteinleri, Klorofil bağlayıcı protein ve Glisin dehidrogenaz kodlayıcı genlere önemli derecede benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), Organik Tarım, Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH), Gen İfadesi

**ANALYSIS OF GENES ISOLATED FROM COMMON BEAN GROWN UNDER  
ORGANIC CONDITIONS USING SSH METHOD**

Özlem TURAN

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Co-Adviser: Res. Assist. Dr. Esra YÜCA

In terms of growth area and production amount common bean have the first place in the world among the other granular leguminous seeds which are used for cooking. According to 2013 statistics, 21.365.119 tons in the world and 632.301 tons of beans are produced in our country. Beans as well as being an important food source it has importance for economic point and use in scientific research because of the animal can be used as feed and nitrogen fixation.

Interest in organic agriculture has been increasing globally because of its advantages such as prevention of environmental pollution, biodiversity conservation, reduced fossil fuel consumption and more nutritious products. Although there are studies on nutritional value of organic products, extensive researches which are related to revealing the underlying molecular differences are almost negligible.

In this study common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genes which are differentially expressed in common bean grown under organic conditions compared to conventional plants were isolated. cDNA library was constructed from leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Using Suppressive Substracted Hybridization (SSH) method. 94 clones were sequenced. Bioinformatic Analysis were performed to convert raw sequence data to EST data. The sequences were compared to the GenBank database of NCBI using BlastN, BlastP and BlastX tool.

Blast results indicated that cDNA sequences showed significant similarity to Fructose-bisphosphate aldolase, Rubisco, tRNA ligase, Hydrolase, Light regulated protein, F-box, ADP-ribosylation factor, Protein kinase, Tumor protein, Heat shock protein, Chlorophyll a/b binding protein, Glycine dehydrogenase protein encoding coding genes.

**Keywords:** Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Organic Farming, Suppression Subtractive Hybridization, Differential Gene Expression

---

**YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

#### 1.1 Literatür Özeti

Organik tarım, sürdürülebilir tarım sistemlerinden biridir. Ancak, organik tarımın tarlada ürünlerin üretimden pazarlamasına kadar geçen süreçte kendine özgü prensip ve uygulamaları bulunmaktadır [1].

Organik tarım; ekolojik sistemde hatalı uygulamalar sonucu kaybolan doğal dengeyi yeniden kurmaya yönelik, insana ve çevreye dost üretim sistemlerini içermekte olup, esas itibariyle sentetik kimyasal ilaçlar ve gübrelerin kullanılmasının yerine organik ve yeşil gübreleme, münavebe (ekim nöbeti), toprağın muhafazası, bitkinin direncini arttırma, parazit ve predatörlerden (zararlı böcekleri yiyen hayvanlar) yararlanmayı tavsiye eden ve üretimde miktar artışını değil ürünün kalitesinin yükselmesini ilke edinen bir üretim şeklidir [2].

Organik tarım uygulamaları sadece gelişmiş ülkelerde değil, gelişmekte olan ülkelerde de yaygınlaşmaktadır. Bu, özellikle gelişmiş ülkelerde tüketicilerin kendi sağlıklarını ve çevreyi korumaya verdikleri önemin giderek artması sonucu karşımıza çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yetiştirilemeyen organik ürünlere olan talep, uluslararası ticaretin gelişmesine sebep olmuştur. Dolayısıyla, Türkiye gibi organik tarıma uygun ekolojiye sahip gelişmekte olan ülkeler, gelişmiş ülkelere gelen talepleri karşılayabilmek için organik ürün üreticisi ve ihracatçısı konumuna gelmektedirler [1], [3].

Organik ve konvansiyonel yöntemlerle yetiştirilen ürünlerin karşılaştırıldığı pek çok araştırma vardır. Yapılan bir çalışmada organik domateslerin protein ve salisilik asit düzeylerinin daha fazla olduğu, vitamin ve likopen içerikleri ise daha düşük olduğu bulunmuştur [4]. Başka bir çalışmada ise organik ve konvansiyonel gübrelenmiş

topraklarda yetiştirilmiş ürünlerin besin elementi özellikleri karşılaştırılmış ve organik ürünlerin konvansiyonellere göre daha yüksek fosfor ve kuru madde oranı, daha düşük azot ve nitrat içeriğine sahip oldukları ortaya konulmuştur [5].

Besin değerlerinin karşılaştırılması dışında organik ve konvansiyonel ürünleri moleküler düzeyde gen anlatım farklılıklarını karşılaştıran çok az çalışma bulunmuştur. İngiltere Rothemstad Araştırma Enstitüsü'nde ekmeklik buğday varyetesi Hereward kullanılarak yapılan bir çalışmada bitkilere organik veya anorganik gübre verilmiştir. İki grup arasındaki gen anlatım farkı EST'ye dayalı mikroarray kullanılarak tespit edilmiştir. İki grubun gen anlatımları arasında farklar gözlemlenmiştir. Ayrıca organik gübre verilerek yetiştirilmiş bitkilerde özellikle azotlu bileşik metabolizmasında görev alan genlerin anlatımında artış gözlemlenmiştir [6].

Literatürde SSH yönteminin kullanıldığı pek çok çalışma vardır. Bunlardan bazılarında SSH kütüphaneleri başlangıç materyallerinden yapılan farklı problemlerle taranarak test örneği probuyla hibridize olan klonlar seçilmiştir [7]. Bazı çalışmalarda gen kütüphanesinin tamamının dizin analizi yaptırılarak biyoinformatik analizler yapılmış ve EST (Anlatımı yapılan dizi işaretleri-Expressed Sequences Tags) dizinleri şeklinde yayınlanmıştır [8]. Bizim laboratuvarımızda EST analizleriyle ilgili çalışmalar yoğun şekilde yapılmakta olduğundan elimizde bununla ilgili biyoinformatik programları koleksiyonu mevcuttur. Bu nedenle ikinci yol izlenecektir.

## **1.2 Tezin Amacı**

Bu araştırmada organik koşullarda yetiştirilmiş fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinde anlatımı artan genlerin baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu yöntemiyle klonlanması hedeflenmiştir. Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu yönteminin kullanılmasının nedeni, organik koşullarda anlatımı artan genler bakımından zenginleştirilmiş cDNA kütüphanelerinin kurulmasıdır. Kütüphanede bulunan klonların dizin analizi yaptırılmış ve biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir.

### **1.3 Hipotez**

Fasulye önemli bir besin kaynağı olmasının yanı sıra hayvan yemi olarak kullanılabilmesi ve azot fiksasyonu yapabilmesinden dolayı hem ekonomik açıdan hem de bilimsel araştırmalarda kullanılması açısından öneme sahiptir.

Organik tarım kimyasal gübrelerin ve ilaçların kullanılmadığı bir tarım çeşididir. Organik tarımın aksine destek maddelerinin kullanıldığı tarım alanlarında toprak ve sular kirlendiğı gibi, birçok canlının zarar görmesi de söz konusudur. Gen düzeyinde baktığımızda da organik koşullarda yetiştirilmiş bir bitki ile ilaçların ve gübrelerin kullanıldığı koşullarda yetiştirilmiş bitki arasında farklılıkların olması beklenmektedir.

Bu çalışmada organik koşullarda yetiştirilmiş fasulyenin yaprak dokusundan anlatımı artan genler klonlanmıştır ve hangi genlerin daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Bu amaçla baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu kullanılmıştır.

### FASULYE VE ORGANİK TARIM

#### 2.1 Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.)

##### 2.1.1 Taksonomi

Fasulye ( $2n = 2x = 22$ ) olgunlaşmamış meyve ve olgun tohumu tüketilebilen bir bitkidir [9]. *Plantae* (bitki) alemi, *Fabaceae* familya, *Papilionoideae* altfamilyasının *Phaseolus* cinsine aittir [10], [11].

Çizelge 2. 1 Fasulye bitkisinin taksonomisi

<b>Alem</b>	Plantae (Bitkiler)
<b>Bölüm</b>	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
<b>Sınıf</b>	Magnoliopsida (İki çenekliler)
<b>Takım</b>	Fabales
<b>Familya</b>	Fabaceae
<b>Alt familya</b>	Papilionoideae
<b>Cins</b>	<i>Phaseolus</i>
<b>Tür</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

##### 2.1.2 Tarihçesi, Besin Olarak ve Ekonomik Olarak Önemi

Fasulye yaklaşık 7000 yıl önce Latin Amerika'da yayla bölgelerinde ekimine başlanmıştır [12], [13], [11]. Amerika'da evcilleştirildiğine dair kronolojik, arkeolojik ve botanik

kanıtlar elde edilmiştir [14], [15]. Amerika'nın keşfinden sonra İspanyollar tarafından Avrupa'ya getirilmiş buradan da Asya'ya geçirilmiştir.

Ülkemizde fasulye tarımının diğer yemeklik baklagillerden sonra başladığı ve yaklaşık 200 yıldan beri kültürünün yapıldığı tahmin edilmektedir.

*Phaseolus vulgaris* L. geliştirmekte olan ülkelerde yaşayan yaklaşık 300 milyon insan için en önemli baklagildir [16], [17], [18]. Baklagiller protein, nişasta, mineral, lif ve fitokimyasallar gibi pek çok sağlığa yararlı bileşikler içerir [19]. Fasulye yüksek protein içeriğinden dolayı et, süt, yumurta gibi protein içeriği fazla ancak daha pahalı besinlere göre daha çok tavsiye edilmektedir [20].

Çizelge 2. 2 Fasulye içerisindeki mineraller ( 100g kuru tohum) [21]

	Demir(mg)	Çinko(mg)	Magnezyum(mg)	Kalsiyum(mg)
Fasulye	7.0	30	197	250

Çizelge 2. 3 Fasulye içerisindeki karbonhidrat, protein ve lipit miktarı [22]

	Karbonhidrat	Protein	Lipit
Fasulye	58.14	23.80	1.40

Protein içeriğinin yanı sıra içerdiği askorbik asit, fenolik asit ve polifenoller gibi hidrofilik fitokimyasalların bağışıklık sisteminin geliştirdiği ve kanser riskini düşürdüğü görülmüştür. Ayrıca karotenoid ve tokoferol gibi lipofilik fitobesinler kardiyovasküler hastalıkları ve bazı göz patojenleri riskini önleyebileceği bildirilmiştir [19].

Fasulye tarımı milyonlarca çiftçinin gelir kaynağını oluşturduğundan dolayı önem taşımaktadır [16]. 2013 yılı verilerine göre Dünya'da 21.365.119 ton, Türkiye'de ise 632.301 ton fasulye üretilmiştir. Üretim miktarımıza göre %3'lük üretim payımızla Dünya'da fasulye üretiminde 4. sırada yer almaktayız [73].

Yemeklik tane baklagiller arasında önemli bir yere sahip olan fasulye, ülkemizde ekim alanı ve üretim yönünden nohut ve mercimekten sonra üçüncü sırada yer almaktadır [23].

## **2.2 Organik Tarım**

II. Dünya Savaşı sonrasında ve 1950'li yılların başından itibaren tarımsal faaliyetlerde yoğun bir şekilde kullanılan girdiler, bir yandan yüksek verim getirmişken diğer yandan da çevre sorunlarını artırmıştır. Çevre sorunlarının önemli boyutlara ulaşması sonucunda yoğun girdi kullanımının olumsuz etkileri tartışılmaya başlanmıştır. Bu tartışmalar özellikle gelişmiş ülkelerde daha fazla olmuş; bu ülkelerdeki üreticiler ve tüketiciler sağlıklı, temiz, kimyasal girdiler kullanılmadan üretilmiş, çevreye ve insana zarar vermeyen tarım ürünlerinin üretimini ve tüketimini talep etmeye başlamışlardır [3].

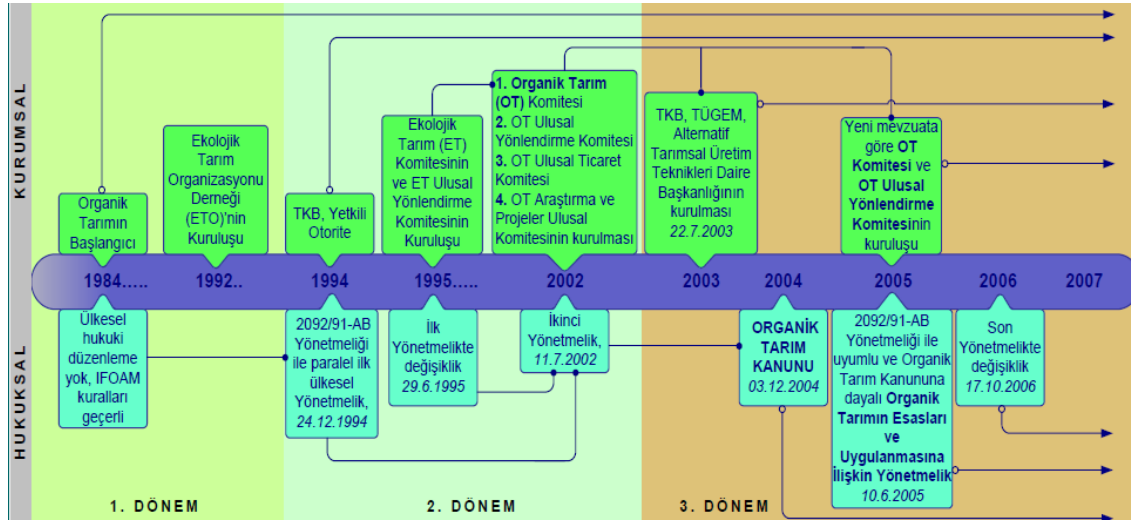
Türkiye'de organik tarım faaliyetleri 1980'li yılların ortalarında Avrupa'da faaliyet gösteren firmaların Türkiye'den organik tarım ürünlerini talep etmeleri ve bu üretim tekniğini tanıtmaya yönelik çalışmaları ile başlamıştır. Türkiye'de organik tarımda faaliyetlerin başlaması, gelişmiş ülkelerdeki gibi tüketicilerin bu ürünlere olan talepleri neticesinde değil, gelişmiş ülkelerdeki tüketicilerin taleplerine bağlı olarak başlamış ve ana amaç Türkiye'nin temel tarım ürünlerinde ihracatı artırmak ve yeni pazarlara girmek olmuştur [3].

Organik tarım; "ekolojik sistemde hatalı uygulamalar sonucu kaybolan doğal dengeyi yeniden kurmaya yönelik, insana ve çevreye dost üretim sistemlerini içeren, esas olarak sentetik kimyasal tarım ilaçları, hormonlar ve sentetik mineral gübrelerin kullanımını yasaklayan, bunların yerine organik ve yeşil gübreleme, toprağın muhafazası, bitkinin direncini artırma, doğal düşmanlardan yararlanma gibi birçok çevre dostu tekniği tavsiye eden, bütün bu olanakların kapalı bir sistemde oluşturulmasını öneren, üretimde sadece miktar artışının değil aynı zamanda ürünün kalitesinin de yükselmesini amaçlayan alternatif bir üretim şekli" olarak kısaca tanımlanabilir [24]. Bu yöntemde kimyasal gübre, ilaçlama, hormon gibi dış etkenler kullanılmaz [25].

### **2.2.1 Türkiye'de Organik Tarım**

Türkiye'de organik tarım 1984-1985 üretim sezonunda Avrupalı firmaların talebiyle, kuru incir ve kuru üzüm üretimiyle Ege Bölgesi'nde başlamıştır. Ülkemizde organik

tarımın sağlıklı ve doğru gelişimini gerçekleştirmek amacıyla 1992’de kısa adı ETO olan Ekolojik Tarım Organizasyonu Derneği kurulmuştur [25], [24].



Şekil 2. 1 Türkiye’de organik tarımın kurumsal ve yasal gelişimi [1]

Türkiye’de konuya ilişkin ilk yasal temel 1994’te “Bitkisel ve Hayvansal Ürünlerin Ekolojik Metotlarla Üretilmesine İlişkin Yönetmelikle” oluşturulmuştur. Daha sonra 2002’de AB uyum çalışmaları çerçevesinde “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik” yayınlanmıştır. 5262 sayılı “Organik Tarım Kanunu” 2004’te çıkarılmış ve buna bağlı olarak, 2005’te “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik” yeniden düzenlenmiştir ( Şekil 2.1 ) [25].

Çizelge 2. 4 Türkiye’de yıllara göre organik tarım verileri [73]

Yıllar	Ürün Sayısı	Çiftçi Sayısı	Yetiştiricilik Yapılan Alan (ha)	Doğal Toplama Alanı (ha)	Toplam Üretim Alanı (ha)	Üretim Miktarı (Ton)
2002	150	12.428	57.365	32.462	89.827	310.125
2003	179	73.368	73.368	40.253	113.621	323.981
2004	174	108.598	108.568	100.975	209.573	377.616
2005	205	93.134	93.134	110.677	203.811	421.934
2006	203	100.275	100.275	92.514	192.789	458.095
2007	201	124.623	124.263	50.020	174.283	568.128
2008	247	109.387	109.387	57.496	166.883	530.224
2009	212	325.831	325.831	175.810	501.641	983.715
2010	216	383.782	383.782	126.251	510.033	1.343.737
2011	225	442.581	442.581	172.037	614.618	1.659.543
2012	204	523.627	523.627	179.282	707.909	1.750.127
2013	213	461.395	461.395	307.619	769.014	1.620.387
2014	208	532.879	532.879	350.239	883.118	2.217.055

### 2.2.2 Organik Tarımın Avantajları

Organik ve konvansiyonel tarımın karşılaştırıldığı pek çok çalışmadaki ana sonuç organik ürünlerin daha yüksek kuru madde içermesi, daha düşük nitrat içeriği bulunması ve daha az pestisit kalıntıları içermesi olmuştur.

Organik ürünlerde C vitaminin daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar varken mineral içeriği ile ilgili yapılan çalışmalar sonuçsuz kalmıştır [26].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda organik yetiştirilmiş şeftali [27] ve domates [28] ürünlerinde C vitaminin belirgin bir şekilde daha fazla olduğu bulunmuştur [26].

Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin kanserli hücrelerin hücre döngüsünü ayarlayarak, apoptozu indükleyerek ve çoğalmayı inhibe ederek insanlarda kanseri kimyasal yollardan önleme rolünün olduğunu ortaya koymuştur [26]. Pek çok çalışma organik ürünlerde fenolik bileşenlerin daha fazla olduğunu göstermiştir [26], [27], [29], [30].

Potansiyel olarak yararlı bileşenlerden ayrı olarak organik ürünlerde pestisit kalıntılarının [31] daha düşük olduğu, nitratların [32] ve mikotoksinlerin [33] genelde daha az olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür [26].

### **2.3 Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH)**

Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu Diatchenko vd. tarafından geliştirilmiş olup, yakın ilgili iki DNA örneğini ayırmak için kullanılan yaygın ve etkili bir yöntemdir [34], [35]. Çıkarılmış cDNA kütüphanelerini veya genomik DNA kütüphanelerini oluşturmak için kullanılan en güçlü ve en önemli PCR temelli yöntemlerden biridir [35].

SSH, geliştirilmesinden bu yana Moleküler Biyoloji' nin çeşitli alanlarındaki birçok araştırma grubu tarafından farklı anlatım yapan genler bakımından zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kurularak, bu genlerin izolasyonları için kullanılmıştır. Örneğin kanserle ilgili araştırmalarda normal hücrelerden farklı anlatım yapan genlerin izole edilmesi amacı ile SSH yöntemine başvurulmuştur [36], [37], [38]. Bitkilerde özellikle farklı stresler ile anlatımı artan genlerin izolasyonunda bu yöntem kullanılmıştır [7], [39], [40]. Aynı zamanda bitkilerde farklı gelişim evrelerinde genlerin izolasyonu içinde SSH etkili bir yöntem olmuştur [41].

SSH işleminde iki hücre popülasyonunda nadir ve yaygın olarak anlatımı yapılan genlerin düzeyi normalize edilmektedir. Belirli bir koşulda tester olarak adlandırılan örnekte driver olarak adlandırılan örneğe göre fazla anlatım yapan genler, birbirini takip eden iki hibridizasyon ve iki PCR yoluyla belirlenir. Bu yöntemde karşılaştırılması istenen iki hücre popülasyonundan çıkarılan mRNA' lar ayrı ayrı cDNA' ya dönüştürülür. cDNA' lar yaklaşık olarak eşit parçalar oluşturmak için seyrek kesen *RsaI* enzimi ile kesilir ve küt uçlar oluşturulur. Tester olarak adlandırılan örnek iki gruba ayrılır ve her grubun 5' ucuna adaptör 1 ve adaptör 2R olmak üzere iki ayrı adaptör takılarak iki farklı tester popülasyonu oluşturması sağlanır. Adaptörlerin uçları fosfat grubu içermez bu nedenle DNA'nın sadece 5' ucuna bağlanabilirler [34].

