

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TUZ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GELİŞTİRİLMİŞ FARKLI
FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) ÇEŞİTLERİNDE LEA-3 GENİ mRNA
İFADE SEVİYELERİNİN KANTİTATİF REAL-TIME PCR YÖNTEMİYLE
İNCELENMESİ**

İlker BÜYÜK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

İlker BÜYÜK tarafından hazırlanan “**Tuz ve Kuraklık Stresi Altında Geliştirilmiş Farklı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Çeşitlerinde LEA-3 Geni mRNA İfade Seviyelerinin Kantitatif Real-Time PCR Yöntemiyle İncelenmesi**” adlı tez çalışması 08.04.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Ergin HAMZAOĞLU
Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Bölümü

Üye : Prof. Dr. Ali ERGÜL
Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü

Üye : Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Nur Münevver PINAR
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. E. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

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

21.04.2014

İlker BÜYÜK

ÖZET

Doktora Tezi

TUZ VE KURAKLIK STRESİ ALTINDA GELİŞTİRİLMİŞ FARKLI FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) ÇEŞİTLERİNDE LEA-3 GENİ mRNA İFADE SEVİYELERİNİN KANTİTATİF REAL-TIME PCR YÖNTEMİYLE İNCELENMESİ

İLKER BÜYÜK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ekolojik koşullar bakımından seçiciliği en fazla olan yemeklik tane baklagil türüdür. Birçok bitki türünde de olduğu gibi abiyotik stres unsurlarından tuz ve kuraklık, fasulye yetiştiriciliğinde de en önemli sınırlayıcı etmenler arasında gösterilmektedir. Birim alandan elde edilen verimin artırılması, kültürel uygulamaların yanı sıra ekolojik koşullara uygun çeşitlerin belirlenerek yetiştirilmesine ve biyoteknolojik uygulamalarda çeşitlerin bu koşullara dirençli hale getirilmesine bağlıdır. Bu sebeple bitkilerin çevresel stres faktörlerine karşı sahip oldukları savunma mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir.

Bu kapsamda gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında 7 farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşidinde (Yunus-90, Akman-98, Şehirali-90, Karacaşehir-90, Eskişehir-855, Göynük-98, Önceler-98) NaCl ve tuz stresine eş kuraklık (PEG) stresinin lipid peroksidasyonu ve LEA-3 geni ifade seviyesine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tarım perlitine ekimi gerçekleştirilen fasulye çeşitleri 15 günlük fideler haline gelinceye dek iklim ve geliştirme odasında Hoagland besisi ortamı içerisinde yetiştirilmiş ve 3 ile 27 saat 100 mM tuz (NaCl) ve eş kuraklık stresine (PEG) maruz bırakılmıştır. Her çeşidin kök ve yaprak dokularından uygun zamanlarda örneklemeler alınarak lipid peroksidasyonu analizi (MDA), RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Light Cycler Nano aracılığıyla Real-Time PCR analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda LEA-3 geninin fasulye bitkisinde hem tuz hem kuraklık stresine karşı olan savunma mekanizmasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda elde edilen tüm moleküler verilerin ortak değerlendirilmesiyle LEA-3 geni ifadesinin çeşitlerin strese karşı direnç kabiliyetlerinin değerlendirilmesinde bir moleküler belirteç olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Gen ifadesi analizi ve lipid peroksidasyonu sonuçları Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinin strese karşı daha dirençli çeşitler olduğunu göstermiştir.

Nisan 2014, 118 sayfa

Anahtar Kelimeler: LEA-3, tuz stres, kuraklık stres, MDA, Real-Time PCR, fasulye

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

SCREENING OF LEA-3 GENE mRNA EXPRESSION LEVELS USING WITH QUANTITATIVE REAL-TIME PCR IN DIFFERENT BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) SUBJECTED TO SALT AND DROUGHT STRESS

İLKER BÜYÜK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) is a edible grain legume species with the its greatest selectivity in terms of ecological conditions. Salt and drought are thought to be most important limiting factors in the cultivation of beans as well as in many plant species. To increase yield per unit area depends on identification and breeding of resistant species to different ecological conditions. For this reason, elucidation of plant defense mechanisms against environmental stress factors is a very important issue.

In this regard, we aimed to evaluate mRNA levels of LEA-3 gene and lipid peroxidation levels in 7 different bean species (Yunus-90, Akman-98, Şchirali-90, Karacaşehir-90, Eskişehir-855, Göynük-98, Önceler-98) subjected to NaCl and PEG stress conditions. Bean species which were grown in agricultural perlite for 15 days in a controlled environmental growth chamber were exposed to 3 and 27 hours of salt (NaCl) and drought (PEG) stress. Lipid peroxidation analysis (MDA), RNA isolation, cDNA synthesis and Real Time PCR analysis using Light Cycler Nano instrument were performed with root and leaf tissues which were sampled at 3 and 27 hours of stress conditions. All results showed that LEA-3 gene plays a key role in defence mechanism against both salt and drought stress. At the same time, usefulness of LEA-3 gene for detection of tolerance capability of bean species against to salt and drought stress conditions was discovered based on the results obtained by analysis. Results of gene expression and lipid peroxidation analysis showed that Göynük-98 and Yunus-90 species were more resistant to stress conditions than the others.

April 2014, 118 pages

Key Words: LEA-3, salt stress, PEG stress, MDA, qRT-PCR, bean

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan değerli danışmanım sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı), hem tez hem de tez dışı bilimsel çalışmalarımın her aşamasında yardımcı olan sayın Doç. Dr. Demet CANSARAN DUMAN ve sayın Dr. Semra SOYDAM AYDIN'a, çeşitli projeler kapsamında birlikte çalıştığım Ankara Üniversitesi Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarından çok değerli arkadaşlarıma ve çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek her anımda yanımda olan biricik eşim Burcu Pelin BÜYÜK'e en derin duygularla teşekkür ederim.

İlker BÜYÜK
Ankara, Nisan 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	2
1.1.1 Tarihçe	2
1.1.2 Sınıflandırılması	2
1.1.3 Ekonomik önemi, Dünya ve Türkiye’de üretimi.....	3
1.1.4 İklim ve toprak istekleri	5
1.2 Bitkilerde Stres	6
1.3 Kuraklık Stresi (Su stresi)	8
1.3.1 Bitkilerde kuraklık stresinin zararları.....	9
1.3.2 Kuraklığa karşı geliştirilen uyum mekanizmaları	9
1.4 Tuz stresi.....	10
1.4.1 Bitkilerde tuz stresinin zararları	10
1.4.2 Tuz stresine karşı geliştirilen uyum mekanizmaları.....	11
1.4.2.1 Na pompaları (dışa verme).....	11
1.4.2.2 Vakuollerde biriktirme	12
1.4.2.3 Hücre zarı geçirgenliği.....	12
1.5 Bitkilerin Stres Koşullarına Karşı Moleküler Cevap Mekanizmaları	12
1.5.1 Makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi	13
1.5.2 Reaktif oksijen türleri (ROT) ve detoksifikasyon	14
1.5.3 Koruyucu moleküllerin sentezi	15
1.5.3.1 LEA proteinleri	16
1.5.3.2 LEA proteinlerinin sınıflandırılması.....	17

1.5.3.2.1 Klasik sınıflandırılma	18
1.5.3.2.1.1 LEA-I proteinleri	18
1.5.3.2.1.2 LEA-II proteinleri.....	19
1.5.3.2.1.3 LEA-III proteinleri	19
1.5.3.2.1.4 LEA-IV proteinleri.....	20
1.5.3.2.1.5 LEA-V proteinleri	21
1.5.3.2.1.6 Atipik LEA proteinleri	21
1.5.3.2.2 POPP sınıflandırması	21
1.5.3.3 LEA proteinlerinin yapısı ve fizyolojik rolleri	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi	27
3.1.1 Yunus-90 (Kuru Fasulye)	27
3.1.2 Şehirali-90 (Kuru Fasulye)	27
3.1.3 Karacaşehir-90 (Kuru Fasulye)	28
3.1.4 Göynük-98 (Kuru Fasulye)	28
3.1.5 Akman-98 (Kuru Fasulye).....	29
3.1.6 Önceler-98 (Barbunya)	29
3.1.7 Eskişehir-855 (Kuru Fasulye)	30
3.2 Hoagland Besi Ortamının Hazırlanması.....	32
3.3 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması	33
3.3.1 100 mM tuz (NaCl) stresi.....	33
3.3.2 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi	34
3.4 Araştırma Basamakları İçin Çalışma Kodlarının Oluşturulması.....	35
3.5 Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi).....	38
3.6 Total RNA İzolasyonu	39
3.7 RNA Pürifikasyon (Saflaştırma) Yöntemi	40
3.8 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	41
3.9 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	42
3.10 Primer Dizaynı	44
3.11 Real-Time PCR Reaksiyonu	47
3.12 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz	49

4. BULGULAR	51
4.1 Fasulye Çeşitlerinde Stres Uygulamaları.....	51
4.2 Lipit Peroksidasyonu (Malondialdehit analizi) Sonuçları	59
4.3 RNA İzolasyonu.....	73
4.4 cDNA Sentezi	73
4.5 Real-Time PCR Uygulaması	79
4.6 RT-PCR Sonuçları, Sonuçların Normalizasyonu ve İstatistiksel Analizi	82
4.6.1 100 mM tuz stresiyle eş PEG stresi altındaki fasulye çeşitlerinde LEA-3 geni mRNA düzeyleri	91
4.6.2 100 mM NaCl stresi altındaki fasulye çeşitlerinde LEA-3 geni mRNA düzeyleri.....	93
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	116

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrad
A	Adenin
ACT	Aktin
APX	Askorbat peroksidaz
C	Sitozin
Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	Kalsiyum Nitrit
Ca ⁺²	Kalsiyum
CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Cl ⁻	Klor
CO ₂	Karbondioksit
CO ₃ ²⁻	Karbonat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır Sülfat
DEPC	Dietil pyrokarnonat
dH ₂ O	Distile su
EtOH	Etil Alkol
FeEDTA	Demir Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GR	Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₃ BO ₃	Borik Asit
ha	Ekilen alan
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HOCl	Hipokloröz asit
K	Potasyum
K ₂ SO ₄	Potasyum Sülfat
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Hidrojen Fosfat
L	Litre
LEA-3	Late Abundant Protein-3
M	Molar
MDA	Malondialdehit
Mg ⁺²	Magnezyum
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum Sülfat
mM	Milimolar
MnSO ₄	Mangan Sülfat
mRNA	Haberci RNA
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NH ₄ Mo	Amonyum Molibdat
NO ⁻	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
OH	Hidroksil
PEG	Polietilen Glikol
POD	Peroksidaz
PPO	Polifenol Oksidaz

qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
SO ₄	Sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
T	Timin
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Çinko Sülfat
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Dünyada kuru fasulye üretiminde ülkelerin sıralaması (Grafikte ilk 9 ülkeye yer verilmiştir, ülkemiz 20. sırada olduğu için grafikte bulunmamaktadır).....	3
Şekil 1.2 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)	7
Şekil 3.1 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına ait iklim ve geliştirme odasında (25 °C sıcaklık %70 nem) steril perlit içeren viyollere ekimi gerçekleştirilmiş 15 günlük fasulye çeşitleri	31
Şekil 3.2 Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ve standartları	35
Şekil 3.3 Yeni nesil Real-Time PCR cihazı, Light Cycler Nano (Roche)	47
Şekil 3.4 cDNA seri dilüsyonları	49
Şekil 4.1 Önceler-98 ve Göynük-98 çeşitlerinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	51
Şekil 4.2 Karacaşehir-90 ve Yunus-90 çeşitlerinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	52
Şekil 4.3 Şehirali-90 ve Akman-98 çeşitlerinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	53
Şekil 4.4 Eskişehir-855 çeşidinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	54
Şekil 4.5 Önceler-98 ve Eskişehir- çeşitlerinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	55
Şekil 4.6 Göynük-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	56
Şekil 4.7 Yunus-90 ve Şehirali-90 çeşitlerinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	57
Şekil 4.8 Akman-98 çeşidinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri	58
Şekil 4.9 Önceler-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	59
Şekil 4.10 Göynük-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	60
Şekil 4.11 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	61

Şekil 4.12 Yunus-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	62
Şekil 4.13 Şehirali-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	63
Şekil 4.14 Akman-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	64
Şekil 4.15 Eskişehir-855 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	65
Şekil 4.16 Önceler-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	66
Şekil 4.17 Göynük-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	67
Şekil 4.18 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	68
Şekil 4.19 Yunus-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	69
Şekil 4.20 Şehirali-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	70
Şekil 4.21 Akman-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	71
Şekil 4.22 Eskişehir-855 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri	72
Şekil 4.23 RNA izolasyonu örnek görüntüsü.....	73
Şekil 4.24 LEA-3 geni standart eğri grafiği oluşturmak üzere PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonları pik görüntüsü	80
Şekil 4.25 LEA-3 standart eğri grafiği	80
Şekil 4.26 ACT geni standart eğri grafiği oluşturmak üzere PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonları pik görüntüsü	81
Şekil 4.27 ACT standart eğri grafiği	81

Şekil 4.28 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin köklerindeki mRNA seviyeleri (Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir). Ayrıca her çeşide ait RT-PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.	92
Şekil 4.29 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA seviyeleri (Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir). Ayrıca her çeşide ait RT-PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.	93
Şekil 4.30 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat tuz (NaCl) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin köklerindeki mRNA seviyeleri (Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir). Ayrıca her çeşide ait RT-PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.	94
Şekil 4.31 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat tuz (NaCl) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA seviyeleri.	95
Şekil 5.1 Gerçek zamanlı PCR cevap eğrileri	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Fasulyenin sınıflandırılması.....	3
Çizelge 1.2 Sayısal olarak Türkiye'nin kuru fasulye üretiminde dünya sıralamasındaki yeri	4
Çizelge 1.3 TÜİK verilerine göre Türkiye'de kuru fasulye üretimi	4
Çizelge 1.4 Sayısal olarak coğrafi bölgelerin kuru fasulye üretiminde Türkiye sıralamasındaki yeri.....	5
Çizelge 3.1 Hoagland besi ortamı makro besin çözeltisi içeriği.....	32
Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamı mikro besin çözeltisi içeriği	32
Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamında bulunan iyonların son konsantrasyonları	33
Çizelge 3.4 Araştırma basamakları için oluşturulan çalışma kodları ve karşılıkları olan örnek adları.....	36
Çizelge 3.5 FA jel hazırlamada kullanılan bufferların içeriği.....	42
Çizelge 3.6 Total RNA - primer karışımı.....	42
Çizelge 3.7 Ters transkripsiyon (RT-PCR) reaksiyonu bileşenleri.....	43
Çizelge 3.8 Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program	43
Çizelge 3.9 Real-Time PCR primer dizileri.....	46
Çizelge 3.10 Çalışmada optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR Protokolü.....	48
Çizelge 3.11 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program.....	48
Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri	73
Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri.....	82
Çizelge 4.3 Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata, standart sapmaları ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları	89

1. GİRİŞ

40 takım içerisinde 640 cins ile bitkiler aleminde en geniş üçüncü aileyi oluşturan baklagiller (Fabaceae), Dünya’da 60 milyon ton üretim ve 40 milyar dolarlık piyasa değerine sahip bir ürün grubudur (Anonim 2011). Tahıldan sonra tarımsal üretimi en fazla yapılan; mercimek, fasulye, nohut, bezelye, bakla ve börülceyi içine alan baklagiller, dünyada iki milyardan fazla insan için protein kaynağı oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalara göre insan beslenmesinde ihtiyaç olan bitkisel proteinlerin %22’si ve karbonhidratların %7’si, hayvan beslenmesindeki proteinlerin %38’i ve karbonhidratların da %5’i yemeklik tane baklagillerden sağlanmaktadır (Wery ve Grinac 1983, Gepts vd. 2005).

Yıllar itibariyle dünya baklagil üretiminde ciddi artışlar yaşanmıştır. 2000’li yılların başında dünyada 55 milyon ton bakliyat üretilirken günümüzde bu rakamın 60 milyon tonlara ulaştığı görülmektedir. Ülkemizde de bitkisel ürünler üretiminde baklagiller büyük önem taşımaktadır. Özellikle 1980’li yıllardan itibaren yemeklik tane baklagiller üretimine büyük ağırlık verilmiş ve üretimi arttırıcı çeşitli projeler sayesinde bakliyat üretimimiz önemli ölçüde artış göstermiştir. Günümüzde ise bakliyat üretiminde dünyada ilk 10 arasında yer alan Türkiye’de, günden güne ekim alanlarının daraldığı ve üretimin düştüğü gözlenmektedir. Bu düşüşte biyotik ve abiyotik kaynaklı stres etmenlerinin büyük rolü bulunmaktadır. Üretim düşüşüne bağlı olarak her yıl daha fazla kuru fasulye, nohut ve daha fazla mercimeğin ithal edildiği rapor edilmiştir (Özdem 2012).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının amacı, 7 farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşidinin günden güne ekim alanlarının daralması ve üretimin düşmesine sebep olan tuz ve kuraklık streslerine karşı performanslarını *in vitro* koşullarda belirlemek ve stres altında çeşitlerde ortaya çıkacak değişimleri biyokimyasal ve moleküler yaklaşımlarla araştırmaktır. Böylece ülkemizde ticari olarak değerli olan ve çalışmada kullanılan kuru fasulye çeşitlerinin dayanıklılık potansiyellerinin karşılaştırılması hedeflenmektedir. Bu kapsamda bitkilerde tuz ve kuraklık stresine karşı savunmada rolü olduğu düşünülen LEA-3 geninin Real-Time PCR aracılığıyla mRNA düzeyindeki ifade seviyesi

araştırılmıştır. Stresin erken ve geç saatlerinde kök ve yaprak dokularındaki ifadelere bakılarak LEA-3 geninin stres savunmasındaki rolüne açıklık getirilmeye çalışılmıştır. Bitkilerdeki stres oluşumunu göstermek amacıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden biri olan malondialdehit (MDA) analizi yapılmıştır. Kuru fasulye gibi önemli bir tarım bitkisinde *LEA* genleri ile ilgili böyle bir çalışma daha önce yapılmamış olup, ülkemizde kuru fasulye çeşitlerinin stres koşullarına göstermiş olduğu tepkinin genetik mekanizması henüz açıklığa kavuşmamıştır.

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.1.1 Tarihçe

Kökeni bazı araştırmacılar tarafından Hindistan, Avustralya veya Afrika olarak bildirilmesine rağmen fasulyenin anavatanının Güney Amerika olduğu kabul edilmektedir. Fasulye tarımının Meksika’da çok eski yıllardan beri yapıldığı bilinmekte ve Amerika kıtasının keşfinden sonra İspanyollar tarafından Avrupa’ya ve buradanda Asya’ya geçtiği düşünülmektedir. Ülkemizde en az 250 yıldan beri yenildiği tahmin edilmektedir ve en fazla üretimi yapılan sebze türlerinden birisidir (Kütevin ve Türkeş 1987, Özdem 2012).

1.1.2 Sınıflandırılması

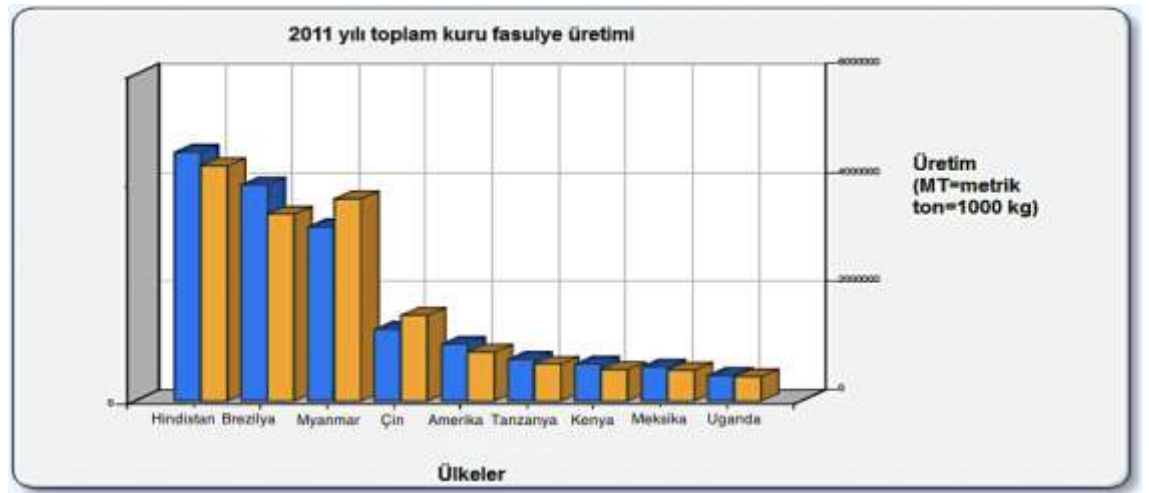
Fasulye *Fabaceae* (Baklagiller) familyasının Papilionoideae alt familyasından Phaseolea oymağının Phaseolus cinsine bağlı bir türdür. Başlıca türleri *Phaseolus acutifolius* A. Gray, *P. coccineus* L., *P. lunatus* L. ve *P. vulgaris* L. olup sistematik sınıflandırılması çizelge 1.1’de sunulmuştur (Freytag ve Debouck 2002).

Çizelge 1.1 Fasulyenin sınıflandırılması

Domain:	Eukarya (Ökaryotikler)
Alem:	Plantae
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Magnoliopsida
Takım:	Fabales
Aile:	Fabaceae (Baklagiller)
Cins:	<i>Phaseolus</i> L.
Tür:	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

1.1.3 Ekonomik önemi, Dünya ve Türkiye’de üretimi

Fasulye dünyada ekim alanı ve üretimi yönünden yemeklik tane baklagiller arasında ilk sırada yer almaktadır. 2012 yılı FAO verilerine göre dünyada kuru fasulye ekim alanları 28.780.377 ha ve üretimi 23.140.276 ton dolaylarındadır. En geniş ekim alanı ve üretim Asya kıtasında iken en yüksek tane verimi Amerika kıtasından elde edilmektedir. FAO kaynaklarına göre ekim alanı ve üretim bakımından Hindistan ilk sırada yer alırken Brezilya, Meksika, Myanmar, Çin ve ABD dünyadaki diğer önemli kuru fasulye üreticisi ülkelerdir. Ancak ülkemiz kuru fasulye üretimi ve ihracatı bakımından dünyada önemli ülkeler arasında bulunmamaktadır (Şekil 1.1, Çizelge 1.2; Anonymous 2011). Dolayısıyla kuru fasulye üretimini arttırmaya yönelik gerçekleştirilen ve gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalar büyük önem taşımaktadır.



Şekil 1.1 Dünyada kuru fasulye üretiminde ülkelerin sıralaması (Grafikte ilk 9 ülkeye yer verilmiştir, ülkemiz 20. sırada olduğu için grafikte bulunmamaktadır)

Çizelge 1.2 Sayısal olarak Türkiye'nin kuru fasulye üretiminde dünya sıralamasındaki yeri

Sıra	Ülke	Üretim (Ton)	Sıra	Ülke	Üretim (Ton)
1	Hindistan	4.330.000	11	Endonezya	341.097
2	Brezilya	3.435.366	12	Etiyopya	340.280
3	Myanmar	3.721.949	13	Rwanda	331.166
4	Çin	1.572.000	14	Arjantin	332.782
5	USA	899.610	15	Angola	303.521
6	Tanzanya	675.948	16	İran	246.056
7	Kenya	577.674	17	Nicaragua	234.163
8	Meksika	567.779	18	Korea	224.000
9	Uganda	447.430	19	Vietnam	216.797
10	Kamerun	366.463	20	Türkiye	200.763

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK 2012) verilerine göre ülkemizde kuru fasulye 200.000 ton üretim ve 93.090 ha ekim alanıyla baklagiller arasında nohut ve mercimekten sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Çizelge 1.3, Anonim 2012).

Çizelge 1.3 TÜİK verilerine göre Türkiye'de kuru fasulye üretimi

Yıl	Üretim (ton)	Ekilen alan (ha)
2008	154.630	97.8484
2009	181.205	94.7509
2010	212.758	103.281
2011	200.763	94.498
2012	200.000	93.090

Kuru fasulye ekim alanları ve üretimi bakımından ülkemizde Batı Anadolu birinci, Orta Anadolu ikinci ve Akdeniz üçüncü sırada bulunmaktadır (Çizelge 1.4, Anonim 2012).

Çizelge 1.4 Sayısal olarak coğrafi bölgelerin kuru fasulye üretiminde Türkiye sıralamasındaki yeri

Sıra	Bölge	Üretim (Ton)	Ekilen alan (ha)
1	Batı Anadolu	96.772	29.625
2	Orta Anadolu	31.911	14.844
3	Akdeniz	14.981	9.550
4	Kuzeydoğu Anadolu	12.278	7.237
5	Batı Karadeniz	9.839	9.133
6	Ege	8.232	6.508
7	Batı Marmara	7.487	4.353
8	Doğu Karadeniz	5.689	4.355
9	Doğu Marmara	4.332	2.558
10	Güneydoğu Anadolu	876	0.358

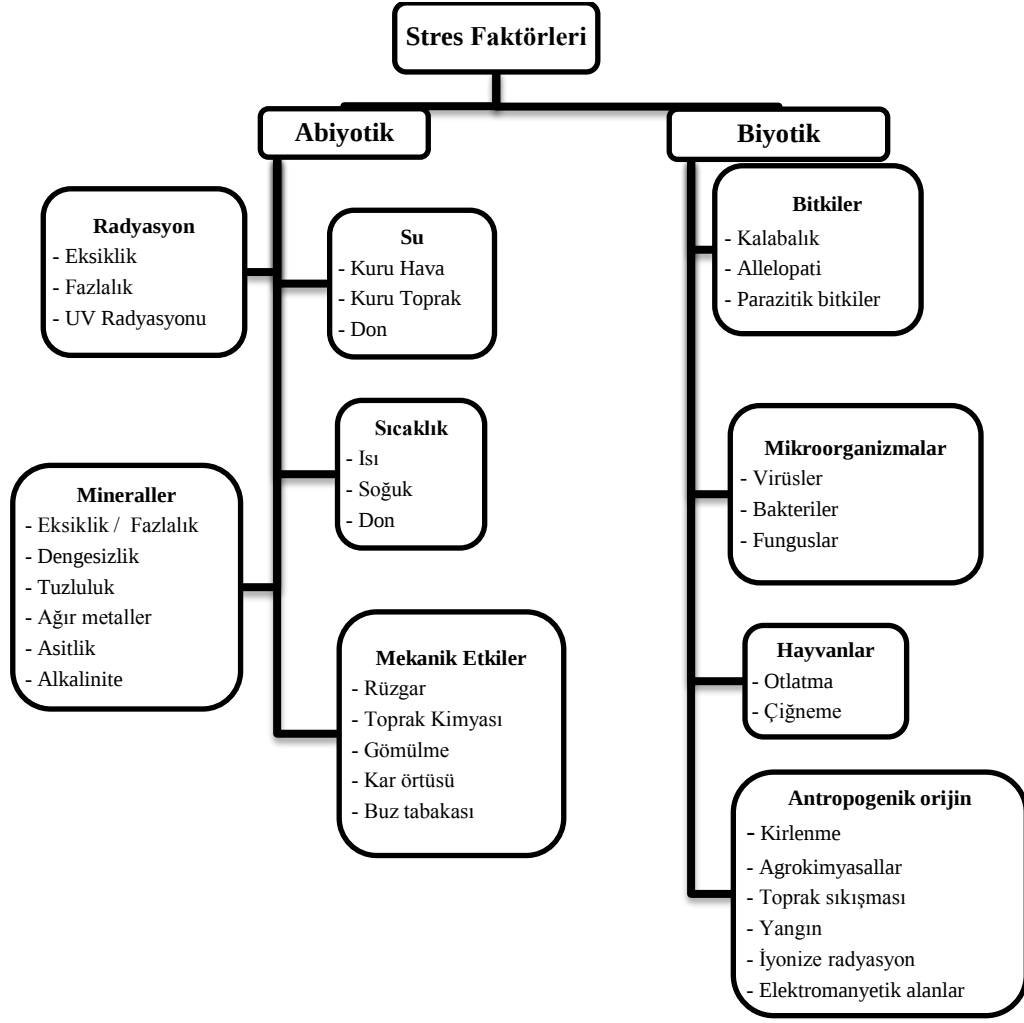
1.1.4 İklim ve toprak istekleri

Fasulye Türkiye’de bütün coğrafi bölgelerde yetiştirilebilen bir sıcak iklim bitkisidir. Tohumlarının çimlenmesi için gerekli olan en ideal sıcaklık aralığı 15-20 °C’dir. Fasulye tohumlarının çimlenmesi 15 °C nin altında yavaşlamakta, 10 °C nin altında ve 35 °C’nin üstünde ise çimlenme çok az veya hiç olmamaktadır. İdeal nem ve sıcaklığın sağlanması durumunda ekimi takiben 7-10 gün sonra çıkış gerçekleşir. Sıcaklıkların daha düşük olması durumunda ise çıkış süresi 20-25 günü bulabilir. 70-140 gün arasında olan vejetasyon süresi, bitkinin sarılcı ve bodur olması, erkenci veya geçici olması yanında bölgenin ekolojik koşullarına göre de değişiklik göstermektedir. Çiçeklenme süresi bodur çeşitlerde 10-15 gün, yan sarılcılarda 20-25 gün ve sarılcı çeşitlerde 30 gün üzerindedir. Toprak neminin yeterli olmaması durumunda çiçeklenme süresi kısalmış ve çiçeklenme azalmıştır. Çiçeklenme için optimum sıcaklık 20-25 °C’dir. 30 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda çiçekler dökülmekte ve verim oldukça düşmektedir. 10 °C’nin altındaki sıcaklıklar tane oluşumunu engellemektedir. Ph 7-8 olan tuzluluk ve alkali sorunu olmayan verimli topraklarda iyi yetişen fasulyenin çinko elementi isteği çok yüksektir (Kütevin ve Türkeş 1987, Freytag ve Debouck 2002, Özdem 2012).

1.2 Bitkilerde Stres

Canlılar doğaları gereği sürekli dış çevre ile ilişki halindedirler ve çevrede uygunsuz koşullar oluşması durumunda adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalırlar. Çevre şartlarının bir bitkinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde bitkide meydana gelen durum **stres** olarak ifade edilir. Bir başka ifade ile bitkiler üzerinde olumsuz etkileri olan dış etmenler stres olarak tanımlanır. Stres, bitkinin canlı kalabilmesi, ürün verebilmesi, biyokütle birikimi ve özümleme ile ilişki kurarak açıklanması gereken bir kavramdır (Büyük vd. 2012).

Bitkilerin yaşamları sürecinde birçok kez karşılaştıkları stres faktörleri biyotik ve fizikokimyasal olmak üzere iki grupta incelenebilir (Şekil 1.2; Levitt 1972). Biyotik stres faktörleri; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan stres faktörleridir. Abiyotik stres faktörleriye su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleridir (Lichtenhaler 1996, Büyük vd. 2012).