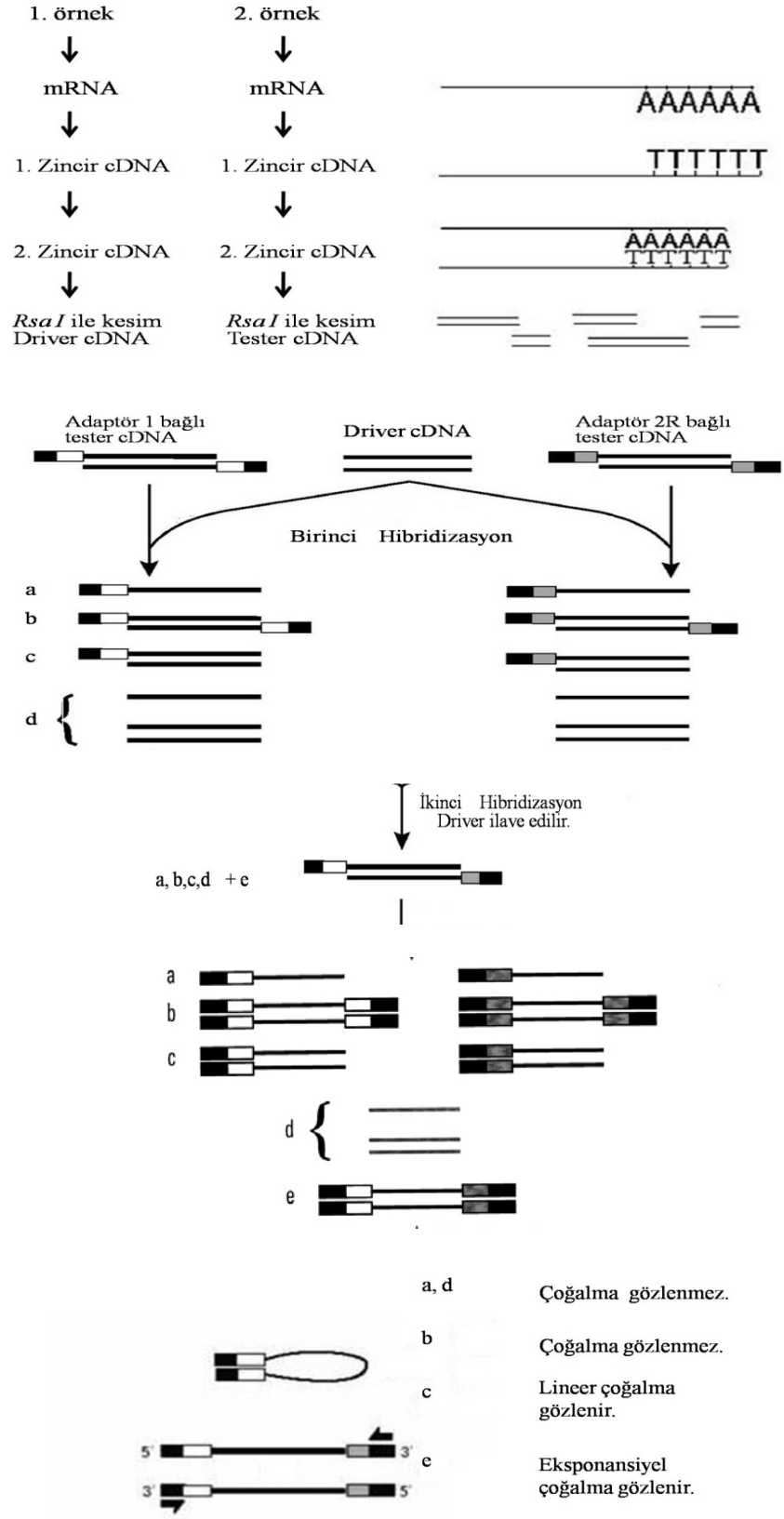
SSH teknolojisi iki hibridizasyon içermektedir. İlk hibridizasyonda driver örneğinin aşırı bir miktarı ayrı ayrı iki tester grubuna da katılmasıyla aynı koşullarda hibridizasyon sağlanır. Testerde aynı konsantrasyonda bulunan cDNA' larla driverde eşit miktarda

veya daha fazla bulunan cDNA' larla driverda daha az bulunan cDNA' lara göre hızlı bir biçimde hibridizasyon gerçekleşir. Bu da testerda daha yüksek oranda bulunan tek zincirli türlerin zenginleşmesine yol açar. Tek zincirli türlerin konsantrasyonunun normalizasyonu ayrıca yaygın olarak bulunan cDNA' ların nadir bulunanlara göre daha hızlı dubleks oluşturması ile de sağlanır [34].

İkinci hibridizasyonda ise ilk hibridizasyonun ürünleri karıştırılır. İki hibridizasyonda da çıkarıma uğramamış biri adaptör 1 diğeri adaptör 2R içeren cDNAlar çoğaltılabilir dubleksler oluşturur ( Şekil 2. 2' te bunlar e hibritleri olarak gösterilmiştir). Hibridizasyon reaksiyonlarından sonra uç kısımlardaki adaptor çıkıntıları DNA polimeraz enziminin uçları doldurma aktivitesinden faydalanılarak tamamlanır. e hibridleri farklı olarak ekspres edilen cDNA' lardır ve uç doldurma işleminden sonra yalnız bunlar nested primerler için bağlanma bölgeleri içerir [34].

Hibridizasyondan sonra dubleksler adaptörlerin içerisinde dizini bulunan primer 1 kullanılarak PCR' la çoğaltılır. Şekil 2. 2' de a ve b olarak gösterilen moleküller primer dizinini taşımadıklarından çoğaltılamazlar. İki zincirinde de aynı adaptörün taşındığı b molekülleri adaptörlerin kendi arasında komplementer olması nedeniyle çoğaltılamazlar. c molekülleri yalnız bir adaptör taşıdığından bir primer için bağlanma bölgesi vardır ve linear olarak çoğaltılabilir. Bu durumda yalnız ucunda iki farklı adaptör olan e molekülleri eksponansiyel olarak çoğaltılabilir. İkinci PCR ise farklı anlatım yapan genleri daha da zenginleştirmek amacıyla iki adaptörde de dizinleri bulunan nested primerler kullanılarak gerçekleştirilir.

Reaksiyon sonunda PCR ürünleri T/ A vektörlerine ya da adaptörlerde bulunan kesim bölgelerinin yardımıyla uygun vektörlere konularak *E. coli'* ye aktarılır ve bir çıkarımlı cDNA kütüphanesi oluşturulur.



Şekil 2. 2 Baskılıyıcı çıkarım hibridizasyonu [34]

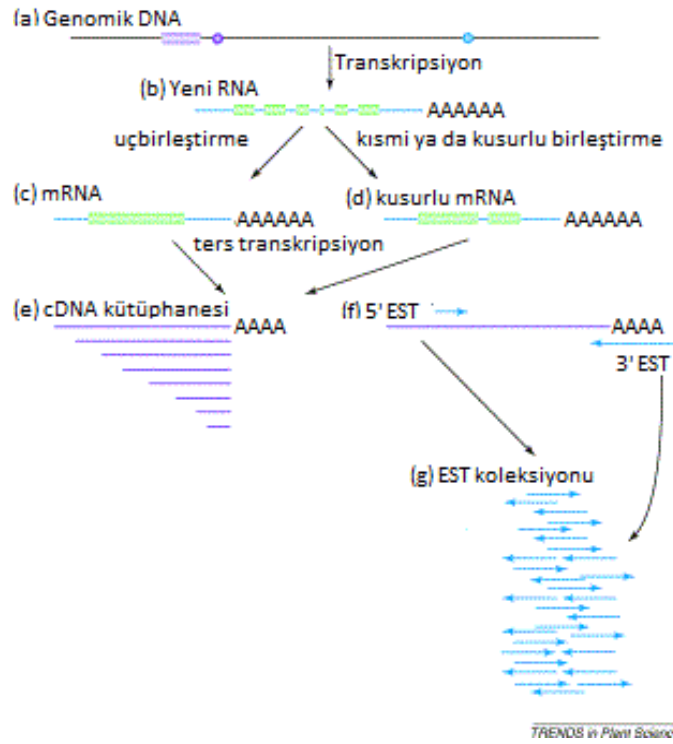
## 2.4 cDNA Kütüphanesi

Karşılaştırmalı genom çalışmalarında gen dizilerini çözmek, genlerin fonksiyonlarını bulmak için önemli bir adımdır. Büyük bir genomda sadece genlerin kodlandığı bölgelere ulaşmak için cDNA sentezinin yapılması araştırmacıların hedefe ulaşmasını kolaylaştırıcı bir yöntemdir.

Farklı yöntemlerle oluşturulan bu cDNA' lardan kütüphaneler kurulur ve buradaki cDNA ların nükleotit dizi bilgisinin çözülmesi ile EST' ler oluşturulur. EST oluşturulmasının amacı tüm bir organizma ya da organizmaların istenilen hücre, doku veya organları için özgün olarak anlatımı yapılan genlerin belirlenmesidir ( Şekil 2.3) [42].

## 2.5 Biyoinformatik Analizlerle EST ( Expressed Sequences Tags) Oluşturulması

EST dizin analizi sonucu elde edilen genom parçalarıdır. EST'ler gen keşfi, karşılaştırmalı genomik ve gen keşfi için kullanılabilir ve sağlam bir dizi kaynak sağlarlar. EST' ler cDNA' lardan üretilir. cDNA' lardan üretilmesi genomik dizilere üstünlük sağlar (Şekil 2.3) [43].



Şekil 2. 3 cDNA kütüphanesi ve EST oluşturulması [43]

## 2.6 GenBank

Dünyada çeşitli canlı ve organizmalara ait nükleotid dizi bilgilerinin organizasyon ve depolama işlemini üstlenen üç veri tabanı vardır. Bunları Amerika Birleşik Devletleri (ABD) merkezli 'NCBI-GenBank' (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi Gen Bankası; ABD-Maryland), Avrupa orijinli 'EMBL' (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı; İngiltere-Hinxton) ve Japonya merkezli 'DDJB' (Japonya veri tabanı; Japonya-Mishima) oluşturmaktadır. Bu üç veri tabanı 'International Sequence Database Colloboration (INSDC)' olarak işbirliği halinde olup, günlük veri alış verişi yoluyla sekansların üniform bir şekilde depolanıp erişime açık hale getirilmesine olanak sağlarlar [44], [45].

GenBank, nükleotit ve protein dizilerinin toplandığı kamuya açık bir veri tabanıdır. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH National Institutes of Health) kampüsünde bulunan, Ulusal Tıp Kütüphanesi ( NLM National Library of Medicine) bünyesinde çalışan, Ulusal Biyoteknoloji Merkezi ( NCBI National Center for Biotechnology Information) tarafından oluşturulur [46].

GenBank, nükleotid sekanslarının ve sekanslara ait biyografik ve biyolojik bilgilerin depolandığı en önemli veritabanı özelliğini taşımaktadır. Bünyesinde 380.000'den fazla genus sınıfında veya daha alt sınıfta organizmaya, insan genom projesi gibi geniş kapsamlı büyük projeler, farklı çalışmalardan ve çevresel örnekleme metotları ile yapılan projeler sonucu elde edilen sekans bilgilerini kapsamaktadır. Nisan 2011 tarihi itibarıyla GenBank üzerinde yaklaşık olarak 135.440.924 sekans kaydında 126.551.501.141 nükleotide ve "Whole genome shotgun sequences" (WGS) bölümünde de 62.715.288 sekans kaydında 191.401.393.188 nükleotide ait bilgi bulunmaktadır [44], [45].

NCBI; GenBank araştırmacılarının doğrudan gönderdikleri dizi bilgileri ile oluşturulmaktadır. Diğer veri kaynakları ise, EST dizilerinin ve diğer dizileme merkezlerinin gönderdiği dizilerle oluşturulmaktadır [47].

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Bitki Materyali

Asgen Tarım Tic.A. Ş. firmasından temin edilen organik *Phaseolus vulgaris* tohumları kullanılmıştır.

#### 3.2 Besiyerleri

##### 3.2.1 *E.coli* Büyütme Besiyeri

Luria Broth (LB)

Çizelge 3. 1 Luria Broth bileşenleri

Besin çeşidi	Miktarı
Tripton	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Sıvı LB hazırlamak için çizelgedeki miktarlar üzerine distile su ilave edilerek 1 litreye tamamlandı. pH 7'ye ayarlandı. Hazırlanan sıvı LB 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

Katı LB hazırlamak için 1 L sıvı LB içerisine 15 g Agar ilave edildi. Hazırlanan katı LB 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

Super Optimal Broth (SOB)

Çizelge 3. 2 Super Optimal Broth bileşenleri

Besin çeşidi	Miktarı
Tripton	5 g
Yeast extract	1,25 g
NaCl	0,145 g
MgCl <sub>2</sub>	0,507 g
KCl	0,046 g

Çizelgedeki miktarlar üzerine distile su ilave edilerek 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan SOB 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

Super Optimal Broth With Catabolite Repression (SOC)

SOC hazırlamak için otoklavlanmış SOB'den 49 ml alındı ve içerisine 1 ml steril edilmiş glikoz eklendi.

### 3.3 Tamponlar ve Solüsyonlar

Çizelge 3. 3 Tampon ve çözeltilerin hazırlanması

Tampon veya çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
Ampisillin stok solüsyonu	100 mg/ ml ddSu ilave edildi. Filtreden geçirildi. – 20 °C' de bekletildi.
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1' lik solüsyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
Etanol	% 75- 80 stok solüsyonu hazırlandı.
dNTP karışımı	20 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.
Etidyum bromid stok solüsyonu ( EtBr)	5 mg/ ml EtBr' e steril deiyonize su ilave edildi.
Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol ( 25: 24: 1)	25 ml Fenol, 24 ml Kloroform ve 1 ml Izoamil alkol karıştırıldı.
IPTG stok solüsyonu	1 M ( 240 mg/ml) izopropanol β-D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20 °C' de saklandı.

Çizelge 3. 3 Tampon ve çözeltilerin hazırlanması (devamı)

Kloroform/ Izoamil alkol ( 24: 1)	24 ml Kloroform ve 1 ml Izoamil alkol karıştırıldı.
5X MOPS (pH 7)	0.2 MOPS pH 7 20.927gr, 50 mM NaOAc 2,51gr, 50 mM pH 8 EDTA 5ml karıştırıldı. DEPC'li su ile 500ml'ye tamamlandı. NaOH ile pH ayarlandı. Hazırlanan MOPS 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.
10X TBE çözeltisi	108 g Tris, 55 g Borik Asit, 40 ml 0,5 M pH 8 EDTA, 1 L saf suya tamamlandı. Hazırlanan TBE 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.
X- Gal stok solüsyonu	50 mg 5-bromo-4- kloro-3-indol β - D- galaktozidaz 1ml DMF( di metil formamid) de çözüldü. Alümiyum folyo ile sarılarak -20 °C' ye kaldırıldı.
1X TE çözeltisi (pH 8)	10 mM Tris- HCl pH 8 5ml, 1 mM EDTA 1ml ve 494ml distile su ile karıştırıldı.
0.5M EDTA solüsyonu	36,53 g EDTA 250ml distile su içerisinde çözüldü. pH 8'e ayarlandı. Hazırlanan EDTA 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.
1M Tris-HCl (pH 8)	12.114 g Tris 100ml distile su ile çözüldü. 4ml HCl eklendi. Hazırlanan Tris-HCl 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

### 3.4 Moleküler Markırlar

Çizelge 3. 4 Moleküler markırlar

RiboRuler high range RNA Ladder ( ng / 2µl)	6000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 500 bp ve 200 bp bantları gözlenir.
Pst1' le kesilmiş Lambda DNA/ EcoRI + HindIII	%1' lik agarozda 21226 bp ile 564 bp arasında toplam 11 bant gözlenir.

### 3.5 Enzimler

Çizelge 3. 5 Enzimler

Taq polimeraz	Promega Corporation
50 X advantage cDNA polimeraz	Clontech

### 3.6 Kitler

Çizelge 3. 6 Kitler

mRNA izolasyon kiti	Oligotex mRNA Spin- Column
SSH kiti	Clontech PCR-Select cDNA Subtraction
PCR pürifikasyon, (saflaştırma) kiti	BIO BASIC EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit

### 3.7 Vektör ve Bakteri Suşları

Çizelge 3. 7 Vektör ve bakteri suşları

pGEM®-T Easy, JM 109	X-Gal içeren besiyerinde mavi- beyaz seçim gözlenir ( Promega).
DH5α	Laboratuvar ortamında kimyasal kompetent hale getirildi.

### 3.8 Oligonükleotidler

Adaptör 1 ve adaptör 2R primerleri SSH kitinde bulunmaktadır.

Çizelge 3. 8 Oligonükleotidler

Primer adı	Primer dizini
Adaptör 1	5' GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGG CAGGT -3' , 3'-CCCGTCCA-5'
Adaptör 2R	5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGG GCGGT -3' , 3'-GCCTCCCGCCA-5'

### **3.9 Programlar**

#### **3.9.1 Chromas**

Vektör dizilerinin çıkartılması için kullanılan ve internetten indirilebilen bir programdır. Dizilerin kromatogram dosyalarını açar ve programa girilmiş olan vektör dizinlerini uzaklaştırır.

#### **3.9.2 BioEdit**

Aynı lokusa ait ileri ve geri primerler ile elde edilen dizilerin kromatogramlarının tek tek gözden geçirilmesini ve her bir birey için ilgili bölgenin en ortak dizilerinin oluşturulmasını ve bu dizilerin hizalandırılmasını sağlayan, internetten indirilebilen bir programdır.

#### **3.9.3 BLAST**

“Basic Local Alingment Search Tool” (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) yazılımı NCBI tarafından geliştirilmiş ve biyoinformatik uygulamalarında araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. BLAST analizi ile hedef gen bölgesine ait kısmi veya tüm sekans dizisi (nükleotid- aminoasit) dünyanın değişik merkezlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından GenBank veri tabanına girilen sekanslar ile karşılaştırılır. Aynı ve en yüksek benzerliğe sahip olan eşleşmelerdeki benzerlik oranı yüzde olarak verilir [44, 48].

BLAST programı, “BLASTN”, “BLASTP”, “BLASTX”, “TBLASTN” ve “TBLASTX” gibi programları içerir. “BLASTN” programı, girilen nükleotid dizilerini nükleotid veri tabanında tarar. “BLASTP”, nükleotid dizinlerinden elde edilen protein bilgisini veri olarak kullanarak; “BLASTX” ise girilen nükleotid dizinlerini protein dizinlerine çevirerek, protein veritabanı üzerinde benzerlik taramasını gerçekleştirir. “TBLASTN” girdi olarak protein bilgisini kullanarak ve “TBLASTX” ise girilen dizin verisini protein bilgisine çevirerek, çevrilmiş nükleotid veri tabanında benzerlik taramasını gerçekleştirir.

### **3.9.4 CAP3**

Örtüşen dizilerin birleştirilmesi için kullanılan bir programdır.

### **3.10 Bitki Büyütme Koşulları**

Organik *Phaseolus vulgaris* L. tohumları organik sertifikalı toprak içerisinde yetiştirilmiştir. Bitki büyütme kabini içerisinde 27°C, %50 nem, 3 LS 14 saat aydınlık - 10 saat karanlık koşullarında büyütülmüştür.

### **3.11 Bitki Örneklerinin Toplanması**

Bitki gelişimini takiben 55. güne ulaşıldığında bitki yaprakları kesilerek moleküler işlemler için hazırlanmıştır. Alınan örnekler sıvı azota konularak -80°C' de bekletilmiştir.

### **3.12 RNA İzolasyonu**

RNA molekülleri nükleotitlerindeki riboz molekülünün OH grubu nedeniyle biyolojik ortamlarda fazlaca bulunan ribonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır. Bu nedenle RNA izolasyonundan önce ortamdaki RNAz kontaminasyonunun oluşmaması için Applichem DEPC solüsyonu kullanıldı.

RNA izolasyonundan önce kullanılacak havan ve havanelleri, tüm cam ve plastik malzemeler % 0,1' lik DEPC' li su içerisinde bir gece bekletildi, daha sonra 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Yine benzer şekilde, izolasyonda kullanılacak Tris dışındaki tüm solüsyonlara ve saf suya % 0,1 oranında DEPC ilave edildi. Bir gece boyunca bekletilip 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Tris, önceden DEPC ile muamele edilip otoklavlanmış çift distile suda hazırlandı.

#### **3.12.1 Bitkilerden Total RNA İzolasyonu**

Organik koşullarda yetiştirilmiş olan bitkinin yapraklarından total RNA izolasyonu Trizol Reagent (Invitrogen ) kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonu 5 aşamada gerçekleştirildi.

### **3.12.1.1 Homojenizasyon**

-80°C'de dondurulmuş olan bitki yaprakları daha önceden soğutulmuş olan havan içerisinde sıvı azot yardımı ile toz haline getirildi. Havanda toz haline getirilen örnekler 50 ml'lik falkon tüpler içerisine alındı. Her 100 mg bitki örneği için 1 ml Trizol Reagent eklendi. Nükleoprotein komplekslerinin ayrışması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler kabaca vortekslendi.

### **3.12.1.2 Faz Ayrımı**

Homojenize örnekler 12000 xg hızda 4°C'de 25 dakika santrifüjlendi. Üst faz 2 ml'lik yeni tüplere alındı. 1 ml Trizol Reagent için 0,2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2- 3 dakika inkübe edildi.

### **3.12.1.3 RNA Çöktürme**

İnkübe edilen örnekler 12000 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüjlendi. Üst faz dikkatli bir şekilde yeni kodlanan 2 ml'lik tüplere alındı. 1 ml Trizol Reagent için 0,5 ml olacak şekilde izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

### **3.12.1.4 RNA Yıkama**

İzole edilip izopropanol eklenen tüpler 12000 xg hızda 4°C'de 30 dakika santrifüjlendi. RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml Trizol Reagent için 1 ml %70' lik soğuk etanol eklenip, 1200 xg hızda 4 °C' de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dökülüp pellet şeffaf görününceye kadar kurutuldu.

### **3.12.1.5 RNA'yı Yeniden Çözündürme**

Kuruyan pellet 100 µl DEPC' li su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübe edilen örnekler -80 °C' de saklandı.

### **3.12.2 Total RNA İçin Cleanup Uygulanması**

Cleanup işlemi için Qiagen RNeasy plant mini kit kullanılmıştır. Kit içerisindeki protokole uyularak cleanup işlemi yapılmıştır.

Total RNA tüplerine 350  $\mu$ l RLT Tamponu eklenip pipetaj yapıldı. Tüplere 250  $\mu$ l absolut etanol eklenip tekrar pipetaj yapıldı. Örnekler mini spin column içine alınarak 17000 xg hızda 30 saniye santrifüjlendi. Alt kısım uzaklaştırılarak tüplere 450  $\mu$ l RPE tamponu eklendi. 17000 xg hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alt kısım uzaklaştırıldı. Tüplere tekrar 300  $\mu$ l RPE tamponu eklendi, 17000 xg hızda 2 dakika santrifüjlendi. Alt kısım uzaklaştırıldı.

1. elüsyon için filtreli kısma 65  $^{\circ}$ C'de ısıtılmış 35  $\mu$ l RNaz free su eklenip oda sıcaklığında 10000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendi.

2. elüsyon için filtreli kısım yeni bir tp içerisine konuldu. 50  $\mu$ l RNaz free su eklendi. 10000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendi.

### **3.12.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi**

#### **3.12.3.1 UV Spektrofotometre İle Total RNA Miktarının Belirlenmesi**

Trizolle ıkartılmış RNA' ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Örnekler DEPC'li su ile 1000 kez dile edildi. RNA' ların konsantrasyonları  $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{sulandırma faktörü}$  formülüyle hesaplandı.

#### **3.12.3.2 Nanodrop ile Total RNA Miktarının Belirlenmesi**

Total RNA örneklerinden 2  $\mu$ l alınarak nanodropta miktar ölçümü yapıldı.

### **3.12.4 RNA' nın Denatüre Edici Formaldehit Jel zerinde Analizi**

#### **3.12.4.1 Jelin Hazırlanması**

Tüm elektroforez aparatları DEPC' li su ile yıkanarak temizlendi. % 1' lik jel hazırlamak için, 0,75 g Agaroz ( Applichem), 15 ml 5X MOPS zeltisi, 46,875 ml DEPC' li su ile

çözüldü ve 60°C' ye soğutuldu. İçerisine 60 °C' ye ısıtılmış 13,125 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü.

#### **3.12.4.2 RNA Örneklerinin Hazırlanması**

Her bir RNA örneğinden 2 µl, 2 µl 5 X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 0,5 µl Etidyum Bromid ilave edilerek, 55 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Total RNA' lar 1X MOPS tamponuyla hazırlanmış % 1' lik Agaroz jel üzerinde 100 V' ta 10 dakika ve 60 V' da 1 saat yürütüldü.