Şekil 1.2 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)

Bitkiler sesil doğaları gereği stres etmeninden uzaklaşarak kaçınma gibi bir yeteneğe sahip olmadıklarından, hayvanlardan farklı olarak strese doğrudan maruz kalırlar. Strese doğrudan maruz kalmaları sonucunda büyüme ve gelişmeleri olumsuz etkilenirken bu durum bitki organlarının yitirilmesine neden olmaktadır. Boyer stres faktörlerinin ekin üretiminin %70 kadarını etkileyebileceğini öne sürerken; 2007 yılındaki Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) raporuna göre dünyadaki karasal alanın sadece %3,5'i herhangi bir çevresel tehditten etkilenmemektedir (Boyer 1982, Veldhuizen vd. 2007).

Stres etmenlerinin yol açtığı zarar; bitkinin türüne, tolerans ve adaptasyon yeteneğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kadıoğlu 2004, Rao vd. 2005). Bitkilerin yaşamları süresince doğada birçok stres faktörü ile karşılaştıkları düşünüldüğünde stresle ilişkili mekanizmaların aydınlatılması, toleranslı tür ve çeşitlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

1.3 Kuraklık Stresi (Su stresi)

Kuraklık stresi bitkilerde üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres etmenlerinden birisi olup tarımsal ve ekolojik sistemler üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Reddy vd. 2004, Jaleel vd. 2007).

Bitkileri strese sokan en önemli etmen toprak su potansiyelindeki düşüştür. Çünkü terleme ile yitirilen su ancak toprakta yeterli miktarda su varsa telafi edilebilir. Toprakta yeterli düzeyde su bulunmaz, tolerans mekanizmaları çalışmaz ve su kaybı gerçekleşir ise bitki su stresine maruz kalır. Kaybedilen suyun alınan sudan fazla olması durumunda iletim boruları içerisinde negatif basınç oluşur ve bitki organları arasında suyun alınması yönünde rekabet meydana gelir. Topraktaki su çok azaldığında, toprak kolloidlerince daha fazla çekilmesi sebebiyle, köklerin emme kuvveti kolloidlerin emme kuvvetini yenemez ve su alımı gerçekleşmez. Böylece kök ve yapraklarda solma gerçekleşmiş olur (Kocaçalışkan 2003). Bu durum turgor basıncıyla ilgilidir. Turgor basıncının hücrede daima pozitif yönde olması gerekmekte, düşmesi durumunda ise bitkide solma meydana gelmektedir (Reddy vd. 2004, Jaleel vd. 2007).

Smirnoff ve Cumbes (1989) kuraklığı genel olarak su noksanlığı ve kuruma olarak iki tipe ayırmaktadır. Bu ayrıma göre su noksanlığı stomaların kapanışına ve gaz değişiminde kısıtlamaya yol açan orta düzeydeki su kaybı iken; kuruma reaksiyonların katalizlenmesini durdurabilecek potansiyeldeki aşırı su kaybı olarak tanımlanabilir. Kuraklık stresi bitkilerde büyüme ve verim, hücre içi yapılar, fotosentez ve azot metabolizması üzerine olumsuz etkilerde bulunarak bitki metabolizmasını bozmaktadır (Kocaçalışkan 2003).

Su stresi, toprakta bitkiye yarayışlı su miktarının azalması, atmosferik koşulların etkisiyle transpirasyon ve evaporasyon sonucu su yitmesinin sürmesi durumunda ortaya çıkmaktadır. Stres günlük ya da uzun süreli olabilir. Su stresinin uzun sürmesi ve yeterince su alımının gerçekleşmemesi bitkilerde ölüme yol açabilir (Kacar vd. 2002).

1.3.1 Bitkilerde kuraklık stresinin zararları

Kuraklık stresinin mekanik etkisi belirgin su kaybı gerçekleşmesi durumunda bitkide turgor kaybıyla kendini göstermektedir (Levitt 1980). Su kaybına bağlı hücre özsuyu konsantrasyonunun artmasıyla protoplazmada artan bir dehidrasyon meydana gelir. Hücrede ozmotik su kaybıyla birlikte protoplast hücre çeperinden ayrılır ve stres altındaki plazma membranında gerçekleşen çökme yırtılmalara, zarlar üzerindeki hidrolitik enzimlerin serbest kalmasına ve sitoplazmanın otolizine sebep olur. Bu zarar hücresel metabolizmayı geri dönüşüz olarak bozar ve neticede bitkide büyüme yavaşlar (Özcan vd. 2004, Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Aşırı su kaybı sonucunda bitkide hücresel metabolizmanın bozulmasıyla gerçekleşen iyon birikimi, membranın yapısal bütünlüğünün ve protein yapılarının bozulmasına neden olur ve hücreye zarar verebilir (Bray 1993, Özcan vd. 2004, Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Hücre büyümesindeki gerileme yaprakların küçülmesine, bununla birlikte de fotosentez ürünlerinin daha da azalmasına yol açar (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). Su stresi bitkilerde enzim aktivitesi ve enzim miktarı üzerine de önemli bir etki yapar (Walton 1980, Salisbury ve Marinos 1985, Plaut 1995). Ayrıca kuraklık stresi bitki hücrelerinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) birikmesine ve oksidatif stres oluşumuna yol açmaktadır.

1.3.2 Kuraklığa karşı geliştirilen uyum mekanizmaları

Bitkiler kurak koşullarda hayatta kalabilmek için stresten kaçınma ve stres toleransı olmak üzere iki ana savunma mekanizmasına sahiptirler (Levitt 1980, Laffray ve Louguet 1990, Cruz de Carvalho vd. 1998). Streten kaçınma eğilimindeki bitkiler

sadece orta şiddetteki kuraklık koşullarında hayatta kalabilirken strese toleranslı bitki grupları ise savunma mekanizmalarını çalıştırarak çok daha şiddetli stres koşullarında yaşamlarını sürdürebilirler.

Bitkiler bünyelerindeki uygun su içeriğini koruyabilmek amacıyla bitkinin morfolojisine de yansıyan birtakım önlemler almaktadırlar. Bu önlemler topraktan su alınımı, transpirasyon yüzeyinin azalması, yüksek bir su iletim kapasitesi veya suyun depolanması gibi fonksiyonel önlemlerdir (Çırak ve Esenal 2006).

1.4 Tuz Stresi

Tuzluluk özellikle kurak veya yarı kurak bölgelerde ortaya çıkan ve üretimi sınırlandıran en önemli çevresel sorunlardan biridir (Ashraf 1999). Genel olarak saturasyon ekstraktında 4 mmhos.cm⁻¹'den fazla tuz içeren topraklar tuzlu topraklar olarak tanımlanmaktadır (Karanlık 2001). Yağışlı bölgelerde toprak yıkandığından tuzlar yer altı sularına karışır ve bu sayede tuzlulaşma (salinizasyon) yağışlı bölgelerde oluşmaz. Özellikle ülkemizde kurak ve yarı kurak alanlarda drenajın iyi olmadığı topraklarda sulama sularından gelen tuzlar zamanla toprakların tuzlu hale gelmesine neden olabilir (Uygan vd. 2006). Ayrıca bazı bölgelerde evaporasyonun yüksek oluşu nedeniyle sular beraberinde taşıdıkları tuzları toprak yüzeyinde bırakırlar. Bu durum bölgede tuzlulaşmaya sebep olur ve tuzun varlığı topraktaki su tutma kapasitesini düşürür (Shannon ve Grieve 1999). Tuzlu topraklarda genellikle Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ ve K⁺ katyonları ile Cl⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻ ve CO₃²⁻ anyonları bulunmaktadır (Kacar vd. 2002).

1.4.1 Bitkilerde tuz stresinin zararları

Tuz stresine karşı dayanıklılıklarına göre bitkiler halofitler (tuzcul bitkiler) ve glikofitler (yüksek tuz yoğunluklarından zarar gören bitkiler) olmak üzere 2 grupta toplanmaktadırlar. Deniz Börülcesi (*Salicornia herbacea* L.) ve Kara Pazı (*Atriplex vesicaria* Heward ex Benth.) halofit olan ve yüksek tuz koşulları altına yaşayabilme yeteneğine sahip bitkilerdir. Ayıkulağı (*Aster tripolium* L.) ve Sinirotu (*Plantago*

lanceolata L.) ise düşük tuz seviyelerinde normal gelişimlerini sürdürebilen bitkiler arasındadır. Yüksek bitkilerin ise tamamı glikofitler grubunda yer almaktadır ve stres koşulları altında ozmotik regülasyon gerçekleştirememektedir (Levitt 1980, Ellialtıoğlu ve Tıprıdamaz 1998, Yaşar 2003, Ashraf 2004, Kuşvuran 2004).

Tuz stresi genel olarak bitkilerde büyümede yavaşlama, bitki yaş ve kuru ağırlıklarında azalma, klorofil miktarında azalma, meyve kalitesinde bozulma ve verimde düşüş şeklinde kendisini göstermektedir (Shannon ve Grieve 1999, Ashraf 2004). Yüksek tuz konsantrasyonlarının bitki hücresinde meydana getirdiği olumsuzluklar üç başlık altında toplanabilir. Bu olumsuzluklar su stresi, iyon toksisitesinin hücrede meydana getirdiği zararlar ve Na ve Cl birikimi sonucunda Ca ve K iyonlarının hücre içerisindeki dengesinin bozulması şeklindedir. Ayrıca topraktaki tuz seviyesinde düşüşle birlikte suyun ozmotik potansiyelinin düşmesi sonucu bitkilerde fizyolojik olarak kuraklık stresinde oluşmaktadır (Levitt 1980).

Bitkiler tuz stresine maruz kaldıklarında transpirasyonu azaltarak su kaybını önlemek için stomalarını kapatır ve yaprak alanlarını küçültürler. Ancak bu durum sonucunda fotosentez azalmakta ve bitkide büyüme ve gelişme gerilemektedir (Karanlık 2001, Yaşar 2003).

1.4.2 Tuz stresine karşı geliştirilen uyum mekanizmaları

Abiyotik stres faktörlerinden olan tuz stresine karşı bitkiler çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptirler ve genel olarak dört farklı mekanizma ile tepki vermektedirler.

1.4.2.1 Na pompaları (dışa verme)

Bazı bitkiler kendileri için stres oluşturabilecek düzeyde tuzlulukla karşılaştıklarında kök hücrelerindeki Na pompaları ile tolere edilemeyecek miktardaki Na'ı ortama geri

vermektedir ve bu sayede hücre içi Na seviyesini dengede tutmaktadır (Schubert ve Lauchli 1990).

1.4.2.2 Vakuollerde biriktirme

Na iyonlarının vakuollerde biriktirilmesiyle bitkiye zarar vermesinin önlendiği ve tuz toksisitesinden korunulduğu bildirilmiştir (Munns 2002).

1.4.2.3 Hücre zarı geçirgenliği

Tuza toleranslı olan bitkiler tuz stresinden kaçınmak için Na ve K iyonlarının geçişlerinin engelleyerek tuzları ya hiç içeriye almamakta yada enerji kullanarak dışarıya pompalamaktadır.

Bitkilerin tuzdan kaçınmak için kullandıkları bir diğer mekanizma ise hızlı büyüme yoluna giderek alınan tuzun seyreltilmesidir. Bu sayede tuz miktarı tolere edilebilir düzeylerde kalmaktadır (Tal 1983).

Strese maruz kalan bitkilerde ozmotik dengenin sağlanması için sitoplazma ve organellerinde çeşitli çözünebilir maddeler biriktirilmekte ve bu maddeler enzimler ve membran bütünlüğü üzerinde pozitif etki sağlamaktadır. Birçok araştırmacı tarafından prolin gibi organik maddelerin stres toleransı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Asraf ve Foolad 2007).

1.5 Bitkilerin Stres Koşullarına Karşı Moleküler Cevap Mekanizmaları

Halofitler (tuzcul), kserofitler (kurakçıl) veya jipsikol (alçıtaşlı topraklarda yetişenler) gibi bazı bitkiler stres koşullarına doğal olarak uyum sağlayabilmektedirler ve bu sayede özelleşmiş bitkiler canlılığını sürdürebilmekte ve bulundukları ortamda yaşam döngülerini tamamlayabilmektedirler. Strese dayanıklılıkları dolayısıyla bu gibi bitki türlerinde ve stres toleransı düşük *Arabidopsis thaliana* (model organizma) gibi bitkiler kullanılarak bitkilerde strese karşı verilen fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler

cevaplar aydınlatılmaya çalışılmıştır (Boscaui vd. 2008). Elde edilen veriler ışığında bitkilerde strese karşı gelişen moleküler cevap mekanizmaları makromoleküllerin ve iyonların homeostasisi, Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumu ve detoksifikasyon ve koruyucu moleküllerin sentezi olmak üzere üç grupta toplanabilir.

1.5.1 Makromoleküllerin ve iyonların homeostazisi

Abiyotik çevresel faktörlerin çoğu (tuzluluk, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklıklar gibi) bir ozmotik bileşen içermekte, hücrel dehidrasyona yol açmakta ve iç dengeyi (homeostazi) bozmaktadır.

Bitkilerde tuz stresi esnasında, membranlar arası potasyum (K^+) ve sodyum (Na^+) iyon dengesinin sağlanması oldukça önemlidir. Bu yüzden iyon taşınımının düzenlenmesi gerekmektedir. Tuzluluk ile beraberinde gelen Na^+ stresi bitkilerde kök hücreleri tarafından K^+ alımını engeller. Aynı zamanda Na^+ 'un hücreye giriş yaparak aşırı seviyede birikmesiyle birlikte toksik etki gösterdiği bilinmektedir (Hasegawa vd. 2000, Wang vd. 2002). Büyümede meydana gelen azalışı veya hücre ölümlerini engellemek amacıyla bitkiler aşırı Na^+ iyonunu uzaklaştırmalı ya da vakuolde bölümlere ayırmalıdır. Hayvanların aksine, bitki hücrelerinde Na-ATPaz veya Na/K-ATPaz olmadığı için tüm iyon ve metabolitlerin taşınımı H-ATPazlar ve H-pyrofosfatazlar ile gerçekleştirilir. Stres koşulları altında bitkilerde birtakım düzenlemeler dahilinde H-ATPazlar ve H-pyrofosfatazlar aracılığı ile iyonların iletimine bağlı olarak homeostaz sağlanır (Hasegawa vd. 2000).

Görüldüğü üzere bitkilerin dehidrasyona karşı olan temel cevap mekanizması su iletimi ve iyon dengesinin kontrolü ile su geçişinde rol oynayan hidrofilik transmembran kanallar olan aquaporinlerin ve iyon taşıma sistemlerinin aktivasyonunu/inaktivasyonunu kapsamaktadır (Zhu 2000, Munns 2002, Wang vd. 2002, Vinocur ve Altman 2005).

1.5.2 Reaktif oksijen türleri (ROT) ve detoksifikasyon

ROT'lar bitkilerde endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşan en yoğun serbest radikallerdir (Van Camp vd. 1998, Van Breusegem ve Dat 2006). Serbest radikaller, radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden dolayı organizmada indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar (Halliwell ve Gutteridge 1998, Flora 2007). Bitkinin normal gelişim sürecince de sentezlenirler ancak detoksifikasyon mekanizması ile aralarındaki denge sayesinde zararlı etki oluşturmazlar. Hücrelerde bilinen başlıca ROT'lar singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) olup normal koşullarda hücredeki düzeyleri sürekli denge halindedir (Halliwell ve Gutteridge 1998).

Bitkilerde stresin öncelikli etkilerinden biri olarak gösterilen lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) analizleriyle stresin öncelikli hedefi olan membranlardaki etkileri yansıtılmaktadır (Hodges vd. 1999). Günümüze dek gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda stresle birlikte *Lycopersicon esculentum* Mill.'de (domates) (Krupa ve Baszynski 1989, Malik vd. 1992, Quariti vd. 1997, Ben Ammar vd. 2005, *Triticum aestivum* L.'da (buğday) (Vassilev 2004), *Hordeum vulgare* L.'de (arpa) (Gaur ve Grupa 1994), *Brassica nigra* (L.) K. Koch'da (hardal) (Nouairi vd. 2006) ve daha birçok bitkide MDA düzeyinin yani lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir.

ROT'lar oluşturdukları membran hasarlarının yanı sıra DNA, protein ve lipitlerle olan etkileşimi ve bu yolla hücrelerde meydana getirdikleri hasar bakımından farklılık göstermektedir.

Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için ROT'un kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidanlara sahiptir. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlar da oksidasyon yapabilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu azaltan (elektron aktarımıyla) veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir (Smirnoff 2005).

Antioksidanlar, enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Enzimatik olmayanlar, askorbik asit (AsA), tokoferoller (E-vitami), karetenoidler, glutatyon ve fenolik bileşikler, enzimatik antioksidanlar ise süperoksid dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar hücredeki lokalizasyonlarına ve rollerine göre farklılık göstermektedir.

1.5.3 Koruyucu moleküllerin sentezi

Bitkilerde strese karşı verilen cevaplardan bir diğeri ise düşük moleküler ağırlıklı çözünen maddeler veya ozmolitler (şekerler, polioller, prolin gibi aminoasitler), ısı şoku proteinleri (Heatshock proteins) ve LEA proteinleri (Geç Embriyogenez Bağımlı proteinler=Late Embryogenesis Abundant proteins) gibi farklı özel proteinlere dayanmaktadır.

Koruyucu moleküllerden olan ozmolitler stres tarafından oluşturulan ROT'un temizlenmesinde görev yapan proteinlerdir. Ozmotik ayarlayıcı ve ozmoprotektan olarak rol oynarlar. Sitoplazmada suyun alıkonmasını sağlar ve sodyumun apoplast ve vakuollerde tutulmasını kolaylaştırarak hücresel yapıları korumaktadırlar (Smirnoff ve Cumbes 1989).

Isı şoku proteinleri; protein katlanması, hücresel düzenlenmesi ve uygun olmayan proteinlerin hücrede birikiminin önlenmesi gibi birçok konuda işlevsel olmalarının yanı sıra farklı stres koşullarında da sentezlendiği bilinen moleküler şaperon gibi

davranan yani proteinlerin katlanarak üç boyutlu hale gelmesi işleminde yer alan proteinlerdir (Henle vd. 1999). Hasarlanmış ve yanlış katlanmış polipeptitleri bağlama potansiyeline sahip olan ısı şoku proteinleri bu sayede bu polipeptitlerin yıkımını önleyerek potansiyel olarak hücreyi strese karşı korumada rol oynarlar (Chiba vd. 2006).

Yapılmış olan çalışmalarda tuzluluk stresi altındaki birçok bitkide toksik etkisi olmayan ancak koruyucu role sahip ozmotin olarak adlandırılan katyonik proteinlerin biriktiği gözlenmiştir. Toplam hücresel proteinin yaklaşık olarak %12'sini oluşturan bu proteinler PR-5 (Patojen ilişkili grup 5 = Pathogenesis related group 5) protein ailesine ait 24kDa'luk stres ilişkili koruyucu proteinler olarak bilinmektedir. Ozmotin sentezinin absisik asit tarafından kontrol edildiği ve osmotoleransı sağladığı gösterilmiştir (Singh vd. 1985, Husaini ve Abdin 2008).

İlk olarak tohum embriyolarında tanımlanmış LEA proteinlerinin de bitkilerde stres savunmasında koruyucu etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Holmberg ve Bulow 1998). Stres altında LEA genleri tarafından ifade edilen hidrofilik LEA proteinleri suyu bağlama kapasiteleri dolayısıyla su eksikliği etkilerini azaltmada ve hücresel bütünlüğün korunmasında etkin rol oynamaktadır (Sairam ve Tyagi 2004).

1.5.3.1 LEA proteinleri

LEA proteinleri kuruma (desiccation) toleransı ile ilgili olduğu düşünülen proteinlerdir. Geç embriyogenez esnasında daha fazla görüldükleri için 'Late embriyogenesis abundant' olarak adlandırılmaktadırlar ve ilk olarak buğday (*Triticum aestivum*) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) embriyolarında tanımlanmışlardır (Dure vd. 1981, Galau vd. 1986). Günümüze dek damarlıdan damarsıza kadar birçok bitkide yüzlerce LEA proteini izole edilmiştir (Dure vd. 1989, Honjoh vd. 1995, Close 1996, Cuming 1999). Şaşırtıcı biçimde, LEA genlerinin ilk olarak gelişen tohumlarda tanımlanmasına rağmen, birçok LEA benzeri genin sadece ABA veya diğer çevresel streslere bağlı olarak indüklendiği görülmektedir (Bray 1993, Cuming 1999, Ingram ve Bartels 1996, Wang vd. 2007). Ayrıca mikropalarda (Mueller vd. 1992, Volker vd. 1994), mantarlarda

(Eichinger vd. 2005, Abba vd. 2006), protozoalarda (Katinka vd. 2001), nematotlarda (Browne vd. 2004, Gal vd. 2004), böceklerde (Kikawada vd. 2006) ve kabuklularda (Hand vd. 2007, Wang vd. 2007) tanımlanmış çeşitli LEA genleride bulunmaktadır.

Bütün bu hayvansal LEA benzeri genler dehidre veya anhidrobiyoz sporlarda, embriyo/fetus/larvalarda veya somatik dokularda ve sadece stres koşulları altında ifade olmaktadır. Bu yüzden kuruma toleransı ile ilgili olabilecekleri öne sürülmektedir. LEA proteinlerinin tanımlanmasına dayalı ilk çalışmalar, kuruma toleransının kazanımındaki koruyucu rolleri üzerine yoğunlaşmıştır. LEA proteinlerinin fizyolojik karakterleri onların davranış şekilleri hakkında bazı ipuçları vermektedir. Genel olarak, LEA proteinlerinin çoğunlukla yüklü ve yüksüz polar aminoasit rezidüleri içeren birincil yapıları, LEA proteinlerinin kararlı bir biçimde hidrofilik olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, LEA proteinlerinin su veya tuz bağlama kapasitesi oluşturduğu ve subelular matriks ile ilişki sağladığı ileri sürülmektedir (Dure vd. 1989, Dure 1993, Close 1996). Transgenik/transformatasyon çalışmaları da LEA proteinlerinin kurumayı önleyici fonksiyonlarına ilişkin doğrudan kanıt oluşturmaktadır (Kazuoka ve Oeda 1994, Imai vd. 1996, Xu vd. 1996, Nylander vd. 2001) LEA proteinlerinin fonksiyonlarının yaklaşık 20 yıldır bilinmesine rağmen detaylı fonksiyonları hakkında halen çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

1.5.3.2 LEA proteinlerinin sınıflandırılması

Transkriptler üzerindeki ilk analizler, LEA genlerinin embriyogenez esnasındaki geçici ifade desenlerine göre, LEA ve LEA-A altgrupları şeklinde 2 farklı sınıf içerdiğini göstermiştir. Bu sınıflandırmadaki LEA-A genleri LEA'ya göre tohum gelişiminin biraz daha erken evresinde ifade olmaktadır (Galau vd. 1986, Hughes ve Galau 1989, 1991). Sonrasında gerçekleştirilen daha genel bir sınıflandırmada ise, LEA proteininin varsayılan yapısal domainleri veya kimyasal karakteristikleri dikkate alınmıştır. Günümüzde klasik değerlendirme ve POPP sınıflandırması olmak üzere iki değerlendirme ölçütü kullanılmaktadır. Klasik değerlendirme ölçütü ilk olarak Dure vd. (1989) tarafından öne sürülmüştür ve bu değerlendirmeye göre aminoasit dizisi ve korunmuş motiflere dayalı olarak, LEA proteinleri 6 altsınıfa ayrılmaktadır (Dure vd.

1989, Bray 1993, Cuming 1999, Bies-Etheve vd. 2008). İkinci değerlendirme ölçütü ise peptit kompozisyonlarına bağlı olarak proteinleri sınıflandıran bir bilgisayar analizine, “Protein or Oligonucleotide Probability Profile, POPP”, dayalı olarak ortaya çıkmıştır (Wise 2002, 2003).

1.5.3.2.1 Klasik sınıflandırılma

1.5.3.2.1.1 LEA-I proteinleri

Bu grup buğday *EM* proteini ve onun homoloğu olan pamuk *D-19* proteinini içermektedir (Litts vd. 1987, Baker vd. 1988). Her iki protein de yüksek dizi homolojisi ve benzer protein karakteristiklerine sahiptir (Baker vd. 1988, Dure vd. 1989). Çeşitli bitki ve bakterilerden izole edilmiş olan LEA-I proteinleri, Gly (yaklaşık %20) ve yüklü amino asitler (%40) bakımından zengindir. Yapılan ilk çalışmalarda LEA-I proteinleri, karboksil ucun yakınındaki hidrofilik 20 bazlık korunmuş dizilerin ((R/G)S(R/K)GGQTRKEQLGXEGTXEM) tekrar sayılarına göre 2 alt gruba ayrılmaktadır (Gaubier vd. 1993, Espelund vd. 1995). Örneğin, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 20 bazlık motifin 4 tekrarından oluşan *AtEm1* ve 20 bazlık tek motif içeren *AtEm6* olmak üzere 2 adet *Em* geni içermektedir (Gaubier vd. 1993). Ayrıca *Bacillus subtilis*’te bir stres proteini kodlayan *gsiB* geninde benzer 20 bazlık bir motife (GRKGGEATSKNHDKEFYQEI) rastlanmıştır (Mueller vd. 1992, Volker vd. 1994, Stacy ve Aalen 1998).

LEA-I proteinlerinin ortalama molekül ağırlıkları 11.5 kDa (maksimum 20.3 ve minimum 6.8) olarak belirlenmiştir. Net elektrik yükü bakımından, bu proteinlerin %58’inde $pI < 6$ iken, %26 ve %16’sında sırasıyla pI 6-9 arası ve >9 olarak saptanmıştır. Bu gruptaki proteinlerin çoğu küçük ve asidikten nötre doğrudur (Volker vd. 1994, Stacy ve Aalen 1998).

1.5.3.2.1.2 LEA-II proteinleri

D-11, *RAB* veya dehidrin proteinleri olarak ifade edilen LEA -II proteinleri, ilk olarak gelişen pamuk embriyolarında tanımlanmıştır (Baker vd. 1988, Mundy ve Chua, 1988, Close 1996). Bazı soğukla ilişkili (*COLD*) proteinlerin LEA -II proteinlerine benzer olduğu gösterilmiştir (Gilmour vd. 1992). Günümüze dek, çeşitli taksonlara ait birçok bitkide 100'den fazla sayıda LEA-II proteini tanımlanmıştır (Rorat 2006, Saavedra vd. 2006). LEA-II proteinleri sadece bu protein sınıfında bulunan 3 spesifik, karakteristik diziye sahiptir. İlki, bütün LEA -II proteinleri C ucunun yakınında 15 bazlık lizince zengin K domain olarak tasarlanmış korunmuş diziler (EKKGIMDKIKEKELPG) içerirler (Galau ve Close 1992). İkinci motif N ucunun yakınında yer almaktadır ve DEYGNP konsensus dizisiyle Y domaini olarak tasarlanmıştır. Bu motif bitki ve bakterilerdeki şaperonlarda bulunan nükleotit bağlama domainine benzer bir amino asit dizisi içermektedir (Martin vd. 1993). S segmenti olarak isimlendirilen 3. özellik protein fosforilasyonu için bir bölge oluşturur. S segmentinin CK2 veya diğer *Ser/Thr* protein kinazlar tarafından fosforile edildiği ve nükleus veya nükleolus yerleşimi için gerekli bir sinyal ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Vilardell vd. 1990).

Y, S ve K domainlerinin bulunuşu, sırası ve sayısına göre LEA-II proteinleri 5 altgrupta sınıflandırılmaktadır. Bu alt gruplar sırasıyla Y_nSK_2 , K_n , K_nS , SK_n ve Y_nK_n proteinlerini içermektedir (n tekrar sayısıdır) (Close 1996). LEA -II proteinlerinin moleküler ağırlığı 18.3 kDa ortalamasıyla 5.3'ten 66.3 kDa'a kadar değişmektedir. LEA-II proteinlerinin geniş moleküler ağırlığı aralığı K segmentlerinden ileri gelmektedir. Net elektrik yükü bakımından, bu proteinlerin %7'sinde $pI < 6$, %58'inde pI 6 ile 9 arasında ve %35'inde $pI > 9$ 'dur ve bu durum LEA-II proteinlerinin nötrden baziğe doğru olduğunu göstermektedir.

1.5.3.2.1.3 LEA-III proteinleri

LEA-I proteinleri gibi, *D-7* proteinleri olarak da adlandırılan LEA-III proteinleri bitki, mantar, mikrobiyal ve hayvan alemlerinde bulunmaktadır (Tunnacliffe ve Wise 2007). Günümüze dek halka açık veritabanlarında 100'den fazla LEA-III proteini

tanımlanmıştır. Net elektrik yükü bakımından, bu proteinlerin %20'sinde $pI < 6$, %37'sinde pI 6 ile 9 arasında ve %43'ünde ise $pI > 9$ dur ve bu durum LEA-III proteinlerinin nötürden bazıge doğru olduğunu göstermektedir. LEA-III proteinlerinde bulunan istisnai özellik içerdikleri 11 bazlık ardışık tekrar (TAGAAKEKAXE) dizisidir (Dure vd. 1989). LEA-III proteinlerinin moleküler ağırlıkları arasında gözlenen çeşitlilik, 5'den 30'a kadar değişen ardışık tekrar sayısından kaynaklanmaktadır. LEA-III proteinlerinin moleküler ağırlığı 25.5 kDa ortalamasıyla 7.2'den 67.2 kDa'a kadar değişmektedir. Bu 11 bazlık motifin iyonik köprülerle ilişkili olduğu ve önemli fizyolojik rollerde görev aldığı varsayılmaktadır. Ayrıca LEA-III benzeri proteinlerin birçok organizmada dehidrasyona karşı oluşturulan cevapta rol aldığı bilinmektedir (Hand vd. 2007, Wang vd. 2007).

1.5.3.2.1.4 LEA-IV proteinleri

D-113 proteinleri olarak adlandırılan bu grup, pamukta *D-113*, domates ve onun yabani akrabasında *Le25*, ayçiçeğinde *Ha ds11*, soya fasulyesinde *GmPM1* ve *GmPM16*, *Arabidopsis*'te *AtLEA4-1* ve *AtLEA4-5* ve fasulyede *PvLEA-18* olmak üzere farklı çeşitlerden izole edilmiştir (Baker vd. 1988, Cohen vd. 1991, Almoguera ve Jordano 1992, Kahn vd. 1993, Parcy vd. 1994, Shih vd. 2004). Günümüze dek, çeşitli taksonlara ait birçok bitkide 100'den fazla LEA-IV proteini tanımlanmıştır. LEA IV proteinlerinin ortalama moleküler ağırlığı 12.6 kDa olup 8.4 kDa ile 18.8 kDa arasında seyretmektedir. LEA IV proteinlerinde LEA-I, LEA-II ve LEA-III proteinlerinde olduğu gibi konsensus motif ve diziler yoktur. Net elektrik yükü bakımından, bu proteinlerin %22'sinde $pI < 6$, %22'sinde pI 6 ile 9 arasında ve %56'sında ise $pI > 9$ dur ve bu durum LEA-III proteinlerinin bazik olduğunu göstermektedir. LEA-I, II ve III proteinleri gibi, LEA-IV proteinleri ısıyla çözünürdür ve bu yüzden 10 dakika kaynatıktan sonra presipite edilemezler. Dizi hizalamasına dayalı olarak bu grup *D113*, *GmPM16*, *PvLEA-18* ve *GmPM28* olmak üzere en az 4 altgrup içermektedir.

1.5.3.2.1.5 LEA-V proteinleri

Pamuk LEA D-34 ve D-95 proteinleri grup V LEA proteinlerine bir örnektir. Pamuk (D-95, D-73), mısır (RAB28), havuç (ECP31), Arabidopsis thaliana (AtECP31 ve AtRAB28) gibi birçok bitki türlerinde bazı homologları tanımlanmıştır (Baker vd. 1988, Galau ve Close. 1992). LEA V proteinlerinin ortalama moleköl ağırlığı 18.1 kDa olup 5.3 ile 38.5 kDa arasında seyretmektedir. Net elektrik yükü bakımından, bu proteinlerin %87'sinde $pI < 6$, %6'sinde pI 6 ile 9 arasında ve %7 sinde ise $pI > 9$ dur ve bu durum LEA-V proteinlerinin çoğunun asidik olduğunu göstermektedir. Bu grubun üyeleri diğer 4 LEA protein grubundan hidrofobik oluşuyla ayrılmaktadır. Diğer 4 LEA protein grubu hidrofilik olarak adlandırılmaktadır.

1.5.3.2.1.6 Atipik LEA proteinleri

Atipik LEA proteinleri diğer LEA protein grupları gibi geç embriyogenez esnasında tohumda birikim göstermekte ve çimlenmenin ilk saatlerinden sonra kaybolmaktadır (Shen vd. 1993, Gosti vd. 1995, Breton vd. 2003). Aynı zamanda çeşitli stres koşulları altında diğer organlarda da birikebilmektedirler. Bu grup diğer LEA proteinlerinde olduğu gibi herhangi bir motif veya protein karakteristiği içermez.

1.5.3.2.2 POPP sınıflandırması

POPP proteinlerin peptit kompozisyonlarına dayalı olarak sınıflandırılmasında ve bilinmeyen bir proteinin kompozisyonundaki olağandışılığın istatistiksel keşfinde rol oynayan bir yazılım aracıdır (Wise 2002, Wise 2003, Tunnacliffe ve Wise 2007). POPP tarafından LEA proteinleri Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 olmak üzere 4 gruba ayrılır.

1.5.3.3 LEA proteinlerinin yapısı ve fizyolojik rolleri

Kuruma toleransındaki önemleri sebebiyle LEA proteinlerinin yapısını saptamaya yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Circular dichroism (CD), nuclear magnetic

resonance (NMR), veya Fourier transform IR (FTIR) spektroskopi kullanılarak bazı LEA proteinlerinin ikincil yapıları karakterize edilmiştir. Ek olarak, D-95 (LEA-V) proteinlerinin 3 boyutlu yapısı belirlenmiştir.

Günümüze dek yapılan çalışmalara göre LEA proteinlerini kodlayan genlerin aşırı ifade olduğu durumlarda transgenik bitkilerin stres toleransını geliştirebileceği düşünülmektedir. Arpa HVA1 geninin arpa ve buğdaydaki ifadesinin bitkilerin kuraklık toleransını ve buğday PMA80 ve PMA1959 genlerinin ifadesinin transgenik pirinçte dehidrasyon toleransını arttırdığı gözlenmiştir (Sivamani vd. 2000, Xu vd. 1996, Cheng vd. 1959). Transgenik tütündeki soğuk toleransının LEA proteini kodlayan bir limon geninin (CuCOR19) ifadesiyle arttığı saptanmıştır (Hara vd. 2003). Diğer taraftan, buğday WCS19 ve *Arabidopsis thaliana* COR15A genlerinin ifadesiyle *Arabidopsis thaliana*'da donma toleransının arttığı belirlenmiştir (Ndong vd. 2002, Artus vd. 1996, Puhakainen vd. 2004). Çilek yapraklarındaki donma toleransının buğday dehidrin geninin (WCOR410) ifadesinin artmasıyla birlikte geliştiği bulunmuştur (Houde vd. 2004). Diğer taraftan, ıspanakta 2 soğukla indüklenen LEA proteinin transgenik bitkilerde soğuk veya kuraklık toleransı ile ilgili olarak istatistiki herhangi bir değişiklik göstermediği belirlenmiş ve bu durum bütün LEA proteinlerinin bitkilerde stress toleransına katkıda bulunamayabileceğini göstermiştir (Iturriaga vd. 1992, Puhakainen vd. 2004).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Arpa HVA1 geninin pirince transforme edildiği Xu vd. (1996)'nin çalışmasında elde edilen transgenik pirinçlerin su eksikliği ve tuz streslerine karşı toleransının önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bu açıdan LEA genlerinin bitki biyoteknolojisinde strese karşı önemli birer moleküler araç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Zegzouti vd. (1997)'nin çalışmasında domateste tanımlanmış LEA benzeri protein kodlayan ER5 geninin kuraklık, ABA ve yaralanma altındaki ifade düzeyleri sınanmıştır. Stres koşullarının ER5 mRNA birikimini arttırdığı gözlenmiş ve bu genin stres savunmasında rol oynadığı bulunmuştur.

Shen vd. (2001)'nin çalışmasında, LEA genleri ile homoloji gösteren *HVA22* geninin arpada (*Hordeum vulgare* L.) stres savunmasında rol oynayan bir gen olduğu belirlenmiştir.

Goyal vd. tarafından (2005) gerçekleştirilmiş olan çalışmada LEA proteinlerinin su stresine karşı proteinlerin agregasyonunu önlediği ileri sürülmüştür. Bu kapsamda bir grup 3 LEA proteini olan *AavLEA1* proteininin (*Aphelenchus avenae*) ve grup 1 LEA proteini olan *Em*'nin rekombinant formları fonksiyonel analizlere tabi tutulmuştur. Sıcaklık stresi denemeleri sonucunda LEA proteinlerinin klasik moleküler şaperonlar gibi davranmadığı, ancak kimyasal şaperon olarak adlandırılan trehaloz'un bulunması durumunda sinerjistik etki ederek koruyucu rol üstlendikleri varsayılmıştır. Bu çalışma LEA proteinlerinin su stresine karşı olan anti agregasyon aktivitelerinin ilk kanıtı niteliğindedir.

Ali-Benali vd. (2005) dehidrasyon, düşük sıcaklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarına maruz kalmış 2 farklı buğday çeşidinde 5 adet LEA geninin ifadelerini analiz etmişlerdir. Stres tipi ve gene bağlı olarak ifadelerinde artışlar gözlemlemişler ve stresle ilişkili olduklarını öne sürmüşlerdir.

Barrera-Figueroa vd. (2007) kuraklığa toleranslı Meksikan fasulye çeşidi olan *Phaseolus vulgaris* cv. *Pinto Villa*'da gerçekleştirdikleri çalışmada kuraklık stresi altında köklerde ifadesi artış gösteren genleri taranmış ve yeni bir grup 3 LEA geni olan *PvLEA3* geni tanımlanmıştır. Bu genin fasulye köklerinde stresle ilgili olarak ifadesinin artış gösterdiği ve stres savunmasında etkili bir gen olduğu saptanmıştır.

Xiao vd. (2007)'nin çalışmasında LEA genlerinin ifadesindeki artışla birlikte pirinçte kuraklık direncinin de arttığı bulunmuştur. Bu kapsamda *OsLEA3-1* geni tanımlanmış ve tarla koşullarında kuraklık, tuz ve absisik asit stresi altında transgenik hatlardaki ifadesi incelenmiştir. Uygun promotorlarla *OsLEA3-1* geninin ifadesinin arttırıldığı transgenik pirinçte kuraklık toleransının arttığı belirlenmiştir.

Tsai vd. (2008) soya fasulyesinde bir LEA-II geni olan *GmPM6*'yı ele almışlar ve bu genin ozmotik strese karşı bir düzenleme yolağında rol oynayabileceğini saptamışlardır.

Capsicum annuum L.'da bir hidrofobik LEA protein geni olan *CaLEA6*'nın moleküler ve fonksiyonel karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada Kim vd. (2005), *CaLEA6*'nın dehidrasyon ve yüksek tuzluluğa bağlı su eksikliğine karşı koruyucu bir rolü olduğunu saptanmıştır.

Hundertmark ve Hinch (2008) yapmış oldukları çalışmada RT-PCR yöntemiyle *Arabidopsis thaliana*'da LEA proteinleri ve kodlayan genlerini analiz etmişler ve 9 farklı gruba ayrılabilen 51 adet LEA proteini tanımlamışlardır. Farklı gelişimsel süreçlerde, farklı bitki organlarında ve farklı stres koşulları altında tüm genler analiz edilmiştir. LEA proteini kodlayan genlerin büyük çoğunluğunun absisik asit, soğuk veya kuraklıkla indüklendiğini bulmuşlardır. LEA proteinlerinin stres savunmasındaki olası rollerinin araştırılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Rajesh vd. (2008) maş fasulyesinde (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, LEA proteini kodlayan *emv2* geninin su stresiyle ilişkili olduğu ileri sürülerek bu genin uygun promotor kullanılarak ifadesini arttırmayı başarmışlardır.

Cortez-Baheza vd. (2008) yapmış oldukları çalışmada, *Capsicum annuum* L.'de kuraklık stresi altında indüklenen yeni bir LEA geni (*Calea 73*) tanımlamışlardır. Ayrıca tanımlamış oldukları bu genin o zamana dek tanımlanmış en kısa LEA geni olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Chen vd. (2009) fasulye bitkisinde PvP5CS geninin tuz, kuraklık ve soğuk stresleri altındaki ifade düzeylerini incelemişlerdir. Sonuç olarak PvP5CS geninin bitkilerde prolin birikimini düzenleyen ve stresle indüklenen bir gen olduğunu saptamışlardır.

Kavar vd. (2008) yılındaki çalışmasında farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris*) çeşitlerinde DREB, DD5, CG18, CA7, CA1, CC3 ve DD19 genlerinin su stresine karşı cevaptaki ifade profillerini çıkarmışlardır. Bir LEA III grup üyesi olan DD5 geninin ve çalışılan diğer genlerin ifadelerinin stres savunmasıyla ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Yang vd. (2012) fasulye bitkisinde aliminyum ve kuraklık stresine karşı olan savunmada ilişkili olabileceğini düşündükleri bazı genlerin analizini yapmışlar ve ABA bağımlı genlerden olan SUS, vLEA18, KS-DHN ve LTP gibi genlerin kuraklık ve metal stresi ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Gao vd. (2012) tarafından *Tamrix androssowii*'de yapılmış olan çalışmada ağır metal stresine karşı *TaLEA1* geninin fonksiyonu sınanmıştır. Çalışma sonucunda *TaLEA1* geninin kadmiyum stresine karşı savunmada rol oynadığı ve lipit peroksidasyonunu düşürdüğü ortaya konmuştur.

Amara vd. (2013) tarafından yapılmış olan çalışmada *Rab28* LEA geninin ifadesinin arttırıldığı transgenik mısır bitkisinin su stresine olan toleransı analiz edilmiştir. LEA *Rab28* geninin ifadesindeki artışla birlikte mısırdaki su stresi toleransının arttığı gözlenmiştir.

Bhagi vd. (2013) alışmasında LEA genlerinin 2 buğday çeşidinde tuz ve su stresi altındaki ifade düzeyleri ve antioksidan cevapları araştırılmıştır. Her iki çeşitte taranan 10 LEA geninin stres koşulları altında ifadesinin arttığı gözlenmiştir.

Savitri vd. (2013) soya fasulyesinde LEA-II grubuna ait bir dehidrin proteini kodlayan *LEA-D11* geninin karakterizasyonunu yapmışlar ve bu genin kuraklık toleransıya ilişkili olduğu, gen aktarımı yoluyla dirençli çeşitlerin geliştirilebilmesi için yol gösterici nitelikte olduğunu saptamışlardır.

Sasaki vd. (2013) buğdayda (*Triticum aestivum*) soğuk toleransıya ilgili yeni bir LEA proteini tanımlanmışlardır. WC16 proteininin stres koşulları altında hem protein hemde DNA'yı koruduğunu belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında ‘T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü-Eskişehir’ den temin edilen 7 farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris*) çeşidi kullanılmıştır. Çalışılan bu fasulye çeşitlerinin Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’nden bildirilen morfolojik özellikleri aşağıda sunulmuştur.

3.1.1 Yunus-90 (Kuru Fasulye)

1990 yılında tescil ettirilmiştir. 115-120 günde olgunlaşan bodur kuru fasulye türüdür. Bitkileri dik gelişir, boyları 60-65 cm. kadardır. Yaprak rengi yeşil ve şekilleri ovaldir. Çiçek rengi beyaz, bakla uçları hafif kıvrıktır. Bakla rengi açık yeşil, baklada tane sayısı 4-5 tir. Tane rengi beyaz, T.S.E standartlarına göre şekli horozdur. Tanelerin eni 7.0-7.5 mm, boyu 14.5-15.0 mm, kalınlığı 5.5-6.0 mm' dir. Bin tane ağırlığı 405-410 gr. arasındadır. Tanelerde protein oranı % 23-26 arasında değişmektedir. Pişme süresi ıslatılarak 35 dakika dolayındadır. Piştikten sonra dağılması yoktur. Diğer çeşitlere nazaran biraz geççi bir çeşit olmasına rağmen normal yetiştirme şartlarında ortalama verimi 200-250 Kg/Da dolayındadır. Çeşidin en önemli özelliği ise bakteriyel ve virüs hastalıklarına toleranslı olmasıdır. Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup, geniş tarla tarımı şeklinde kuru fasulye yetiştiriciliği yapılan bölgelere tavsiye edilmektedir (Anonim 2013).

3.1.2 Şehirli-90 (Kuru Fasulye)

1990 yılında tescil ettirilmiştir. 110-115 günde olgunlaşan bodur kuru fasulye türüdür. Bitkiler dik gelişir, boyları 55-60 cm kadardır. Yaprak rengi yeşil ve şekilleri ovaldir. Çiçek rengi beyaz, bakla uçları hafif kıvrıktır. Bakla rengi açık yeşil, baklada tane sayısı 4-5 dir. Tane rengi beyaz, T.S.E standartlarına göre tane şekli \"Horoz\" dur. Tanelerin eni 7.6-7.8 mm, boyu 14.4-14.6 mm, kalınlığı 5.8-6.0 mm dir. Bin tane ağırlığı 450-460

gr. arasındadır. Tanelerin protein oranı % 22-23 arasında değişmektedir. Pişme süresi ıslatılarak 30 dakika civarındadır. Taneler piştikten sonra dağılmamaktadır. Diğer çeşitlere göre biraz daha erkenci bir çeşit sayılmakla birlikte verimi normal yetiştirme koşullarında ortalama 220-260 Kg/Da arasında olabilmektedir. Çeşidin en önemli özelliği ise bakteri ve virüs hastalıklarına toleranslı olmasıdır. Olgunlaşma esnasında az miktarda tane dökme görülmektedir. Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup, yine geniş tarla tarımı yapılan bölgelere önerilmektedir (Anonim 2013).

3.1.3 Karacaşehir-90 (Kuru Fasulye)

1990 yılında tescil ettirilmiştir. 110-115 günde olgunlaşan yarı sarılcı bitki formunda bir çeşittir. Bitkiler yarı yatık gelişir, yerden 45-50 cm. yüksekliğinde bir görüntü verirler. Yaprakları sık, açık yeşil ve küçük, uçları sivri ve ovaldir. Çiçek rengi beyaz, bakla rengi açık yeşil, uçları kıvrıktır. Baklada tane sayısı 6-7 dir. Tane rengi kirli beyaz ve tane şekli T.S.E. standartlarına göre \"Tombul\" dur. Tanelerinin eni 5.3-5.5 cm, boyu 8.7-8.9 mm, kalınlığı 4.6-4.8 mm'dir. Bin tane ağırlığı 180-200 gr. arasındadır. Tanelerin protein oranı % 28-30 arasındadır. Pişme süresi ıslatılarak 20-25 dakika civarında ve piştikten sonraki dağılma çok azdır. Konservelik özelliği de taşıyan bu çeşit lezzet yönünden oldukça beğenilmektedir. Normal yetiştirme şartlarında verimi 220-260 Kg/da olabilmektedir. Bakteriye ve virüs hastalıklarına karşı toleranslıdır. Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup geniş tarla tarımı şeklinde kuru fasulye yetiştiriciliği yapılan bölgelere tavsiye edilmektedir (Anonim 2013).

3.1.4 Göynük-98 (Kuru Fasulye)

1998 yılında tescil ettirilmiştir. 110-120 günde olgunlaşan bodur kuru fasulye türüdür. Bitkileri dik gelişir, boyları 45-55 cm. kadardır. Yaprak rengi yeşil ve şekilleri ovaldir. Çiçek rengi beyaz, bakla uçları hafif kıvrıktır. Bakla rengi açık yeşil, baklada tane sayısı 3-5 tir. Tane rengi beyaz, T.S.E standartlarına göre şekli horozdur. Tanelerin eni 7.2-7.5 mm, boyu 15.4-15.8 mm, kalınlığı 5.5-5.9 mm' dir. Bin tane ağırlığı 535-550 gr. arasındadır. Tanelerde protein oranı % 23-26 arasında değişmektedir. Pişme süresi ıslatılarak 34-37 dakika dolayındadır. Piştikten sonra fazla dağılma yoktur. Verimi 220-

250 Kg/da dolayındadır. Çeşidin en önemli özelliği ise bakteriyel ve virüs hastalıklarına toleranslı olmasıdır. Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup, geniş tarla tarımı şeklinde kuru fasulye yetiştiriciliği yapılan bölgelere tavsiye edilmektedir (Anonim 2013).

3.1.5 Akman-98 (Kuru Fasulye)

1998 yılında tescil ettirilmiştir. 115-125 günde olgunlaşan bodur kuru fasulye türüdür. Bitkiler dik gelişir, boyları 60-70 cm kadardır. Yaprak rengi yeşil ve şekilleri oval ve uçları sivridir. Çiçek rengi beyaz, bakla uçları hafif kıvrıktır. Bakla rengi açık yeşil, baklada tane sayısı 3-5 dir. Tane rengi beyaz, tane şekli küçük dermason' dur. Tanelerin eni 7.8-7.1 mm, boyu 11.9-12.2 mm, kalınlığı 4.6-4.9 mm dir. Bin tane ağırlığı 340-350 gr. arasındadır. Tanelerin protein oranı % 23-26 arasında değişmektedir. Pişme süresi ıslatılarak 26-28 dakika civarındadır. Taneler piştikten sonra fazla dağılmamaktadır. Diğer çeşitlere göre biraz daha geççi bir çeşit sayılmakla birlikte verimi normal yetiştirme koşullarında oldukça yüksektir. Ortalama 250-300 Kg/da arasında olabilmektedir. Çeşidin en önemli özelliği ise bakteri ve virüs hastalıklarına toleranslı olmasıdır. Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup, yine geniş tarla tarımı yapılan bölgelere önerilmektedir (Anonim 2013).

3.1.6 Önceler-98 (Barbunya)

1998 yılında tescil ettirilmiştir. 105-115 günde olgunlaşan bodur tipli tescilli ilk barbunya çeşididir. Bitkiler dik gelişir, boyları 40-50 cm kadardır. Yaprak rengi yeşil ve şekilleri oval ve uçları sivridir. Çiçek rengi beyaz, bakla uçları hafif kıvrıktır. Bakla rengi açık yeşil, baklada tane sayısı 3-5 dir. Tane rengi düz bej zemin üzerinde çizgili yada lekeli alacalı, şekli yuvarlağa yakın oval ve taneler orta iriliktir. T.S.E standartlarına göre tane şekli "Barbunya" dır. Tanelerin eni 5.8-6.2 mm, boyu 11.8-12.2 mm, kalınlığı 5.8-6.2 mm dir. Bin tane ağırlığı 405-410 gr. arasındadır. Tanelerin protein oranı % 23-26 arasında değişmektedir. Pişme süresi ıslatılarak 30-35 dakika civarındadır. Taneler piştikten sonra dağılmamaktadır. Verimi ortalama 200-220 Kg/da arasında olabilmektedir. Çeşidin en önemli özelliği ise bakteriyel ve virüs hastalıklarına

karşı orta derecede toleranslı olmasıdır. Çeşidin kademeli tohumluk üretimi yapılmakta olup, yine geniş tarla tarımı yapılan bölgelere önerilmektedir (Anonim 2013).

3.1.7 Eskişehir-855 (Kuru Fasulye)

1980 yılında tescil ettirilmiştir. 110-115 günde olgunlaşan bodur kuru fasulye türüdür. Bitkiler dik gelişir, 50-60 cm. kadardır. Çok yapraklı, yaprak rengi yeşil, yaprak şekilleri ovaldır. Çiçek rengi beyaz, baklaları düz rengi yeşil, baklada tane sayısı 4-5'dir. Tane rengi beyaz, T.S.E. standartlarına göre tane şekli horozdur. Tanelerin eni 7.0-7.5 mm, boyu 16.0-16.5 mm, kalınlığı 6.0-6.5 mm'dir. Bin tane ağırlığı 640 gr kadardır. Tanelerinde protein oranı %24-37 arasında değişebilmektedir. Orta geçci bir çeşit sayılmakta, verimi normal şartlarda 220-260 kg/da olabilmektedir (Anonim 2013).

Yukarıda morfolojik özelliklerine yer verilmiş 7 fasulye çeşidine ait tohumlar yüzey sterilizasyonunun ardından steril tarım perliti ile doldurulmuş 40x25x5 cm boyutlarındaki plastik viyollere ekilmiştir. Her çeşitten 3 farklı viyole 10'ar adet ekim yapılmıştır. Ekimi gerçekleştirilen fasulye çeşitleri 15 günlük fideler haline gelinceye dek, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'na ait iklim ve geliştirme odasında (25 °C sıcaklık %70) aşağıda içeriği verilen Hoagland besi ortamı içerisinde geliştirilerek stres aşamasına geçilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına ait İklim ve geliştirme odasında (25 °C sıcaklık %70 nem) steril perlit içeren viyollere ekimi gerçekleştirilmiş 15 günlük fasulye çeşitleri

Ekim sırasına göre soldan sağa doğru; Yunus-90, Akman-98, Şehirali-90, Karacaşehir-90, Eskişehir-855, Göynük-98, Önceler-98

3.2 Hoagland Besi Ortamının Hazırlanması

7 farklı *Phaseolus vulgaris* çeşidine ait tohumlar 15 gün süre ile aşağıda içeriği bulunan 1/10 luk Hoagland besi ortamı içerisinde geliştirilmiştir. Hoagland besi ortamı içeriği çizelge 3.1 - 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Hoagland besi ortamı makro besin çözeltisi içeriği

Makro besin çözeltisi		
K₂SO₄	15.7 g	2 L saf su içerisinde çözülür
KH₂PO₄	2.7 g	
MgSO₄.7H₂O	24 g	
Ca (NO₃)₂. 4H₂O	47.23 g	
KCl	0.0746 g	

Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamı mikro besin çözeltisi içeriği

Mikro besin çözeltisi		
H₃BO₃.	0.124 g	2 L saf su içerisinde çözülür
MnSO₄	0.066 g	
CuSO₄.5H₂O	0.100 g	
NH₄Mo	0.048 g	
ZnSO₄.7H₂O1	0.1553 g	

Hoagland besi ortamını hazırlamak için, 10 L 10X makro besin çözeltisi içine 50 ml mikro besin çözeltisi eklendikten sonra hazırlanan bu çözelti 1/10 seyreltilmiştir. Elde edilen 1L 1X konsantrasyonundaki çözeltiye 1 ml 1000 X FeEDTA çözeltisi kullanımdan hemen önce eklenerek kontrol çalışma ortamı olarak kullanılmıştır. 1000 X FeEDTA 365 g FeEDTA 1 L dH₂O içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamında bulunan iyonların son konsantrasyonları

Çözelti içerisinde iyonların son konsantrasyonları			
Ca	2 mM	Mn	10^{-6} M
NO₃	4 mM	Cu ²⁺	10^{-7} M
Mg	1 mM	NH ₄	10^{-8} M
K	2 mM	Zn	10^{-6} M
P	0.2 mM	Fe	10^{-4} M
B	10^{-6} M		

Tuz gibi katı ortamlar, bitkilerin iyon alımını engellediğinden bu tip olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ve bitkileri direkt olarak strese sokmak amacıyla, bitki yetiştirme ve uygulamaları hidroponik sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Hidroponik sistemlerde bitkiler ihtiyaç duydukları mineralleri toprak yerine bir besin solüsyonundan alırlar. Tuz ve kuraklık stresini aynı anda görebilmek ve inceleyebilmek amacıyla hidroponik sistemlerde tuz uygulamaları ön değerlendirmelerle gerçekleştirilirken, uygulanacak tuz miktarına benzer kuraklık stresini yaratmak amacıyla PEG 6000 (polietilen glikol) kullanılmıştır. Tuz ve PEG konsantrasyonları Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ile belirlenerek birbirlerine denkleştirilmiştir. Öncelikle 290, 1000, 100 mmol/kg basınç oluşturan standartlar ile osmometre cihazının kalibrasyonu yapılmıştır.

3.3 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması

3.3.1 100 mM tuz (NaCl) stresi

5 lt 1/10 Hoagland besi ortamına NaCl son konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde 29,22 g NaCl eklenmiştir. Elde edilen 100 mM NaCl solüsyonunun osmotik basıncı yaklaşık olarak 190 mmol/kg olarak belirlenmiştir. 15 günlük bitkiler her kap içerisinde 10 fide olacak şekilde 100 mM NaCl içeren 3 kap içerisine alınmış, iklim ve geliştirme odasında tutularak 0., 3., ve 27. saatlerde örneklem alımı gerçekleştirilmiştir. Stresin

erken ve geç etkilerini gözlemlemek amacıyla 3 ve 27. saatler seçilmiştir. 2 zaman dilimi arasında (3 ve 27) 24 saat bırakılmasının sebebi gen ifadesi düzeylerinde sirkadiyan saat kontrolüyle oluşabilecek istenmeyen değişiklikleri önlemektir. Örneklem alımları yaprak ve kök olmak üzere 2 farklı dokudan gerçekleştirilmiş olup hedef örnekler sıvı azot ile muamele edilerek RNA izolasyonu aşamasına kadar muhafaza edilmek üzere -80'e kaldırılmıştır.

3.3.2 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık (PEG) stresi

100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi oluşturmak amacıyla; 1/10 kontrol Hoagland besi ortamına 100 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturacak şekilde, yapay kuraklık oluşturmak amacıyla gerekli PEG 6000 miktarları tespit edilmiştir. Bu sayede tuz ve kuraklık stresleri dengeli olarak uygulanmıştır. Besi ortamına PEG 6000 belirli aralıklarla ve düşük miktarlarda ilave edilerek osmotik basıncı ölçülmüş, 100 mM NaCl ile eş osmotik basınç oluşturan madde miktarı tespit edilmiştir (%15,955) (Şekil 3.2). 100 mM tuz (NaCl) stresine eş kuraklık stresi için hazırlanan PEG 6000 solüsyonları benzer şekilde iki gerçek yapraklı bitkilere 27 saat süre ile uygulanarak örneklem alımı tuz stresi ile aynı saatlerde (0., 3. ve 27. saatlerde) yapılmıştır. Örneklem alımları yaprak ve kök olmak üzere 2 farklı dokudan gerçekleştirilmiş olup hedef örnekler sıvı azot ile muamele edilerek RNA izolasyonu aşamasına kadar muhafaza edilmek üzere -80'e kaldırılmıştır.



Şekil 3.2 Viescor marka Vapro (Vapor Pressure Osmometer) 5520 model osmometre cihazı ve standartları

3.4 Araştırma Basamakları İçin Çalışma Kodlarının Oluşturulması

Çalışmanın araştırma basamaklarında herhangi bir karışıklık oluşmaması için fasulye çeşitleri, stres tipleri, uygulama süreleri ve doku tipi parametreleri için birer sembol ve bu sembollerin biraraya gelmesiyle kodlar oluşturulmuştur. Bu kodlamada ilk olarak çeşit adını sembolize eden bir harf kullanılmıştır. Her bir fasulye çeşidi çeşit isminin ilk harfi ile sembolize edilmiştir (YUNUS-90 çeşidi için Y, ŞEHİRALİ-90 çeşidi için S gibi).