#### **3.13 Total RNA' dan mRNA İzolasyonu**

mRNA izolasyonu Oligotex mRNA Spin- Column Protokolu kullanılarak yapıldı.

Bitki örneklerinden çıkarılan total RNAlar, toplam miktar 0,25 mg olacak şekilde 15 µl Oligotex süspansiyonu ve 250 µl OBB tamponu ile karıştırılarak mRNA izolasyonunda kullanıldı.

Sekonder yapıların yok edilmesi için RNA çözültüsü, 70 °C' de 5 dakika heatblock içinde inkübe edildi. Oligotex içerisindeki OligodT'nin mRNA'daki polyA kuyruğu ile hibridize olması için 30 °C' de 10 dakika daha heatblock içinde inkübe edildikten sonra 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra pellet 2 defa 500 µl OW 2 tamponu ile yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika Small spin columnda santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra kolonda kalan mRNA' lar, 70 °C' de bekletilen 10 µl OEB tamponu ile 2 defa yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 1 dakika santrifüjlenerek 1. ve 2. elüsyonlar oluşturuldu. Oluşturulan mRNA elüsyonları -80 °C' de saklandı.

#### **3.13.1 mRNA Miktarının Belirlenmesi**

##### **3.13.1.1 Spot Testi İle mRNA Miktarının Belirlenmesi**

mRNA miktarını belirlemek amacıyla, 0,2 g Agaroz, 20 ml 1XTBE ile çözüldü, 60 °C' ye soğutuldu. İçerisine 10 µl Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

Kontrol RNA' sı ( 1µg/ 1µl) dilue edilerek 100 ng, 50 ng, 40 ng, 25 ng, 20 ng ve 10 ng' lık sulandırma serileri oluşturuldu. Jele 1 µl spotlandı. İzole edilen mRNA'larda jele 1µl spotlandı. 15 dakika bekletildi. UV üzerinde spotlanan jele bakıldı ve elde edilen fotoğraf üzerinde kontrol RNA'sı göz önüne alınarak miktar hesabı yapıldı.

### 3.13.1.2 Nanodrop İle mRNA Miktarının Belirlenmesi

mRNA örneklerinden 2 µl alınarak nanodropta miktar ölçümü yapıldı.

## 3.14 cDNA Sentezi

Organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilen *Phaseolus vulgaris* L. yapraklarından cDNA sentezi Clontech PCR-select cDNA Substraction kiti protokolünde belirtildiği gibi 2 µg mRNA kullanılarak yapıldı. Organik koşullarda yetiştirilmiş *Phaseolus vulgaris* yapraklarından elde edilen mRNA'lardan tester cDNA hazırlandı. Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş *Phaseolus vulgaris* L. yapraklarından elde edilen mRNA'lardan ise driver cDNA hazırlandı. Kit içerisinde bulunan kontrol mRNA ise kontrol cDNA olarak hazırlandı.

### 3.14.1 cDNA Sentez Primerinin Bağlanması

Çizelgede verilen miktarlar doğrultusunda örnekler tüplere eklendi. Thermal cyclerda 70°C'de 5 dakika ve ardından 4°C'de 2 dakika inkübe edildi.

Çizelge 3. 9 mRNA örneklerine cDNA sentez primerinin bağlanması

	Yaprak tester (organik)	Yaprak driver (konvansiyonel)	Kontrol
polyA <sup>+</sup> RNA	12 µl	12 µl	1 µl
cDNA sentez primeri (10 µM)	2 µl	2 µl	1 µl
dH <sub>2</sub> O ( µl)	-	-	3µl
<b>Toplam</b>	14 µl	14 µl	5 µl

### 3.14.2 Birinci Zincir cDNA Sentezi

Primer bağlanmış reaksiyonların üzerine, tampon çözeltiler kitteki miktarlar doğrultusunda çizelgedeki gibi ilave edildi. Tüpler 42 °C' de thermal cycler' da 2 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 10 mRNA örneklerinden birinci zincir cDNA sentezi

	Yaprak tester (organik)	Yaprak driver (konvansiyonel)	Kontrol
Primer bağlanmış reaksiyon	14 µl	14 µl	5 µl
5 X birinci zincir tamponu	4 µl	4 µl	2 µl
dNTP karışımı ( 10mM)	1 µl	1 µl	1 µl
Steril H <sub>2</sub> O	-	-	1 µl
RT enzim( AMV 20 u/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>10 µl</b>

### 3.14.3 İkinci Zincir cDNA Sentezi

Birinci zincir reaksiyonunun üzerine tampon çözeltiler kitteki miktarlar doğrultusunda çizelgedeki gibi ilave edildi. Tüpler 16 °C' de thermal cycler' da 2,5 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 11 mRNA örneklerinden ikinci zincir cDNA sentezi

	Yaprak tester (organik)	Yaprak driver (konvansiyonel)	Kontrol
Birinci zincir cDNA	20 µl	20 µl	10 µl
5X ikinci zincir tamponu	16 µl	16 µl	16 µl
dNTP karışımı (10mM)	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl
20X ikinci zincir enzim kokteyli	4 µl	4 µl	4 µl
Steril H <sub>2</sub> O	38,4 µl	38,4 µl	38,4 µl
<b>Toplam</b>	<b>80 µl</b>	<b>80 µl</b>	<b>80 µl</b>

### 3.14.4 cDNA Uçlarının Kütleştirilmesi

Elde edilen cDNA'ların uçlarının kütleştirilmesi için her bir tüp içerisine 2 µl T4DNA polimeraz eklendi ve thermal cyclerda 16°C'de 30 dakika inkübe edildi.

cDNA uçlarının kütleştirilmesinden sonra reaksiyonu durdurmak ve pellet görülmesini sağlamak amacı ile tüplere 4 µl 20X EDTA/ Glikojen mix eklendi. Ardından tüplere 100 µl Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (10: 10: 0,4) eklenerek 35000 xg hızda 10 dakika 23°C'de santrifüjlendi. Akışkan üst faz ayrı tüp içerisine alınarak tüplere 100 µl Kloroform/ Izoamil alkol (24: 1) eklendi ve aynı santrifüj koşullarında tekrar santrifüjlendi. Üst faz yeni bir tüp içerisine alındı. cDNA'nın çökmesini sağlamak amacı ile tüplerin içerisine 40 µl 4M NH<sub>4</sub>OAc ve 300 µl % 95'lik etanol eklendi. Tüpler 35000 xg hızda 40 dakika 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 500 µl %80'lik etanol tüplere eklendi. Etanol eklenen tüpler 35000 xg hızda 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletler etanolün uçması için oda sıcaklığından 10 dakika bekletildi.

Etanol buharlaştırıldıktan sonra pelletler 53 µl distile su içerisinde çözüldü. 53 µl cDNA'dan 2 µl agaroz jelde cDNA'yı kontrol etmek için ayrıldı, 44 µl kesim için ayrıldı. Kalan 7 µl cDNA -80°C'ye kaldırıldı.

### **3.14.5 Tester ve Driver cDNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi**

% 1' lik jel hazırlamak için 0,75 g Agaroz, 75 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60 °C' ye soğutulup içerisine 3 µl ( mg/ ml) Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü. 70 V' ta 5 dakika ve 60 V' ta 45 dakika yürütüldü.

### **3.15 *RsaI* Kesimi**

Belirli bir uzunluk aralığında küt uçlu cDNA' lar oluşturmak için dört bazda kesim yapan *RsaI* enzimiyle kitteki miktarlar doğrultusunda ve çizelgede verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. Tüpler 37 °C' de thermal cycler' da 1,5 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 12 cDNA örneklerinin *RsaI* enzimi ile kesimi

	<b>Yaprak tester</b>	<b>Yaprak driver</b>	<b>Kontrol</b>
<b>ds cDNA</b>	44 µl	44 µl	44µl
<b>10X <i>RsaI</i> kesim tamponu</b>	5 µl	5 µl	5 µl
<b><i>RsaI</i> enzimi</b>	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>

İnkübasyondan sonra kesim reaksiyonunun durdurulması için tüplere 2,5 µl EDTA/ Glikojen mix eklendi. 50 µl Fenol/ Kloroform/ İzoamil alkol ( 25: 24: 1) katılarak, 14000 rpm hızda 10 dakika 23 °C' de santrifüj yapıldı. Süpernatant yeni tüplere alındı ve tüplere 50 µl Kloroform/ İzoamil alkol eklendi. 35000 xg hızda 10 dakika 23 °C' de santrifüj yapıldı. Üst faz yeni tüplere alınarak 25 µl 4 M NH<sub>4</sub>OAc ve 187,5 µl %95'lik etanol katıldı. Vortekslenen tüpler 23 °C' de 35000 xg hızda 20 dakika santrifüjlendi.

Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 200 µL %80 Etanol katıldı, 35000 xg hızda 5 dakika santrifüjlendi. Pelletler, Etanolün uçması için 20 dakika bekletildi. Kuruyan pelletler 6 µl distile su içinde çözündürüldü.

### **3.16 Adaptör Ligasyonu**

Örneklerin hazırlamak için *RsaI* enzimi ile kesilmiş cDNA' lardan 1 µl alınarak 5 µl distile H<sub>2</sub>O seyreltildi. Geriye kalan cDNA' lardan 3 µl' si birinci hibridizasyon için, 1 µl' si ikinci hibridizasyon için kullanıldı.

Kit içerisinde bulunan kontrol cDNA'sının hazırlanması için ise *RsaI* enzimi ile kesilmiş kontrol cDNA'sından 1 µl alınarak içerisine yine kitte bulunan dilue edilmiş φX174/ *Hae* III kontrol DNA'dan 5 µl eklendi.

Çizelgedeki şekilde master karışım hazırlandı.

Çizelge 3. 13 Adaptör ligasyonu için master karışım hazırlanması

	<b>Bir reaksiyon için</b>	<b>6,5 reaksiyon için</b>
<b>Steril H<sub>2</sub>O</b>	3,5 µl	22,75 µl
<b>5X Ligasyon Tamponu</b>	2 µl	13 µl
<b>T4 DNA Ligaz</b>	1 µl	6,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>6,5 µl</b>	<b>42,25 µl</b>

Master karışım hazırlandıktan sonra çizelgedeki miktarlar doğrultusunda reaksiyonlar kuruldu.

Çizelge 3. 14 Adaptör ligasyonu için reaksiyonların kurulması

	<b>O1</b>	<b>O2</b>	<b>K1</b>	<b>K2</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
<b><i>RsaI</i> kesilmiş cDNA</b>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<b>Adaptör 1</b>	1,5 µl	-	1,5 µl	-	1,5 µl	-
<b>Adaptör 2R</b>	-	1,5 µl	-	1,5 µl	-	1,5 µl
<b>Master karışım</b>	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

O1= 1. adaptörlü organik tester, O2= 2. adaptörlü organik tester, K1= 1. adaptörlü konvansiyonel driver, K2= 2. adaptörlü konvansiyonel driver, C1= 1. adaptörlü kontrol, K2= 2. adaptörlü kontrol.

Hazırlanan 10 µl hacmindeki reaksiyonlardan organik driver çıkarımı yapılmamış kontrol için yeni bir tüp içerisinde 2 µl organik 1 ve 2 µl organik 2R reaksiyonlarından birleştirildi. Konvansiyonel tester çıkarımı yapılmamış kontrol için yeni bir tüp içerisinde 2 µl konvansiyonel 1 ve 2 µl konvansiyonel 2R reaksiyonlarından birleştirildi. Kontrol çıkarımı yapılmamış kontrol için ise yeni bir tüp içerisinde 2 µl kontrol 1 ve 2 µl kontrol 2R reaksiyonlarından birleştirildi.

Tüpler kısaca vortekslendi ve 16°C'de 12 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra reaksiyonu durdurmak amacı ile tüplere 1 µl EDTA/ Glikojen eklendi. Ligaz enziminin inaktive olması için örnekler thermal cyler kullanılarak 72°C'de 5 dakika inkübe edildi.

### 3.17 Birinci Hibridizasyon

Hibridizasyon için kullanılacak olan 4X Hibridizasyon Tamponu oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Çizelgelere göre 1. Hibridizasyon reaksiyonları kuruldu.

Çizelge 3. 15 Organik cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

	1 (Adaptör 1)	2 (Adaptör 2R)
<b><i>RsaI</i> ile kesilmiş adaptörsüz driver (konvansiyonel)</b>	1,5 µl	1,5 µl
<b>Adaptör 1 takılmış organik</b>	1,5 µl	-
<b>Adaptör 2R takılmış organik</b>	-	1,5 µl
<b>4x Hibridizasyon Tamponu</b>	1 µl	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>4 µl</b>	<b>4 µl</b>

Çizelge 3. 16 Konvansiyonel cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

	1 (Adaptör 1)	2 (Adaptör 2R)
<b><i>RsaI</i> ile kesilmiş adaptörsüz driver (organik)</b>	1,5 µl	1,5 µl
<b>Adaptör 1 takılmış konvansiyonel</b>	1,5 µl	-
<b>Adaptör 2R takılmış konvansiyonel</b>	-	1,5 µl
<b>4X Hibridizasyon Tamponu</b>	1 µl	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>4 µl</b>	<b>4 µl</b>

Çizelge 3. 17 Kontrol cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

	1 (Adaptör 1)	2 (Adaptör 2R)
<b><i>RsaI</i> ile kesilmiş adaptörsüz driver (kontrol)</b>	1,5 µl	1,5 µl
<b>Adaptör 1 takılmış kontrol</b>	1,5 µl	-
<b>Adaptör 2R takılmış kontrol</b>	-	1,5 µl
<b>4X Hibridizasyon Tamponu</b>	1 µl	1 µl
<b>Toplam</b>	<b>4 µl</b>	<b>4 µl</b>

Tüpler hazırlandıktan sonra üstlerine 25 µl mineral yağı eklendi. Örnekler thermal cyclerda 98 °C' de 1,5 dakika, 68 °C' de 8 saat inkübe edildi.

### 3.18 İkinci Hibridizasyon

4 X Hibridizasyon tamponu, hibridizasyon öncesi oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Adaptör 1 takılmış ve adaptör 2R takılmış örnekler birleştirilmeden önce içinde denatüre edilmiş driver bulunan karışım hazırlandı.

Çizelge 3. 18 Organik koşullarda yetiştirilen fasulye cDNA'sı için karışım miktarları

	<b>Tek reaksiyon</b>
<b>Driver cDNA (<i>RsaI</i> ile kesilmiş adaptörsüz konvansiyonel cDNA)</b>	1 µl
<b>4X hibridizasyon tamponu</b>	1 µl
<b>Steril su</b>	2 µl
<b>TOPLAM</b>	4 µl

Çizelge 3. 19 konvansiyonel koşullarda yetiştirilen fasulye cDNA'sı için karışım miktarları

	<b>Tek reaksiyon</b>
<b>Driver cDNA (<i>RsaI</i> ile kesilmiş adaptörsüz organik cDNA)</b>	1 µl
<b>4X hibridizasyon tamponu</b>	1 µl
<b>Steril su</b>	2 µl
<b>TOPLAM</b>	4 µl

Çizelge 3. 20 Kontrol cDNA'sı için karışım miktarları

	<b>Tek reaksiyon</b>
<b>Driver cDNA (<i>RsaI</i> kesilmiş adaptörsüz kontrol cDNA)</b>	1 µl
<b>4X hibridizasyon tamponu</b>	1 µl
<b>Steril su</b>	2 µl
<b>TOPLAM</b>	4 µl

Tüplerin üzerlerine 8 µl mineral yağ ilave edildi. Örnekler 98 °C' de 1.5 dakika inkübe edildi.

Denatüre edilmiş driver cDNA' lar üzerine adaptör 1 takılmış birinci hibridizasyon cDNA ve adaptör 2R takılmış birinci hibridizasyon cDNA eş zamanlı olarak eklendi. Tüm tüpler 1 gece 68 °C' de inkübe edildikten sonra 200 µl dilüsyon tamponu ( 20 mM HEPES, pH 8.3, 20 mM NaCl, pH 6.6, 0.2 mM EDTA, pH 8.0) ilave edildi. Örnekler 68 °C' de 7 dakika inkübe edildikten sonra – 20 °C' ye kaldırıldı.

### 3.19 Birinci PCR Amplifikasyonu

Çıkarımı yapılmamış ve çıkarımı yapılmış örnekler kullanılarak 1. PCR kuruldu. Çıkarımı yapılmamış örnekler 100 defa dilue edildi ve dilue edilen örneklerden 1 µl kullanıldı. Çıkarımı yapılmış örneklerden ise 1 µl kullanıldı.

Çizelge 3. 21 Birinci PCR karışımı

Karışım	Reaksiyon başına
PCR su	19,5 µl
10 X PCR rxn tamponu	2,5 µl
dNTP karışımı ( 10 mM)	0,5 µl
PCR primer 1 (10 µM)	1 µl
50 X adv. cDNA pol.	0,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>24 µl</b>

PCR tüpü içerisine; 19,5 µl PCR su, 2,5 µl 10 X PCR rxn Tamponu, 0,5 µl dNTP karışımı ( 10 mM), 1 µl PCR primer 1( 10 µM), 0,5 µl 50 X Advantage cDNA polimeraz enzimi ilave edilerek toplam 24 µl' ye tamamlandı. Tüplere 1 µl örnek eklendi ve tüplerin üzerine 50 µl mineral yağ ilave edildi.

PCR döngüsü ise şöyledir; 75 °C' de 5 dakika, 94 °C' de 25 saniye denatüre edildikten sonra, 94 °C 10 saniye denatürasyon, 66 °C 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C 90 saniye uzatma aşamaları 27 kez tekrarlandı.

Hibridizasyon sonuçları ve çıkarılmamış örneklerine ait PCR sonuçlarının karşılaştırılması jel üzerinde kontrol edildi.

### 3.19.1 Birinci PCR Amplifikasyonunun Agaroz Jel Üzerinde Analizi

1. PCR ürünlerinden 8'er µl kullanılarak final hacim 10 µl olacak ve 1 X yükleme tamponu içerecek şekilde karışım hazırlandı ve kuyucuklara yüklendi.

% 1' lik jel hazırlamak için 0,75 g Agaroz, 75 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60 °C' ye soğutulup içerisine 3 µl ( mg/ ml) Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü. 70 V' ta 5 dakika ve 60 V' ta 45 dakika yürütüldü.

### 3.20 İkinci PCR Amplifikasyonu

1. PCR örneklerinden 1' er µl kullanılarak nested PCR kuruldu. Nested PCR ile iki primer çifti kullanıldı ve tek bir hedef dizi çoğaltıldı. İlk primer çifti klasik PCR'da olduğu gibi bir hedef diziyi çoğaltır. İkinci primer çifti ( nested primerler) ise ilk PCR ürünü DNA parçasına bağlanarak daha kısa boydaki ikinci bir DNA parçasının çoğaltılmasını sağlar.

Yanlış bir DNA parçasının çoğaltılması durumunda, nested primerler tarafından o parçanın ikinci kez çoğaltılma olasılığı çok düşüktür. Bu nedenle, Nested PCR ile oldukça spesifik çoğaltım sağlanmaktadır.

Çizelge 3. 22 İkinci PCR karışımı

Karışım	Reaksiyon başına
PCR su	18,5 µl
10 X PCR rxn tamponu	2,5 µl
Nested primer 1( 10 µM)	1 µl
Nested primer 2R ( 10 µM)	1 µl
dNTP karışımı ( 10 mM)	0,5 µl
50 X adv. cDNA pol.	0,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>24 µl</b>

PCR tüpü içerisine; 18,5 µl PCR su, 2,5 µl 10 X PCR tamponu, 0,5 µl dNTP mix ( 10 mM), 1 µl Nested primer 1( 10 µM), 1 µl Nested primer 2R ( 10 µM), 0,5 µl 50 X Advantage cDNA polimeraz enzimi ilave edilerek toplam 24 µl' ye tamamlandı. Tüplerin üzerine 50 µl mineral yağ ilave edildi.

### **3.20.1 İkinci PCR Amplifikasyonunun Agaroz Jel Üzerinde Analizi**

1. PCR ürünlerinden 8'er µl kullanılarak final hacim 10 µl olacak ve 1X yükleme tamponu içerecek şekilde karışım hazırlandı ve kuyucuklara yüklendi.

% 1' lik jel hazırlamak için 0,75 g Agaroz, 75 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60 °C' ye soğutulup içerisine 3 µl ( mg/ ml) Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü. 70 V' ta 5 dakika ve 60 V' ta 45 dakika yürütüldü.

### **3.21 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması**

2. PCR ürünleri BioBasic Pürifikasyon Kit kullanılarak saflaştırıldı.

Tüplere örnek miktarının 3 katı kadar Binding Tamponu eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 25°C'de 17000 xg hızda 2 dakika santrifüjlendi. Dipte kalan sıvı dökülerek kolon içerisine 750 µl Yıkama Tamponu ilave edildi. Aynı santrifüj koşullarında tekrar santrifüjlendi.

Kolonun alt tüpleri yenilendi. 15 µl distile su ilave edildi. 37 °C sıcaklıkta 2 dakika bekletildi. 2 dakika, 17000 xg hızda 25°C'de santrifüj edildi ve 1. elüsyon hazırlandı.15 µl distile su ilave edilerek 2 dakika, 17000 xg hızda 25°C'de santrifüj edildi ve 2. elüsyon hazırlandı. Örnekler - 20 °C' ye kaldırıldı. Örneklerden 1 µl alınarak spektrofotometrede miktar tayini yapıldı.

#### **3.21.1 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Analizi**

Saflaştırılmış PCR ürünlerinden 2'şer µl kullanılarak final hacim 10 µl olacak ve 1 X yükleme tamponu içerecek şekilde karışım hazırlandı ve kuyucuklara yüklendi.

% 1' lik jel hazırlamak için 0,75 g Agaroz, 75 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60 °C' ye soğutulup içerisine 3 µl ( mg/ ml) Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü. 70 V' ta 75 dakika yürütüldü.

#### **3.21.2 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Spektrofotometrede Miktar Analizi**

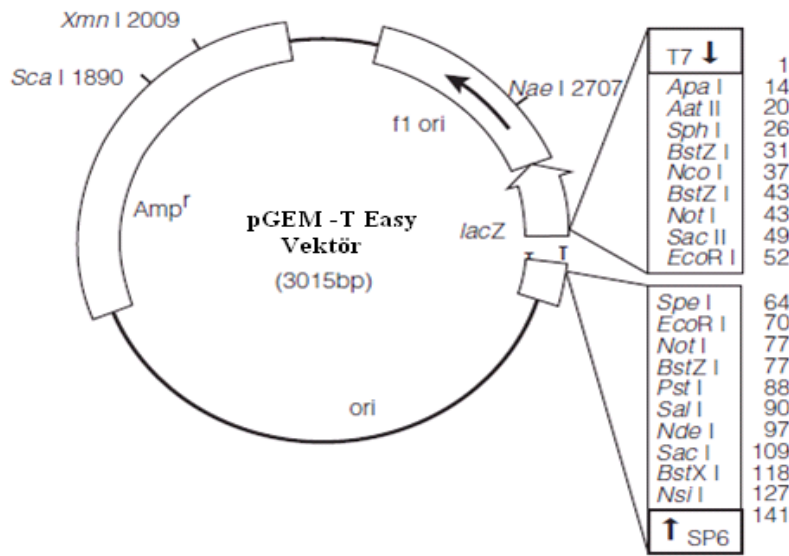
Saflaştırılmış PCR ürünlerinin konsantrasyonları 1000 kez sulandırılarak UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. DNA' ların konsantrasyonları  $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{sulandırma faktörü}$  formülüyle hesaplandı.

### 3.22 Birinci PCR ve İkinci PCR Amplifikasyonlarının Tekrarlanması

Saflaştırılmış PCR ürünleri kullanılarak 3.18' de anlatıldığı gibi Birinci PCR ve 3.19' da anlatıldığı gibi ikinci PCR tekrarlandı.

### 3.23 cDNA' ların pGEM®-T Easy Vektörüne Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM®-T Easy vektörü kullanıldı. pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi Şekil 3.1' de verilmiştir ( Promega Vektör Kullanım Kılavuzu ).



Şekil 3. 1 pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi

Ligasyon için kullanılacak insert miktarı Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda yer alan formül ile hesaplandı.

Çizelge 3. 23 Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

	O	K
<b>2 X Rapid ligasyon tamponu</b>	5 µl	5 µl
<b>pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektör ( 50 ng/ µl)</b>	1 µl	1 µl
<b>İnsert</b>	3 µl	4 µl
<b>T4 DNA ligaz ( 3 u/ µl)</b>	1 µl	1 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1 µl	-
<b>Toplam</b>	<b>11 µl</b>	<b>11 µl</b>

Çizelgedeki doğrultuda reaksiyon kuruldu. Tüpler 4 °C' de 48 saat inkübe edildi.

### 3.24 *E.coli'* ye Transformasyon

*E.coli'* ye transformasyon gerçekleştirilirken JM109 (PROMEGA) ve DH5α (laboratuvarda hazırlanmış olan) suşları kullanılmıştır.

Eppendorf içine alınan 125 µl kompetan JM109 hücreleri üzerine 5,5 µl ligasyon karışımı eklendi. Tüpler 45 dakika buz üstünde bekletildi. 45 saniye 42 °C'de ısı şoku verildikten sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi. Tüplere 400 µl SOC eklenip içlerinde 1ml SOC olan 15ml'lik falkonların içine alındı. 1,5 saat shaker içinde 37 °C'de inkübe edildi.

Eppendorf içine alınan 200 µl kompetan DH5α hücreleri üzerine 5,5 µl ligasyon karışımı eklendi. Tüpler 45 dakika buz üstünde bekletildi. 45 saniye 42 °C'de ısı şoku verildikten sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi. Tüplere 400 µl SOC eklenip içlerinde 1ml SOC olan 15ml'lik falkonların içine alındı. 1,5 saat shaker içinde 37 °C'de inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından transformasyon ürünleri içerisinde Ampisilin, X-Gal ve IPTG bulunan katı besiyerine ( 500 ml LB için; 5 ml Amp, 2,5 ml IPTG, 0,5 ml X-Gal) 100'er µl olacak şekilde yayıldı. 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

Mavi renkte gözlemlenen koloniler içlerine cDNA almadan kapanmış plazmidleri bulunan hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise fasülye cDNA' ları olarak kapanmış plazmidleri bulunan hücrelerden oluşmaktaydı.

### **3.25 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kùltür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol**

#### **Stoklarının Hazırlanması**

Katı LB petrilerinde büyümüş olan beyaz koloniler steril kürdanlar ile 96' lık Greiner kaplarına ekildi ve 37 °C' de bir gece büyütüldü. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğun replikası yapıldı. Örnekler -80 °C' de saklandı.

### **3.26 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi**

Organik koşullarda yetiştirilmiş bitki yaprağına ait 94 koloni 1 kap dizin analizi için BioGen firmasına gönderildi.

### **3.27 Biyoinformatik Analizler**

Yaprak örnekleri için trace uzantılı ( ABI) olan dosyaların vektör dizinleri CHROMAS programı ile uzaklaştırıldı. Programda oluşan diziler text dosyası biçiminde idi, bu diziler fasta formatına çevrildi. Diziler, NCBI web sitesinden BLASTX, BLASTN ve BLASTP programları kullanılarak GenBank veritabanıyla karşılaştırıldı.

### SONUÇ VE ÖNERİLER

#### 4.1 Bitkilerin Büyütülmesi

Bitki gelişimini takiben 55. güne ulaşıldığında bitki yaprakları kesilerek moleküler işlemler için hazırlanmıştır. Alınan örnekler sıvı azota konularak  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de bekletilmiştir ( Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Yetiştirilmiş fasulye bitkisi

Bitki büyütme kabini içerisinde (Thermo Scientific)  $27^{\circ}\text{C}$ , %50 nem, 3 LS 14 saat aydınlık - 10 saat karanlık koşullarında yetiştirilen Organik Askız Fasulye Çeşidi (solda) ile Konvansiyonel Askız Fasulye Çeşidi'nin

(sağda) 55.gün sonundaki gelişimi ( organik koşullarda yetiştirilmiş gruptan 4 örnek bitki, konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş gruptan 4 örnek bitki yetiştirilmiştir).

#### 4.2 Total RNA'ların Spektrofotometre Ölçümü

DEPC'li su ile 1000 kez dilüe edilen total RNA' ların konsantrasyonları  $OD_{260} \times 40 \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{sulandırma faktörü}$  formülüyle hesaplandı.

Çizelge 4. 1 Organik koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin spektrofotometre sonuçları

ÖRNEK	ABSORBANS DEĞERİ (260nm)	RNA MİKTARI ( $OD \times 40 \times dF$ ) ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1B1	0,039	1,56
1B2	0,052	2,08
1B3	0,044	1,76
1B4	0,045	1,80
2B1	0,045	1,80
2B2	0,060	2,40
2B3	0,103	4,12
2B4	0,073	2,92

1B1 1. bitkiye ait 1. örnek, 1B2 1. bitkiye ait 2. örnek, 1B3 1. bitkiye ait 3. örnek, 1B4 1. bitkiye ait 4. örnek, 2B1 2. bitkiye ait 1. örnek, 2B2 2. bitkiye ait 2. örnek, 2B3 2. bitkiye ait 3. örnek, 2B4 2. bitkiye ait 4. Örnek

Çizelge 4. 2 Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin spektrofotometre sonuçları

ÖRNEK	ABSORBANS DEĞERİ (260 nm)	RNA MİKTARI (OD × 40 × dF) (µg/µl)
1B1	0,087	3,48
1B2	0,054	2,16
1B3	0,057	2,28
1B4	0,064	2,56
2B1	0,075	3
2B2	0,070	2,8
2B3	0,076	3,04
2B4	0,114	4,56
2B5	0,064	2,56

1B1 1. bitkiye ait 1. örnek, 1B2 1. bitkiye ait 2. örnek, 1B3 1. bitkiye ait 3. örnek, 1B4 1. bitkiye ait 4. örnek, 2B1 2. bitkiye ait 1. örnek, 2B2 2. bitkiye ait 2. örnek, 2B3 2. bitkiye ait 3. örnek, 2B4 2. bitkiye ait 4. Örnek, 2B5 2. bitkiye ait 5. Örnek

Spektrofotometre sonuçları baz alınarak örnekler birleştirildi ve tekrar spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı.

Çizelge 4. 3 Birleştirilmiş total RNA örneklerinin spektrofotometre sonuçları

ÖRNEK	ABSORBANS DEĞERİ (260 nm)	RNA MİKTARI (OD × 40 × dF) (µg/µl)
O1	0,009	0,36
O2	0,009	0,36
C1	0,025	1
C2	0,013	0,52

O1 organik koşullarda yetiştirilmiş 1. fasulye bitkisi, O2 organik koşullarda yetiştirilmiş 2. fasulye bitkisi, C1 konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş 1. fasulye bitkisi, C2 konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş 2. Fasulye bitkisi

### 4.3 Total RNA'ların Nanodrop Ölçümü

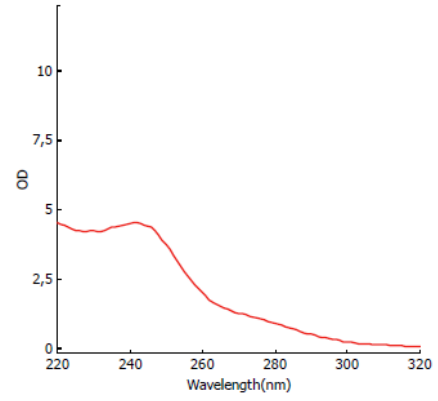
3.12.3.2 'de anlatıldığı gibi nanodrop ölçümü yapıldı. Ölçüm sonuçları Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

Nucleic Acid Conc : 78,28 ng/μL

OD260/280 : 2,34

OD260/230 : 0,47

Item	Result
OD260	2,033
OD280	0,913
OD230	4,243
OD320	0,076
Pathlength (mm)	0,192
Dilution	1,000



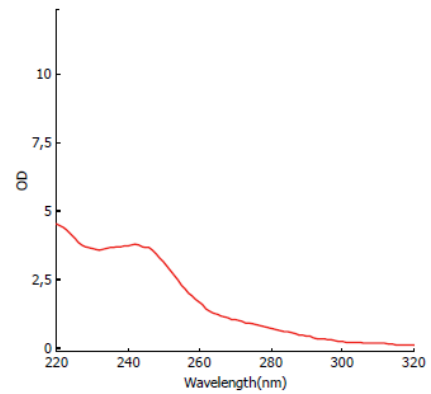
Şekil 4. 2 Organik yetiştirilmiş 1. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu

Nucleic Acid Conc : 63,26 ng/μL

OD260/280 : 2,56

OD260/230 : 0,45

Item	Result
OD260	1,682
OD280	0,719
OD230	3,645
OD320	0,101
Pathlength (mm)	0,192
Dilution	1,000



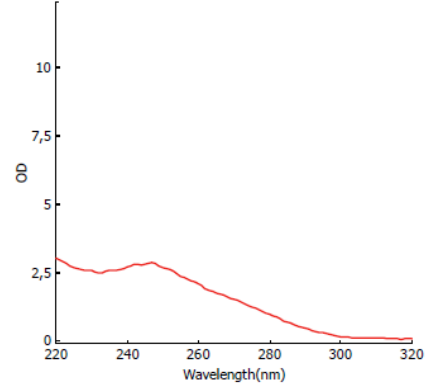
Şekil 4. 3 Organik yetiştirilmiş 2. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu

Nucleic Acid Conc : 81,42 ng/ $\mu$ L

OD260/280 : 2,26

OD260/230 : 0,81

Item	Result
OD260	2,092
OD280	0,956
OD230	2,559
OD320	0,056
Pathlength (mm)	0,192
Dilution	1,000



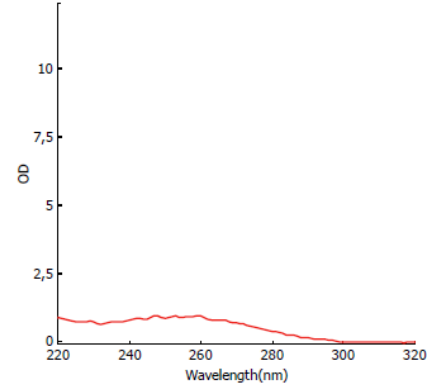
Şekil 4. 4 Konvansiyonel yetiştirilmiş 1. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu

Nucleic Acid Conc : 38,59 ng/ $\mu$ L

OD260/280 : 2,40

OD260/230 : 1,30

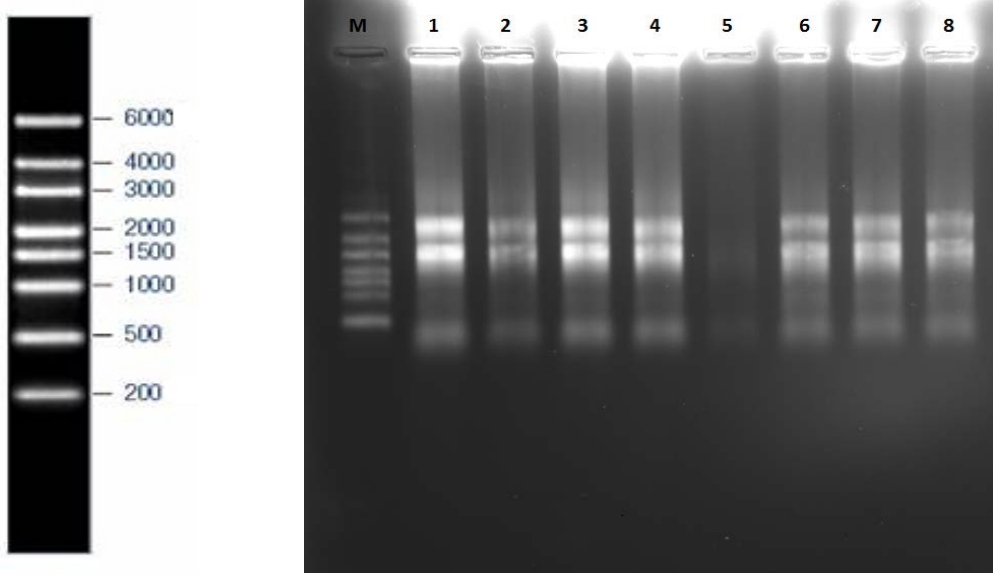
Item	Result
OD260	0,922
OD280	0,359
OD230	0,700
OD320	-0,043
Pathlength (mm)	0,192
Dilution	1,000



Şekil 4. 5 Konvansiyonel yetiştirilmiş 2. bitkiye ait total RNA nanodrop sonucu

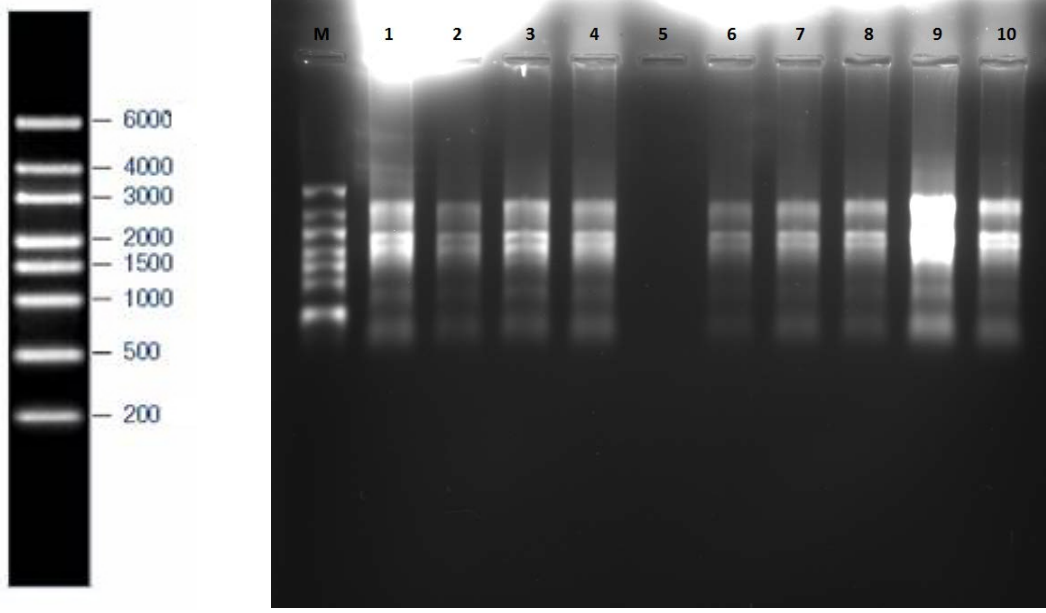
#### 4.4 Total RNA Analizi

3.12.1'de anlatıldığı gibi izole edilen total RNA'lar hazırlanan %1'lik MOPS jeline yüklendi. Analiz edilen RNA'larda ribozomal RNA bantlarına bakılarak herhangi bir parçalanma olmadığı tespit edildi ( Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4. 6 Organik koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin yapraklarından izole edilen total RNA örnekleri jel görüntüsü

Yükleme sırası; M: high range RNA ladder- Fermentas, 1. 1B1, 2. 1B2, 3. 1B3, 4. 1B4, 5. 2B1, 6. 2B2, 7. 2B3, 8. 2B4 ( 1B1 1. bitkiye ait 1. örnek, 1B2 1. bitkiye ait 2. örnek, 1B3 1. bitkiye ait 3. örnek, 1B4 1. bitkiye ait 4. örnek, 2B1 2. bitkiye ait 1. örnek, 2B2 2. bitkiye ait 2. örnek, 2B3 2. bitkiye ait 3. örnek, 2B4 2. bitkiye ait 4. Örnek)

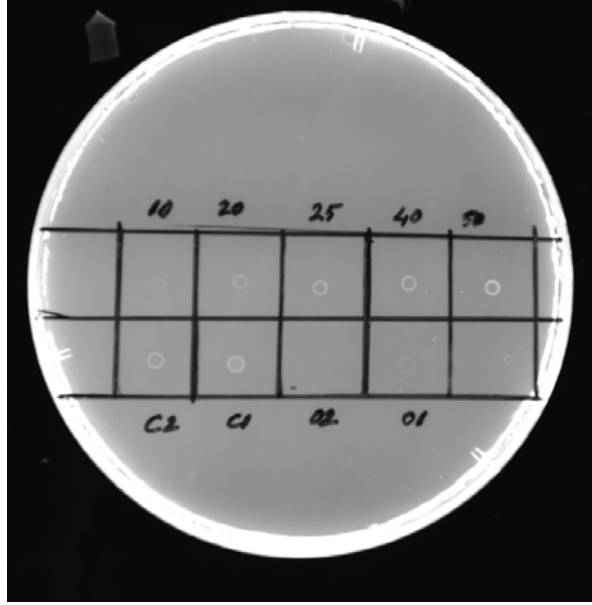


Şekil 4. 7 Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye bitkisinin yapraklarından izole edilen total RNA örnekleri jel görüntüsü

Yükleme sırası; M: high range RNA ladder- Fermentas, 1. 1B1, 2. 1B2, 3. 1B3, 4. 1B4, 5. Boş, 6. 2B1, 7. 2B2, 8. 2B3, 9. 2B4, 10. 2B5 (1B1 1. bitkiye ait 1. örnek, 1B2 1. bitkiye ait 2. örnek, 1B3 1. bitkiye ait 3. örnek, 1B4 1. bitkiye ait 4. örnek, 2B1 2. bitkiye ait 1. örnek, 2B2 2. bitkiye ait 2. örnek, 2B3 2. bitkiye ait 3. örnek, 2B4 2. bitkiye ait 4. Örnek, 2B5 2. bitkiye ait 5. Örnek)

#### 4.5 mRNA Spot Testi

Total RNA'lerden mRNA izolasyonu bölüm 3. 13'te anlatıldığı gibi yapıldı. mRNA spotlarının UV ışığı altında görüntüsü konsantrasyonu bilinen bir mRNA' nın görüntüsü ile karşılaştırılarak mRNA miktarları belirlendi ( Şekil 4.8).



Şekil 4. 8 mRNA spot testi

#### 4.6 mRNA Nanodrop Analizi

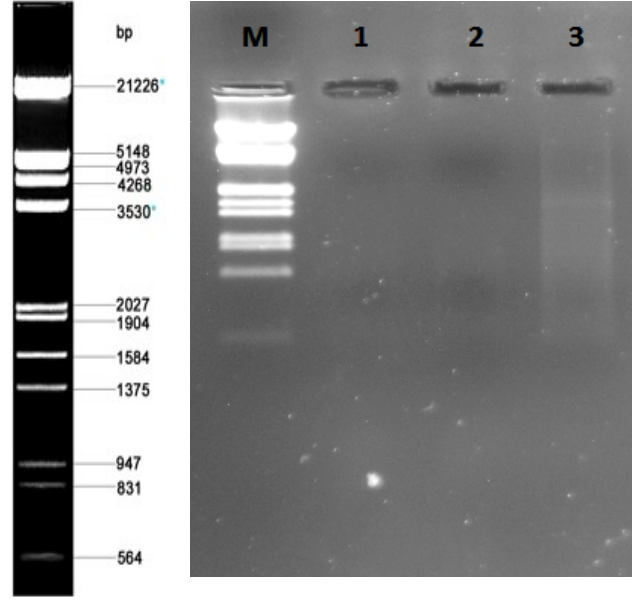
mRNA örneklerinden 1 µl alınarak nanodropta yapılan ölçüm sonuçları EK-B'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 4 Nanodropta ölçülen mRNA miktarları

ÖRNEK	OD 260
Kontrol	0,945
O1	1,075
O2	1,743
C1	1,341
C2	1,544

#### 4.7 cDNA'nın Jel Üzerinde Görüntülenmesi

cDNA sentezi 3.14'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. %1'lik agaroz jel üzerinde UV altında görüntülenmiştir ( Şekil 4.9).

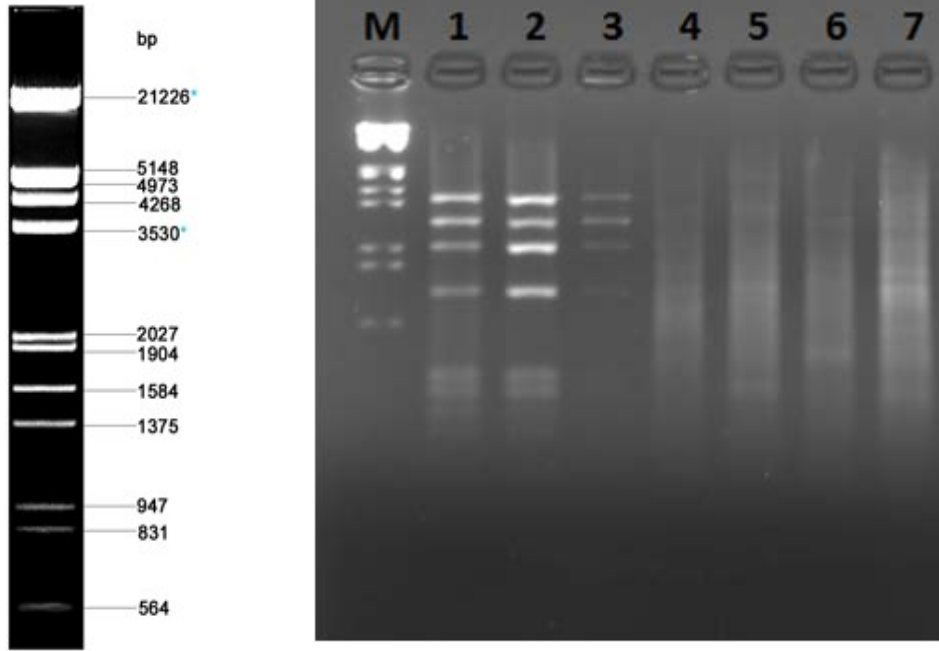


Şekil 4. 9 cDNA jel görüntüsü

Yükleme sırası; M:  $\lambda$ DNA EcoRI + Hind III 1. organik cDNA, 2. konvansiyonel cDNA, 3. kontrol cDNA

#### 4.8 1. PCR Amplifikasyonu PCR' larının Agaroz Jel Üzerinde Analizi

3. 18'de anlatıldığı gibi PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. 3. 18. 1'de anlatıldığı gibi hazırlanan % 1'lik Agaroz jele yüklenerek kontrol edildi ( Şekil 4.10).