Kodlamadaki 2. sembol stresin uygulama süresini ifade etmektedir. Çalışmada 3. ve 27. saatlerde örneklem alımı gerçekleştiği için çeşit sembolünün yanında uygulama süresine göre 3 veya 27 sembolleri yazılmıştır (A3PK ve A27PK gibi). Kodlamadaki 3. sembol stresin türünü ifade etmektedir ve bunlar PEG (kuraklık) stresi için P, tuz stresi için T olarak seçilmiştir (G27TY, A3PY gibi). Kodlamadaki son sembol ise fasulye çeşitlerinin örneklem olarak alınan kök ve yaprak dokularını ifade etmektedir. Kök için K yaprak için ise Y sembolleri kullanılmıştır (A27TK, E3PY gibi). Çalışma kodları ve karşılıkları olan örnek adları çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Araştırma basamakları için oluşturulan çalışma kodları ve karşılıkları olan örnek adları

	Çalışma kodu	Örnek adı		Çalışma kodu	Örnek adı
1	Yunus-90 K-0	Yunus-90 çeşidi kök kontrol örneği	37	G3TK	Göynük-98 çeşidi 3 saat tuz stresi kök örneği
2	Yunus-90 Y-0	Yunus-90 çeşidi yaprak kontrol örneği	38	G3TY	Göynük-98 çeşidi 3 saat tuz stresi yaprak örneği
3	Karacaşehir-90 K-0	Karacaşehir-90 çeşidi kök kontrol örneği	39	E3PK	Eskişehir-855 çeşidi 3 saat PEG stresi kök örneği
4	Karacaşehir-90 Y-0	Karacaşehir-90 çeşidi yaprak kontrol örneği	40	E3PY	Eskişehir-855 çeşidi 3 saat PEG stresi yaprak örneği
5	Göynük-98 K-0	Göynük-98 çeşidi kök kontrol örneği	41	E3TK	Eskişehir-855 çeşidi 3 saat tuz stresi kök örneği
6	Göynük-98 Y-0	Göynük-98 çeşidi yaprak kontrol örneği	42	E3TY	Eskişehir-855 çeşidi 3 saat tuz stresi yaprak örneği
7	Akman-98 K-0	Akman-98 çeşidi kök kontrol örneği	43	Y27PK	Yunus-90 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
8	Akman-98 Y-0	Akman-98 çeşidi yaprak kontrol örneği	44	Y27PY	Yunus-90 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
9	Önceler-98 K-0	Önceler-98 çeşidi kök kontrol örneği	45	Y27TK	Yunus-90 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği
10	Önceler-98 Y-0	Önceler-98 çeşidi yaprak kontrol örneği	46	Y27TY	Yunus-90 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
11	Şehirali-90 K-0	Şehirali-90 çeşidi kök kontrol örneği	47	A27PK	Akman-98 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
12	Şehirali-90 Y-0	Şehirali-90 çeşidi yaprak kontrol örneği	48	A27PY	Akman-98 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
13	Eskişehir-855 K-0	Eskişehir-855 çeşidi kök kontrol örneği	49	A27TK	Akman-98 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği

Çizelge 3.4 Araştırma basamakları için oluşturulan çalışma kodları ve karşılıkları olan örnek adları (devam)

Çalışma kodu	Örnek adı	Çalışma kodu	Örnek adı
14 Eskişehir-855 Y-0	Eskişehir-855 çeşidi yaprak kontrol örneği	50 A27TY	Akman-98 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
15 K3PK	Karacaşehir-90 çeşidi 3 saat PEG stresi kök örneği	51 G27PK	Göynük-98 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
16 K3PY	Karacaşehir-90 çeşidi 3 saat PEG stresi yaprak örneği	52 G27PY	Göynük-98 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
17 K3TK	Karacaşehir-90 çeşidi 3 saat tuz stresi kök örneği	53 G27TK	Göynük-98 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği
18 K3TY	Karacaşehir-90 çeşidi 3 saat tuz stresi yaprak örneği	54 G27TY	Göynük-98 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
19 S3PK	Şehirali-90 çeşidi 3 saat PEG stresi kök örneği	55 E27PK	Eskişehir-855 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
20 S3PY	Şehirali-90 çeşidi 3 saat PEG stresi yaprak örneği	56 E27PY	Eskişehir-855 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
21 S3TK	Şehirali-90 çeşidi 3 saat tuz stresi kök örneği	57 E27TK	Eskişehir-855 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği
22 S3TY	Şehirali-90 çeşidi 3 saat tuz stresi yaprak örneği	58 E27TY	Eskişehir-855 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
23 Y3PK	Yunus-90 çeşidi 3 saat PEG stresi kök örneği	59 S27PK	Şehirali-90 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
24 Y3PY	Yunus-90 çeşidi 3 saat PEG stresi yaprak örneği	60 S27PY	Şehirali-90 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
25 Y3TK	Yunus-90 çeşidi 3 saat tuz stresi kök örneği	61 S27TK	Şehirali-90 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği

Çizelge 3.4 Araştırma basamakları için oluşturulan çalışma kodları ve karşılıkları olan örnek adları (devam)

Çalışma kodu	Örnek adı	Çalışma kodu	Örnek adı
26 Y3TY	Yunus-90 çeşidi 3 saat tuz stresi yaprak örneği	62 S27TY	Şehirali-90 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
27 A3PK	Akman-98 çeşidi 3 saat PEG stresi kök örneği	63 O27PK	Önceler-98 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
28 A3PY	Akman-98 çeşidi 3 saat PEG stresi yaprak örneği	64 O27PY	Önceler-98 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
29 A3TK	Akman-98 çeşidi 3 saat tuz stresi kök örneği	65 O27TK	Önceler-98 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği
30 A3TY	Akman-98 çeşidi 3 saat tuz stresi yaprak örneği	66 O27TY	Önceler-98 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
31 O3TK	Önceler-98 çeşidi 3 saat tuz kök örneği	67 K27PK	Karacaşehir-90 çeşidi 27 saat PEG stresi kök örneği
32 O3TY	Önceler-98 çeşidi 3 saat tuz yaprak örneği	68 K27PY	Karacaşehir-90 çeşidi 27 saat PEG stresi yaprak örneği
33 O3PK	Önceler-98 çeşidi 3 saat PEG kök örneği	69 K27TK	Karacaşehir-90 çeşidi 27 saat tuz stresi kök örneği
34 O3PY	Önceler-98 çeşidi 3 saat PEG yaprak örneği	70 K27TY	Karacaşehir-90 çeşidi 27 saat tuz stresi yaprak örneği
35 G3PK	Göynük-98 çeşidi 3 saat PEG stresi kök örneği		
36 G3PY	Göynük-98 çeşidi 3 saat PEG stresi yaprak örneği		

3.5 Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi)

Bitkide stres etkisini göstermek ve gen ifadesi düzeyleriyle karşılaştırmak amacıyla malondialdehit (MDA) analizi ile lipit peroksidasyonu belirlenmiştir (Hodges vd. 1999).

Malondialdehit (MDA) Analizi

- 1- 100 mg yaprak örneği %80'lik 1 ml alkol ile homojenize edilir. 3000 g de +4 °C'de 10 dk santrifüj edilir.
- 2- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ikiye bölünür;
 - a. 1 hacim alınır + 1 hacim %20'lik TCA (trichloroaceticacid) + 1 hacim %0,01'lik BHT (butylated hydroxytoluene) eklenir. (-TBA)
 - b. 1 hacim alınır + 1 hacim %0,65 TBA (2-thiobarbituric acid) içeren %20'lik TCA + 1 hacim %0,01'lik BHT eklenir. (+TBA)
- 3- a ve b şeklinde ayrılmış ve yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan tüpler 95 °C'de 25 dk inkübasyon sonrası ani bir şekilde soğutma amacıyla buza alınır.
- 4- Soğuyan örnek 3000 g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant alınır.
- 5- Birinci aşamada 532-600 nm'de, ikinci aşamada ise 532-600-440 nm'de ölçülür.

Spektrofotometrede okunan değerler ile yüzde MDA seviyelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

ABS=Absorbans

MDA=Malondialdehit

- 1- $((\text{ABS } 532 + \text{TBA}) - (\text{ABS } 600 + \text{TBA}) - (\text{ABS } 532 - \text{TBA}) - (\text{ABS } 600 - \text{TBA})) = A$
- 2- $((\text{ABS } 440 + \text{TBA}) - (\text{ABS } 600 + \text{TBA})) \times 0,0971 = B$
- 3- $\text{nmolMDA/ml} = (A - B / 157000) \times 10^6$

3.6 Total RNA İzolasyonu

Stres uygulamaları sonrasında alınan tüm bitki örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar -80 °C'lik buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışmada her bir stres koşulu için 3 biyolojik tekrar ele alınmıştır. Bitki örneklerinden RNA izolasyonu Trizol protokolüne göre gerçekleştirilmiş, RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazında belirlenmiştir (Chomczynski ve Mackey 1995).

Trizol Protokolü:

- 1- Örnekler porselen havan içinde sıvı azotta ezilir.
- 2- 2 ml'lik eppendorf tüpe 1 ml trizol eklenir.
- 3- Üzerine 300-500 mg örnek eklenir.
- 4- Tüp kuvvetli bir şekilde elle sallanarak karışım sağlanır, vortekslenir ve örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
- 5- Üzerine 250 µl kloroform eklenir, karıştırılır.
- 6- Oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
- 7- 14.000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilir ve üst sıvı yeni tüpe aktarılır.
- 8- Üzerine 250 µl 1.2 M NaCl, 250 µl 0.8 M Na-citrate ve 250 µl isopropanol eklenir.
- 9- -20 °C'de 10 saat bekletilir.
- 10- 14.000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edilir, üst sıvı atılır, pellet tüp dibinde gözlenir.
- 11- Pellet %70 EtOH ile yıkanır ve dikkatlice buz ile teması kesilmeden kurutulur.
- 12- 20-50 µl DEPC ile muamele edilmiş suda çözülür.

İzole edilen RNA'ların saflık ve miktarlarının kontrol edilmesi, daha sonra yapılacak işlemlerin optimizasyonu ve standartlaştırılması için gereklidir. Bu nedenle izole edilen RNA'lar hem % 1,2'lik FA (formaldehit agaroz) jelde yürütülerek, hem de Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı ile spektroskopik olarak ölçülerek saflık ve miktarları kontrol edilmiştir.

3.7 RNA Pürifikasyon (Saflaştırma) Yöntemi

Trizol protokolü ile izole edilen RNA'lardan 50-70 µg alınıp Rnaeasy Mini Kit (Qiagen, Cat No: 74104) kullanılarak pürifiye edilmiş, cDNA sentezi için gerekli RNA miktarını belirlemek üzere saflık ve miktarları Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazı ile ölçülmüştür. Pürifikasyon sonrasında 260/280 oranının 1,9 – 2,1; 260/230 oranının ise 2,0 – 2,5 arasında olması RNA saflığının iyi olduğunun göstergesidir.

Rneasy Mini Kit Protokolü

1. 10 µl beta merkaptto etanol 1 ml RLT ile karıştırılır (1 ay için kullanılabilir)
2. 50-70 µg RNA alınarak Rnase'ı uzaklaştırılmış su ile hacim 100 µl'ye tamamlanır.
3. Üzerine 350 µl RLT eklenip pipetle karıştırılır.
4. Üzerine 250 µl saf alkol eklenip pipetle karıştırılır.
5. Yaklaşık 700 µl karışım 2 ml tüp içerisine yerleştirilen RNeasy kolonuna aktarılır.
6. 15 sn 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilir.
7. Kolona 500 µl RPE eklenerek 15 sn 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilir, alt süzüntü atılır.
8. Kolona 500 µl RPE eklenerek 2 dk 14.000 rpm'de (maksimum hızda) 4 °C'de santrifüj edilir, alt süzüntü atılır.
9. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alınarak maksimum hızda 1 dk 4 °C'de santrifüj edilir.
10. Kolon 1.5 ml eppenndorf tüpe yerleştirilir, kolon membranına 30-50 µl RNase'ı uzaklaştırılmış su eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilir. Bu aşama iki defa yapılır.

3.8 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

%1,2 FA agaroz jel DEPC ile muamele edilmiş su (içeriği aşağıda verilmiştir) ile 100 ml' ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz kaynatılıp 65 °C'ye soğutulur, üzerine 1,8 ml %37 formaldehit (12.3 M) ve 1 µl etidyum bromür (EtBr) eklenerek dökülür. Donması için 30 dk bekletilir. 1 hacim 5x jel yükleme boyası ve 4 hacim RNA karıştırılıp 3-5 dk 65 °C'de inkübe edildikten sonra buz üzerine alınır. Örnekler 1x FA buffer içinde 70-80 voltta 1 saat koşturulur. FA jel hazırlamada kullanılan bufferların içeriği çizelge 3.5'deki gibidir.

DEPC (Dietilpirokarbonat)' li su: 0,1 ml DEPC 100 ml saf suda çözülür. 37 °C'de 12 saat inkübe edildikten sonra 121°C 'de 20 dakika otoklavlanır.

Çizelge 3.5 FA jel hazırlamada kullanılan bufferların içeriği

10x FA jel buffer	1x FA jel buffer	5x jel yükleme boyası
200 mM MOPS	100 ml 10x FA jel buffer	1,6 µl bromofenol blue
50 mM NaAc	20 ml %37 formaldehit (12.3 M)	8 µl 500 mM EDTA pH 8.0
10 mM EDTA	880 ml DEPC muamele edilmiş su	72 µl %37 formaldehit (12.3 M)
NaOH ile pH: 7.0		200 µl %100 gliserol
		300 µl formamide
		400 µl 10x FA jel buffer
		17,4 µl DEPC muamele su

3.9 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi first-strand cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit - Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. LEA-3 ve aktin (ACT), gen bölgelerinin 400 bp'nin üzerinde olması nedeni ile anchored-oligo(dT)₁₈ ile çalışılmıştır. Çizelge 3.6'da cDNA sentezinin ilk aşamasında hazırlanan total RNA – primer karışımı içerisinde bulunan bileşenler ve son konsantrasyonları görülmektedir.

Çizelge 3.6 Total RNA - primer karışımı

Bileşen	Son Konsantrasyon
Total RNA	10 ng – 5 µg total RNA
Anchored-oligo(dT)18 Primer,	2.5 µM
50 pmol/µl	
Saf su, PCR-grade	Toplam hacim 13 µl'ye ayarlanır

Total RNA – primer karışımı Biorad marka ısı döngü cihazında 65 °C'de 10 dakika bekletilerek RNA'nın ikincil yapısının denatürasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon

sonrasında örnekler hemen buz üzerine alınmış olup ters transkripsiyon reaksiyonunu gerçekleştirecek diğer bileşenler çizelge 3.7’de belirtilen sıra ile buz üzerindeki 0,2 ml eppendorf tüp içine eklenmiştir.

Çizelge 3.7 Ters transkripsiyon (RT-PCR) reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Son Konsantrasyon
Transcriptor Reverse Transcriptase	1× (8 mM MgCl ₂)
Reaction Buffer, 5× conc.	
Protector RNase Inhibitor,	20 U
40 U/μl	
Deoxynucleotide Mix, 10 mM her birinden	1 mM her birinden
Transcriptor Reverse Transcriptase,	10 U
20 U/I	

Ters transkripsiyon reaksiyonu çizelge 3.8’de belirtilen programda, Biorad marka ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.8 Ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

Primer	Hedef mRNA	RT Reaksiyonu İnkübasyon Süresi
Anchored-oligo(dT)18 primer	4 kb a kadar	55 °C’de 30 dk
		85 °C’de 5 dk

Elde edilen cDNA’lar Real time PCR reaksiyonu gerçekleştirilene kadar -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.10 Primer Dizaynı

LEA-3 ve Actin (ACT) genlerine ait diziler ile primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmanın ön denemelerinde ACT'ye alternatif bir housekeeping gen olarak B-Tubulin geninden faydalanılmıştır. Çalışılan genlere ait diziler NCBI'dan temin edilmiştir.

LEA-3 genine ait 2711 baz uzunluğundaki dizi (NCBI, Entrez Gene ID: DQ196430.1) aşağıdaki gibi belirlenmiş ve bu diziye uyan primer dizileri tespit edilmiştir.

```
ACTGTTTGTGTATTTTCGAAATTGGAGTACATAAATAGAAAGAAACACGGAA
ATGGAAAAAAAGTTATATCTGTTTTCAAAAAATAAATAATATCGAGTCTGT
GAAAAATGCCTTCATACTAACTATAACAGGAGAAAAGAAAAAACATGAA
TAAGTCTCTCGTAAAGAAAAGCTTATAACAGGAGAAAAGAAAAAACATGA
ATAGAAGTCTCTGGTAAAGAAAAGCTTAGAGAAAAATGTTTGTGATCCTCT
GCTATGTAGAGTTAAACAAGAATGTATATAATAGTGATAAGAGGGATCGTT
TGACTCTTCGATTTGGTTACTCCTTCACCTAACATCATGCCACGATTTAGAGT
TACCTATAGGCAGGTTTCATGAAACATGTGATGATGTCAGGTTCTAGGGGAC
CGAACAACCACTTAATACTCATATACCTTAGTTTAATCCAAATACATGCACA
TCATCATATCATTTACGTAACATTAGATGTCACCACCAAGAACCATCTCCTG
CTAACGTGTCACACCTTGCAACCATGCCTGCATCCACATGTCCACCTCCACT
GCTCTTGCTCTCCCTTGCACCCACGTGTCACCTCTACCCCCTCCTTTCCCTTTT
CCATTTCTCATTTCCATTCACTCATATAAACCATCAACTCCTGCTTCCACTCCT
CAACATCTCCATATCATATCCTATACACAGATCAAACCTTCCAACCTCAAAGTG
CAAATACTGTACAAAACCAAACAGATTTTCAATGGCATCGAGGCAACACG
AGGAACGAGCTGAGGCAGCTTCGAAAATTGCTGCCAAAGAGCTTGAACAAG
CCAACAGAGAGAGAGATCGTGAAGATGTGGGCGTTGTGGACCAGCTAAAC
AATGAAGAAAAGCGTGGTGTGATAGGGTCCATGTTGAGGGCGGTGCAAGA
AGCGGTGGTTGGGAAGAAAGATTTCAGTTCCTGCGAAATCATGCACCACAGA
GGTGATTCATGATGTTAATATCAAACCTGATGACGTGACAACCGGGGAAGT
GAGAGACATATCCGTGCGCAAGTCTCCTGGGATCTACGATTCTCCTGCCACG
GACGAAACCGGTTCCAAGGTTGGTGAATATGCAGATTGTGCTTCTCAGAAG
GCGAAGGAAGCAAAGGATGCAGCAATGGCAAAAGCTGGGGACTACGCAGA
TTATGCTTCTCAGAAGGCGAAGGAAGCGAAGGACAAGACTCTGGAGAAGG
GTGGGGAGTATAAGGACTATGCTGCTGAGAAGGCTAAGGAAGGAAAAGAT
GCTACAGTGAATAAGCTGGGAGAGTACAAGGATTACACTGCGGAGAAGAC
GAAAGAAGGGAAGGACACTGCTATGGAGAAGCTTGGGGAGCTGAAGGATT
CTGCTACGGAAGCTGCTAAGAAAGCTGTGGAATACTTGAGCGGCAAGACAG
AGGAAACCAAAGAGAAGGTCTCGGAATCCGCAGTGATTGCCAAGAACAAG
GCAGCGGAGACGGCAGAGACCGCGAAGGATAGAGCGGCGGAGATGAAGGA
TGCGGCGAAGGACAAGGCTGCTGAAGCTGCCGAGGCAACAAAGAACAAGA
CCGCTGAGACGACTGAGGCAGCAAAGAATAAGGGTAGGGGGATGAAGGAC
AAGGCTGCAGAACTGCGGAGGCAATAAAGAACAAGACTGCTGAGATGAC
```

TGAGGCAGCAAAGAAGAAGGCTGCAGAAACTGCTGATGCAACAAAGAACA
AGACTGCTGAAACGACCGAGGCAGCGAAGAATAAGGCTGCGGAGATGAGG
GACAAGACCTGGGATGCAACTGAAGCAGCAAAGAACAAGACCTGGGAAGC
AACTGAGGCAGCAAAGAACAGGACTGCGGAGATGAAGGACAAGGCTGCAG
AAACCACAGAAGCAGCAAAACAGAAAACCTGCACAGGCAAGGGACAAAACC
AAGGTCTCACTCTCTCTTTTAAATTTGTTGAGCCTAACATGTCTTAGAATCTG
TTCAAGTTCTATTGAAGTTTTTCGTATTCTTTTTTTCAATCACAAGGATCAAAA
TCACTTTAAGAATGGAACACATTATATGCATTTGTGAATTTAGGGACTAAAA
CTTTGATTTGGAGCAAATCTGGAAGCCAAAACACATTGCATTGGCACCTTAT
GTGGGTGCAGTTTTGTGTATATGTGACTAATTGTGAATGTTTGAGAAAAATT
GACAAGTTATGGATGTGATATGATGTGACACAGGGGAATGTGAGAGGTGAA
GATGAAGATGCAAGGAGGAAACTGGAGGATCTAAAGCTACAAGGGTACAA
AGATATATCTGAGGGGCGTGCAGATAAGGTGGTGATGAAAGTGGAAGAGA
CTCGACCAGGGGCAATAGCGGATACACTGAAAGCCGCGGATCAGAATGCG
GGACAGACCTTCAACGATGTGGGACGCTTCCATGATGAGGAGATCGTAAAA
AAGAAATAATGTGATACTTAGTATATAGTATCATATTATGTGCAATGCACAA
TATCTATATATATGTGCAGTTTATGTAGTGTGTTTGGAGTATATGTTATGTGA
TCAAAAGTTGTTTGTTTAAATTTTGGTTTTCTTGTTTTGATTCTCTTCAAAAT
GTGTATTGGTTCTAGAGGTTTCATATGGTGACCATGGTACCATTACAACAACA
ATAAACATTGTGCCCGTTCTTTGTGCAACACTTCAATGCAAGCTCTTCATCT
CATCT

Actin (ACT) genine ait 774 baz uzunluğundaki dizi aşağıdaki gibi belirlenmiş ve bu diziye uyan primer dizileri tespit edilmiştir (NCBI, Entrez Gene ID: CV537379).

GGTACCTCAGCCACACACATACACACACAAATTTACAAACTTCGAAAAAA
CACGACACACTCTCATACACACACGTTGTGCGCACACACATTCTTTCTTTCCG
CAGCAACAAACGTCCTTACCTTAAACGACAATGGCCGATGCCGAGGATATT
CAACCCCTAGTCTGCGATAATGGAACCTGGAATGGTCAAGGCTGGTTTTGCC
GGAGATGATGCTCCGAGGGCGGTGTTTCCTAGCATTGTGGGACGCCACGT
CACACTGGGGTGATGGTTGGGATGGGGCAGAAGGATGCGTATGTTGGGGAC
GAGGCTCAATCGAAGAGGGGTATTTTGACTCTGAAATACCCTATTGAGCAT
GGGATTGTGAGTAATTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTC
TACAATGAGCTTCGTGTGGCTCCTGAAGAACACCCCGTGCTTCTCACCGAGG
CACCGCTTAATCCTAAGGCTAATCGTGAGAAAATGACTCAGATCATGTTTGA
GACCTTCAACACTCCTGCTATGTATGTTGCCATCCAAGCTGTGCTTTCCCTTT
ACGCTAGTGGCCGTACAACTGGTATTGTTCTGGACTCCGGAGACGGTGTCA
GTCACACGGTTCCTATCTATGAAGGCTATGCCCTCCCGCATGCAATCTTGCG
TTTGGACCTTGACAGGGCGTGATCTCACCGATGCCCTCATGAAAATCCTGACC
GAGCGTGGTTACTCTTTCACCACATCTGCAGAGCGGGAAATTGTGAGGGAC
AT

B-Tubulin genine ait 845 baz uzunluğundaki dizi aşağıdaki gibi belirlenmiş ve bu diziye uyan primer dizileri tespit edilmiştir (NCBI, Entrez Gene ID: CV530631).

AACCCTAATTCCCTTTCTCCCACACTCTTGCACACTCTCCGATCGAAAATGA
GAGAAATCTTGCACATCCAGGGAGGGCAATGCGGGAACCAGATCGGAGCC
AAGTTCTGGGAGGTGATCTGCGACGAGCACGGCATCGACCACACCGGGAAG
TACAGCGGCGATTCCGAGCTCCAACCTCGAACGCATCAACGTCTACTATAAT
GAAGCCAGCGGCGGAAGGTACGTTCCACGCGCCGTCCTCATGGATCTTGAA
CCCGGCACCATGGACTCCGTCAGATCCGGCCCCTACGGCCAGATCTTCCGCC
CCGACAATTTTCGTCTTTGGCCAGTCCGGCGCCGGCAACAACTGGGCCAAAG
GCCACTACACTGAAGGTGCCGAACATCGACTCAGTCCTCGACGTCGTTTCG
CAAAGAAGCCGAAAATTGCGATTGCTTGCAAGGGTTTCAGGTGTGCCATTC
TCTTGGGGGAGGAACGGGTCTGGCATGGGGACGCTTCTGATTTCAAAGAT
TCGTGAGGAGTATCCAGATCGGATGATGTTGACGTTTTTCAGTGTTTCCTTCT
CCTAAGGTTTCTGACACCGTTGTGGAGCCTTACAATGCTACGCTCTCTGTTC
ACCAGCTTGTAGAGAACGCTGATGAGTGTATGGTTCTGGACAATGAGGCTC
TCTACGACATTTGTTTCAGGACCCTCAAGCTCGCTACACCGACGTTTGGTGA
CCTTAACCACCTGATTTCCGCCACCATGAGTGGAGTTACTTGCTGTCTACGT
TTCCCTGGGGCACTGAACTCCGATCTTCGCAAGCTTGCTGTTAATCTTATCC
CATTTCCCCGGGTCCAT TTCTT

Çalışma döneminde LEA-3 (group 3 late embryogenesis abundant protein), housekeeping gen olan Aktin ve alternatif olarak B-Tubulin'e ait diziler ile primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Buna göre bu gen bölgeleri için tasarlanan primer dizileri aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9 Real-Time PCR primer dizileri

Primer	Sekans (5'→3')	Primer uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (T _m)
LEA-3 F	CAC AGA GGT GAT TCA TGA TGT T	22	58 °C
LEA-3 R	ACC CTT CTC CAG AGT CTT	18	58 °C
ACT F	TGA GCA AGG AGA TTA CAG CAT TGG	24	56 °C
ACT R	CAT ACT CTG CCT TCG CAA TCC AC	23	56 °C
B-Tubulin F	CCG TTG TGG AGC CTT ACA A	19	57 °C
B-Tubulin R	GCT TGA GGG TCCT GAA ACA A	19	57 °C

(F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)

3.11 Real-Time PCR reaksiyonu

Uygun miktar ve kalitede cDNA sentezini takiben çalışmada taraması yapılacak hedef gen olan LEA-3 (DQ196430.1) ve housekeeping olarak seçilmiş ACT (CV537379) ve B-Tubulin (CV530631) genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapılmıştır. Real-Time PCR uygulamaları Light Cycler Nano (Roche) (Şekil 3.3) cihazı aracılığıyla SYBR Green I Master boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilen kantitasyonu takiben PCR'in etkinliğini saptamak ve herhangi bir dimer oluşumu olup olmadığını gözlemlemek amacıyla Erime Eğrisi Analizi yapılmıştır. Housekeeping gen olarak ACT'in kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.3 Yeni nesil Real-Time PCR cihazı, Light Cycler Nano (Roche)

Bu kapsamda öncelikle reaksiyon koşullarının optimizasyonu için ön denemeler kurulmuştur. Kurulan reaksiyon denemelerinde uygun primer (0,2 ile 1 μ M arasında taranmıştır) ile cDNA konsantrasyonları taranmış ve en ideal olanları seçilmiştir. RT-PCR uygulamalarında taraması yapılan koşullar arasında en erken cq (quantification cycle) değerini veren reaksiyon koşulları optimal koşullar olarak seçilmektedir. Sonuç olarak aşağıda verilen koşullarda RT-PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10 - 3.11).

Çizelge 3.10 Çalışmada optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR Protokolü

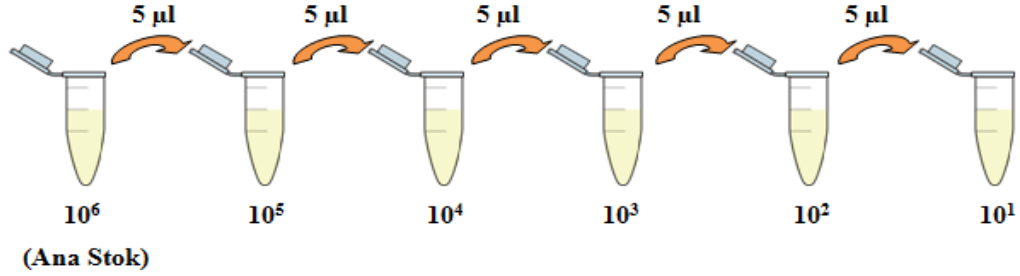
Bileşen	Son Konsantrasyon
cDNA	2 µg
Forward Primer	0.7 µM
Reverse Primer	0.7 µM
Light Cycler ® SYBR Green 1 Master	1X
Toplam hacim 20 µl'dir.	

Çizelge 3.11 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	10 s	
Bağlanma	60 °C	30 s	45
Uzama	72 °C	15 s	
Erime Eğrisi Analizi	58-95 °C	Sürekli okuma	1

Real Time PCR işlemi sonrasında her iki gen için de, her stres koşuluna ait farklı zamanlarda alınmış örneklerde polimeraz zincir reaksiyonu eş zamanlı olarak izlenmiş ve pik profili olarak kaydedilmiştir. Cq değeri polimeraz zincir reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artış fazına geçilen döngüyü (ilk noktayı) ifade eder. Cq değerleri pik profilleri aracılığı ile belirlenmiştir. Belirlenen bu Cq değerleri ve her iki gen için de oluşturulmuş olan standart eğri grafikleri aracılığı ile sentezlenen gen ürünlerinin mRNA seviyeleri kantitatif olarak tespit edilmiştir.

Örneklerin konsantrasyonları cDNA seri dilüsyonları ile oluşturulan LEA-3 ve aktin (ACT) standart eğri grafikleri ile hesaplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 cDNA seri dilüsyonları

cDNA seri dilüsyonları 1/10 sulandırma ile ana stok 6 kat dilüe edilerek yapılmıştır. İlk sulandırma

1/10 = 5 µL cDNA + 45 µL su şeklinde yapılmıştır.

Standart eğri grafiği oluştururken dikkat edilmesi gereken özellikler:

1. Target (hedef gen) ve referans (house keeping gen) için ayrı ayrı standart eğriler oluşturulmalıdır.
2. PCR etkinliği'nin 2'ye yakın olması gerekir, 1,85-2,00 uygundur, bu değer 2'ye yaklaştıkça güvenilirliği artar, 2'nin üzerine çıktığı zaman o örnek iptal edilir. PCR etkinliğinin en fazla 2 olma nedeni her döngüde PCR ile oluşan ampikon miktarının 2 katına çıkmasıdır.
3. En düşük konsantrasyondan daha düşük bir konsantrasyon çıktığında formüle yerleştirilir.
4. Doğru bir standart eğri grafiği oluşturabilmek için oluşturulan grafik en az 3 cDNA dilüsyonuna karşılık gelen logaritmik konsantrasyon değerinden geçmelidir.

3.12 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz

Farklı sürelerde tuz ve kuraklık stresi uygulanmış bitkilerde LEA-3 genine ait transkript profilleri kontrol profilleri ve aktin ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin

istatistiksel olarak değerlendirilmesi Livak ve Schmittgen (2001)'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre ve One Way ANOVA (Dunnett) ile yapılmıştır. Araştırmacıların bir kontrol grubunu birden fazla deney grubu ile karşılaştırması gerektiğinde Dunnet testini kullanmaları önerilmektedir (Dunnet 1955). Post-Hoc testi ise (Multiple Comparisons Dependent Variable: Expression Dunnet T3) eğer varyans analizi sonucunda gruplar arasında bir fark bulunmuşsa, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için kullanılmaktadır (Roscoe 1975).

Cq değeri olarak belirlenen gen ekspresyonu sonuçları housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan ACT (aktin) ve kontrol şartları dikkate alınarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Bu verilerin ortalama, standart sapma, standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri istatistik programı (SPSS 15) ile hesaplanmıştır. Bu şekilde tuz (NaCl) ve kuraklık (PEG) stresi altında geliştirilmiş olan örneklerde LEA-3 geni mRNA ifade seviyesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Fasulye Çeşitlerinde Stres Uygulamaları

7 farklı çeşide ait *Phaseolus vulgaris* tohumları 15 gün süre ile 1/10 luk Hoagland besi ortamı içerisinde geliştirilmiştir. Geliştirilen bitkilere 100 mM NaCl ve 100 mM tuz stresine eş ozmotik basıncı oluşturacak PEG stresi uygulanmış, farklı zamanlarda (0. 3. ve 27. saatlerde) alınan örnekler sıvı azota batırılarak -80 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır. Her iki stres koşullarının 3. saatindeki fasulye çeşitlerinin görüntüsü aşağıdaki gibidir.