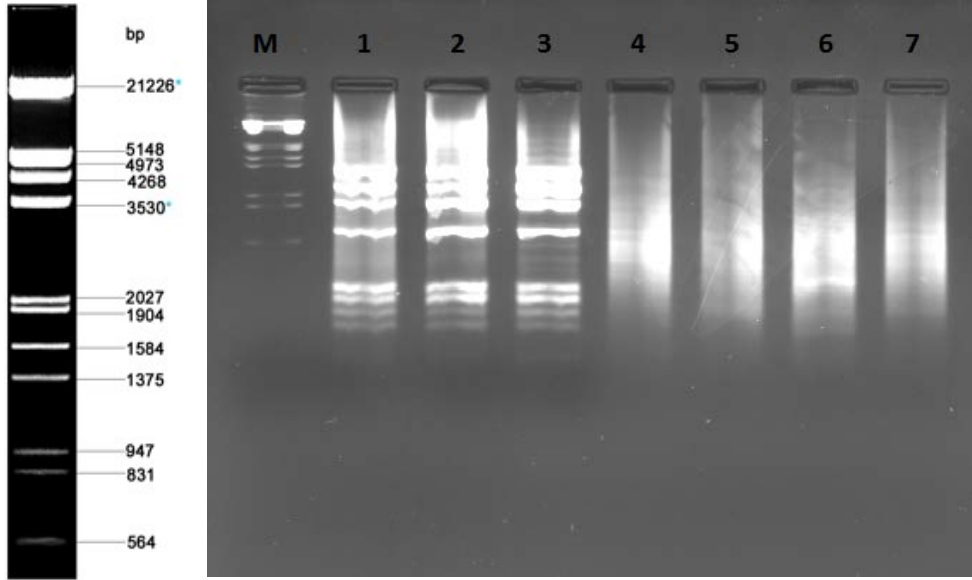


Şekil 4. 10 Birinci PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü

Yükleme sırası; M:  $\lambda$ DNA EcoRI + Hind III, 1. (+) çıkarım yapılmış kontrol, 2. çıkarım yapılmış kontrol, 3. Çıkarım yapılmamış kontrol, 4. Çıkarım yapılmış konvansiyonel yaprak, 5. Çıkarım yapılmamış konvansiyonel yaprak, 6. Çıkarım yapılmış organik yaprak, 7. Çıkarım yapılmamış organik yaprak

#### 4.9 2. PCR Amplifikasyonu PCR' larının Agaroz Jel Üzerinde Analizi

3. 19'da anlatıldığı gibi PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. 3. 19. 1'de anlatıldığı gibi hazırlanan % 1'lik Agaroz jele yüklenerek kontrol edildi ( Şekil 4.11).

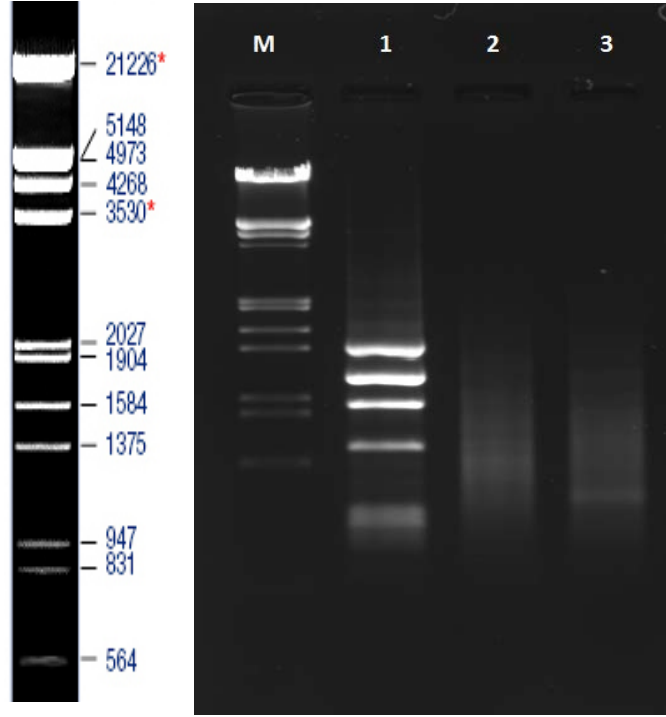


Şekil 4. 11 İkinci PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü

Yükleme sırası; M:  $\lambda$ DNA EcoRI + Hind III, 1. (+) çıkarım yapılmış kontrol, 2. çıkarım yapılmış kontrol, 3. Çıkarım yapılmamış kontrol, 4. Çıkarım yapılmış konvansiyonel yaprak, 5. Çıkarım yapılmamış konvansiyonel yaprak, 6. Çıkarım yapılmış organik yaprak, 7. Çıkarım yapılmamış organik yaprak

#### 4.10 Safılaştırılmış PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Üzerinde Analizi

PCR ürünlerinin saflaştırılması 3. 20'de anlatıldığı gibi yapıldı. 3. 20. 1'de anlatıldığı gibi hazırlanan % 1'lik Agaroz jel üzerinde kontrol edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin jel üzerindeki görüntüsü

Yükleme sırası; M: λDNA EcoRI + Hind III, 1. Saflaştırılmış kontrol, 2. Saflaştırılmış konvansiyonel yaprak, 3. Saflaştırılmış organik yaprak

#### 4.11 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinin Spektrofotometrede Miktar Analizi

3. 20. 2'de anlatıldığı gibi sulandırılarak hazırlanan örneklerin analizi 260nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

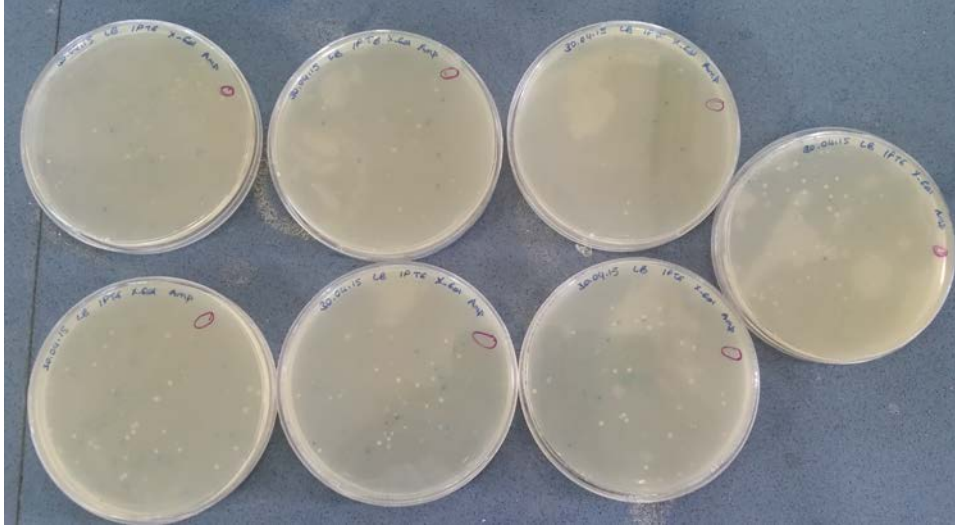
Çizelge 4. 5 Saflaştırılmış PCR ürünlerinin miktarı

ÖRNEK	ABSORBANS DEĞERİ (260 nm)	DNA MİKTARI (OD × 50 × dF) (µg/ml)
Konvansiyonel	0,003	150
Organik	0,004	200

#### 4.12 Rekombinant Hücrelerin Belirlenmesi

3.22.1 ve 3.22.2' de anlatıldığı biçimde hazırlanan katı LB petrilerinde mavi- beyaz seçilimi yapıldı. Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için β- galaktosidaz testi

kullanıldığından mavi ve beyaz olmak üzere iki çeşit koloni gözlemlendi. Beyaz koloniler transformasyona uğramış ve cDNA' yı almış olanlardı ( Şekil 4.13).



Şekil 4. 13 Organik yapraktan elde edilen cDNA'nın klonlanması sonucu elde edilen koloniler

#### **4.13 Beyaz Kolonilerin Seçilmesi ve Kolonilerin Analize Gönderilmesi**

Organik koşullarda yetiştirilmiş bitki yaprağına ait 94 koloni 1 tane 96'lık plate dizin analizi için BioGen firmasına gönderildi.

#### **4.14 Biyoinformatik analizler**

##### **4.14.1 BLAST Analizleri**

Dizin analizine 1 tane 96'lık plate 94 koloni gönderilmiştir. Gönderilen 94 koloniden 49 kolonisinde yeterli üreme olmadığı için analiz gerçekleştirilememiştir. Analizi yapılan kolonilerden ise 2 tanesi yeterli uzunlukta olmadığından dolayı BLAST analizleri gerçekleştirilememiştir.

Dizin analizi sonuçlarından vektör ve adaptör dizileri CHROMAS programı ile uzaklaştırıldı. Ardından fasta formatına dönüştürülerek CHROMAS programı ile vektör ve adaptör dizileri çıkarılan EST' lerin analizleri de tek tek yapıldı.

BLASTN analizlerinin sonuçları üç bölüm halindedir. Birinci bölüm, EST dizisinin özelliği hakkında bilgi verir. İkinci bölüm, incelenen dizi ile benzerlik gösteren sekansları ve bu sekansların analiz sonuçlarını verir ( Şekil 4.14).

Analiz sonuçlarında; veritabanındaki dizilerin tanınmasını sağlayan numaralar ( Accession number), benzerlik gösteren dizinin fonksiyonuna ve ait olduğu organizmaya ait bilgi ( Description), karşılaştırılan dizilerin uzunluk anlamında ne derece birbirlerini kapsadıkları ( Query Coverage), karşılaştırılan dizilerin bir pozisyonda aynı nükleotide sahip olmasının rastlantısal olabilme durumu ( E- value terimi), birbirleri arasında benzerlik tespit edilen diziler arasındaki homolojinin derecesi ( Maximum Identity) belirtilir.

Üçüncü bölüm ise benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotit düzeyinde benzerliklerini verir.

A

The screenshot shows the NCBI BLASTN search results page. The header includes the BLAST logo and the text "Basic Local Alignment Search Tool". Below the header are navigation buttons: Home, Recent Results, Saved Strategies, and Help. The main content area displays the search results for the query "2-plate-83\_\_T7\_A60954\_H09\_1509023383J". The results are formatted as follows:

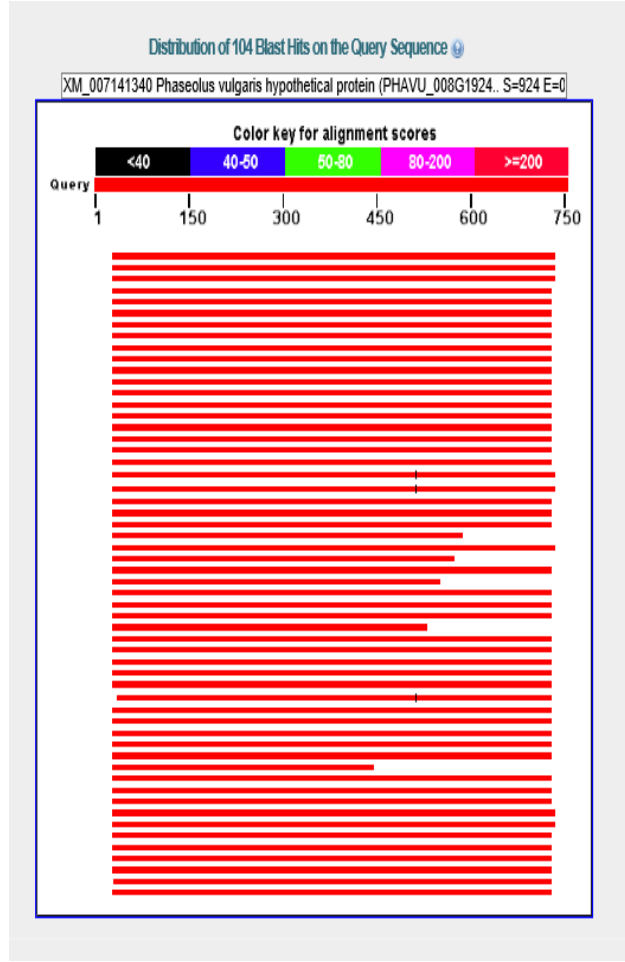
<b>RID</b>	<a href="#">2G27VM92013</a> (Expires on 10-23 05:51 am)	<b>Database Name</b>	nr
<b>Query ID</b>	Id Query_86679	<b>Description</b>	Nucleotide collection (nt)
<b>Description</b>	2-plate-83__T7_A60954_H09_1509023383J	<b>Program</b>	BLASTN 2.2.32+ <a href="#">Citation</a>
<b>Molecule type</b>	nucleic acid		
<b>Query Length</b>	751		

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)

Şekil 4. 14 BLASTN analiz sonucunun NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü

B



C

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds	1295	1295	93%	0.0	99%	<a href="#">XM_007163373.1</a>
<input type="checkbox"/> Phaseolus vulgaris rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds	1295	1295	93%	0.0	99%	<a href="#">AF041088.1</a>
<input type="checkbox"/> Phaseolus vulgaris clone BE1374 ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase mRNA, complete cds	1256	1256	93%	0.0	99%	<a href="#">KF569937.1</a>
<input type="checkbox"/> Vigna radiata rubisco activase (Rca) mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product	1051	1051	92%	0.0	94%	<a href="#">AF128870.2</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast-like (LOC100797222), mRNA	1035	1035	92%	0.0	93%	<a href="#">NM_001288218.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max cultivar Kefeng No.1 beta-form rubisco activase (RCAbeta) mRNA, complete cds	1035	1035	92%	0.0	93%	<a href="#">GQ917184.1</a>
<input type="checkbox"/> Soybean clone JCVI-FLGm-24E8 unknown mRNA	1035	1035	92%	0.0	93%	<a href="#">BT093853.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max cDNA, clone: GMFL01-02-J24	1035	1035	92%	0.0	93%	<a href="#">AK244296.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max cDNA, clone: GMFL01-01-P20	1035	1035	92%	0.0	93%	<a href="#">AK244090.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max cDNA, clone: GMFL01-15-M13	1035	1035	92%	0.0	93%	<a href="#">AK285758.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max cDNA, clone: GMFL01-02-C20	1027	1027	92%	0.0	93%	<a href="#">AK244130.1</a>
<input type="checkbox"/> Glycine max rDNA clone: GMFI 01-15-K15	968	968	97%	0.0	97%	<a href="#">AK285750.1</a>

Şekil 4. 14 BLASTN analiz sonucunun NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü (devam)

A: birinci bölüm, B: ikinci bölüm, C: üçüncü bölüm

BLASTP analizleri için dizinlerin protein bilgisi kullanıldı. Klonlama yönlü olmadığından doğru protein kodlayan dizinin vektöre yerleşme şansı 1 /6' dır.

#### 4.14.2 BLAST sonuçları

Dizin analizi yapılan kolonilerden 5 tanesinde BLASTX sonuçlarında dizinler kısa olduğu için benzerlik bulunamadı ( 18SP6, 18T7, 27SP6, 53SP6 ve 53T7).

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları

	DİZİNLER	UZUNLUK (BP)	PGEM-T VE ADAPTÖR KESİLDİKTEN SONRA UZUNLUK (BP)	BLASTX		
				BENZERLİK	BENZERLİK YÜZDESİ	SKOR
FORWARD DİZİN	4T7	1273	620	Hypothetical protein PHAVU_011G039100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-97 <b>XP_007131755.1</b>	%78	301
				Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-97 <b>AGV54415.1</b>	%78	301
	5T7	1270	981	Hypothetical protein PHAVU_009G116900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-146 <b>XP_007137313.1</b>	%99	450
				PREDICTED: probable alanine--tRNA ligase, chloroplastic-like [ <i>Glycine max</i> ] 5e-134 <b>XP_003526788.</b>	%94	417

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>11T7</b>	1264	322	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC105976410 [ <i>Erythranthe guttatus</i> ] 3e-55 <b>XP_012857135.1</b>	%96	183
			Putative senescence-associated protein [ <i>Lilium longiflorum</i> ] 6e-55 <b>ABO20851.1</b>	%98	177
<b>12T7</b>	1261	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	361
			Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%95	354
<b>13T7</b>	1259	535	Hypothetical protein PHAVU_001G085200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-97 <b>XP_007161627.1</b>	%100	289
			Hypothetical protein LR48_Vigan03g170800 [ <i>Vigna angularis</i> ] 4e-87 <b>KOM38326.1</b>	%90	264
			Light-regulated protein [ <i>Glycine soja</i> ] 6e-82 <b>KHM99217.1</b>	%86	251
<b>16T7</b>	1281	497	Hypothetical protein PHAVU_011G009700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 8e-60 <b>XP_007131390.1</b>	%93	193

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

21T7	1306	665	Hypothetical protein PHAVU_008G036200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-110 <b>XP_007139515.1</b>	%99	345
			Hypothetical protein LR48_Vigan03g019600 [ <i>Vigna angularis</i> ] 4e-109 <b>KOM36815.1</b>	%96	336
			Cyclic nucleotide-gated ion channel 2 [ <i>Glycine soja</i> ] 2e-107 <b>KHM98806.1</b>	%94	331
22T7	1240	495	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-93 <b>XP_007143828.1</b>	%99	285
			Hypothetical protein LR48_Vigan02g179900 [ <i>Vigna angularis</i> ] 7e-86 <b>KOM35649.1</b>	%94	266
			OTU domain-containing protein [ <i>Glycine soja</i> ] 5e-82 <b>KHN37847.1</b>	%91	254
23T7	1262	486	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RubisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 5e-101 <b>O64981.1</b>	%100	309

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>26T7</b>	1212	615	Hypothetical protein PHAVU_007G271000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-83 <b>XP_007145823.1</b>	%98	256
<b>28T7</b>	1248	463	Hypothetical protein LR48_Vigan04g167700 [ <i>Vigna angularis</i> ] 3e-45 <b>KOM41479.1</b>	%99	163
			Hypothetical protein PHAVU_009G133200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-45 <b>XP_007137511.1</b>	%99	162
			F-box protein SKP2B [ <i>Glycine soja</i> ] 8e-43 <b>KHN44273.1</b>	%95	157
<b>29T7</b>	1262	1118	Hypothetical protein PHAVU_007G108900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-167 <b>XP_007143870.1</b>	%99	494
			Hypothetical protein LR48_Vigan02g172500 [ <i>Vigna angularis</i> ] 2e-161 <b>KOM35575.1</b>	%96	480
			Cryptochrome-2 [ <i>Glycine soja</i> ] 1e-147 <b>KHN05061.1</b>	%91	444

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>33T7</b>	1246	874	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-127 <b>XP_007151018.1</b>	%99	373
			Hypothetical protein B456_001G263300 [ <i>Gossypium raimondii</i> ] 6e-127 <b>KJB11518.1</b>	%94	372
			ADP-ribosylation factor 1-like protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ] 8e-127 <b>NP_001274832.1</b>	%99	371
<b>34T7</b>	1277	930	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RubisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 0.0 <b>O64981.1</b>	%99	612
<b>36T7</b>	1307	726	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-127 <b>XP_007134497.1</b>	%99	372
			Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-124 <b>AHA84172.1</b>	%99	363
<b>38T7</b>	1257	438	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] 1e-44 <b>NP_198197.1</b>	%97	155
			Light-harvesting complex I protein Lhca2 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-44 <b>AGV54278.1</b>	%100	157

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>39T7</b>	1271	729	Hypothetical protein PHAVU_002G238800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-133 <b>XP_007159452.1</b>	%99	399
			CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 12 [ <i>Glycine soja</i> ] 8e-94 <b>KHN06402.1</b>	%80	297
<b>40T7</b>	1254	589	Hypothetical protein PHAVU_009G248700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-109 <b>XP_007138917.1</b>	%98	321
			PREDICTED: translationally-controlled tumor protein homolog isoform X1 [ <i>Phoenix dactylifera</i> ] 8e-91 <b>XP_008789873.1</b>	%85	275
<b>46T7</b>	1232	488	40S ribosomal S15a-1 -like protein [ <i>Gossypium arboreum</i> ] 6e-49 <b>KHG04133.1</b>	%100	166
<b>47T7</b>	1240	684	Hypothetical protein PHAVU_002G024000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-94 <b>XP_007156865.1</b>	%99	291
			Hypothetical protein LR48_Vigan06g038500 [ <i>Vigna angularis</i> ] 6e-94 <b>KOM45079.1</b>	%98	290
			Oxygen-evolving enhancer protein 1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 7e-92 <b>AGV54778.1</b>	%97	285

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>48T7</b>	1265	662	Hypothetical protein PHAVU_006G207300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-109 <b>XP_007148423.1</b>	%100	326
			Chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor [ <i>Vigna radiata</i> ] 3e-105 <b>AAD27882.2</b>	%96	317
<b>52T7</b>	1275	537	Hypothetical protein PHAVU_001G035500g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-98 <b>XP_007161011.1</b>	%97	318
			PREDICTED: glycine dehydrogenase [decarboxylating], mitochondrial-like [ <i>Glycine max</i> ] 8e-96 <b>XP_003550270.1</b>	%95	311
<b>57T7</b>	1227	707	hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	361
			Endo-1,4-betamannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%81	354
<b>58T7</b>	1261	694	Homeodomain leucine zipper protein HDZ1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-118 <b>AAK84885.1</b>	%100	350
<b>59T7</b>	1270	399	Hypothetical protein PHAVU_008G075700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 8e-32 <b>XP_007139991.1</b>	%100	119

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>60T7</b>	1255	786	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-169 <b>XP_007163264.1</b>	%99	488
			Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-166 <b>AHA84179.1</b>	%98	479
<b>65T7</b>	1255	320	Hypothetical protein PHAVU_006G014400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-30 <b>XP_007146123.1</b>	%95	115
<b>69T7</b>	1262	838	Hypothetical protein PHAVU_002G269400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-100 <b>XP_007159811.1</b>	%99	303
			Hypothetical protein LR48_Vigan01g016500 [ <i>Vigna angularis</i> ] 1e-95 <b>KOM30611.1</b>	%94	291
			PREDICTED: photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic [ <i>Cucumis melo</i> ] 5e-78 <b>XP_008441057.1</b>	%80	246
<b>70T7</b>	1241	617	70 kDa heat shock protein [ <i>Sandersonia aurantiaca</i> ] 1e-110 <b>AAL85887.1</b>	%97	332
<b>71T7</b>	1227	791	Hypothetical protein PHAVU_001G100200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-141 <b>XP_007161811.1</b>	%99	414
			NAC transcription factor [ <i>Glycine max</i> ] 4e-113 <b>AHB63580.1</b>	%84	342

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>72T7</b>	1196	562	Hypothetical protein PHAVU_002G196000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-52 <b>XP_007158956.1</b>	%100	174
<b>73T7</b>	1260	637	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-85 <b>XP_007151018.1</b>  ADP-ribosylation factor A1F [ <i>Theobroma cacao</i> ] 1e-84 <b>XP_007031496.1</b>	%100  %99	262  261
<b>77T7</b>	1245	341	Putative senescence-associated protein [ <i>Pisum sativum</i> ] 8e-55 <b>BAB33421.1</b>	%80	184
<b>81T7</b>	1264	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>  Endo-1,4-betamannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%97  %95	361  354
<b>82T7</b>	1257	495	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-93 <b>XP_007143828.1</b>  PREDICTED: OTU domain-containing protein At3g57810-like [ <i>Glycine max</i> ] 2e-82 <b>XP_003556279.1</b>	%99	285
<b>83T7</b>	1277	751	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-169 <b>O64981.1</b>	%99	488

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

	<b>91T7</b>	1263	933	Hypothetical protein PHAVU_001G262700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 0.0 <b>XP_007163772.1</b>	%99	625
				PREDICTED: F-box only protein 6-like isoform X1 [ <i>Glycine max</i> ] 0.0 <b>XP_003551172.1</b>	%96	604
	<b>95T7</b>	1260	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	361
				Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%95	354
<b>REVERSE DİZİN</b>	<b>4SP6</b>	1281	618	Hypothetical protein PHAVU_011G039100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-75 <b>XP_007131755.1</b>	%81	221
				Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 5e-75 <b>AGV54415.1</b>	%81	221
	<b>5SP6</b>	1241	982	Hypothetical protein PHAVU_009G116900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 5e-114 <b>XP_007137313.1</b>	%99	355
				PREDICTED: probable alanine--tRNA ligase, chloroplastic-like [ <i>Glycine max</i> ] 2e-109 <b>XP_003526788.1</b>	%94	342

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>11SP6</b>	1237	322	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC105976410 [ <i>Erythranthe guttatus</i> ] 3e-55 <b>XP_012857135.1</b>	%96	183
			Putative senescence-associated protein [ <i>Lilium longiflorum</i> ] 6e-55 <b>ABO20851.1</b>	%98	177
<b>12SP6</b>	1227	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	361
			Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%95	354
<b>13SP6</b>	1226	535	Hypothetical protein PHAVU_001G085200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-97 <b>XP_007161627.1</b>	%100	289
			Hypothetical protein LR48_Vigan03g170800 [ <i>Vigna angularis</i> ] 4e-87 <b>KOM38326.1</b>	%90	264
			Light-regulated protein [ <i>Glycine soja</i> ] 6e-82 <b>KHM99217.1</b>	%86	251
<b>16SP6</b>	1233	497	Hypothetical protein PHAVU_011G009700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 8e-52 <b>XP_007131390.1</b>	%100	172

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>21SP6</b>	1241	665	Hypothetical protein PHAVU_008G036200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-110 <b>XP_007139515.1</b>	%99	345
			Hypothetical protein LR48_Vigan03g019600 [ <i>Vigna angularis</i> ] 4e-109 <b>KOM36815.1</b>	%96	336
			Cyclic nucleotide-gated ion channel 2 [ <i>Glycine soja</i> ] 2e-107 <b>KHM98806.1</b>	%94	331
<b>22SP6</b>	1240	495	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-93 <b>XP_007143828.1</b>	%99	285
			Hypothetical protein LR48_Vigan02g179900 [ <i>Vigna angularis</i> ] 7e-86 <b>KOM35649.1</b>	%94	266
			OTU domain-containing protein [ <i>Glycine soja</i> ] 5e-82 <b>KHN37847.1</b>	%91	254
<b>23SP6</b>	1234	486	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RubisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 5e-101 <b>O64981.1</b>	%100	309
<b>26SP6</b>	1204	615	Hypothetical protein PHAVU_007G271000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-83 <b>XP_007145823.1</b>	%98	256

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>28SP6</b>	1232	463	Hypothetical protein LR48_Vigan04g167700 [ <i>Vigna angularis</i> ] 3e-45 <b>KOM41479.1</b>	%99	163
			Hypothetical protein PHAVU_009G133200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-45 <b>XP_007137511.1</b>	%99	162
			F-box protein SKP2B [ <i>Glycine soja</i> ] 8e-43 <b>KHN44273.1</b>	%95	157
<b>29SP6</b>	1205	1103	Hypothetical protein PHAVU_007G108900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-107 <b>XP_007143870.1</b>	%100	341
			Hypothetical protein LR48_Vigan02g172500 [ <i>Vigna angularis</i> ] 7e-102 <b>KOM35575.1</b>	%96	326
			Cryptochrome-2 [ <i>Glycine soja</i> ] 1e-89 <b>KHN05061.1</b>	%89	294
<b>33SP6</b>	1230	873	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-127 <b>XP_007151018.1</b>	%99	373
			Hypothetical protein B456_001G263300 [ <i>Gossypium raimondii</i> ] 6e-127 <b>KJB11518.1</b>	%94	372
			ADP-ribosylation factor 1-like protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ] 7e-127 <b>NP_001274832.1</b>	%99	371

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>34SP6</b>	1196	930	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RubisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 0.0 <b>O64981.1</b>	%99	612
<b>36SP6</b>	1192	725	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-126 <b>XP_007134497.1</b>	%100	369
			Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-123 <b>AHA84172.1</b>	%100	361
<b>38SP6</b>	1232	438	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] 1e-44 <b>NP_198197.1</b>	%97	155
			Light-harvesting complex I protein Lhca2 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-44 <b>AGV54278.1</b>	%100	157
<b>39SP6</b>	1221	729	Hypothetical protein PHAVU_002G238800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-133 <b>XP_007159452.1</b>	%99	399
			CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 12 [ <i>Glycine soja</i> ] 8e-94 <b>KHN06402.1</b>	%80	297

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>40SP6</b>	1233	589	Hypothetical protein PHAVU_009G248700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-109 <b>XP_007138917.1</b>	%98	321
			PREDICTED: translationally-controlled tumor protein homolog isoform X1 [ <i>Phoenix dactylifera</i> ] 8e-91 <b>XP_008789873.1</b>	%85	275
<b>46SP6</b>	1218	488	40S ribosomal S15a-1 -like protein [ <i>Gossypium arboreum</i> ] 6e-49 <b>KHG04133.1</b>	%100	166
<b>47SP6</b>	1219	684	Hypothetical protein PHAVU_002G024000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-94 <b>XP_007156865.1</b>	%99	291
			Hypothetical protein LR48_Vigan06g038500 [ <i>Vigna angularis</i> ] 6e-94 <b>KOM45079.1</b>	%98	290
			Oxygen-evolving enhancer protein 1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 7e-92 <b>AGV54778.1</b>	%97	285
<b>48SP6</b>	1230	662	Hypothetical protein PHAVU_006G207300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 6e-109 <b>XP_007148423.1</b>	%100	326
			Chlorophyll a/b-binding protein CP24 precursor [ <i>Vigna radiata</i> ] 3e-105 <b>AAD27882.2</b>	%96	317

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>52SP6</b>	1224	537	Hypothetical protein PHAVU_001G035500g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-98 <b>XP_007161011.1</b>	%97	318
			PREDICTED: glycine dehydrogenase [decarboxylating], mitochondrial-like [ <i>Glycine max</i> ] 8e-96 <b>XP_003550270.1</b>	%95	311
<b>57SP6</b>	1264	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	361
			Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%81	354
<b>58SP6</b>	1249	694	Homeodomain leucine zipper protein HDZ1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-118 <b>AAK84885.1</b>	%100	350
<b>59SP6</b>	1245	399	Hypothetical protein PHAVU_008G075700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 8e-32 <b>XP_007139991.1</b>	%100	119
<b>65SP6</b>	1235	320	Hypothetical protein PHAVU_006G014400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-30 <b>XP_007146123.1</b>	%95	115

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>69SP6</b>	1207	840	Hypothetical protein PHAVU_002G269400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-99 <b>XP_007159811.1</b>	%99	301
			Hypothetical protein LR48_Vigan01g016500 [ <i>Vigna angularis</i> ] 1e-94 <b>KOM30611.1</b>	%93	288
			PREDICTED: photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic [ <i>Cucumis melo</i> ] 7e-77 <b>XP_008441057.1</b>	%79	243
<b>70SP6</b>	1211	617	70 kDa heat shock protein [ <i>Sandersonia aurantiaca</i> ] 2e-110 <b>AAL85887.1</b>	%97	332
<b>71SP6</b>	1184	791	Hypothetical protein PHAVU_001G100200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-141 <b>XP_007161811.1</b>	%99	413
			NAC transcription factor [ <i>Glycine max</i> ] 5e-113 <b>AHB63580.1</b>	%84	342
<b>72SP6</b>	1195	562	Hypothetical protein PHAVU_002G196000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-52 <b>XP_007158956.1</b>	%100	174
<b>73SP6</b>	1245	637	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-85 <b>XP_007151018.1</b>	%100	262
			ADP-ribosylation factor A1F [ <i>Theobroma cacao</i> ] 1e-84 <b>XP_007031496.1</b>	%99	261

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>77SP6</b>	1157	341	Putative senescence-associated protein [ <i>Pisum sativum</i> ] 8e-55 <b>BAB33421.1</b>	%80	184
<b>81SP6</b>	1217	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	366
			Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%95	354
<b>82SP6</b>	1217	495	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 4e-93 <b>XP_007143828.1</b>	%99	285
			PREDICTED: OTU domain-containing protein At3g57810like [ <i>Glycine max</i> ] 2e-82 <b>XP_003556279.1</b>	%92	257
<b>83SP6</b>	1231	751	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=Rubisco activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-170 <b>O64981.1</b>	%99	490
<b>85SP6</b>	1233	681	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-126 <b>XP_007134497.1</b>	%100	369
			Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 2e-123 <b>AHA84172.1</b>	%100	361

Çizelge 4. 6 İleri ve geri dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>91SP6</b>	1247	933	Hypothetical protein PHAVU_001G262700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 0.0 <b>XP_007163772.1</b>	%99	625
			PREDICTED: F-box only protein 6-like isoform X1 [ <i>Glycine max</i> ] 0.0 <b>XP_003551172.1</b>	%96	604
<b>93SP6</b>	1226	656	Hypothetical protein PHAVU_006G133600g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-139 <b>XP_007147544.1</b>	%100	420
			PREDICTED: Ferric reduction oxidase 7, chloroplastic-like [ <i>Glycine max</i> ] 8e-130 <b>XP_003535028.1</b>	%94	395
<b>95SP6</b>	1232	707	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 3e-120 <b>XP_007163264.1</b>	%97	361
			Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] 1e-117 <b>AHA84179.1</b>	%95	354

#### 4.14.3 Konsensus Dizilerin BLAST Sonuçları

İleri ve geri dizilerden BioEdit programı kullanılarak konsensus diziler oluşturuldu. 4 dizin için konsensus oluşturulamadı ( 60T7 ileri dizininin geri dizini olmadığı için, 85SP6 geri dizininin ileri dizini olmadığı için, 92SP6 geri dizininin ileri dizini olmadığı için, 93SP6 geri dizininin ileri dizini olmadığı için konsensus dizinleri yapılamadı ). Bu dizilerin protein benzerliğinin bulunması için BLASTX yapıldı. Oluşturulan konsensus dizinlerden konsensus 7 ( 18SP6-18T7) ve consensus 24 (53SP6-53T7) için benzerlik bulunamadı.

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları

DİZİNLER	BLASTX				
	BENZERLİK	SCORE	QUERY COVER	E VALUE	İDENT
<b>Konsensus 1</b> <b>(Reverse 4SP6-4T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_011G039100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007131755.1</b>	214	88%	6e-64	62%
	Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AGV54415.1</b>	214	88%	7e-64	62%
<b>Konsensus 2</b> <b>(Reverse 5SP6-5T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_009G116900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007137313.1</b>	355	68%	5e-114	99%
	PREDICTED: probable alanine- tRNA ligase, chloroplasticlike [ <i>Glycine max</i> ] <b>XP_003526788.1</b>	342	68%	2e-109	94%
<b>Konsensus 3</b> <b>(Reverse 11SP6-11T7)</b>	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC105976410 [ <i>Erythranthe guttatus</i> ] <b>XP_012857135.1</b>	183	82%	3e-55	96%
	Putative senescence-associated protein [ <i>Lilium longiflorum</i> ] <b>ABO20851.1</b>	177	79%	6e-55	98%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 4</b> <b>(Reverse 12SP6-12T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007163264.1</b>	361	81%	3e-120	97%
	Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AHA84179.1</b>	354	81%	1e-117	95%
	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] <b>XP_002515142.1</b>	244	81%	8e-75	65%
	Glycosyl hydrolase superfamily protein isoform 1 [Theobroma cacao] 221 221 81% 5e66 60% <b>XP_007051341.1</b>	221	81%	5e-66	60%
<b>Konsensus 5</b> <b>(Reverse 13SP6-13T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G085200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007161627.1</b>	289	77%	6e-97	100%
	Light-regulated protein [ <i>Glycine soja</i> ] <b>KHM99217.1</b>	251	77%	6e-82	86%
	GA [ <i>Pisum sativum</i> ] <b>CAA46272.1</b>	178	77%	3e-53	61%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 6</b> <b>(Reverse 16SP6-16T7)</b>	Hhypoetical protein PHAVU_011G009700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007131390.1</b>	160	63%	5e-47	93%
	Photosystem II 5 kDa protein [ <i>Medicago truncatula</i> ] <b>XP_013455454.1</b>	104	63%	4e-25	63%
<b>Konsensus 8</b> <b>(Reverse 21SP6-21T7)</b>	Hhypoetical protein PHAVU_008G036200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007139515.1</b>	345	90%	1e-110	99%
	Cyclic nucleotide-gated ion channel 2 [ <i>Glycine soja</i> ] <b>KHM98806.1</b>	331	90%	3e-107	94%
<b>Konsensus 9</b> <b>(Reverse 22SP6-22T7)</b>	Hypoetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007143828.1</b>	285	83%	4e-93	99%
	PREDICTED: OTU domain- containing protein At3g57810like [ <i>Glycine max</i> ] <b>XP_003556279.1</b>	257	83%	2e-82	92%
	Cysteine-type peptidase, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] <b>XP_002530891.1</b>	230	85%	3e-73	82%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<p><b>Konsensus 10</b> <b>(Reverse 23SP6-23T7)</b></p>	<p>RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [<i>Phaseolus vulgaris</i>] <b>O64981.1</b></p>	<p>309</p>	<p>91%</p>	<p>5e-101</p>	<p>100%</p>
<p><b>Konsensus 11</b> <b>(Reverse 26SP6-26T7)</b></p>	<p>Hypothetical protein PHAVU_007G271000g [<i>Phaseolus vulgaris</i>] <b>XP_007145823.1</b></p> <p>Proton gradient regulation protein [<i>Medicago truncatula</i>] <b>XP_003590158.1</b></p>	<p>256</p>	<p>61%</p>	<p>1e-83</p>	<p>98%</p>
<p><b>Konsensus 12</b> <b>(Reverse 28SP6-28T7)</b></p>	<p>Hypothetical protein LR48_Vigan04g167700 [<i>Vigna angularis</i>] <b>KOM41479.1</b></p> <p>F-box protein SKP2B [<i>Glycine soja</i>] <b>KHN44273.1</b></p> <p>PREDICTED: nuclear pore complex protein NUP160 homolog [<i>Malus domestica</i>] <b>XP_008365809.1</b></p>	<p>163</p>	<p>51%</p>	<p>3e-45</p>	<p>99%</p>
		<p>157</p>	<p>51%</p>	<p>8e-43</p>	<p>95%</p>
		<p>134</p>	<p>51%</p>	<p>1e-33</p>	<p>79%</p>

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 13</b> <b>(Reverse 29SP6-29T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_007G108900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007143870.1</b>	438	69%	3e-145	92%
	Cryptochrome2 [ <i>Glycine soja</i> ] <b>KHN05061.1</b>	388	69%	9e-126	83%
<b>Konsensus 14</b> <b>(Reverse 33SP6-33T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007151018.1</b>	373	62%	2e-127	99%
	ADP-ribosylation factor 1 like protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ] <b>NP_001274832.1</b>	371	62%	8e-127	99%
	Chain A, Molecular Insights Into Plant Cell Proliferation Disturbance By Agrobacterium Protein 6b <b>3AQ4_A</b>	367	62%	4e-125	97%
<b>Konsensus 15</b> <b>(Reverse 34SP6-34T7)</b>	RecName: Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>O64981.1</b>	98.6	90%	9e-20	42%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 16</b> <b>(Reverse 36SP6-36T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007134497.1</b>	372	87%	4e-127	99%
	Chloroplast oxygen-evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> ] <b>AHA84172.1</b>	363	85%	4e-124	99%
<b>Konsensus 17</b> <b>(Reverse 38SP6-38T7)</b>	Light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] <b>NP_198197.1</b>	155	51%	1e-44	97%
	Chain 2, Improved Model Of Plant Photosystem I <b>3LW5_2</b>	153	51%	1e-43	97%
<b>Konsensus 18</b> <b>(Reverse 39SP6-39T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_002G238800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007159452.1</b>	399	91%	1e-133	99%
	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 12 [ <i>Glycine soja</i> ] <b>KHN06402.1</b>	297	91%	8e-94	80%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 19</b> <b>(Reverse 40SP6-40T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_009G248700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007138917.1</b>	321	80%	6e-109	98%
	PREDICTED: translationally- controlled tumor protein homolog isoform X1 [ <i>Phoenix dactylifera</i> ] <b>XP_008789873.1</b>	275	80%	8e-91	85%
	Callus protein P23 [ <i>Populus trichocarpa</i> ] <b>XP_006382473.1</b>	266	80%	2e-87	83%
<b>Konsensus 20</b> <b>(Reverse 46SP6-46T7)</b>	40S ribosomal S15a1 Like protein [ <i>Gossypium arboreum</i> ] <b>KHG04133.1</b>	166	48%	6e-49	100%
	r-protein BnS15a [ <i>Brassica napus</i> ] <b>CAA42600.1</b>	159	48%	2e-46	97%
<b>Konsensus 21</b> <b>(Reverse 47SP6-47T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_002G024000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007156865.1</b>	291	70%	2e-94	99%
	Oxygen-evolving enhancer protein 1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AGV54778.1</b>	285	70%	7e-92	97%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 22</b> <b>(Reverse 48SP6-48T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_006G207300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007148423.1</b>	326	72%	6e-109	100%
	Chlorophyll a/b binding protein CP24 precursor [ <i>Vigna radiata</i> ] <b>AAD27882.2</b>	317	72%	3e-105	96%
<b>Konsensus 23</b> <b>(Reverse 52SP6-52T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G035500g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007161011.1</b>	318	95%	2e-98	97%
	PREDICTED: glycine dehydrogenase [decarboxylating], Mitochondrial-like [ <i>Glycine max</i> ] <b>XP_003550270.1</b>	311	95%	8e-96	95%
	Glycine decarboxylase P subunit [ <i>Lolium perenne</i> ] <b>AFA36524.1</b>	283	98%	3e-92	85%
	Victorin binding protein [ <i>Lolium perenne</i> ] <b>AFA36596.1</b>	283	98%	4e-92	85%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 25</b> <b>(Reverse 57SP6-57T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007163264.1</b>	361	81%	3e-120	97%
	Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AHA84179.1</b>	354	81%	1e-117	95%
	Hydrolase, hydrolyzing O glycosyl compounds, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] <b>XP_002515142.1</b>	244	81%	8e-75	65%
<b>Konsensus 26</b> <b>(Reverse 58SP6-58T7)</b>	Homeodomain leucine zipper protein HDZ1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AAK84885.1</b>	350	92%	2e-118	100%
	Hypothetical protein PHAVU_002G260700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007159709.1</b>	350	92%	1e-117	100%
	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2 isoform 3 [ <i>Theobroma cacao</i> ] <b>XP_007047860.1</b>	206	92%	5e-61	55%
	Transcription factor, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] <b>XP_002535237.1</b>	201	92%	3e-60	53%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 27</b> <b>(Reverse 59SP6-59T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_008G075700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007139991.1</b>	119	53%	8e-32	100%
<b>Konsensus 28</b> <b>(Reverse 65SP6-65T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_006G014400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007146123.1</b>	115	53%	2e-30	95%
<b>Konsensus 29</b> <b>(Reverse 69SP6-69T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_002G269400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007159811.1</b>	302	60%	7e-100	99%
	PREDICTED: photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic [ <i>Cucumis melo</i> ] <b>XP_008441057.1</b>	244	60%	3e-77	79%
<b>Konsensus 30</b> <b>(Reverse 70SP6-70T7)</b>	70 kDa heat shock protein [ <i>Sandersonia aurantiaca</i> ] <b>AAL85887.1</b>	332	95%	2e-110	97%
<b>Konsensus 31</b> <b>(Reverse 71SP6-71T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G100200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007161811.1</b>	413	76%	3e-141	99%
	NAC transcription factor [ <i>Glycine max</i> ] <b>AHB63580.1</b>	342	76%	5e-113	84%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 32</b> <b>(Reverse 72SP6-72T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_002G196000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007158956.1</b>	174	46%	2e-52	100%
<b>Konsensus 33</b> <b>(Reverse 73SP6-73T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007151018.1</b>	262	58%	2e-85	100%
	ADP-ribosylation factor A1F [ <i>Theobroma cacao</i> ] <b>XP_007031496.1</b>	261	58%	1e-84	99%
	ARF GTPase family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] <b>NP_177206.1</b>	258	58%	2e-83	98%
<b>Konsensus 34</b> <b>(Reverse 77SP6-77T7)</b>	Putative senescence-associated protein [ <i>Pisum sativum</i> ] <b>BAB33421.1</b>	184	92%	8e-55	80%
<b>Konsensus 35</b> <b>(Reverse 81SP6-81T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007163264.1</b>	361	81%	3e-120	97%
	Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AHA84179.1</b>	354	81%	1e-117	95%
	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]	244	81%	8e-75	65%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 36</b> <b>(Reverse 82SP6-82T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007143828.1</b>	285	83%	4e-93	99%
	PREDICTED: OTU domain- containing protein At3g57810like [ <i>Glycine max</i> ] <b>XP_003556279.1</b>	257	83%	2e-82	92%
	Cysteine-type peptidase, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] <b>XP_002530891.1</b>	230	85%	3e-73	82%
<b>Konsensus 37</b> <b>(Reverse 83SP6-83T7)</b>	RecName: Full=Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>O64981.1</b>	486	95%	9e-169	98%

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Konsensus 38</b> <b>(Reverse 91SP6-91T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G262700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007163772.1</b>	625	95%	0	99%
	F-box only protein 6 [ <i>Glycine soja</i> ] <b>KHN44447.1</b>	599	95%	0	95%
	Protein LEAF CURLING RESPONSIVENESS [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] <b>NP_564278.1</b>	485	96%	6e-167	74%
<b>Konsensus 39</b> <b>(Reverse 95SP6-95T7)</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007163264.1</b>	361	81%	3e-120	97%
	Endo-1,4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AHA84179.1</b>	354	81%	1e-117	95%
	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] <b>XP_002515142.1</b>	244	81%	8e-75	65%

#### 4.14.4 Kontik Dizilerin BLAST Sonuçları

Consensus dizilerden CAP3 programı kullanılarak kontik oluşturuldu. Oluşan 4 kontik dizin için protein benzerliğinin bulunması amacı ile BLASTX yapıldı.