Önceler-98 3. saat PEG



Önceler-98 3. saat Tuz



Göynük-98 3. saat PEG



Göynük-98 3. saat Tuz

Şekil 4.1 Önceler-98 ve Göynük-98 çeşitlerinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri



Karacaşehir-90 3. saat PEG



Karacaşehir-90 3. saat Tuz

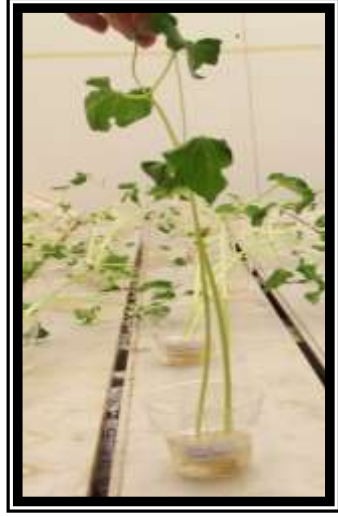


Yunus-90 3. saat PEG



Yunus-90 3. saat Tuz

Şekil 4.2 Karacaşehir-90 ve Yunus-90 çeşitlerinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri



Şehirali-90 3. saat PEG



Şehirali-90 3. saat Tuz



Akman-98 3. saat PEG



Akman-98 3. saat Tuz

Şekil 4.3 Şehirali-90 ve Akman-98 çeşitlerinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri



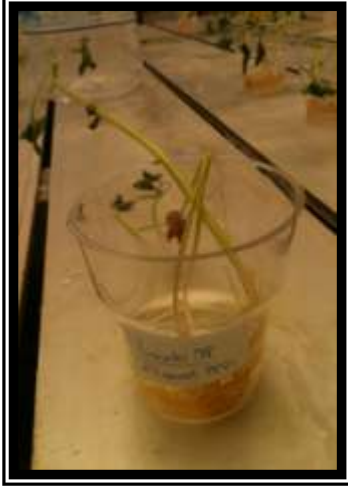
Eskişehir-855 3. saat PEG



Eskişehir-855 3. saat Tuz

Şekil 4.4 Eskişehir-855 çeşidinin 3 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri

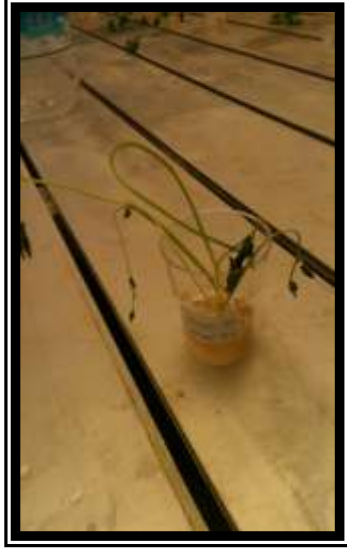
Her iki stres koşullarının 27. saatindeki fasulye çeşitlerinin görüntüsü aşağıdaki gibidir.



Önceler-98 27. saat PEG



Önceler-98 27. saat Tuz



Eskişehir-855 27. saat PEG



Eskişehir-855 27. saat Tuz

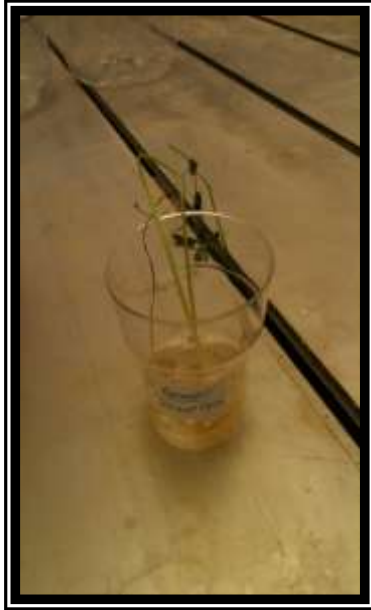
Şekil 4.5 Önceler-98 ve Eskişehir- çeşitlerinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri



Göynük-98 27. saat PEG



Göynük-98 27. saat Tuz



Karacaşehir-90 27. saat PEG



Karacaşehir-90 27. saat Tuz

Şekil 4.6 Göynük-98 ve Karacaşehir-90 çeşitlerinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri



Yunus-90 27. saat PEG



Yunus-90 27. saat Tuz



Şehirali-90 27. saat PEG



Şehirali-90 27. saat Tuz

Şekil 4.7 Yunus-90 ve Şehirali-90 çeşitlerinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri



Akman-98 27. saat PEG

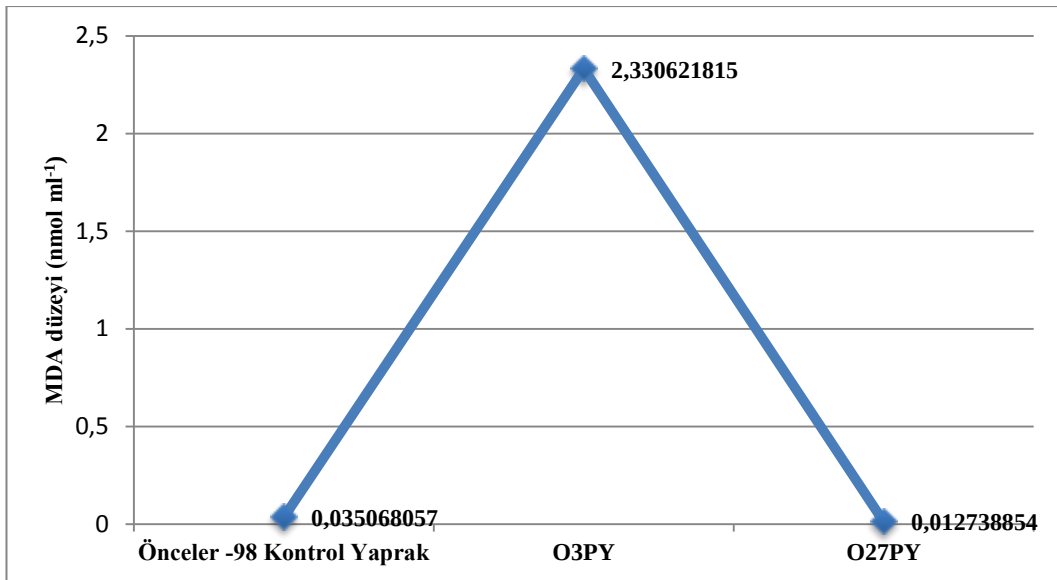
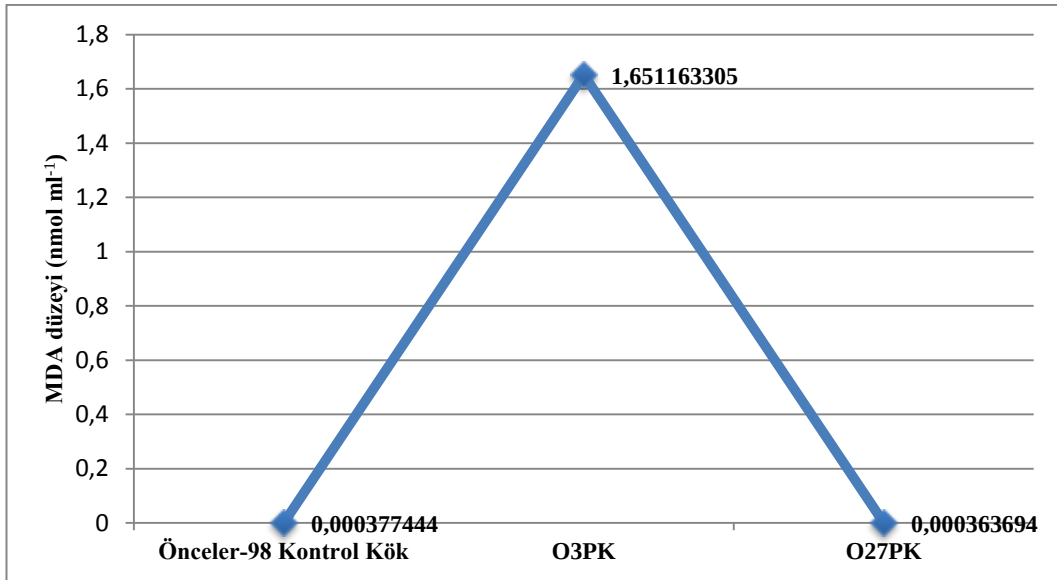


Akman-98 27. saat Tuz

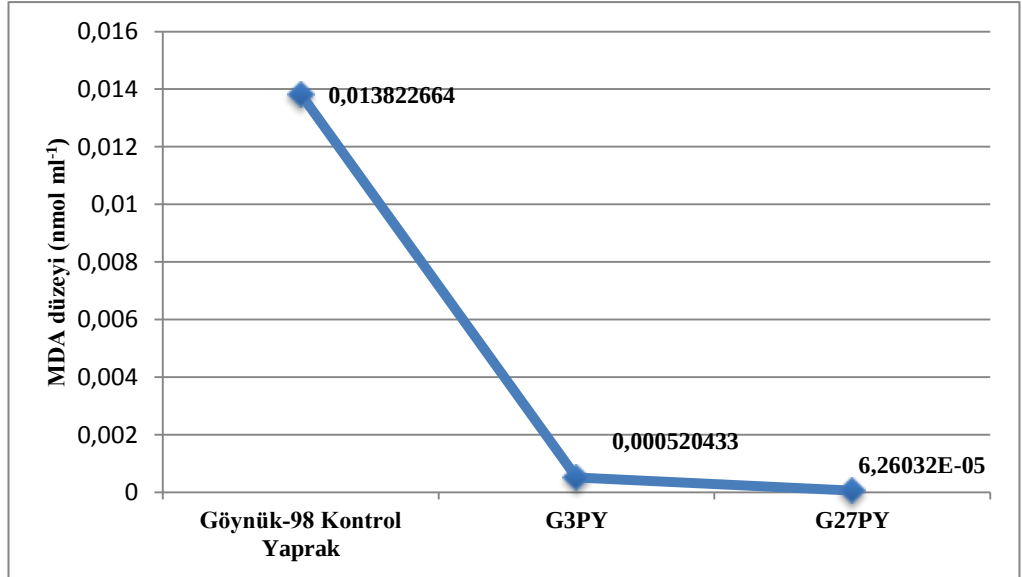
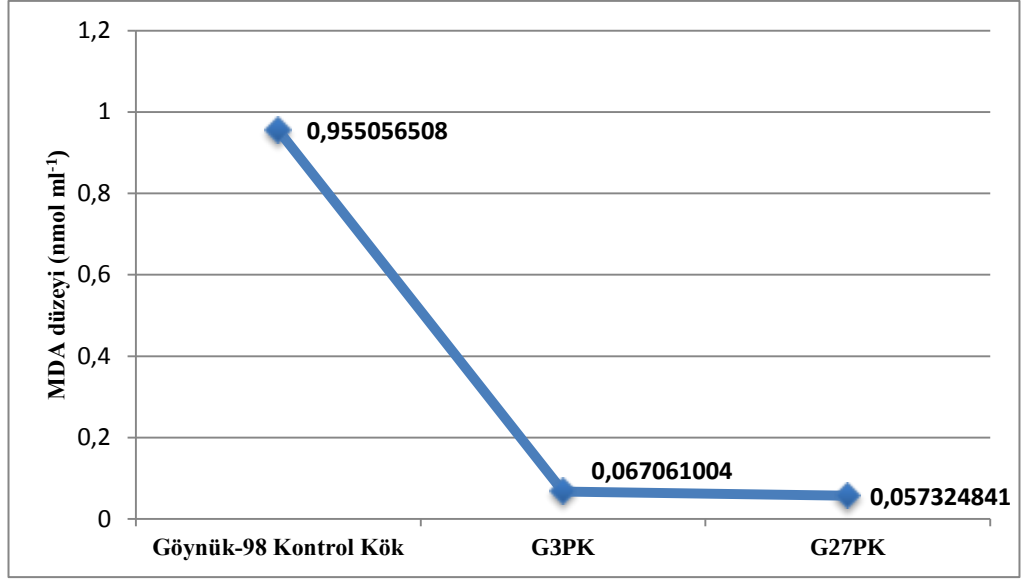
Şekil 4.8 Akman-98 çeşidinin 27 saat tuz ve PEG stresi sonrası görüntüleri

4.2 Lipit Peroksidasyonu (Malondialdehit analizi) Sonuçları

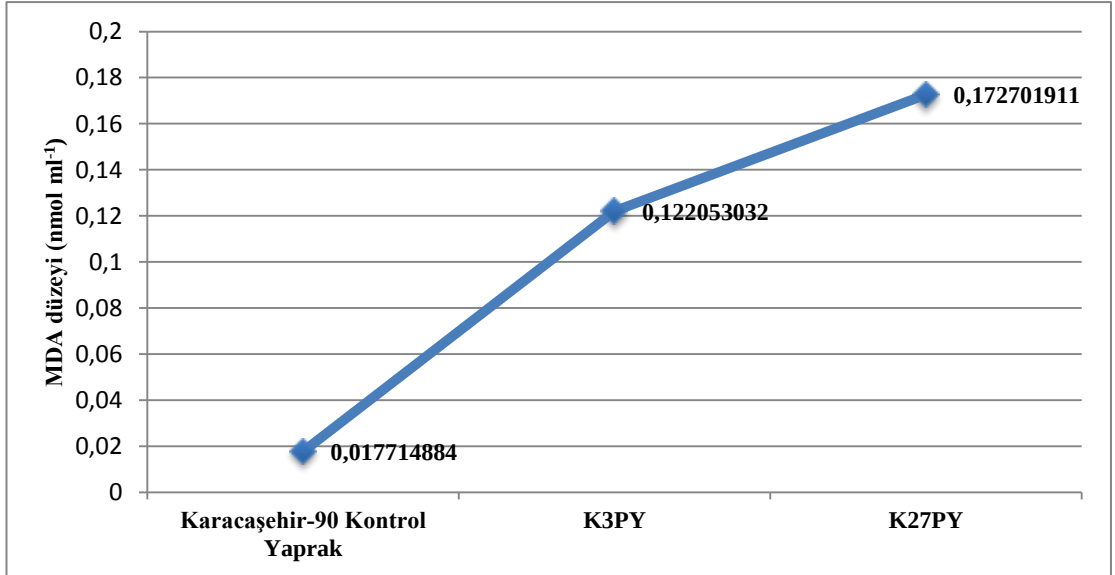
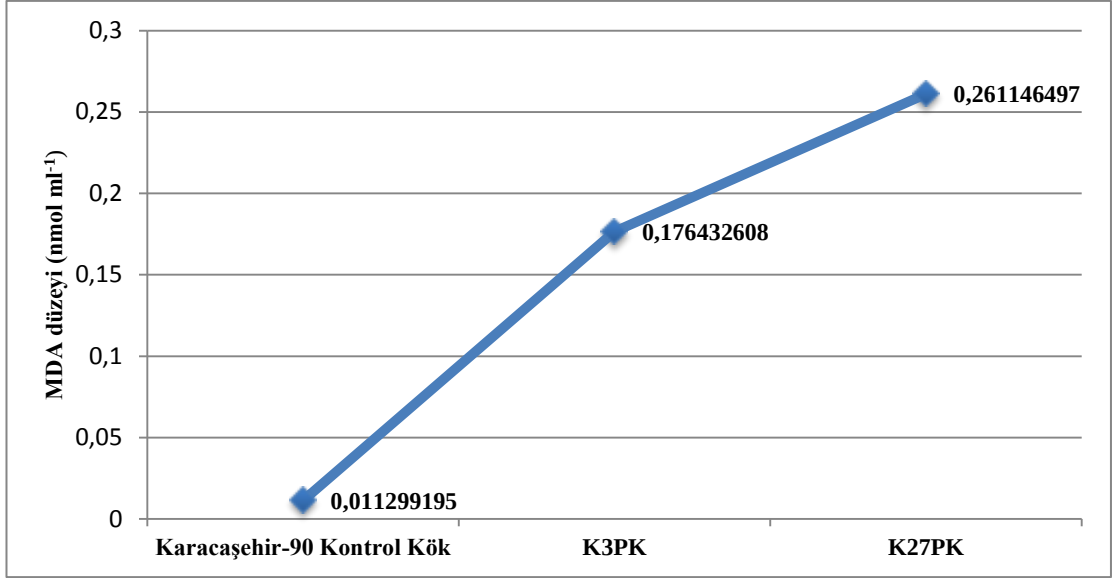
Tez çalışmasında gerçekleştirilen MDA analizi sonuçlarına ilişkin grafikler aşağıda sunulmuştur.



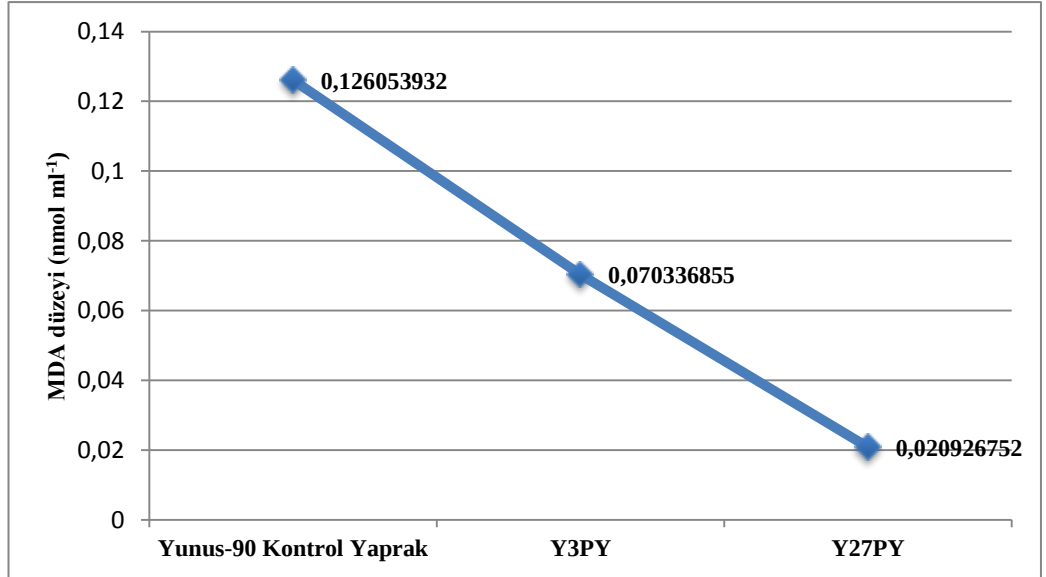
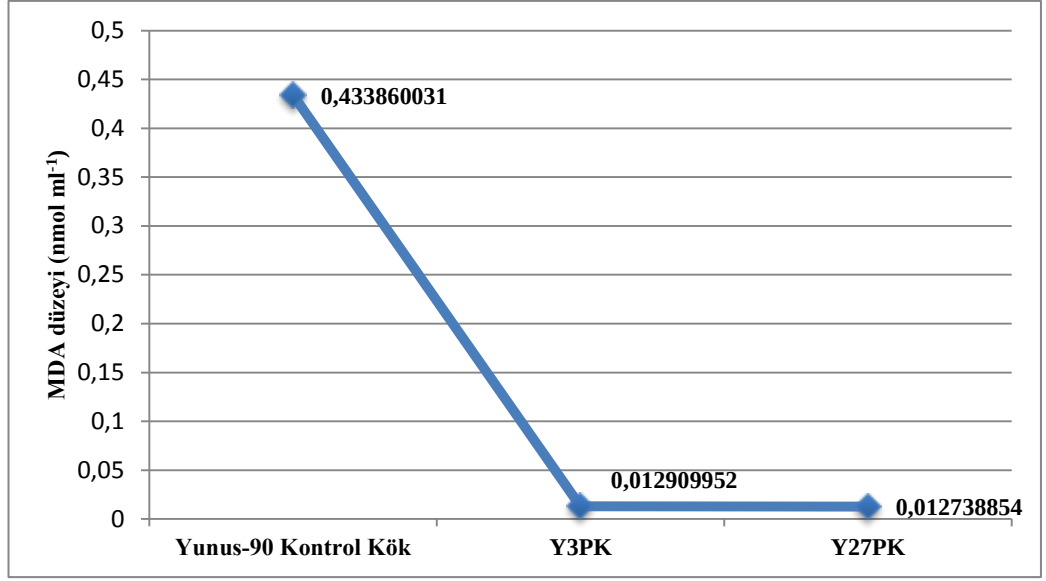
Şekil 4.9 Önceler-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



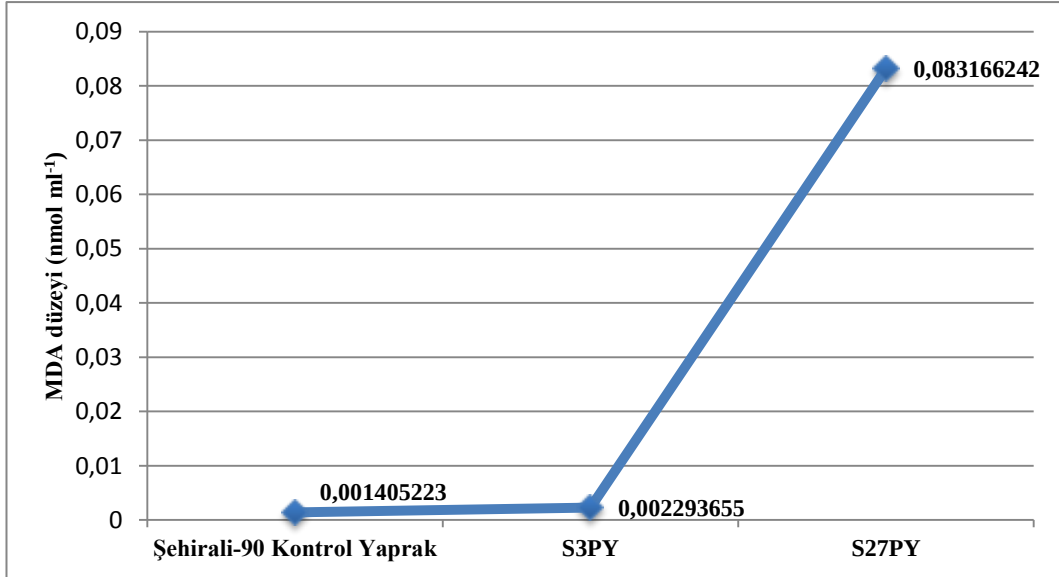
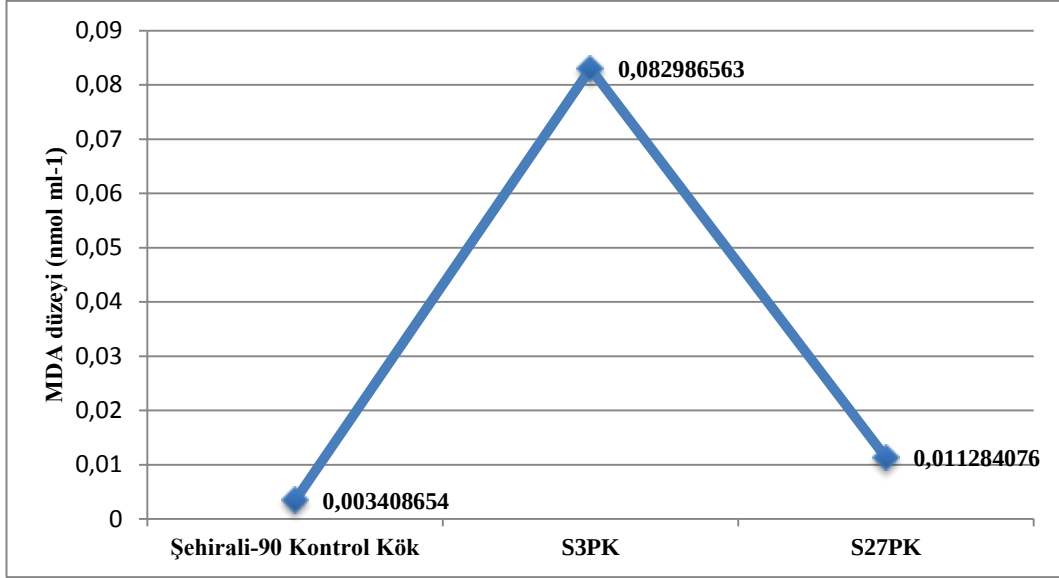
Şekil 4.10 Göynük-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



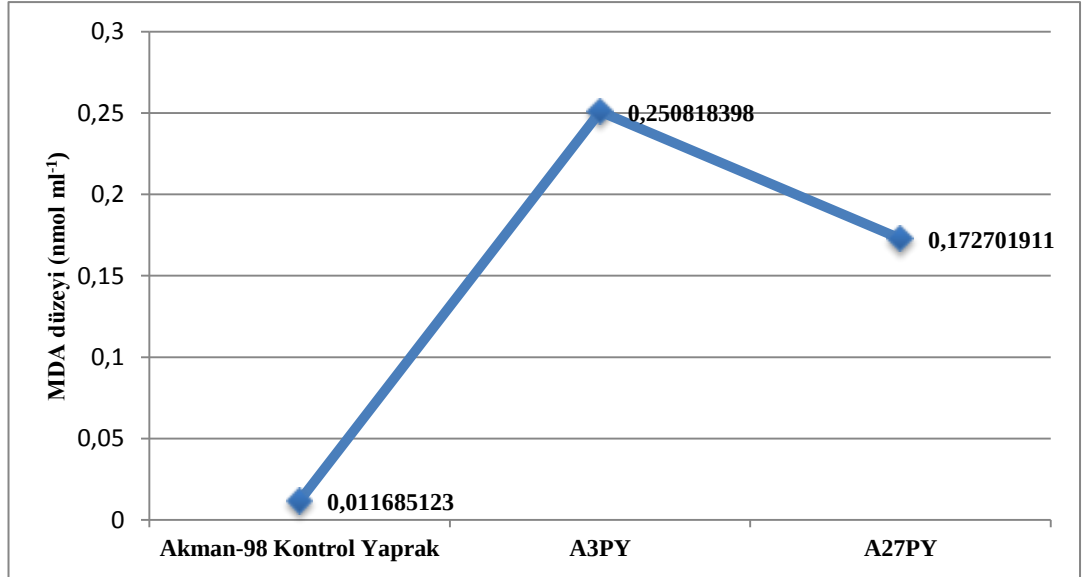
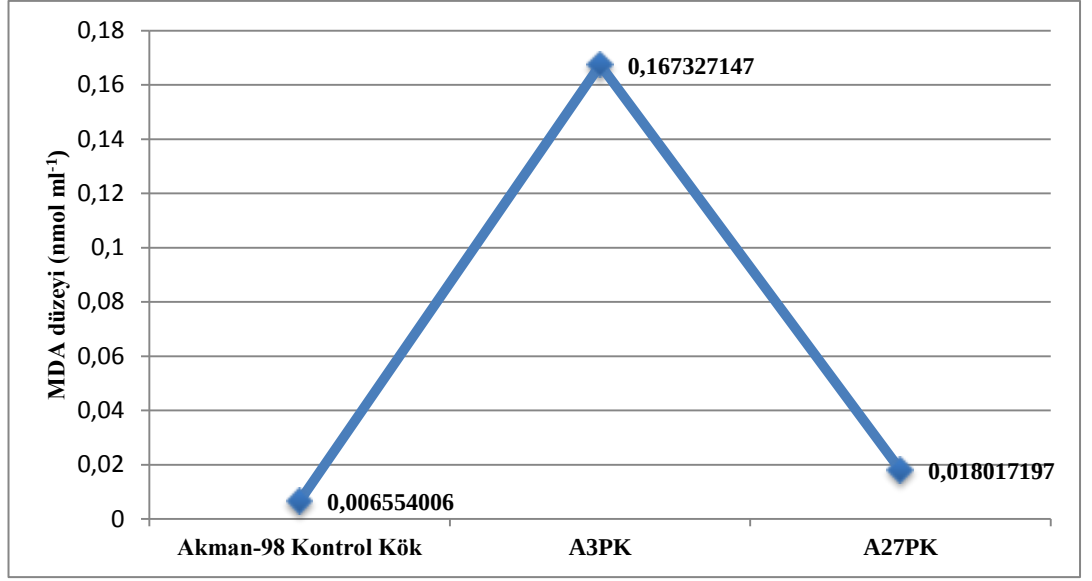
Şekil 4.11 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



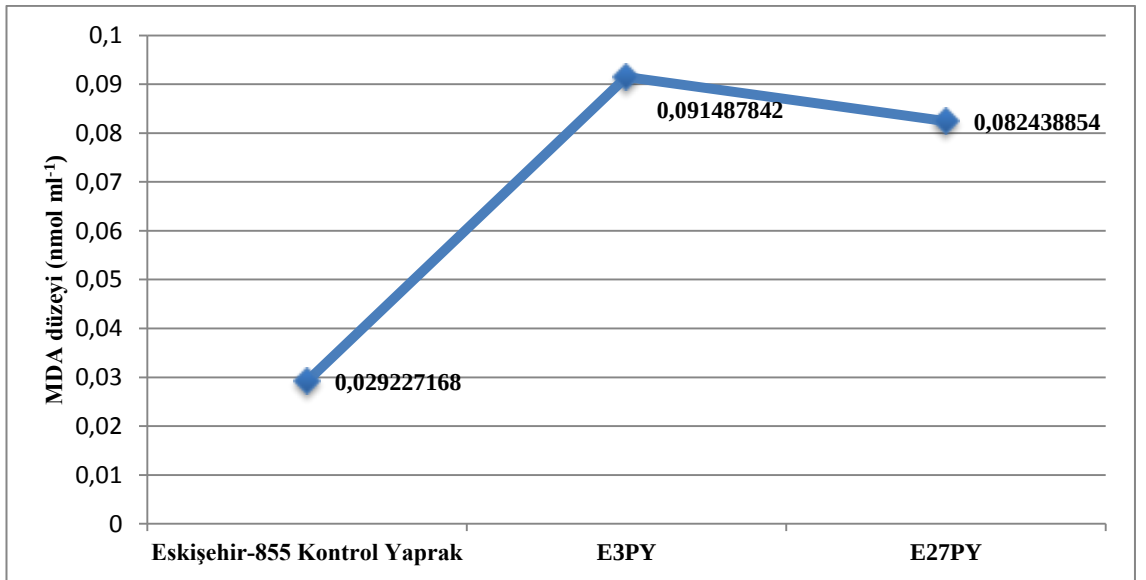
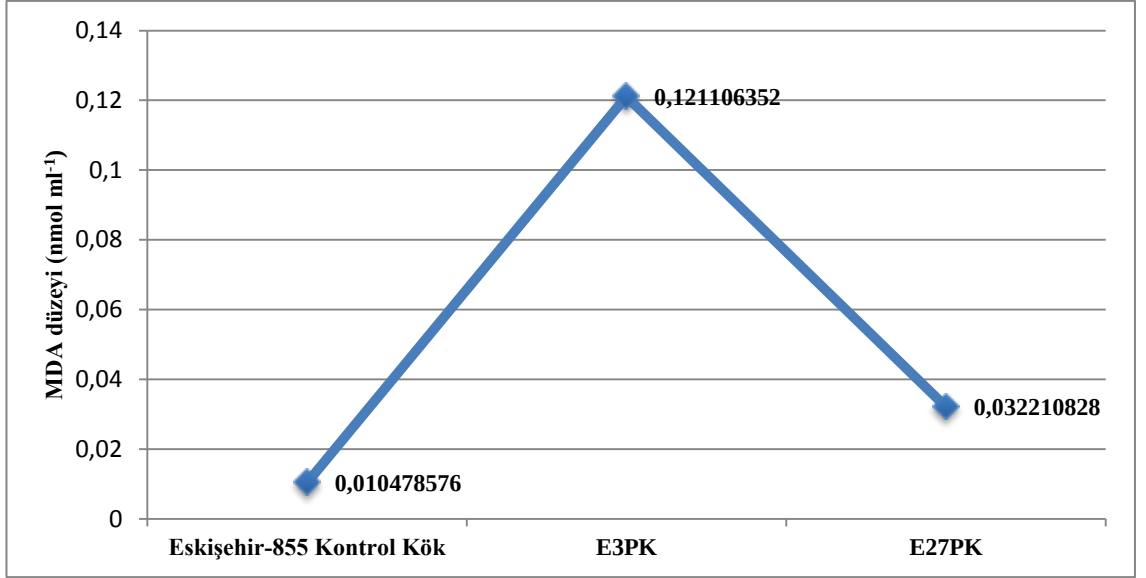
Şekil 4.12 Yunus-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



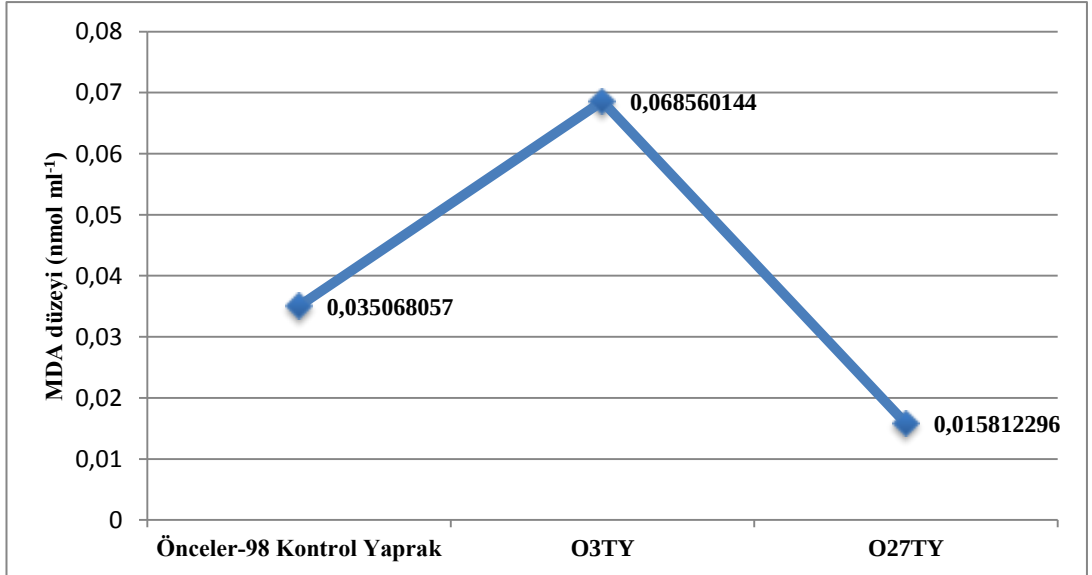
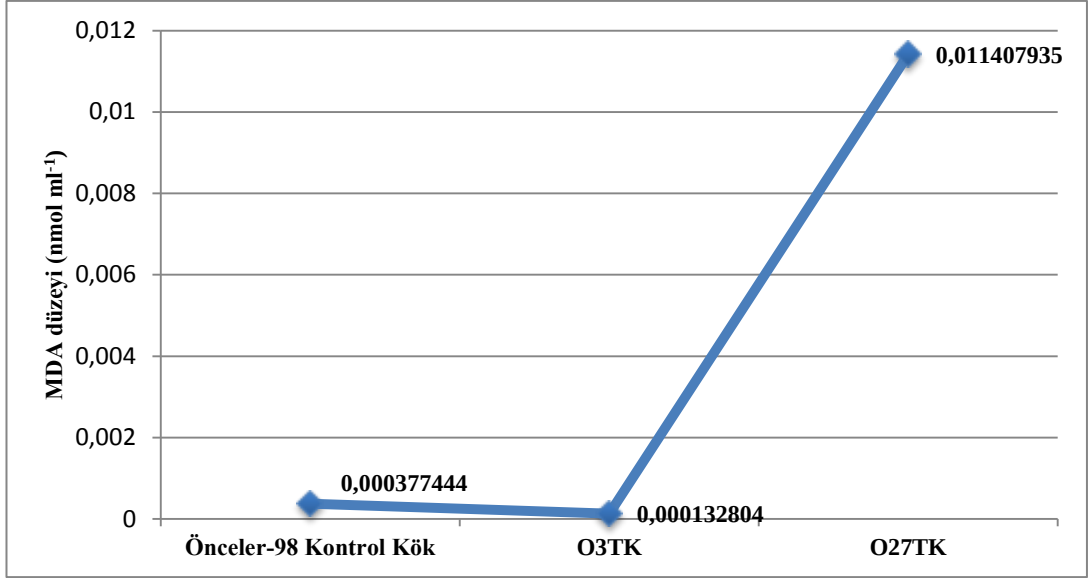
Şekil 4.13 Şehirali-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



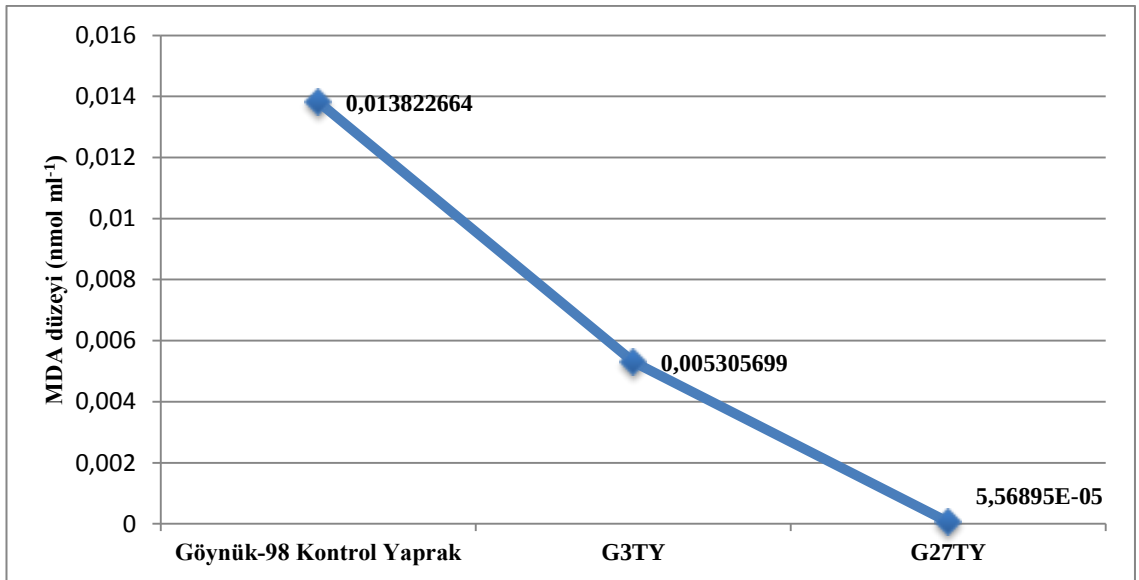
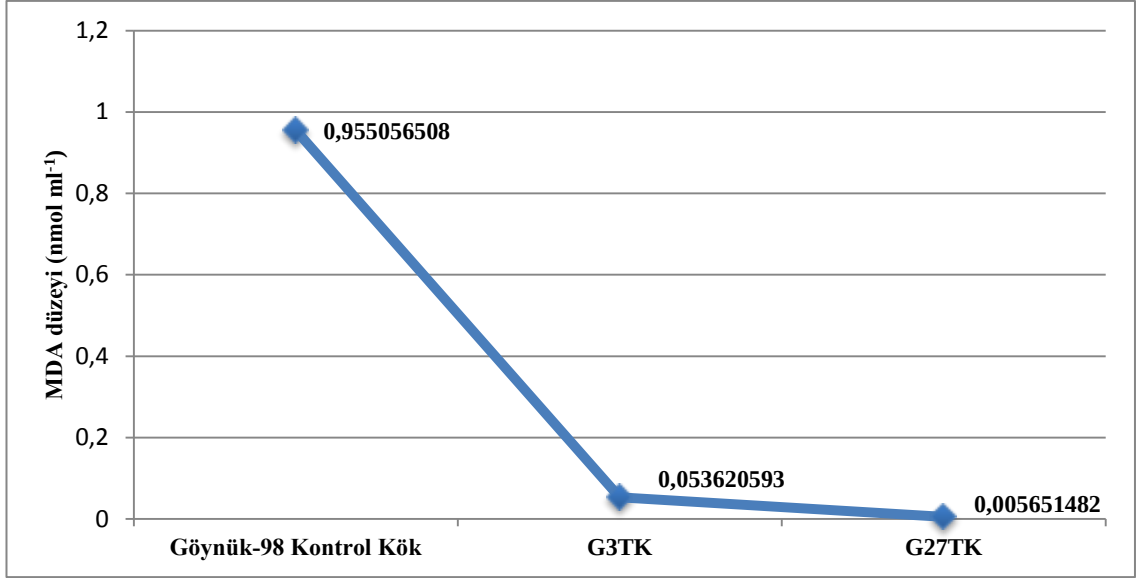
Şekil 4.14 Akman-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



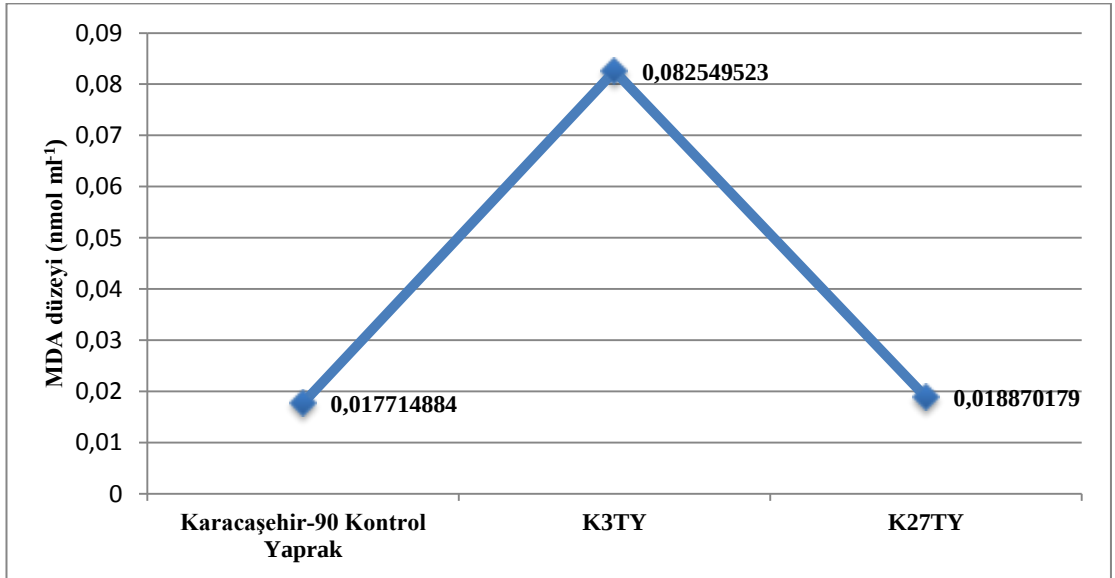
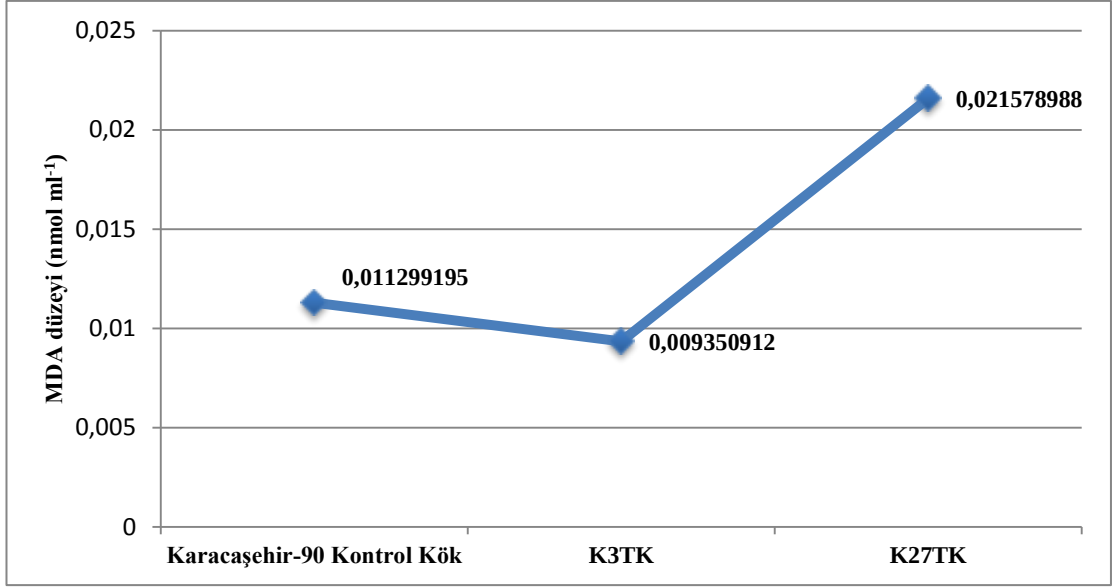
Şekil 4.15 Eskişehir-855 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında PEG stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



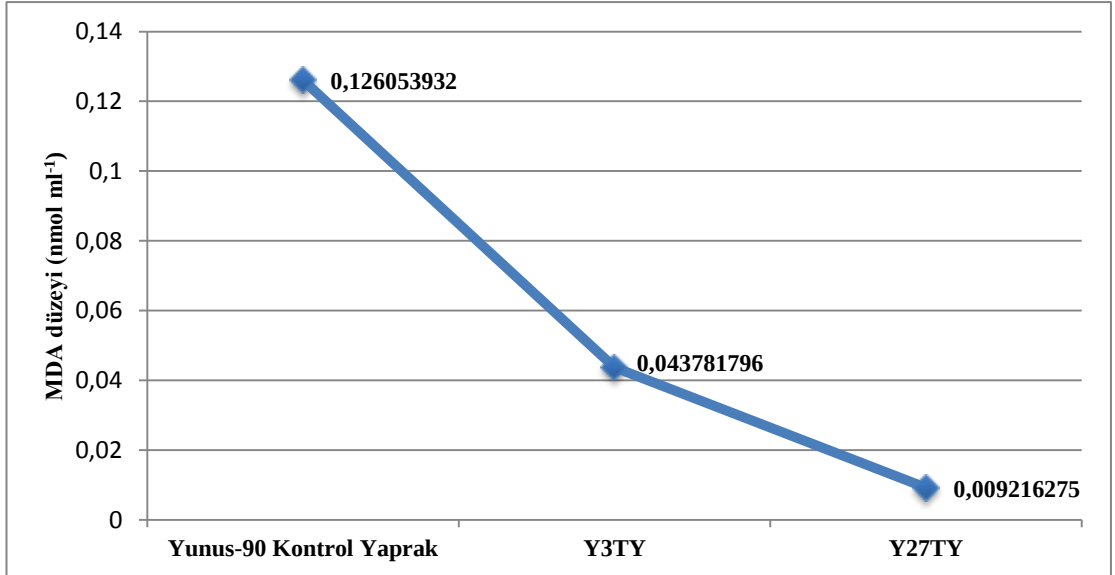
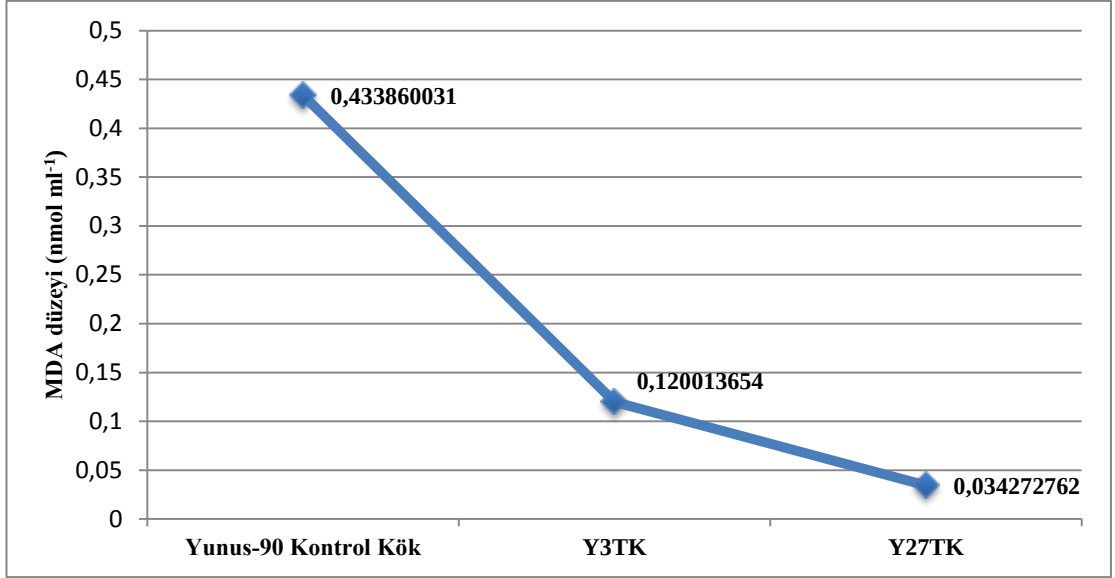
Şekil 4.16 Önceler-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



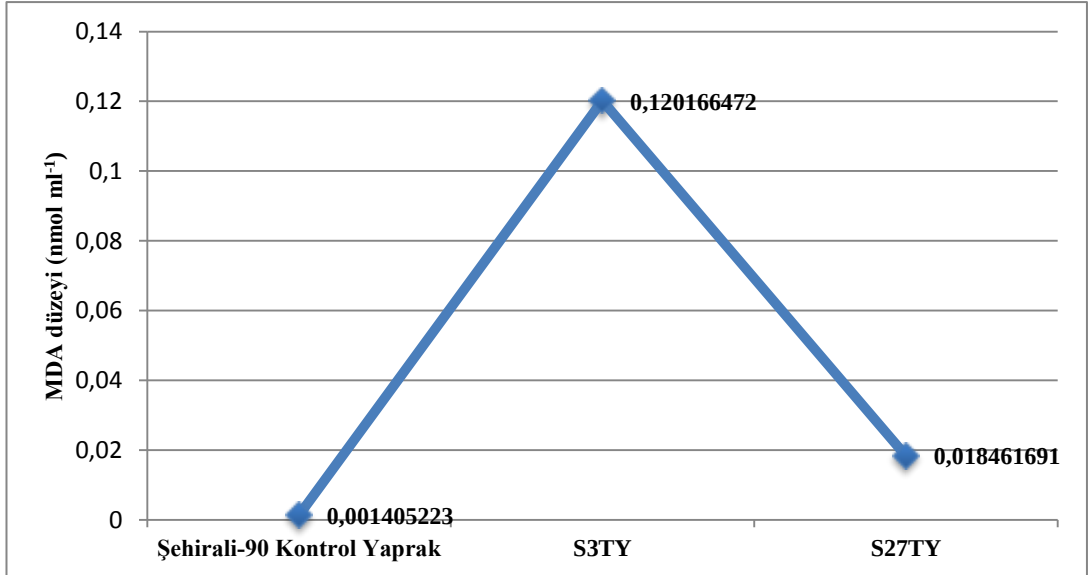
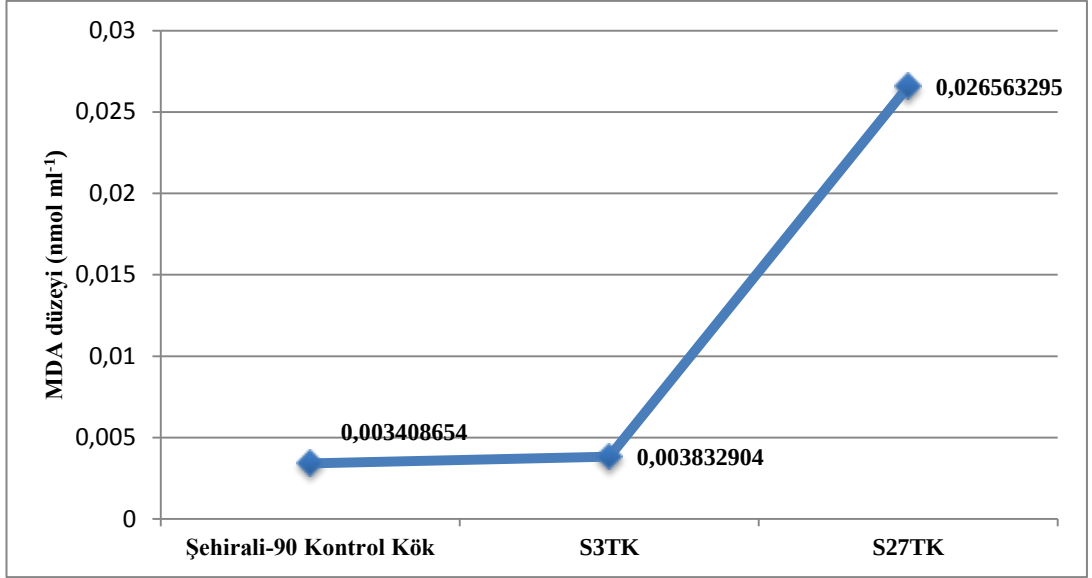
Şekil 4.17 Göynük-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



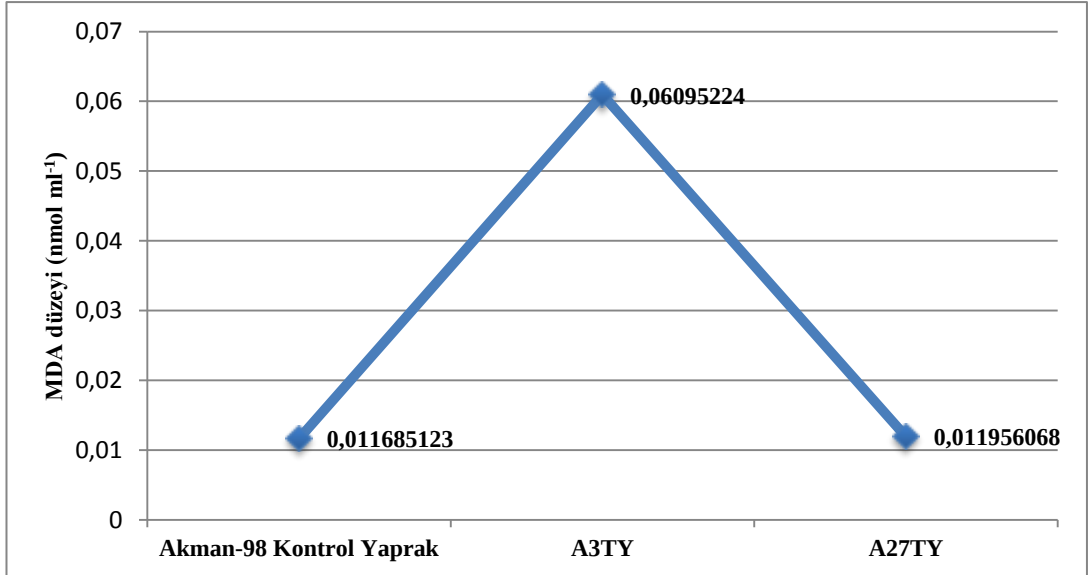
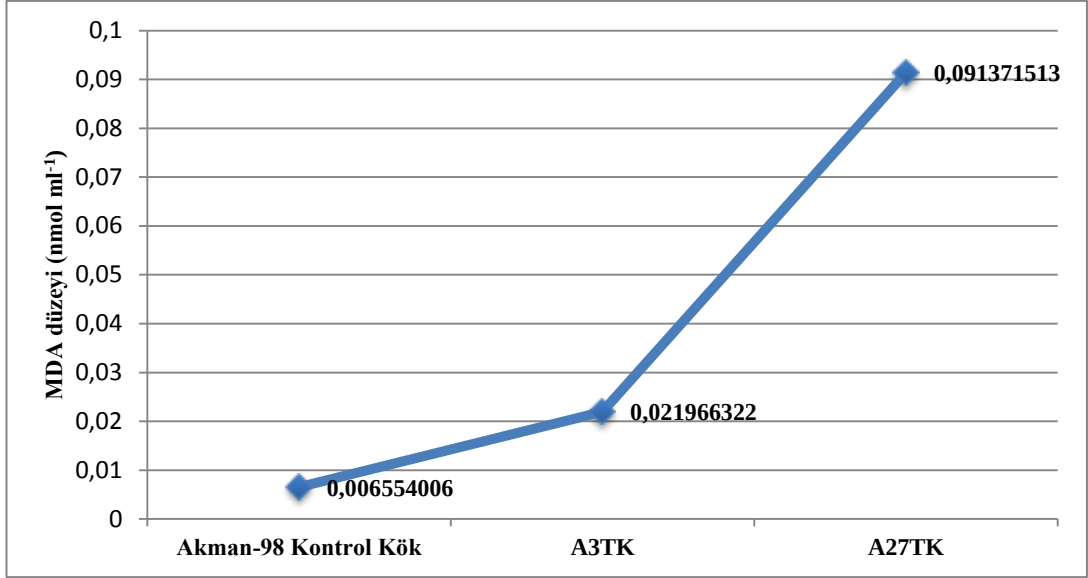
Şekil 4.18 Karacaşehir-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



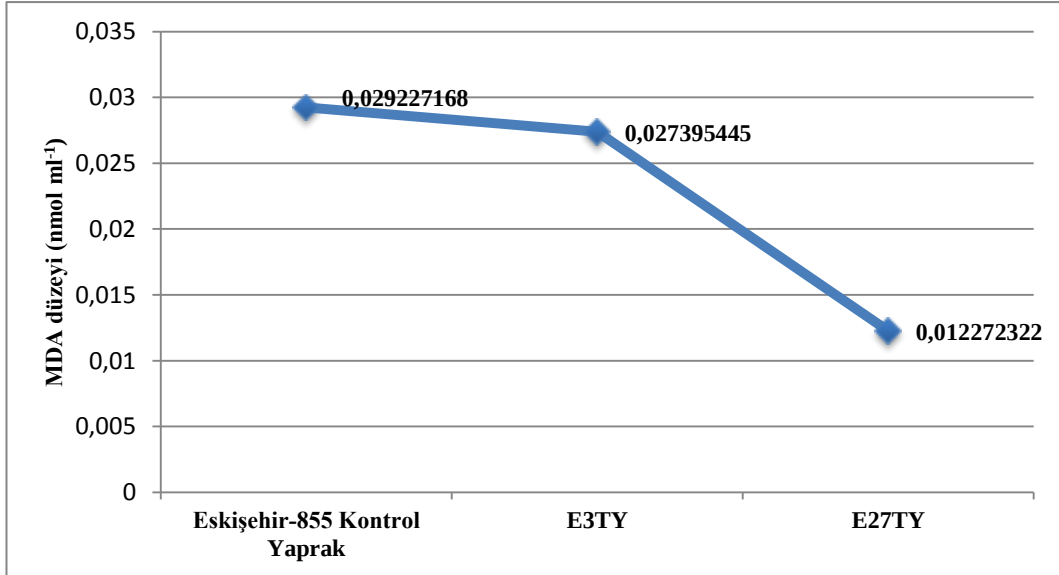
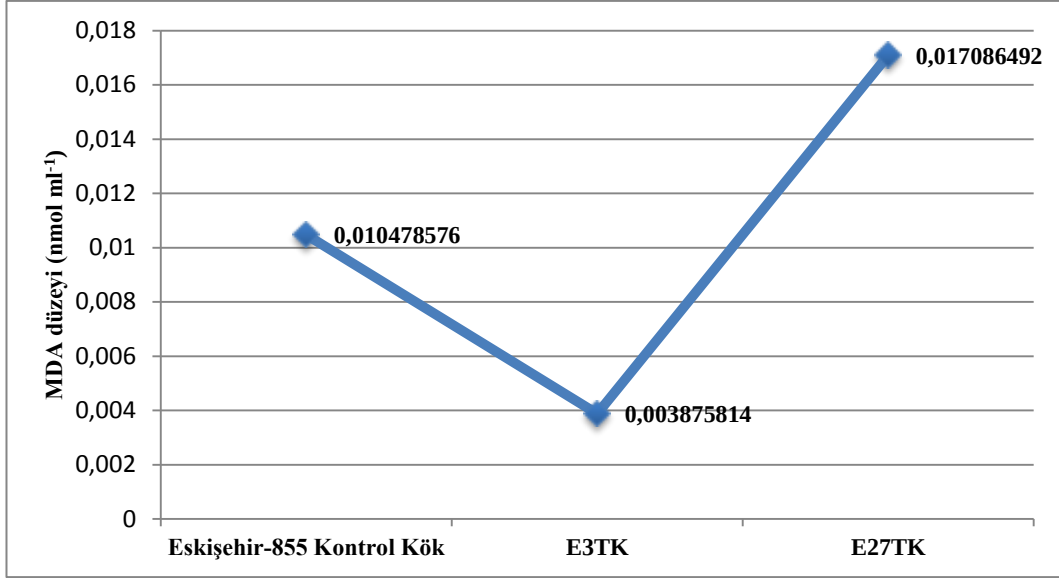
Şekil 4.19 Yunus-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



Şekil 4.20 Şehirali-90 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



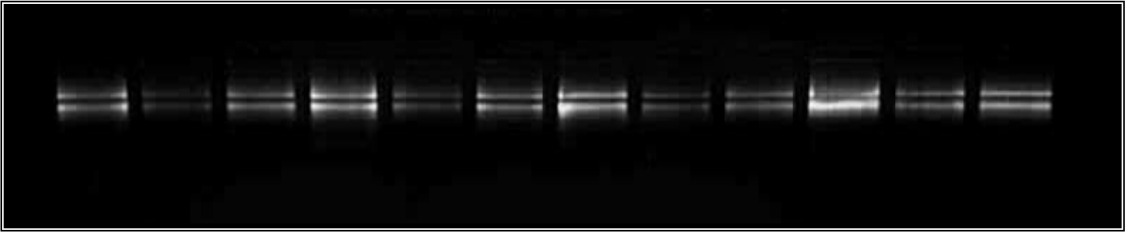
Şekil 4.21 Akman-98 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri



Şekil 4.22 Eskişehir-855 fasulye çeşidinin kök ve yapraklarında tuz stresinin 3. ve 27. saatlerinde gözlenen MDA düzeyleri

4.3 RNA İzolasyonu

Stres uygulamalarının ardından alınan tüm örnekler RNA izolasyonuna kadar -80 °C'lik soğuk dolaplarda saklanmış ve RNA izolasyonu Trizol protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lar %1,2'lik FA (formaldehit agaroz) jelde görüntülenmiş ve ND 1000 Spektrofotometre aracılığı ile miktar ve saflık tayini yapılmıştır ve pürifikasyon için yeterli olan 50–70 µg aralığında olduğu belirlenmiştir. İzole edilen RNA 'lara ait örnek formaldehit agaroz jel görüntüsü aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.23 RNA izolasyonu örnek görüntüsü

4.4 cDNA Sentezi

cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak ve çalışılacak LEA-3 ve housekeeping gen olan ACT'in uzunluklarının 400 bp'den büyük olması nedeniyle Anchored-oligo(dT)₁₈ ile çalışılmıştır. Bu şekilde elde edilen cDNA'ların saflık ve miktar tayinleri çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri

Sıra	Örnek İsmi	ng/ul	260/280	260/230
1a	Yunus-90 K-0	2229,22	1,89	1,84
1b		2122,23	1,85	1,84
1c		2153,72	1,85	1,85
2a	Şehirali-90 Y-0	2112,62	1,9	1,85
2b		2166,01	1,85	1,84
2c		2176,98	1,85	1,88
3a	Karacaşehir-90 Y-0	2347,91	1,88	1,84
3b		2182,04	1,85	1,89
3c		2153,06	1,85	1,89
4a	Göynük-98 K-0	2167,84	1,89	1,84
4b		2137,91	1,85	1,89
4c		2131,75	1,84	1,84
5a	Göynük-98 Y-0	2236,48	1,9	1,88
5b		2080,58	1,85	1,84
5c		2086,63	1,85	1,88
6a	Karacaşehir-90 K-0	2138,79	1,89	1,89
6b		1993,39	1,89	1,80
6c		2123,79	1,84	1,91
7a	Akman-98 K-0	2541,29	1,87	1,89
7b		2135,12	1,84	1,91
7c		2214,85	1,85	1,64
8a	Önceler-98 Y-0	2188,19	1,88	1,89
8b		2144,88	1,85	1,65
8c		2166,43	1,85	1,79
9a	Akman-98 Y-0	2130,67	1,87	1,84
9b		2177,74	1,85	1,79
9c		2159,18	1,85	1,9
10a	Eskişehir-855 K-0	2340,21	1,87	1,84
10b		2166,83	1,85	1,89
10c		2127,96	1,85	1,89
11a	Şehirali-90 K-0	2145,09	1,88	1,88
11b		2140,24	1,85	1,89
11c		2149,69	1,84	1,92
12a	Eskişehir-855 Y-0	2034,71	1,89	1,80
12b		2144,53	1,84	1,92
12c		2153,14	1,84	1,83
13a	Önceler-98 K-0	2247,87	1,88	1,91
13b		2154,75	1,85	1,83

Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ng/ul	260/280	260/230
13c		2135,42	1,84	1,88
14a	Yunus-90 Y-0	2275,66	1,88	1,91
14b		2131,75	1,84	1,88
14c		1981,17	1,85	1,93
15a	K3PK	2750,73	1,84	1,64
15b		1904,58	1,89	1,85
15c		2047,56	1,87	1,89
16a	K3PY	3938,29	1,82	1,65
16b		2252,84	1,89	1,87
16c		1996,39	1,87	1,81
17a	K3TK	2052,08	1,88	1,79
17b		1933,65	1,89	1,86
17c		2000,08	1,87	1,91
18a	K3TY	3532,22	1,83	1,79
18b		2225,22	1,9	1,77
18c		1985,92	1,87	1,72
19a	S3PK	3575,98	1,81	1,9
19b		1930,24	1,89	1,84
19c		1978,47	1,86	1,89
20a	S3PY	4443,47	1,84	1,89
20b		1936,17	1,89	1,85
20c		1973,99	1,87	1,73
21a	S3TK	3512,98	1,81	1,89
21b		1936,17	1,89	1,85
21c		2009,37	1,86	1,87
22a	S3TY	4325,13	1,83	1,89
22b		2168,29	1,9	1,85
22c		1980,56	1,86	1,81
23a	Y3PK	3423,96	1,8	1,92
23b		1933,65	1,89	1,86
23c		2009,01	1,87	1,9
24a	Y3TY	3329,77	1,85	1,92
24b		2190,77	1,89	1,87
24c		1999,41	1,87	1,84
25a	Y3TK	3367,42	1,82	1,83
25b		1885,02	1,89	1,85
25c		2010,06	1,87	1,7
26a	Y3PY	2815,09	1,48	1,83

Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ng/ul	260/280	260/230
26b		2222,07	1,89	1,87
26c		2001,31	1,87	1,72
27a	A3PK	5071,57	1,62	1,84
27b		2198,63	1,89	1,87
27c		2014,13	1,87	1,88
28a	A3PY	3992,96	1,86	1,85
28b		2164,38	1,89	1,86
28c		1958,29	1,89	1,85
29a	A3TY	4793,55	1,79	1,84
29b		1936,17	1,89	1,85
29c		1929,79	1,89	1,86
30a	A3TK	3362,7	1,83	1,84
30b		1933,65	1,89	1,86
30c		1895,22	1,88	1,85
31a	O3TK	3875,72	1,84	1,88
31b		1885,02	1,89	1,85
31c		1926,2	1,88	1,87
32a	O3PY	1443,01	1,84	1,89
32b		1896,94	1,88	1,87
32c		1885,02	1,89	1,85
33a	O3PK	1795,13	1,9	1,89
33b		1900,4	1,88	1,8
33c		1918,45	1,89	1,85
34a	O3TY	1795,13	1,9	1,89
34b		2000,08	1,89	1,86
34c		1981,17	1,86	1,87
35a	G3TY	3514,84	1,84	1,84
35b		1980,56	1,89	1,86
35c		1885,02	1,89	1,87
36a	G3PK	1738,19	1,86	1,84
36b		2198,63	1,89	1,87
36c		2131,75	1,84	1,88
37a	G3PY	4473,17	1,78	1,88
37b		1958,29	1,88	1,87
37c		1918,45	1,89	1,85
38a	G3TK	2461,3	1,86	1,80
38b		1930,24	1,87	1,72
38c		1980,56	1,87	1,72

Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ng/ul	260/280	260/230
39a	E3TK	4579,79	1,8	1,84
39b		1933,65	1,89	1,85
39c		2190,77	1,87	1,84
40a	E3PK	3920,1	1,78	1,85
40b		2122,23	1,85	1,84
40c		2153,72	1,85	1,85
41a	E3TY	3255,37	1,82	1,84
41b		2153,72	1,86	1,84
41c		2166,01	1,85	1,84
42a	E3PY	1986,38	1,86	1,79
42b		2176,98	1,85	1,88
42c		2182,04	1,85	1,89
43a	Y27PK	2213,06	1,84	1,88
43b		2153,06	1,85	1,89
43c		2137,91	1,85	1,89
44a	Y27TY	1565,03	1,82	1,89
44b		2131,75	1,84	1,84
44c		2080,58	1,85	1,84
45a	Y27PY	943,12	1,88	1,89
45b		2086,63	1,85	1,88
45c		1993,39	1,89	1,80
46a	Y27TK	1740,73	1,83	1,89
46b		2123,79	1,84	1,91
46c		2135,12	1,84	1,91
47a	A27PY	1766,43	2,13	1,85
47b		2214,85	1,85	1,64
47c		2144,88	1,85	1,65
48a	A27TK	1240,68	1,97	1,84
48b		2166,43	1,85	1,79
48c		2177,74	1,85	1,79
49a	A27PK	1832,11	1,81	1,84
49b		2159,18	1,85	1,9
49c		2166,83	1,85	1,89
50a	A27TY	1567,56	1,83	1,80
50b		2127,96	1,85	1,89
50c		2140,24	1,85	1,89
51a	G27TK	1971,23	1,8	1,91
51b		2144,53	1,84	1,92

Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri (devam)

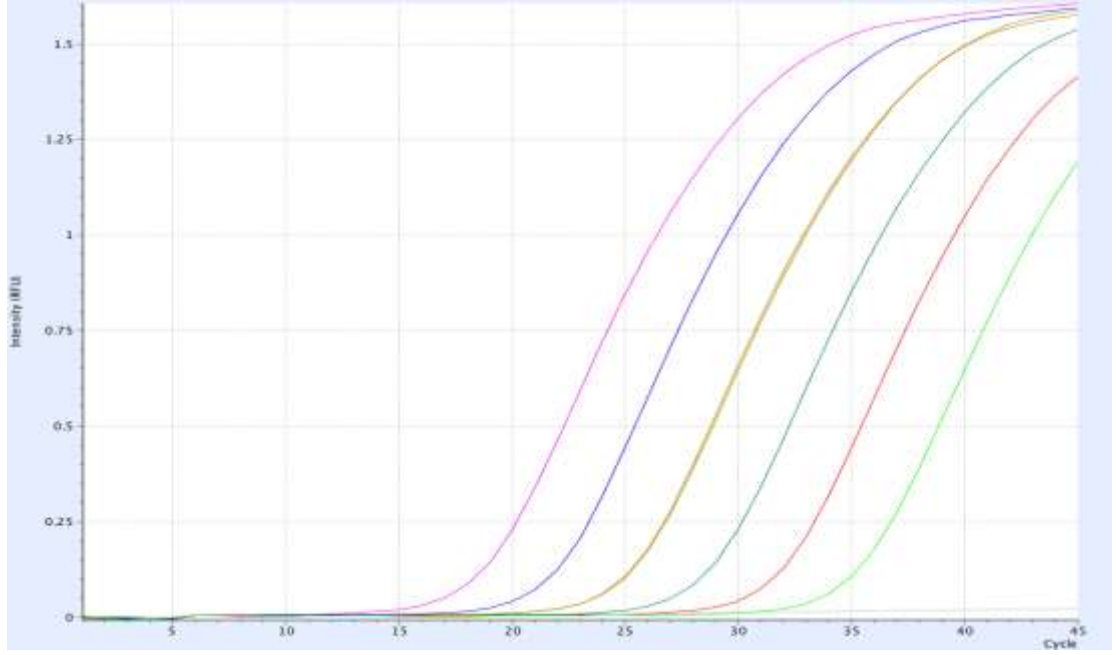
Sıra	Örnek İsmi	ng/ul	260/280	260/230
51c		2153,14	1,84	1,83
52a	G27TY	2013,66	1,85	1,91
52b		2164,38	1,89	1,86
52c		1958,29	1,89	1,85
53a	G27PY	1863,4	1,82	1,64
53b		1936,17	1,89	1,85
53c		1929,79	1,89	1,86
54a	G27PK	3625	1,48	1,65
54b		1933,65	1,89	1,86
54c		1895,22	1,88	1,85
55a	E27TY	1459,99	1,62	1,79
55b		1885,02	1,89	1,85
55c		1926,2	1,88	1,87
56a	E27PY	1986,38	1,86	1,79
56b		1926,07	1,89	1,85
56c		1896,94	1,88	1,87
57a	E27PK	2396,48	1,79	1,9
57b		1885,02	1,89	1,85
57c		1900,4	1,88	1,8
58a	E27TK	1600,65	1,83	1,89
58b		2144,88	1,85	1,65
58c		2166,43	1,85	1,79
59a	S27PY	2759,6	1,84	1,89
59b		2153,14	1,84	1,83
59c		2154,75	1,85	1,83
60a	S27TK	1855,47	1,84	1,89
60b		1900,4	1,88	1,8
60c		1918,45	1,89	1,85
61a	S27PK	1599,89	1,9	1,92
61b		2164,38	1,89	1,86
61c		1926,2	1,88	1,87
62a	S27TY	2126,27	1,83	1,92
62b		1896,94	1,88	1,87
62c		1885,02	1,89	1,85
63a	O27PY	1357,98	1,84	1,83
63b		1929,79	1,89	1,86
63c		1933,65	1,89	1,86
64a	O27TY	2100,95	1,86	1,83

Çizelge 4.1 Sentezlenen cDNA'lara ait saflık ve miktar tayinleri (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ng/ul	260/280	260/230
64b		1958,29	1,89	1,85
64c		1936,17	1,89	1,85
65a	O27TK	2336,15	1,78	1,84
65b		1895,22	1,88	1,85
65c		1885,02	1,89	1,85
66a	O27PK	1628,46	1,86	1,85
66b		1926,2	1,88	1,87
66c		1926,07	1,89	1,85
67a	K27TY	5356,54	1,8	1,84
67b		1933,65	1,89	1,86
67c		1895,22	1,88	1,85
68a	K27PK	2429,03	1,78	1,84
68b		1936,17	1,89	1,85
68c		1929,79	1,89	1,86
69a	K27TK	2284	1,82	1,88
69b		1900,4	1,88	1,8
69c		1918,45	1,89	1,85
70a	K27PY	2161,36	1,81	1,89
70b		2164,38	1,89	1,86
70c		1958,29	1,89	1,85

4.5 Real-Time PCR Uygulaması

Real-time PCR uygulaması Light Cycler Nano (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. cDNA seri dilüsyonlarından hem LEA-3 hem de ACT genleri için oluşturulan standart eğri grafikleri ve bu grafiklere ait validasyon değerleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.24 - 4.27).

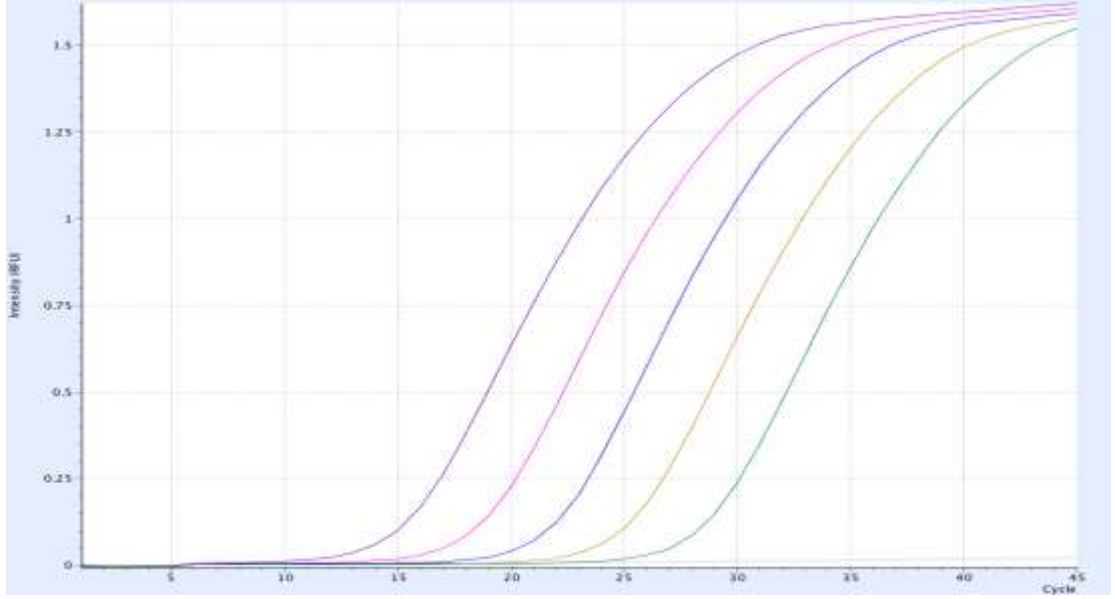


Şekil 4.24 LEA-3 geni standart eğri grafiği oluşturmak üzere PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonları pik görüntüsü

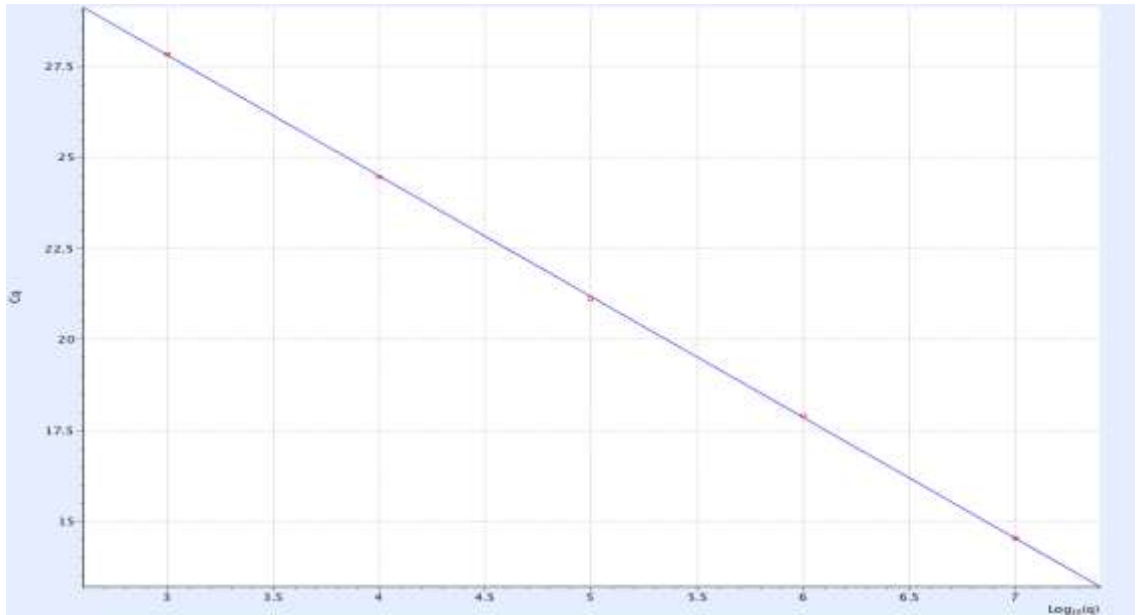


Şekil 4.25 LEA-3 standart eğri grafiği

Efficiency: 2.001 Error: 0.051 Slope: -3.32



Şekil 4.26 ACT geni standart eğri grafiği oluşturmak üzere PCR'ı yapılan cDNA seri dilüsyonları pik görüntüsü



Şekil 4.27 ACT standart eğri grafiği

Efficiency: 2.003 Error: 0.033 Slope: -3.31

Doğru bir standart eğri grafiği oluşturabilmek için oluşturulan grafiğin en az üç cDNA dilüsyonu ile çalışmak gereklidir. Oluşturulan eğrinin yine en az 3 logaritmik

konsantrasyon değerinden geçmesi ve efficiency (etkinlik) değerinin 1,7 ile 2 arasında olması gerekmektedir. Bu değer 2'ye yaklaştıkça güvenilirliği artar. Bu tez kapsamında LEA-3 ve ACT geni standart eğrilerini oluşturabilmek amacıyla 5 logaritmik konsantrasyon kullanılmıştır. Şekillerde görüldüğü gibi LEA-3 ve ACT standart eğri grafikleri kullanılabilir nitelikte birer standart eğri grafiğidir.

4.6 RT-PCR Sonuçları, Sonuçların Normalizasyonu ve İstatistiksel Analizi

Cq değeri olarak belirlenen LEA-3 ve ACT gen ekspresyonu sonuçları çizelge 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
1	YUNUS K-0	21,313	21,521	34,288	34,105
		21,521	21,325	34,595	34,113
		21,223	21,748	34,123	34,328
2	SEHIRALI Y-0	19,344	19,45	29,447	29,85
		19,04	19,28	29,954	29,74
		19,662	19,03	29,88	29,338
3	KARACASEHIR Y-0	20,126	20,88	28,947	28,89
		20,8	20,143	28,472	28,425
		20,153	20,002	28,84	28,443
4	GOYNUK K-0	21,001	21,09	33,166	33,154
		21,37	21,085	33,391	33,89
		21,317	21,14	33,084	33,681
5	GOYNUK Y-0	23,642	23,19	30,203	30,188
		23,522	23,55	30,228	30,24
		23,866	23,89	30,134	30,441

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır) (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
6	KARACASEHIR K-0	20,25	20,189	29,582	30,12
		20,078	20,09	29,081	29,242
		20,179	20,114	29,139	29,021
7	AKMAN K-0	22,218	22,181	25,848	25,5
		22,137	22,084	25,864	25,71
		22,148	22,32	25,689	25,99
8	ONCELER Y-0	24,269	24,388	33,101	33,189
		24,144	24,185	33,161	33,165
		24,166	24,585	33,242	33,279
9	AKMAN Y-0	21,052	21,87	32,479	32,282
		21,826	21,55	32,138	32,379
		21,591	21,46	32,185	32,239
10	ESKISEHIR K-0	17,881	18,87	26,871	26,681
		18,506	18,65	26,834	26,589
		18,512	18,575	26,654	26,526
11	SEHIRALI K-0	20,179	20,83	27,036	26,818
		20,946	20,324	26,737	26,61
		20,149	20,424	27,092	26,26
12	ESKISEHIR Y-0	19,344	19,59	23,231	23,50
		19,04	19,24	23,389	23,32
		19,21	19,32	23,114	23,183
13	ONCELER K-0	22,621	22,288	29,2	29,291
		22,375	22,345	29,186	29,223
		22,335	22,334	29,053	29,088
14	YUNUS Y-0	20,661	20,388	27,656	27,41
		20,724	20,662	27,821	27,486
		20,456	20,464	27,753	27,43
15	K3PK	22,64	22,14	27,579	27,71
		22,53	22,456	27,578	27,65
		22,51	22,287	27,146	27,39
16	K3PY	20,57	20,82	25,733	25,65
		20,75	20,49	25,292	25,487
		20,96	20,47	25,452	25,381
17	K3TK	23,25	22,88	29,575	29,79
		22,81	22,59	30,25	29,67

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır) (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
18	K3TY	22,43	22,77	29,765	29,85
		22,29	21,83	29,506	29,479
		21,96	21,91	29,661	29,37
19	S3PK	21,859	21,87	29,411	29,72
		22,08	22,181	28,464	28,344
		22,22	22,09	28,291	28,245
20	S3PY	22,178	22,36	28,244	28,312
		21,19	21,084	23,932	23,589
		20,76	20,89	23,008	23,285
21	S3TK	21,197	21,117	23,356	23,473
		21,76	21,51	25,834	25,98
		21,34	21,49	25,41	25,53
22	S3TY	21,19	21,26	25,45	25,47
		20,47	20,283	26,997	26,489
		20,11	20,29	26,589	26,643
23	Y3PK	20,198	20,386	26,432	26,552
		22,47	22,14	27,647	27,432
		22,03	22,52	27,585	27,255
24	Y3TY	22,245	22,45	27,563	27,115
		19,67	19,85	29,813	29,92
		19,86	19,89	29,837	29,87
25	Y3TK	19,99	19,87	29,445	29,54
		23,21	23,64	26,727	26,53
		22,75	23,53	26,558	26,55
26	Y3PY	23,65	23,36	26,535	26,37
		19,95	19,48	23,281	22,835
		19,1	19,89	22,963	22,873
27	A3PK	19,31	19,87	23,14	22,721
		23,75	23,62	29,599	29,834
		23,32	23,89	29,621	29,455
28	A3PY	23,56	23,487	29,423	29,488
		20,9	20,53	25,931	25,643
		20,35	20,54	25,642	25,324
29	A3TY	20,35	20,35	25,532	25,145
		20,81	20,79	29,774	29,834

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır) (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
		20,49	20,89	29,422	29,853
		20,45	20,59	29,24	29,436
30	A3TK	23,75	23,83	33,852	33,584
		23,66	23,489	33,919	33,446
		23,89	23,788	33,144	33,535
31	O3TK	21,58	21,34	25,197	25,88
		21,94	21,49	25,714	25,55
		21,45	21,58	25,455	25,17
32	O3PY	21,85	21,84	26,519	26,364
		21,96	21,858	26,187	26,532
		21,64	21,49	26,332	26,65
33	O3PK	22,64	22,954	28,944	28,89
		22,53	22,88	28,396	28,38
		22,46	22,81	28,352	28,85
34	O3TY	21,58	21,149	29,33	28,89
		21,65	21,489	28,913	29,186
		21,53	21,686	29,014	29,22
35	G3TY	20,06	20,42	24,361	24,84
		20,11	20,14	24,756	24,36
		20,43	20,43	24,565	24,74
36	G3PK	22,34	22,846	22,481	22,584
		22,12	22,139	22,674	22,557
		22,131	22,114	22,115	22,848
37	G3PY	19,66	19,738	20,545	20,288
		19,21	19,818	20,749	20,87
		19,18	19,289	20,42	20,485
38	G3TK	21,91	21,86	25,197	25,8
		21,16	21,67	25,506	25,72
		21,80	21,42	25,542	24,92
39	E3TK	20,65	20,457	24,197	24,084
		20,07	20,289	24,275	24,145
		20,077	20,247	23,95	23,84
40	E3PK	22,14	22,68	28,064	28,82
		22,07	22,25	28,674	28,34

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır) (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
41	E3TY	22,537	22,85	28,532	28,25
		20,96	20,82	26,145	26,44
		20,22	20,86	26,061	26,214
42	E3PY	20,45	20,345	26,432	26,54
		20,96	20,86	23,021	23,079
		21,32	21,25	22,827	23,188
43	Y27PK	21,02	21,085	22,983	23,21
		24,96	24,84	34,561	34,132
		24,37	24,65	34,241	34,245
44	Y27TY	24,13	24,85	34,053	34,545
		19,41	19,39	32,05	32,356
		19,43	19,47	32,067	32,774
45	Y27PY	19,55	19,52	32,32	32,453
		18,87	18,68	24,722	24,568
		18,82	18,55	24,36	24,667
46	Y27TK	18,993	18,789	24,87	24,623
		22,35	22,74	32,064	32,24
		22,15	22,83	32,452	32,26
47	A27PY	22,42	22,45	32,326	32,54
		21,16	21,13	27,275	27,245
		21,69	21,85	27,28	27,164
48	A27TK	21,44	21,47	27,128	27,265
		22,44	22,29	34,723	34,336
		22,14	2,35	34,743	34,477
49	A27PK	22,177	22,45	34,567	34,42
		22,83	22,81	34,626	34,42
		22,5	22,85	34,34	34,39
50	A27TY	22,668	22,78	34,53	34,59
		19,21	19,33	24,869	24,80
		19,28	19,25	24,55	24,12
51	G27TK	19,214	19,45	24,84	24,50
		23,91	23,8	29,528	29,51
		23,86	23,84	29,57	29,32
52	G27TY	23,54	23,67	29,31	29,33
		20,02	20,085	29,528	29,24

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır) (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
		20,05	20,19	29,468	29,26
		20,14	20,14	29,51	29,14
53	G27PY	20,01	20,11	29,528	29,23
		20,05	20,22	29,427	29,34
		20,14	20,18	29,43	29,31
54	G27PK	23,53	23,48	29,528	29,65
		23,15	23,59	29,51	29,86
		23,522	23,88	29,321	29,45
55	E27TY	18,22	18,42	27,699	27,34
		18,13	18,19	27,63	27,54
		18,26	18,38	27,52	27,72
56	E27PY	22,84	22,86	34,529	34,379
		22,81	22,789	34,25	34,55
		22,896	22,588	34,73	34,387
57	E27PK	25,47	25,179	33,369	33,41
		25,15	25,4	33,42	33,285
		25,1900	25,388	33,19	33,18
58	E27TK	22,84	22,83	34,529	34,29
		22,6	22,75	34,452	35,65
		22,66	22,45	34,6	34,79
59	S27PY	19,82	19,84	27,789	27,69
		19,58	19,34	27,564	27,83
		19,54	19,45	27,522	27,44
60	S27TK	22,18	22,34	35,108	34,89
		22,13	22,4	34,97	34,78
		22,1	22,001	34,84	34,75
61	S27PK	21,53	21,9	29,705	21,92
		21,6	21,67	29,65	29,86
		21,62	21,55	29,52	29,63
62	S27TY	22,18	22,33	35,108	35,192
		22,17	22,04	35,00	35,187
		22,24	22,29	35,2	35,085
63	O27PY	22,22	22,30	32,961	32,33
		22,03	22,09	32,86	32,46
		22,14	22,19	32,789	32,86

Çizelge 4.2 LEA-3 ve ACT genine ait Real-Time PCR Nano cihazından alınan tüm cq değerleri (Çalışma 3 biyolojik ve 2 teknik tekrar içerdiği için her bir örnek için 6 adet cq değeri bulunmaktadır) (devam)

Sıra	Örnek İsmi	ACT cq değerleri		LEA-3 cq değerleri	
64	O27TY	23,06	23,26	36,901	35,83
		23,05	23,29	36,0	35,85
		23,67	23,39	35,9	35,97
65	O27TK	23,06	22,61	34,401	34,084
		22,86	22,78	34,01	34,03
		22,85	22,589	33,0	33,85
66	O27PK	24,32	24,386	35,437	35,208
		24,13	24,288	35,12	35,18
		24,26	24,15	35,25	35,3
67	K27TY	23,15	23,08	35,405	35,125
		23,18	23,04	35,2	35,186
		23,2	23,188	35,18	35,25
68	K27PK	27,74	27,71	36,672	36,384
		27,06	27,3	36,2	36,14
		27,5	27,59	36,18	36,386
69	K27TK	23,15	23,182	35,405	35,058
		23,56	23,48	35,23	35,28
		23,18	23,189	35,321	35,185
70	K27PY	27,74	27,281	36,193	36,49
		27,17	27,1	36,2	36,086
		27,59	27,289	36,01	36,085

Hedef gen olan LEA-3 geni ifadesine ait sonuçlar housekeeping gen olarak çalışmada kullanılan ACT (aktin) ve kontrol şartları dikkate alınarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata ve standart sapmaları hesaplanmış ve örneklerin kontrollerine göre farklılaşan gen ekspresyonu seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı One Way ANOVA (Dunnet) metodu kullanılarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Tüm örneklerin LEA-3 genine ait normalize edilmiş gen ekspresyonu verilerinin ortalaması alınarak, elde edilen veriler ile LEA-3 gen ifadesi düzeyini gösteren grafikler çizilmiştir.