Çizelge 4. 8 Kontik dizilerin BLASTX sonuçları

DİZİNLER	BLASTX				
	BENZERLİK	SCORE	QUERY COVER	E VALUE	İDENT
<b>Kontik 1</b>	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007163264.1</b>	361	81%	3e-120	97%
	Endo-1, 4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>AHA84179.1</b>	354	81%	1e-117	95%
<b>Kontik 2</b>	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007143828.1</b>	285	83%	4e-93	99%
	Hypothetical protein LR48_Vigan02g179900 [ <i>Vigna angularis</i> ] <b>KOM35649.1</b>	266	82%	8e-86	94%
	PREDICTED: OTU domain- containing protein At3g57810- like [ <i>Glycine max</i> ] <b>XP_003556279.1</b>	257	83%	2e-82	92%

Çizelge 4. 8 Kontik dizilerin BLASTX sonuçları (devam)

<b>Kontik 3</b>	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] <b>XP_007151018.1</b>	376	61%	1e-128	100%
	ADP-ribosylation factor 1-like protein [ <i>Solanum tuberosum</i> ] <b>NP_001274832.1</b>	374	61%	5e-128	99%
<b>Kontik 4</b>	Putative senescence-associated protein [ <i>Lilium longiflorum</i> ] <b>ABO20851.1</b>	175	74%	5e-54	96%
	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC105976410 [ <i>Erythranthe guttatus</i> ] <b>XP_012857135.1</b>	180	77%	7e-54	94%

#### 4.14.5 BLAST Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BLAST sonuçlarına bakıldığında en çok benzerlik gösterilen proteinlerden bir tanesi Endo-1, 4- $\beta$ mannazdır.

Hemiselülozlar hücre duvarının yapısında bol miktarda bulunan heteropolisakkaritlerdir [49]. B-1, 4-Mannan tohumlarda, fasulyede ve yumrulara yaygın bir şekilde bulunan temel hemiselülozdur. Fibrillerin mikrobiyal saldırılarla ve selülazlar tarafından bozunmasına karşı korunmasını sağlarlar [50]. Endo-1, 4- $\beta$ mannaz (  $\beta$ -Mannanaz; mannan endo-1,4-b-mannosidaz; EC 3.2.1.78) mannan ve heteromannan ana zinciri üzerindeki  $\beta$ -1,4-mannozidik bağlarının rastgele hidrolizini katalize eder ve bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunur [49], [50], [51].

F-box proteinleri yapılarında F domainleri ( protein-protein etkileşimleri olan yaklaşık 50 aminoasidin bulunduğu yapısal bir motif) içeren ve bitkilerde çeşitli gelişimsel süreçlerin ve hücre döngüsünün düzenlenmesiyle, sinyal iletimiyle ve fotomorfogenezle ilişkili olan bir proteindir [52].

Rubisco ( Ribuloz-1, 5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz, EC 4.1.1.39) bitkilerde, alglerde, siyanobakterlerde ve fototropik ve kemootorofik proteobakterlerde bulunan bir enzimdir. Fotosentetik karbon asimilasyonundan sorumlu anahtar bir enzimdir. Aynı zamanda oksijen reaksiyonunu katalizleyerek fotorespirasyonu başlatır [53], [54].

Fotosentez ışık enerjisinin kimyasal enerjiye çevrilmesinde güneş enerjisini tutan iki tip (LHC- I ve LHC- II ) kompleks içeren iki fotosistem (PS II ve PS I ) tarafından kontrol edilir. LHC II ( Light-harvesting protein 2), klorofil a/b bağlama proteinlerine bağlanan ve tilakoid membranda en bol bulunan komplekstir. Klorofil bağlama proteinleri güneş ışığını absorbe eder ve uyarma enerjisinin PSII çekirdek kompleksine transfer edilmesini sağlarlar [55].

Oksijen evolving-enhancer protein 1 kloroplastta tilakoid lümende bulunan ve fotosistem 2 için önemli olan su reaksiyonları için iyonik çevreyi koruyan proteindir [56].

Fruktoz-bifosfat aldolaz (aldolaz, EC 4.1.2.13) fruktoz-1, 6-bifosfatın dihidroksiaseton-fosfat ve giseraldehit 3-fosfata ayrılmasını katalize eder [57].

Alanin-tRNA ligaz ( L-alanine: tRNAAla ligaz (AMP-forming), alanil-tRNA sentetaz, EC 6.1.1.7 ) alaninin tRNA'ya bağlanmasını katalizleyen bir enzimdir [58].

ADP ribosilasyon faktörünün (ARFs) bitki hücrelerindeki rolü diğer ökaryotik sistemlerle karşılaştırıldığında daha az karakterize edilmiştir. Özellikle lipit metabolizmasında ve hücre içinde veziküler trafikte önemli rol oynadığı görülmektedir. Bitki hücrelerinde ARF proteinlerinin COPI vezikül kaplama protein bileşenleri ile etkileşime girerek golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum arasında geri dönüşümlü protein taşınmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür [59], [60].

ADP ribozilasyon faktörleri ( ARF) GTP bağlayıcı protein ailesinin bir üyesidir ve ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunur. Aktin düzenlenmesinden ve veziküler trafikten sorumlulardır [61].

En büyük transkripsiyon faktör ailelerinden biri olan NAC ailesi ( NAM, ATAF1/2, CUC2 ) bugüne kadar sadece bitkilerde bulunmuştur. Bu protein aileleri N-terminal bölgesinde NAC domain olarak bilinen yüksek ölçüde korunmuş bir DNA bağlanma alanı içermesi ile karakterize edilir. NAC protein ailesi bitki gelişiminde, ikincil duvar oluşumunda, lateral kök gelişiminde ve embriyo ve çiçek oluşumunda önemli rol oynar [62], [63], [64].

70 kilodaltonluk ısı şok proteinleri (Hsp70s) ısı şoku proteinleri ailesine ait tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan bir proteindir. İlk başlarda ısı şokunda ifade edildiği düşünülmüştür ama şimdi soğukta, UV ışığının etkisinde, yara iyileşmesinde ve doku yenilenmesinde de ifade edildiği bilinmektedir [65], [66].

Protein kinazlar bitki büyümesi ve gelişiminde ve strese cevap verilmesinde önemli rol oynamaktadır. CIPK tipi kinazlar ( CBL etkileşen protein kinaz) serin-tireonin bitkiye özel ailesidir. CBL ( kalsinörin B benzeri) bir çeşi kalsiyum sensörüdür ve CIPK kompleksini aktive ederek stres sinyallerinin algılanmasını sağlar. Aktive olmuş kompleks stres efektörlerinin ifadesini düzenler [67].

Glisin dehidrogenaz ( Glisin dekarboksilaz EC 1.4.4.2) tüm prokaryot ve ökaryot organizmalarda bulunan bir protein kompleksidir. Ökaryotlarda glisin sisteminde (glisin-serin dönüşümü) görevli bir P-proteinidir [68].

Translasyon kontrol tümör proteini ( TCTP ) bütün ökaryotlarda bulunan translasyon düzeyinde düzenlenmiş büyüme ile ilişkili bir proteindir. Bitkilerde, TCTP mRNA ifadesi kök mitozu ile ilişkilidir ve karanlık dönemde indüklenir. Bu protein polen tübü gelişiminde ve floem proteinlerinin uzun mesafe hareketinde rol oynar. Hücre döngüsü ilerlemesini kontrol ederek mitotik bölünmeyi düzenler. Sadece bitkinin büyümesini düzenlemez aynı zamanda bitki özel işlevlerini de belirtmektedir [69].

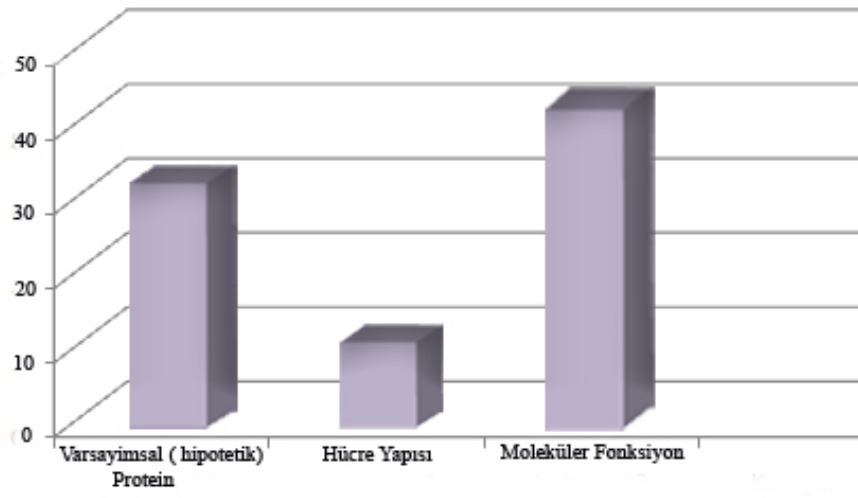
Kriptokromlar mavi ışığa duyarlı flavoprotein sınıfının bir üyesidir. Mavi ışık reseptörleri fotomorfojenizde, fototropizmada ve çiçeklenme başlangıcında görev alırlar [70].

Sistein proteaz ( sistein peptidaz) bitkinin büyümesinde, hücre sinyal iletiminde ve strese cevap vermede etkili bir proteindir [71].

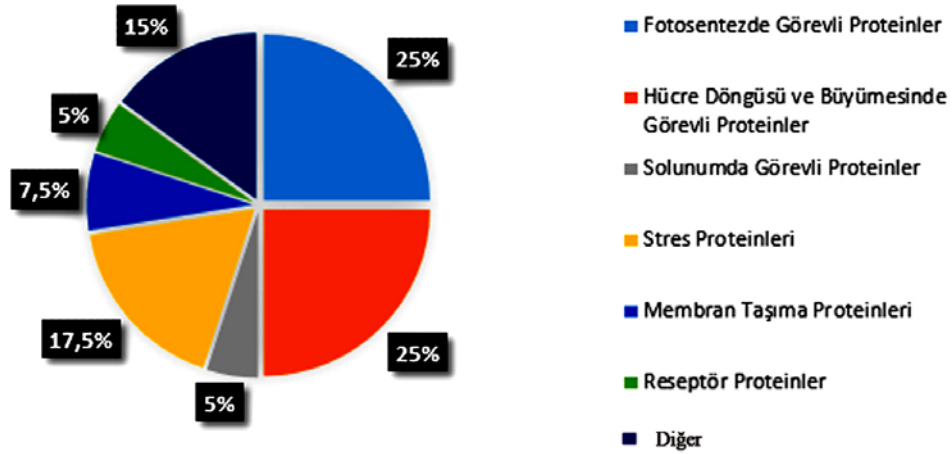
Alanin- glioksilat transaminaz ( EC 2.6.1.44) fotorespirasyonda görev alan bir enzimdir.

Homodomain lösin zipper 1 proteini ( HD-Zip1) abiyotik stres altında cevap verilmesini sağlar [72].

BLAST sonuçlarının analizleri kategorilendirilmiş olarak Şekil 4.15 ve Şekil 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4. 15 Konsensus dizilerin BLAST sonuçlarının kategorileri



Şekil 4. 16 Çıkarılan cDNA kütüphanesinin moleküler fonksiyonu sınıflandırılması

#### 4.15 Öneriler

Bu çalışmada organik koşullarda yetiştirilen *Phaseolus vulgaris* L. 'de anlatımı artan genlerin tespit edilebilmesi amacı ile yaprak dokularından SSH kütüphanesi kurulmuştur. Bu kütüphaneyi oluşturan klonlar dizin analizine gönderilmiş ve gelen diziler için biyoinformatik analizler yapılmıştır. Gelen dizilerden Chromas programı kullanılarak vektör dizileri kesilmiştir. Diziler Fasta formatına çevrilmiştir. NCBI BLASTN, BLASTX ve BLASTP analizleri yapılarak veritabanındaki benzerlikler aranmıştır.

BLAST sonuçları incelendiğinde varsayımsal proteinlerin fazla olduğu görülmektedir. Literatürde organik koşullarda yetiştirilen fasulye dizileri için yeteri kadar araştırma yapılmadığından, araştırılmaya açık protein dizilerinin var olduğu gözlenmiştir.

Sonuçlara bakıldığı zaman bitkide stresten sorumlu genlere karşılık gelen kısmi cDNA'ların klonlandığı görülmüştür. Konvansiyonel tarımla karşılaştırıldığında organik tarım uygulamalarında kullanılan gübre çeşidi bitkinin besin ihtiyacını karşılayamayabilir. Bu durumda bitki besin stresine girmiş olabilir ve stres genlerinin ifadesinde bir artış olabilir. Ayrıca gen kütüphanesi içinde fotosentezde görev alan proteinleri kodlayan genlerinde mevcut olduğu görülmüştür. Organik koşullarda yetiştirilen bitkinin kendi kaynaklarına yönelerek besin ihtiyacını doğal sentez yolu ile karşıladığı düşünülebilir.

Her iki gen grubu içinde Real time PCR kullanılarak genlerin ifadesindeki değişimlerin analizi yapılacaktır.

## KAYNAKLAR

---

- [1] Demiryürek, K., (2011). "Organik tarım kavramı ve organik tarımın Dünya ve Türkiye'deki durumu", GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(1): 27-36.
- [2] Selçuk, İ., (2010). "Uluslararası ticari boyutuyla organik tarım ve devlet destekleri", Girişimcilik ve Kalkınma Dergisi, 5(1).
- [3] Ataseven, Y. ve E. Güneş, (2008). "Türkiye'de İşlenmiş Organik Tarım Ürünleri Üretimi ve Ticaretindeki Gelişmeler", UÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(2): 25-33.
- [4] Rossi, F. vd., (2008). "Health-promoting substances and heavy metal content in tomatoes grown with different farming techniques", European journal of nutrition, 47(5): 266-272.
- [5] Herencia, J.F. vd., (2011). "Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil", Scientia horticulturae, 129(4): 882-888.
- [6] Lu, C. vd., (2005). "Markedly different gene expression in wheat grown with organic or inorganic fertilizer", Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 272(1575): 1901-1908.
- [7] Zhang, X.-N. vd., (2002). "Application of suppression subtractive hybridization (SSH) to cloning differentially expressed cDNA in *Dunaliella salina* (chlorophyta) under hyperosmotic shock", Plant molecular biology reporter, 20(1): 49-57.
- [8] Cramer, R.A. vd., (2006). "Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola*–*Brassica oleracea* interaction". Molecular plant pathology, 7(2): 113-124.
- [9] Güvenç, İ. ve F. Güngör, (1996). "Türkiye'de tescilli fasulye çeşitlerine ait tohumların fiziksel özellikleri ve besin bileşimleri/seed characteristics of registered bean cultivars in Turkey", Journal of the Faculty of Agriculture, 27(4).
- [10] Gepts, P., (2001). "*Phaseolus vulgaris* (Beans)", Encyclopedia of Genetics, 1444-1445.
- [11] Graham, P. ve P. Ranalli, (1997). "Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", Field Crops Research, 53(1): 131-146.

- [12] Gentry, H.S., (1969). "Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*", *Economic Botany*, 23(1): 55-69.
- [13] Singh, S.P., (1989). "Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Fabaceae*)", *Economic Botany*, 43(1): 39-57.
- [14] Hayat, I. vd., (2014). "Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview", *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(5): 580-592.
- [15] Gepts, P. ve D. Debouck, (1991). "Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Common beans: research for crop improvement*, 7-53.
- [16] Hernández-Lucero, E. vd., (2014). "Differential expression of genes for tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Plant molecular biology reporter*, 32(2): 318-327.
- [17] Colpaert, N. vd., (2008). "Composite *Phaseolus vulgaris* plants with transgenic roots as research tool", *African Journal of Biotechnology*, 7(4).
- [18] Du, S.-k. vd., (2014). "Physicochemical properties and digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) starches", *Carbohydrate polymers*, 108: 200-205.
- [19] Boschin, G. ve A. Arnoldi, (2011). "Legumes are valuable sources of tocopherols", *Food chemistry*, 127(3): 1199-1203.
- [20] McCollum, E., N. Simmonds, ve W. Pitz, (1917). "The dietary deficiencies of the white bean, *Phaseolus vulgaris*", *Journal of Biological Chemistry*, 29(3): 521-536.
- [21] Sandberg, A.-S., (2002). "Bioavailability of minerals in legumes", *British Journal of Nutrition*, 88(S3): 281-285.
- [22] Abdelwahab, N.M., (2015). "The Nutritive and Functional Properties of Dry Bean Flour As Affected By Gamma Irradiation", UOFK.
- [23] Önder, M. vd., (2012). "Konya ilinde fasulye tarımında karşılaşılan problemler ve çözüm önerileri", *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 5: 143-148.
- [24] Aytoğu, R., (2006). "Organik Tarım Analizi ve AB Pazarı Fırsatı", İstanbul Ticaret Odası Yayınları, Yayın.
- [25] Yürüdü, E., K. Hasan, ve K. Aribaş, (2010). "Türkiye'nin organik (ekolojik) tarım coğrafyası", *Elektronik Sosyal Bilimler Dergisi*, 32(32).
- [26] Huber, M. vd., (2011). "Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research", *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3): 103-109.
- [27] Carbonaro, M. vd., (2002). "Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.)", *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(19): 5458-5462.
- [28] Caris-Veyrat, C. vd., (2004). "Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes

- and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans", *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21): 6503-6509.
- [29] Lombardi-Boccia, G. vd., (2004). "Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1): 90-94.
- [30] Young, J.E. vd., (2005). "Phytochemical phenolics in organically grown vegetables", *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(12): 1136.
- [31] Hoogenboom, L. vd., (2008). "Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products", *Food Additives and Contaminants*, 25(10): 1195-1207.
- [32] Abu-Zahra, T., K. Al-Ismaïl, ve F. Shatat. (2006). "Effect of organic and conventional systems on fruit quality of strawberry (*fragaria* × *ananassa* duch) grown under plastic house conditions in the Jordan Valley", in I International Symposium on Fresh Food Quality Standards: Better Food by Quality and Assurance 741.
- [33] Schneewis, I. vd., (2005). "Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs", *Archives of animal nutrition*, 59(3): 155-163.
- [34] Diatchenko, L. vd., (1996). "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12): 6025-6030.
- [35] Rebrikov, D.V. vd., (2004). "Suppression subtractive hybridization, in *Gene Expression Profiling*", Springer. 107-134.
- [36] Atalay, A. vd., (2002). "Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells", *Biochemical and biophysical research communications*, 299(5): 839-846.
- [37] Chen, I. vd., (2001). "Identification of estrogen-induced genes downregulated by AhR agonists in MCF-7 breast cancer cells using suppression subtractive hybridization", *Gene*, 262(1): 207-214.
- [38] Lü, B. vd., (2007). "Systemic analysis of the differential gene expression profile in a colonic adenoma– normal SSH library", *Clinica chimica acta*, 378(1): 42-47.
- [39] Ouyang, B. vd., (2007). "Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis", *Journal of Experimental Botany*, 58(3): 507-520.
- [40] Basyuni, M. vd., (2011). "Isolation of salt stress tolerance genes from roots of mangrove plant, *Rhizophora stylosa* Griff., using PCR-based suppression subtractive hybridization", *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(3): 533-543.
- [41] Abid, G. vd., (2012). "Identification and analysis of differentially expressed genes during seed development using suppression subtractive hybridization (SSH) in *Phaseolus vulgaris*", *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(3): 719-730.

- [42] Primrose, S.B. ve R. Twyman, (2013). "Principles of gene manipulation and genomics", John Wiley & Sons.
- [43] Rudd, S., (2003). "Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences?" Trends in plant science, 8(7): 321-329.
- [44] Kalaycıoğlu, A.T., (2013). "Nükleotid Dizilerinin Aminoasit Formatına Dönüştürülmesi ve Dünya Veri Tabanlarındaki Verilerle Karşılaştırılması", Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(2).
- [45] Benson, D. vd., (2011). "GenBank Nucleic Acids Res", 39. Database, (D32-D37).
- [46] Benson, D.A. vd., (2015). "GenBank", Nucleic Acids Research, 43(Database issue): D30.
- [47] NCBI, R.C., (2015). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information", Nucleic acids research, 43(Database issue): D6.
- [48] Johnson, M. vd., (2008). "NCBI BLAST: a better web interface", Nucleic acids research, 36(suppl 2): W5-W9.
- [49] Stålbbrand, H. vd., (1995). "Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* beta-mannanase gene containing a cellulose binding domain", Applied and environmental microbiology, 61(3): 1090-1097.
- [50] Bien-Cuong, D. vd., (2009). "Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1, 4- $\beta$ -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01", Microb Cell Fact, 8(1): 1-12.
- [51] Zhao, Y. vd., (2013). "Populus endo-beta-mannanase PtrMAN6 plays a role in coordinating cell wall remodeling with suppression of secondary wall thickening through generation of oligosaccharide signals", The Plant Journal, 74(3): 473-485.
- [52] Jain, M. vd., (2007). "F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress", Plant physiology, 143(4): 1467-1483.
- [53] Spreitzer, R.J. ve M.E. Salvucci, (2002). "Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme", Plant Biology, 53.
- [54] Parry, M. vd., (2003). "Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation", Journal of Experimental Botany, 54(386): 1321-1333.
- [55] Gao, L. ve H.-M. Li, (2015). "Identification of a Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding Protein Gene in *Gardenia jasminoides*".
- [56] Ishida, K.-i. ve B.R. Green, (2002). "Second-and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont", Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(14): 9294-9299.

- [57] Konishi, H. vd., (2004). "Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling", *Plant molecular biology*, 56(6): 839-848.
- [58] Boyce, S., K. Tipton, ve A. McDonald, (2004). "Extending enzyme classification with metabolic and kinetic data: some difficulties to be resolved", *Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations*, 17-44.
- [59] Li, Y. vd., (2004). "Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*", *The FASEB journal*, 18(15): 1834-1850.
- [60] Matheson, L.A. vd., (2007). "Multiple roles of ADP-ribosylation factor 1 in plant cells include spatially regulated recruitment of coatomer and elements of the Golgi matrix", *Plant physiology*, 143(4): 1615-1627.
- [61] Lee, M.H. vd., (2002). "ADP-ribosylation factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis", *Plant Physiology*, 129(4): 1507-1520.
- [62] Fang, Y. vd., (2008). "Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice", *Molecular Genetics and Genomics*, 280(6): 547-563.
- [63] Olsen, A.N. vd., (2005). "NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse", *Trends in plant science*, 10(2): 79-87.
- [64] Zheng, X. vd., (2009). "Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance", *Biochemical and biophysical research communications*, 379(4): 985-989.
- [65] Wang, W. vd., (2004). "Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response", *Trends in plant science*, 9(5): 244-252.
- [66] Kiang, J.G. ve G.C. Tsokos, (1998). "Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology", *Pharmacology & therapeutics*, 80(2): 183-201.
- [67] Li, R. vd., (2012). "HbCIPK2, a novel CBL-interacting protein kinase from halophyte *Hordeum brevisubulatum*, confers salt and osmotic stress tolerance", *Plant, cell & environment*, 35(9): 1582-1600.
- [68] Bauwe, H. ve Ü. Kolukisaoglu, (2003). "Genetic manipulation of glycine decarboxylation", *Journal of Experimental Botany*, 54(387): 1523-1535.
- [69] Brioudes, F. vd., (2010). "Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37): 16384-16389.
- [70] Banerjee, R. vd., (2007). "The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone", *Journal of biological chemistry*, 282(20): 14916-14922.

- [71] Turk, V. ve W. Bode, (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases", FEBS letters, 285(2): 213-219.
- [72] Elhiti, M. ve C. Stasolla, (2009). "Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins", Plant signaling & behavior, 4(2): 86-88.
- [73] MdrlĖ, T.C.T.v.H.B.B..G., (2015). "BGEM FAALYETLER", <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf>. 5 Kasım 2015

## TOTAL RNA NANODROP SONUÇLARI

Measurement Mode: Simple Nucleic Acid Quant.

Date: 2015.02.27

Analyte: RNA

Page: 1/2

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	kontrol	15.02.27 14:35:32			9,42	-2,64	-0,07	-0,297	-0,622	-3,824	-0,532	0,192	1,000
2	o1b1	15.02.27 14:36:18			482,98	2,15	5,17	11,746	5,290	2,009	-0,329	0,192	1,000
3	o1b2	15.02.27 14:36:44			369,64	2,09	1,35	9,116	4,306	6,735	-0,125	0,192	1,000
4	o1b3	15.02.27 14:37:08			-57,45	1,59	0,43	0,073	0,607	-1,866	1,510	0,192	1,000
5	o1b4	15.02.27 14:37:45			376,05	2,06	1,24	9,895	5,051	8,093	0,494	0,192	1,000
6	o2b1	15.02.27 14:38:12			17,03	-105,69	-1,17	-0,118	-0,548	-0,907	-0,543	0,192	1,000
7	o2b2	15.02.27 14:38:39			261,37	2,29	-25,09	6,410	2,723	-0,384	-0,124	0,192	1,000
8	o2b3	15.02.27 14:41:20			-59,30	1,54	0,40	-0,697	-0,177	-2,941	0,785	0,192	1,000
9	o2b4	15.02.27 14:42:15			279,21	2,23	-34,22	6,350	2,499	-0,835	-0,631	0,192	1,000
10	c1b1	15.02.27 14:42:53			742,20	2,19	3,83	17,980	7,901	4,274	-0,574	0,192	1,000

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/ $\mu$ L)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
11	c1b2	15.02.27 14:45:16			-55,78	1,46	0,38	-0,665	-0,225	-2,901	0,729	0,192	1,000
12	c1b3	15.02.27 14:46:01			865,52	2,18	3,83	21,150	9,427	5,160	-0,488	0,192	1,000
13	c1b4	15.02.27 14:46:37			1089,55	2,19	2,86	26,740	11,957	9,012	-0,499	0,192	1,000
14	c2b1	15.02.27 14:47:06			230,21	2,30	7,02	5,164	1,908	0,228	-0,591	0,192	1,000
15	c2b2	15.02.27 14:47:36			438,08	2,25	7,01	11,849	5,762	2,458	0,897	0,192	1,000
16	c2b3	15.02.27 14:48:03			516,49	2,20	4,92	12,295	5,239	2,007	-0,618	0,192	1,000
17	c2b4	15.02.27 14:48:24			685,52	2,19	4,11	16,537	7,217	3,572	-0,601	0,192	1,000
18	c2b5	15.02.27 14:49:06			625,12	2,20	3,91	15,052	6,534	3,423	-0,577	0,192	1,000

## mRNA NANODROP SONUÇLARI

Measurement Mode:Simple Nucleic Acid Quant.

Date:2015.04.16

Analyte:RNA

Page:1/1

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/ $\mu$ L)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	kontrol	15.04.16 09:07:18			42,10	2,25	1,57	0,945	0,360	0,562	-0,108	0,192	1,000
2	O1	15.04.16 09:08:07			39,79	2,37	0,50	1,075	0,500	2,089	0,081	0,192	1,000
3	O2	15.04.16 09:08:39			64,61	2,26	0,48	1,743	0,841	3,520	0,127	0,192	1,000
4	C1	15.04.16 09:09:15			34,68	2,25	0,94	1,341	0,860	1,391	0,474	0,192	1,000
5	C2	15.04.16 09:09:46			55,82	2,38	0,47	1,544	0,736	3,102	0,149	0,192	1,000

## BLASTN VE BLASTP SONUÇLARI

	DİZİNLER	UZUNLUK (BP)	PGEM-T VE ADAPTÖR KESİLDİKTEN SONRA UZUNLUK (BP)	BLASTN		BLASTP	
				BENZERLİK	SKOR	BENZERLİK	SKOR
FORWARD DİZİN	4T7	1273	620	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_011G03 9100g) mRNA, complete cds e = 0	749	Hypothetical protein PHAVU_011G039100g [ <i>Phaseolus Vulgaris</i> ] e = 2e-97	301
				<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2391 fructose- bisphosphate Aldolase mRNA, complete cds e = 0	749	Fructosebisphosphate aldolase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-97	301
	5T7	1270	981	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein	1653	Hypothetical protein PHAVU_009G116900g	449

			(PHAVU_009G116900g) mRNA, complete cds e = 0		[ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-146  Probable alanine tRNA ligase, chloroplastic- like [ <i>Glycine max</i> ] e = 7e-134	417
11T7	1264	322	<i>Oxytropis ochrocephala</i> 26S ribosomal RNA, partial sequence e = 9e-139	503		
12T7	1261	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0	1160	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131  Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	390  383
13T7	1259	535	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G085200g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max cDNA, clone: GMFL0115L07 e = 2e-137	902  499	Hypothetical protein PHAVU_001G085200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-97	289
16T7	1281	497	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_011G009700g) mRNA, complete cds e = 8e-251	544	Hypothetical protein PHAVU_011G009700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 8e-61	195
18T7	1245	416	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_010G150000g)	678	Hypothetical protein PHAVU_010G150000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	121

			mRNA, complete cds e = 0  Glycine max cDNA, clone: GMFL0106F03 e = 7e-121	444	e = 1e-32	
21T7	1306	665	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_008G036200g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max cyclic nucleotidigated ion channel 2like (LOC100798823), mRNA e = 0	1131  942	Hypothetical protein PHAVU_008G036200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-140	421
22T7	1240	495	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G105100g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max uncharacterized LOC100793001 (LOC100793001), mRNA e = 2e-161	824  579		
23T7	1262	486	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds e = 0  Phaseolus vulgaris rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds	817  817	Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-101	309

			e = 0		Hypothetical protein PHAVU_001G234300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-101	309
26T7	1212	615	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G271000g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max uncharacterized LOC100500247 (LOC100500247), mRNA e = 0	1026  708		
28T7	1248	463	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_009G133200g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max F-box protein SKP2Blike (LOC100818928), misc_RNA e = 6e-137	763  497	Hypothetical protein PHAVU_009G133200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-63	211
29T7	1262	1118	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G108900g) mRNA, complete cds e = 0	1882	Hypothetical protein PHAVU_007G108900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	543
33T7	1246	874	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_004G011900g) mRNA, complete cds e = 0	1487	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-127	373

34T7	1277	930	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds e = 0	1631	Hypothetical protein PHAVU_001G234300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	615
			<i>Phaseolus vulgaris</i> rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds e = 0	1620	Full=Rubulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	612
36T7	1307	726	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_010G052300g) mRNA, complete cds e = 0	1254	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-146	420
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE3174 chloroplast oxygen-evolving enhancer protein mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product e = 0	1243	Chloroplast oxygen- evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-143	412
38T7	1257	438	<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2656 chlorophyll A/B binding protein 7 chloroplastic-like protein mRNA, complete cds e = 0	719	Lightharvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] e = 4e-45	156
					Lightharvesting complex I protein	158

			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE5D1906 lightharvesting complex I protein Lhca2 mRNA, complete cds e = 0	719	Lhca2 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-44	
39T7	1271	729	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G238800g) mRNA, complete cds e = 0	1251	Hypothetical protein PHAVU_002G238800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-152	446
40T7	1254	589	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_009G248700g) mRNA, complete cds e = 0	992	Hypothetical protein PHAVU_009G248700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-109	322
46T7	1232	488	Glycine max cDNA, clone: GMFL0134B21 e = 2e-137  Glycine max uncharacterized LOC100527843 (LOC100527843), mRNA e = 4e-134	499  488	40S ribosomal S15a1 like protein [ <i>Gossypium arboreum</i> ] e = 1e-49  Ribosomal protein S8 [ <i>Medicago truncatula</i> ] e = 1e-49	167  167
47T7	1240	684	<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1170 oxygen-evolving enhancer protein 1 mRNA, complete cds e = 0	1110	Hypothetical protein PHAVU_002G024000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-107	323
48T7	1265	662	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_006G207300g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone	1146  1134	Hypothetical protein PHAVU_006G207300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-110	328

			BE5D0354 chlorophyll A/B binding protein CP24 10A chloroplastic mRNA, complete Cds e = 0			
52T7	1275	537	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G035500g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max cDNA, clone: GMFL0107F11 e = 0	905  771	Hypothetical protein PHAVU_001G035500g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-110  Glycine dehydrogenase [decarboxylating], Mitochondrial-like [Glycine max] e = 9e-95	350  308
53T7	1253	158	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_005G055200g) mRNA, complete cds e = 3e-45  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1476 chloroplast photosystem II 10 kDa protein mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product e = 3e-35	191  158		
57T7	1227	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0  Phaseolus vulgaris clone	1160  1122	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131  Endo-1, 4-beta-mannanase	390  383

			BE2964 endo-1, 4-beta-mannanase mRNA, complete cds e = 0		[ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	
58T7	1261	694	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G260700g) mRNA, complete cds e = 0	1194	Homeodomain leucine zipper protein HDZ1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-154	441
			<i>Phaseolus vulgaris</i> homeodomain leucine zipper protein HDZ1 mRNA, partial cds e = 0	1194	Hypothetical protein PHAVU_002G260700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-153	440
59T7	1270	399	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_008G075700g) mRNA, complete cds e = 2e-180	641		
60T7	1255	786	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0	1371	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	517
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 Endo-1, 4-beta-mannanase mRNA, complete cds e = 0	1327	Endo-1, 4-beta-mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-178	509
65T7	1255	320	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_006G014400g) mRNA, complete cds e = 1e-107	399	Hypothetical protein PHAVU_006G014400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 9e-31	117

			Glycine max uncharacterized LOC100305889 (LOC100305889), mRNA e = 2e-50			
69T7	1262	838	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G269400g) mRNA, complete cds e = 0	1387	Hypothetical protein PHAVU_002G269400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 8e-118	347
			<i>Phaseolus vulgaris</i> photosystem I-N subunit (PSIN) mRNA, complete cds e = 0	1262		
70T7	1241	617	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G157200g) mRNA, complete cds e = 0	1053	Hypothetical protein CISIN_1g020168mg [ <i>Citrus sinensis</i> ] e = 2e-132	387
					Heat shock protein 70 cognate [ <i>Salix gilgiana</i> ] e = 4e-132	389
71T7	1227	791	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G100200g) mRNA, complete cds e = 0	1301	Hypothetical protein PHAVU_001G100200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-158	456
			Glycine max transcriptional factor NAC11 (NAC11), mRNA e = 0	773		
72T7	1196	562	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein	896		

			(PHAVU_002G196000g) mRNA, complete cds e = 0			
73T7	1260	637	<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1808 ADP-ribosylation factor 1 mRNA, complete cds e = 0	1064	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-86  ADP-ribosylation factor A1F [ <i>Theobroma cacao</i> ] e = 9e-86	265  263
77T7	1245	341	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH12_ 01_B03_T3 mRNA sequence e = 3e-153	551		
81T7	1264	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e= 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 endo-1, 4-beta- mannanase mRNA, complete cds e = 0	1160  1122	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131  Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	390  383
82T7	1257	495	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G105100g) mRNA, complete cds e = 0	824	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-93	285
83T7	1277	751	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds	1295	Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic;	488

				e = 0 <i>Phaseolus vulgaris</i> rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds e = 0	1295	Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-169	
	91T7	1263	933	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G262700g) mRNA, complete cds e = 0	1637	Hypothetical protein PHAVU_001G262700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	625
	95T7	1260	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0	1160	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131	390
				<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 Endo-1, 4-beta- mannanase mRNA, complete cds e = 0	1122	Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	383
REVERSE DIZIN	4SP6	1281	618	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypot hetical protein (PHAVU_011G03 9100g) mRNA, complete cds e = 0	745	Hypothetical protein PHAVU_011G039100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e= 2e-66	221
				<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2391 fructose- biphosphate Aldolase mRNA, complete cds e = 0	745	Fructose-biphosphate aldolase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e= 3e-66	221
	5SP6	1241	982	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1648	Hypothetical protein	353

			hypothetical protein (PHAVU_009G116900g) mRNA, complete cds e = 0		PHAVU_009G116900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-109  Probable alanine tRNA ligase, chloroplastic- like [ <i>Glycine max</i> ] e = 7e-105	340
11SP6	1237	322	<i>Oxytropis ochrocephala</i> 26S ribosomal RNA, partial sequence e = 9e-139	503		
12SP6	1227	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 Endo-1, 4-beta- mannanase mRNA, complete cds e = 0	1160  1122	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131  Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	390  383
13SP6	1226	535	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G085200g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max cDNA, clone: GMFL0115L07 e = 2e-137	902  499	Hypothetical protein PHAVU_001G085200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-97	289
16SP6	1233	497	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_011G009700g)	588	Hypothetical protein PHAVU_011G009700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	216

			mRNA, complete cds e = 4e-164		e = 6e-69	
18SP6	1221	416	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_010G150000g) mRNA, complete cds e = 0  Glycine max cDNA, clone: GMFL0106F03 e = 7e-121	678    444	Hypothetical protein PHAVU_010G150000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-32	121
21SP6	1241	665	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_008G036200g) mRNA, complete cds e = 0	1131	Hypothetical protein PHAVU_008G036200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-140	421
22SP6	1240	495	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G105100g) mRNA, complete cds e = 0	824	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-93	285
23SP6	1234	486	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds e=0	817    817	Full=Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RubisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-101  Hypothetical protein PHAVU_001G234300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-101	309       309
26SP6	1204	615	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1026		

			hypothetical protein (PHAVU_007G271000g) mRNA, complete cds e = 0			
28SP6	1232	463	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_009G133200g) mRNA, complete cds e = 0	763	Hypothetical protein PHAVU_009G133200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-63	211
29SP6	1205	1103	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G108900g) mRNA, complete cds e = 0	1812	Hypothetical protein PHAVU_007G108900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-127	391
33SP6	1230	873	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G108900g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1808 ADPribosylation factor 1 mRNA, complete cds e = 0	1489  1474	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-127	373
34SP6	1196	930	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds e = 0	1631	Hypothetical protein PHAVU_001G234300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0  Full=Rubulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RubisCO	612  612

					activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	
36SP6	1192	725	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_010G052300g) mRNA, complete cds e = 0	1254	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-145	417
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE3174 chloroplast oxygen-evolving enhancer protein mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product e = 0	1243	Chloroplast oxygen- evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-142	409
38SP6	1232	438	<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2656 chlorophyll A/B binding protein 7 chloroplastic-like protein mRNA, complete cds e = 0	719	Lightharvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 2 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ] e = 4e45	156
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE5D1906 light- harvesting complex I protein Lhca2 mRNA, complete cds e = 0	719	Lightharvesting complex I protein Lhca2 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-44	158
39SP6	1221	729	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G238800g) mRNA, complete cds e = 0	1251	Hypothetical protein PHAVU_002G238800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-152	446
40SP6	1233	589	<i>Phaseolus vulgaris</i>	992	Hypothetical protein	322

			hypothetical protein (PHAVU_009G248700g) mRNA, complete cds e = 0		PHAVU_009G248700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-109	
46SP6	1218	488	Glycine max cDNA, clone: GMFL0134B21 e = 2e-137	499	40S ribosomal S15a1 like protein [ <i>Gossypium arboreum</i> ] e = 1e-49	167
					Ribosomal protein S8 [ <i>Medicago truncatula</i> ] e = 1e-49	167
47SP6	1219	684	<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1170 Oxygen-evolving enhancer protein 1 mRNA, complete cds e = 0	1110	Hypothetical protein PHAVU_002G024000g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-107	323
48SP6	1230	662	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_006G207300g) mRNA, complete cds e = 0	1146	Hypothetical protein PHAVU_006G207300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-110	328
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE5D0354 chlorophyll A/B binding protein CP24 10A chloroplastic mRNA, complete cds e = 0	1134		
52SP6	1224	537	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G035500g) mRNA, complete cds e = 0	905	Hypothetical protein PHAVU_001G035500g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-110	350
					Glycine dehydrogenase [decarboxylating],	308

						mitochondrial-like [Glycine max] e = 9e-95	
53SP6	1205	158	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein PHAVU_005G055200g mRNA, complete cds e = 3e-45	191			
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1476 chloroplast photosystem II 10 kDa protein mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product e = 3e-35	158			
57SP6	1264	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0	1160	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131	390	
			<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 endo-1, 4-beta- mannanase mRNA, complete cds e = 0		Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	383	
58SP6	1249	694	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G260700g) mRNA, complete cds e = 0	1194	Homeodomain leucine zipper protein HDZ1 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-154	441	
			<i>Phaseolus vulgaris</i> homeodomain leucine zipper protein HDZ1	1194	Hypothetical protein PHAVU_002G260700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-153	440	

			mRNA, partial cds e = 0			
59SP6	1245	399	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_008G075700g) mRNA, complete cds e = 2e-180	641		
65SP6	1235	320	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_006G014400g) mRNA, complete cds e = 1e-107	399	Hypothetical protein PHAVU_006G014400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 9e-31	117
69SP6	1207	840	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G269400g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> photosystem I-N subunit (PSIN) mRNA, complete cds e = 0	1376    1251	Hypothetical protein PHAVU_002G269400g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 6e-117	345
70SP6	1211	617	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G157200g) mRNA, complete cds e = 0	1053	Hypothetical protein CISIN_1g020168mg [ <i>Citrus sinensis</i> ] e = 2e132  Heat shock protein 70 cognate [ <i>Salix gilgiana</i> ] e = 4e-132	387   389
71SP6	1184	791	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G100200g)	1273	Hypothetical protein PHAVU_001G100200g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	452

			mRNA, complete cds e = 0  Glycine max transcriptional factor NAC11 (NAC11), mRNA e = 0	745	e = 6e-157	
72SP6	1195	562	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_002G196000g) mRNA, complete cds e = 0	896		
73SP6	1245	637	<i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE1808 ADP-ribosylation factor 1 mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_004G011900g) mRNA, complete cds e = 0	1064  1055	Hypothetical protein PHAVU_004G011900g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 2e-86  ADP-ribosylation factor A1F [ <i>Theobroma</i> <i>cacao</i> ] e = 9e-86	265  263
77SP6	1157	341	<i>Sesbania drummondii</i> clone SSH12_ 01_B03_T3 mRNA sequence e = 3e-153	551		
81SP6	1217	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 endo-1, 4-beta- mannanase mRNA,	1160  1122	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131  Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	390  383

			complete cds e = 0			
82SP6	1217	495	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_007G105100g) mRNA, complete cds e = 0	824	Hypothetical protein PHAVU_007G105100g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 4e-93	285
83SP6	1231	751	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> rubisco activase (Rca1) mRNA, complete cds e = 0	1295  1295	Full=Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic; Short=RA; Short=RuBisCO activase; Flags: Precursor [ <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> ] e = 2e-170	490
85SP6	1233	681	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_010G052300g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE3174 chloroplast oxygen-evolving enhancer protein mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product e = 0	1173  1168	Hypothetical protein PHAVU_010G052300g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 3e-145  Chloroplast oxygen- evolving enhancer protein [ <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> ] e = 5e-142	417  408
91SP6	1247	933	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G262700g) mRNA, complete cds e = 0	1637	Hypothetical protein PHAVU_001G262700g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 0	625
93SP6	1226	656	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1127	Hypothetical protein	420

			hypothetical protein (PHAVU_006G133600g) mRNA, complete cds e = 0		PHAVU_006G133600g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-139	
95SP6	1232	707	<i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_001G219800g) mRNA, complete cds e = 0  <i>Phaseolus vulgaris</i> clone BE2964 endo-1, 4-beta- mannanase mRNA, complete cds e = 0	1160	Hypothetical protein PHAVU_001G219800g [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 1e-131  Endo-1, 4-beta- mannanase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] e = 5e-129	390  383

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Özlem TURAN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 23.06.1987 / İSTANBUL  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : ozlemturan\_87@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	Biyoloji öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2011
Lise	Fen/Matematik	YDA Florya Tevfik Ercan Lisesi	2006

## **İŞ TECRÜBESİ**

<b>Yıl</b>	<b>Firma/Kurum</b>	<b>Görevi</b>
2012-2015	Yıldız Teknik Üniversitesi	Öğrenci Asistan

## **YAYINLARI**

### **Proje**

1. 2012-01-07-KAP02/ Organik koşullarda yetiştirilmiş fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) anlatımı artan genlerin SSH yöntemiyle izolasyonları