Çizelge 4.3 Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata, standart sapmaları ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları

No	Örnek ismi	Ortalama Cq değerleri	Standart Hata	Standart Sapma	Anlamlılık derecesi (p değeri)
1	Kontrol	1	-	-	-
2	K3PK	18,37773085	0,14396	0,287	7,97.E ⁻⁹
3	O3PK	1,56115105	0,30535	0,610	0,547*
4	Y3PK	245,4986866	0,42274	0,8439	7,9744.E ⁻⁹
5	A3PK	0,191530465	0,16811	0,336	0,199*
6	G3PK	3931,108831	0,45245	0,906	7,13.E ⁻⁹
7	E3PK	5,520365754	0,24908	0,481	8,09.10
8	S3PK	3,309962931	0,042	0,496	2,106.E-5
9	K3PY	11,12751215	0,14396	0,181292	7,974456.E ⁻⁹
10	O3PY	21,53914694	0,30535	0,04991	7,9744.E ⁻⁹
11	Y3PY	142,202897	0,42274	0,21716	7,9744.E ⁻⁹
12	A3PY	52,14024415	0,16811	0,005	7,9744.E ⁻⁹
13	G3PY	174,5094575	0,42245	0,146401	8,2463.E ⁻⁹
14	E3PY	5,130327071	0,23997	0,1812	9,183.E ⁻⁶
15	S3PY	37,55314498	0,24908	0,236291	7,9744.E ⁻⁹
16	K3TK	5,140403033	0,09065	0,0573	7,9744.E ⁻⁹
17	O3TK	8,220246804	0,02476	0,005	7,9744.E ⁻⁹
18	Y3TK	802,1004122	0,10830	0,024495	3,317.E ⁻⁸
19	A3TK	0,010984371	0,00231	0,005	7,9744.E ⁻⁹
20	G3TK	368,5806978	0,07377	0,0310	7,9744.E ⁻⁹
21	E3TK	28,78770128	0,09043	0,0282	7,9744.E ⁻⁹
22	S3TK	17,88963947	0,11823	0,005	7,9744.E ⁻⁹
23	K3TY	1,81610862	0,2749	0,01291	7,9744.E ⁻⁹

Çizelge 4.4 Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata, standart sapmaları ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları (devam)

No	Örnek ismi	Ortalama Cq değerleri	Standart Hata	Standart Sapma	Anlamlılık derecesi (p değeri)
24	O3TY	2,58865635	0,00078	0,005	7,9744.E ⁻⁹
25	Y3TY	65,80264983	0,01235	0,014142	7,9744.E ⁻⁹
26	A3TY	3,995593685	0,00050	0,03304	7,9744.E ⁻⁹
27	G3TY	72,99462717	0,1657	0,005	7,9744.E ⁻⁹
28	E3TY	1,167704945	0,1425	0,005774	0,00347
29	S3TY	12,12512808	0,00228	0,03304	7,9744.E ⁻⁹
30	K27PK	0,913451074	0,02749	0,01291	0,273*
31	O27PK	0,043941712	0,00078	0,0057	2,355.E ⁻⁸
32	Y27PK	10,70762402	0,01235	0,005	2,47.E ⁻⁸
33	A27PK	0,003219729	0,00050	0,01443	5,295.E ⁻⁹
34	G27PK	69,01694681	0,01657	0,020616	3,68.E ⁻¹⁴
35	E27PK	1,560949106	0,01425	0,022174	0,00031
36	S27PK	0,295073547	0,00228	0,146401	9,37.E ⁻⁷
37	K27PY	0,754656364	0,00702	0,1812	0,00034
38	O27PY	0,272287545	0,00076	0,236291	2,465.E ⁻⁸
39	Y27PY	34,45306144	0,00714	0,0573	3,1192.E ⁻¹⁶
40	A27PY	2,252972345	0,00477	0,610	1,37.E ⁻⁶
41	G27PY	40,66869481	0,00723	0,8439	0
42	E27PY	0,005245901	0,000003	0,336	0
43	S27PY	3,985410193	0,01686	0,906	2,496.E ⁻⁸
44	K27TK	0,139336625	0,00132	0,03304	2,49.E ⁻⁸
45	O27TK	0,006618486	0,00008	0,005	0
46	Y27TK	11,14308457	0,00099	0,005774	0
47	A27TK	0,002317608	0,0004	0,014142	0

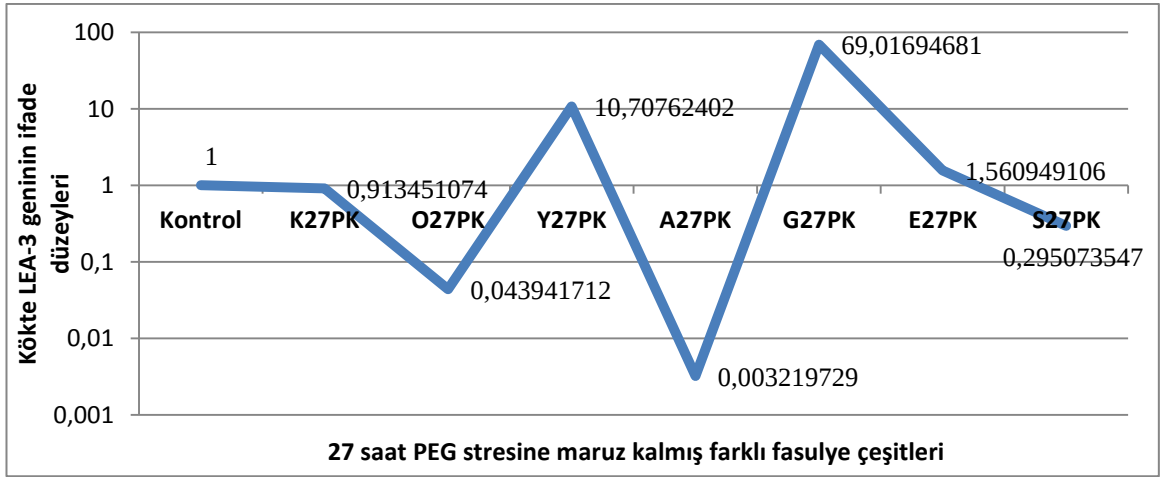
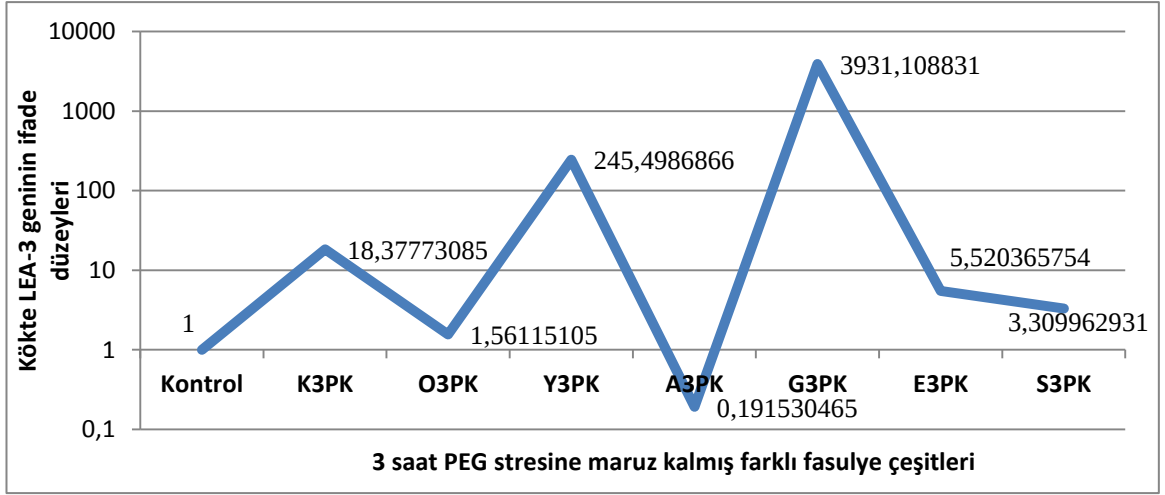
Çizelge 4.5 Normalizasyon ile elde edilen gen ekspresyonu verilerinin ortalama, standart hata, standart sapmaları ve kontrole göre olan istatistiksel analiz sonuçları (devam)

No	Örnek ismi	Ortalama Cq değerleri	Standart Hata	Standart Sapma	Anlamlılık derecesi (p değeri)
48	G27TK	99,70472046	0,01480	0,03304	0
49	E27TK	0,115615565	0,00622	0,005	7,21.E ⁻⁶
50	S27TK	0,010515922	0,00082	0,181292	2,37.E ⁻⁶
51	K27TY	0,065485305	0,00116	0,04991	2,46.E ⁻⁸
52	O27TY	0,03160396	0,00163	0,21716	2,65.E ⁻⁸
53	Y27TY	5,020872018	0,00153	0,005	2,51.E ⁻⁸
54	A27TY	0,132585968	0,00888	0,146401	7,40.E ⁻⁶
55	G27TY	39,63244841	0,01088	0,1812	9,39.E ⁻¹³
56	E27TY	0,023763356	0,00003	0,236291	0
57	S27TY	0,137698309	0,01152	0,0573	1,402.E ⁻⁶

* p>0.05 İstatistiki olarak anlamsız

4.6.1 100 mM Tuz Stresiyle Eş PEG Stresi Altındaki Fasulye Çeşitlerinde LEA-3 Geni mRNA Düzeyleri

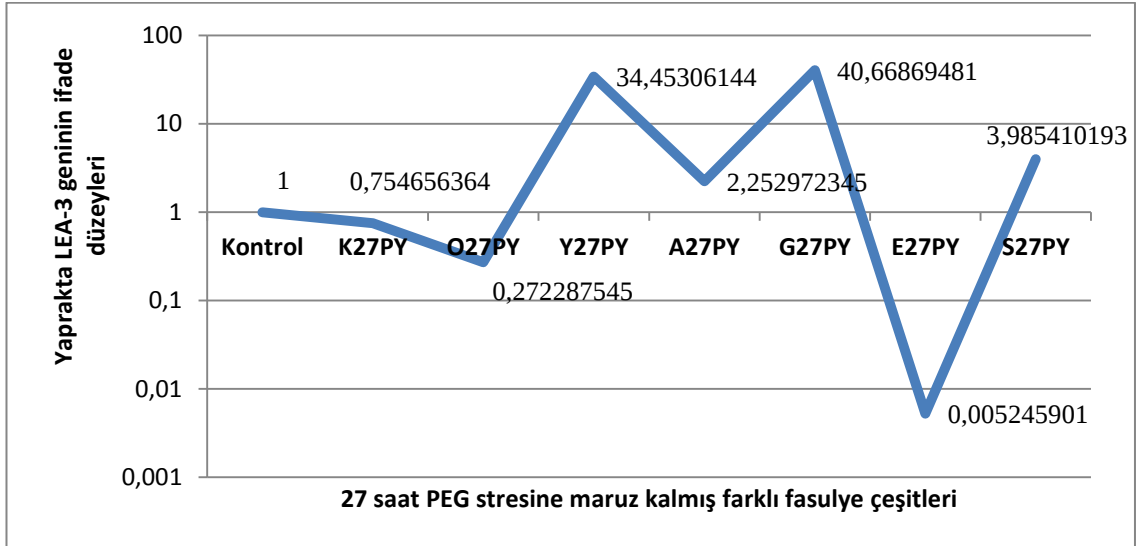
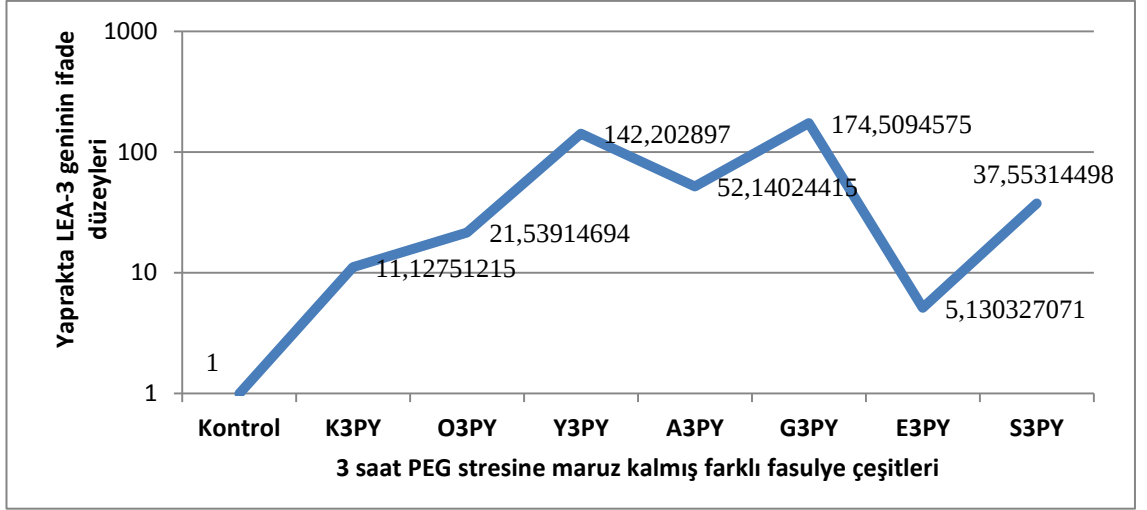
100 mM tuz stresiyle eş PEG stresine maruz kalmış 7 farklı fasulye çeşidi köklerinde stresin 3. ve 27. saatlerinde LEA-3 geninin housekeeping gen ve kontrole göre normalize edilerek elde edilmiş olan ifade düzeyleri şekil 4.28’de gösterilmektedir.



Şekil 4.28 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin köklerindeki mRNA seviyeleri

Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir. Ayrıca her çeşide ait Real-Time PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.

100 mM tuz stresine eş PEG stresine maruz kalmış 7 farklı fasulye çeşidi yapraklarında stresin 3. ve 27. saatlerinde LEA-3 geninin ifade düzeyleri şekil 4.29'da gösterilmektedir.

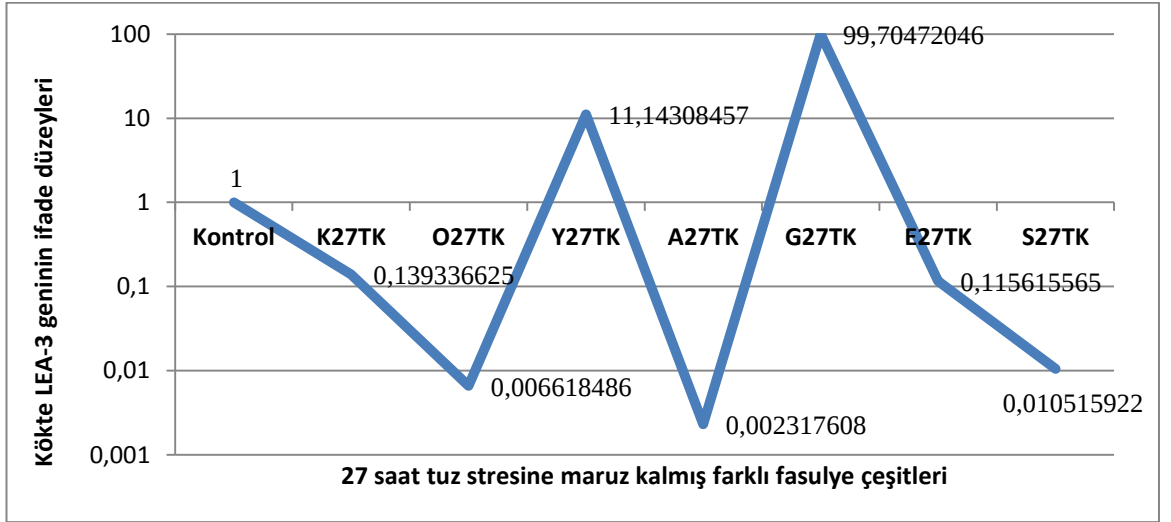
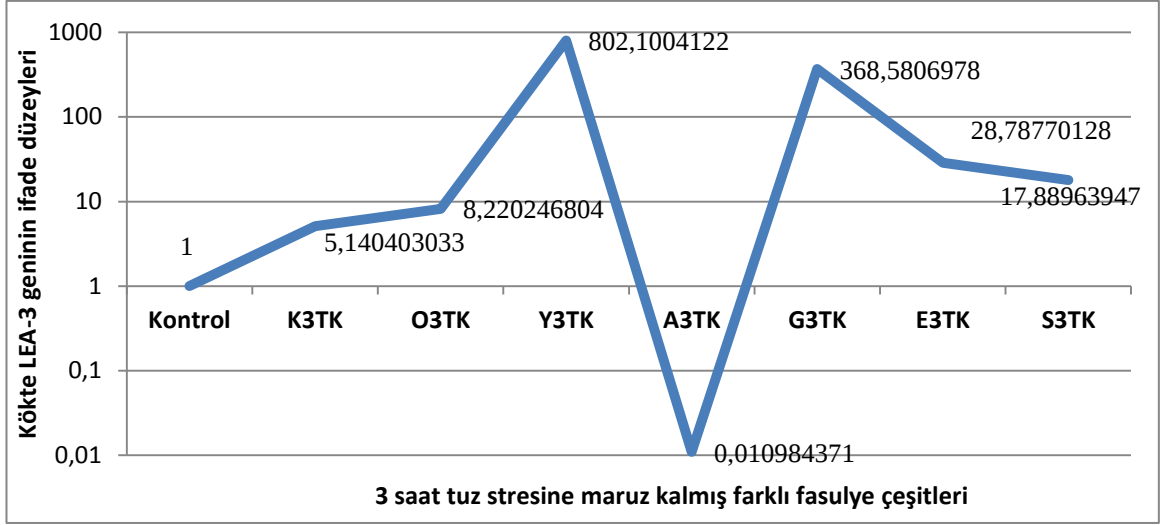


Şekil 4.29 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA seviyeleri

Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir. Ayrıca her çeşide ait Real-Time PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.

4.6.2 100 mM NaCl stresi altındaki fasulye çeşitlerinde LEA-3 Geni mRNA düzeyleri

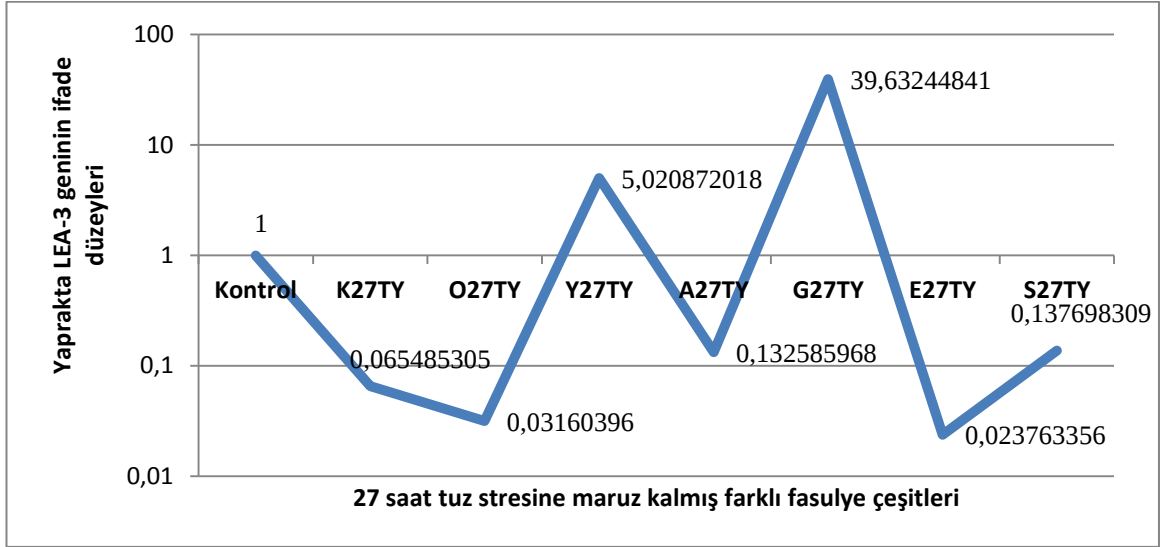
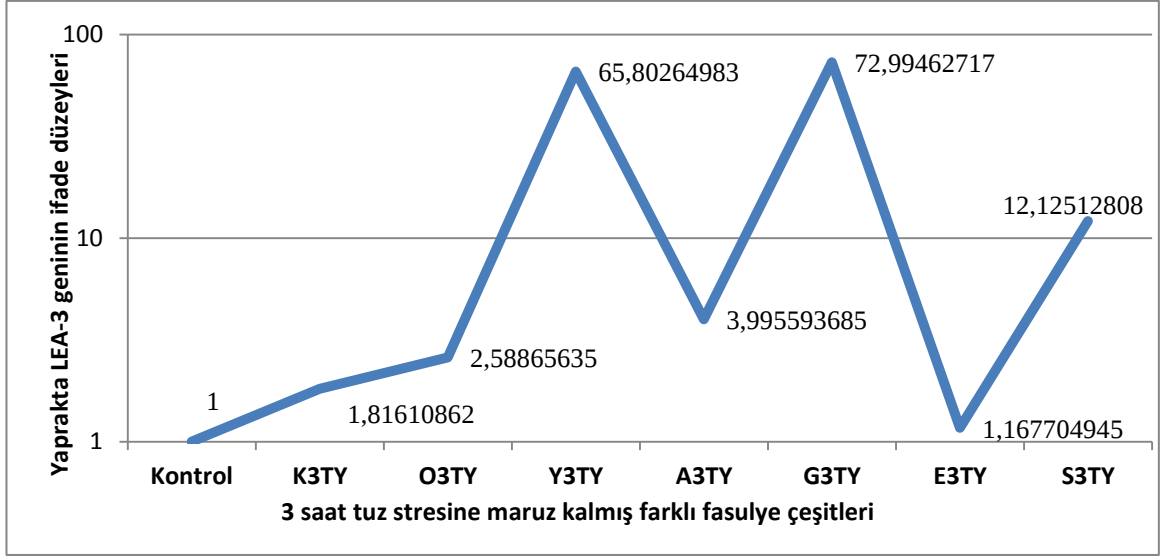
100 mM NaCl stresine maruz kalmış 7 farklı fasulye çeşidi köklerinde stresin 3 ve 27. saatlerinde LEA-3 geninin ifade düzeyleri şekil 4.30'da gösterilmektedir.



Şekil 4.30 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat tuz (NaCl) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin köklerindeki mRNA seviyeleri

Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir. Ayrıca her çeşide ait Real-Time PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.

100 mM NaCl stresine maruz kalmış 7 farklı fasulye çeşidi yapraklarında stresin 3. ve 27. saatlerinde LEA-3 geninin ifade düzeyleri şekil 4.31’de gösterilmektedir.



Şekil 4.31 LEA-3 geninin 3 ve 27 saat tuz (NaCl) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA seviyeleri

Değerler kontrole göre olan kat artış ve azalışlarını ifade etmektedir). Ayrıca her çeşide ait Real-Time PCR verileri kendi kontrolüne göre normalize edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada; farklı sürelerde 100 mM tuz ve 100 mM tuz stresine eş PEG stresi uygulanmış 7 farklı fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris*) stres savunmasında ilişkili olduğu düşünülen LEA-3 geninin kök ve yapraktaki mRNA seviyeleri belirlenmiş ve bu yolla genin strese karşı geliştirilen tolerans mekanizmasındaki etkisi araştırılmıştır. Çalışılan çeşitlerdeki MDA düzeylerinin tespitiyle birlikte tuz ve PEG stresinin çeşitlerde oluşturduğu oksidatif hasar saptanarak, MDA düzeyleri bakımından çeşitlerin strese karşı olan dayanıklılıkları ortaya çıkarılmıştır. Çeşitlerin morfolojik özelliklerinden de faydalanılmak suretiyle MDA düzeyleri ve LEA-3 geninin ifade düzeyleri arasında ilişkilendirme yapılarak çeşitlerin tolerans kabiliyetleri karşılaştırılmıştır.

Oksidatif strese neden olan serbest radikaller hücreyi oluşturan tüm yapılarla reaksiyona girebilirler ancak bu etkileşime en hassas yapılar lipitlerdir (Cheeseman 1993). Serbest oksijen radikallerinin dokulara etkisi ile oluşan, lipit peroksidasyonu esnasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen, oldukça reaktif olan metabolik ürünlerden bir tanesi malondialdehit (MDA)'tir (Rao vd. 2005). Plazma MDA düzeyinin belirlenmesi dokulardaki lipit peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin hassas göstergelerinden biridir (Knight vd. 1988). MDA uzun ömürlü olması ve yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve hücre dışında bulunan protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan yapısal ve fonksiyonel hasarların ortaya çıkmasına neden olur (Rao vd. 2005).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında MDA analizinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitleri hariç diğer bütün çeşitlerde hem tuz hemde PEG stresi altında stresin 3. ve 27. saatinde MDA düzeylerinin çoğunlukla kontrole göre artış gösterdiği gözlenmektedir (Şekil 4.9-4.22). Bu durum tuz ve PEG stresi altında Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitleri dışındaki tüm fasulye çeşitlerinde stresin lipit peroksidasyonu üzerinde etkili olduğuna işaret etmektedir. Diğer bir ifadeyle bu çeşitlerin stresten olumsuz etkilendikleri, membran lipitlerindeki peroksidasyon seviyesinin arttığı yani membran bütünlüğünün bozulduğu söylenebilir. Çalışılan

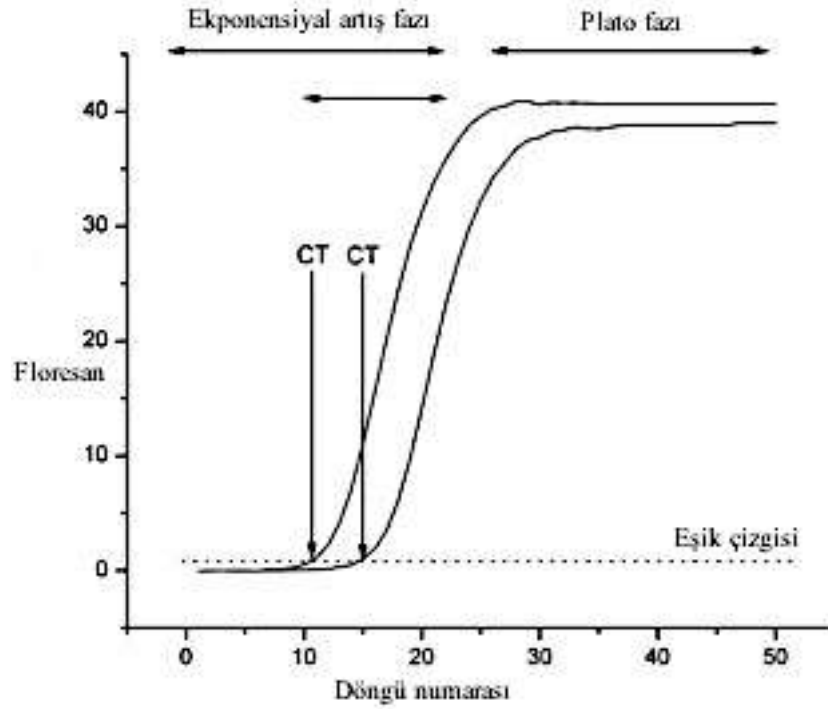
çeşitler arasında Göynük-98 ile Yunus-90 en toleranslı, Karacaşehir-90 ise en hassas çeşit olarak belirlenmiştir. Diğer çeşitler ise araform olarak değerlendirilmektedir. Günümüze dek gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda MDA miktarının genotiplerin strese karşı olan toleranslarının değerlendirilmesinde kullanılabildiği görülmektedir (Yaşar 2003, Terzi vd. 2010).

Çalışmada MDA analizleri sonucunda elde edilen bulguların literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu gözükmemektedir. Terzi vd. (2010)'nin topraktaki kuraklık stresinin *Phaseolus vulgaris* çeşitlerindeki etkilerini inceledikleri çalışmasında, Göynük-98, Karacaşehir-90, Şehirali-90, Eskişehir-855 ve Yunus-90 çeşitleri kullanılmıştır. Kuraklık stresi altındaki çeşitlerde lipid peroksidasyonu analizi yapılmış ve bu çalışmanın sonuçlarını destekler nitelikte Yunus-90 çeşidi kuraklığa en toleranslı çeşit olarak bulunmuştur (Terzi vd. 2010). Terzi vd. (2010)'nin çalışmasında yine gerçekleştirdiğimiz çalışma ile benzer şekilde Karacaşehir-90 çeşidi MDA düzeyinin diğer çeşitlere nazaran daha yüksek olması sebebiyle kuraklığa karşı en hassas çeşit olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.18).

7 farklı kuru fasulye çeşidindeki gen ifadesi analizleri için kantitatif Real-Time PCR (Kantitatif gerçek zamanlı PCR) yöntemi kullanılmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, reaksiyon sırasında her döngü sonunda oluşan ürün miktarının, boya ya da probın hedef bölgeye hibridize olması sonucu oluşan ışımanın (floresans) kamera ile görüntülenmesiyle gerçek zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir.

Kantitatif gerçek zamanlı PCR, oluşan ürüne bağlanan ışıyı veren raportöre gereksinim duyar. Raportör oluşan ürün miktarını yansıtan floresans sinyal oluşturur. PCR döngüleri sonucunda oluşan kısa sekanslara ampikon adı verilir. Başlangıç PCR döngülerinde kantitatif gerçek zamanlı PCR'da sinyal zayıftır. Sinyalin güçlenmesi ampikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik seviyeye ulaşması için gereken döngü sayısına CT (threshold cycle = eşik değer döngü) veya CQ (Cycle quantification) değeri adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri CT veya CQ değeri aşıldıktan sonra logaritmik

olarak artar (Kubista vd. 2006).



Şekil 5.1 Gerçek zamanlı PCR cevap eğrileri (Kubista vd. 2006)

Gerçek zamanlı PCR’da floresans raportörler kullanılmaktadır. Hedef bölgenin çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği anda floresans raportörlerden alınan sinyal artan miktarda gözlenir. Kullanılan raportörler moleküler beacon, Taqman prob, hibridizasyon probu, LightUp prob, simple prob, scorpion primer ya da SYBR Green ve BOXTO gibi boyalar olabilir (Kubista vd. 2006).

Hedeflenen genlerin stres koşulları altındaki davranışlarının Real-Time PCR yöntemiyle takip edilmesi genlerin fonksiyonlarının sınanmasına ve stresle ilişkili olan genlerin tanımlanmasına olanak tanımaktadır. Bu kapsamda gerek ulusal gerek uluslararası düzeyde Real-Time PCR yöntemi kullanılarak yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Wu vd. 2004, Soydam vd. 2013).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, MDA analizini takiben hedef gen olan LEA-3 geninin farklı çeşitlerin kök ve yaprak dokularında her iki stres koşulundaki ifade düzeyleri

Real-Time PCR yöntemiyle SYBR Green I boyası kullanılarak araştırılmıştır. Kontrol ve housekeeping gene göre gerçekleştirilen normalizasyon sonucunda elde edilen verilere bakıldığında bütün koşullarda tüm fasulye çeşitlerinde LEA-3 geninin ifadesinde kontrole göre farklılıklar meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.28-4.31).

Kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinde stresin 3. saatinde Akman-98 çeşidi haricindeki diğer tüm çeşitlerde LEA-3 geninin kökteki ifadesinin kontrole göre istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir. En fazla artış Göynük-98 (yaklaşık 4000 kat) ve Yunus-90 (245 kat) çeşitlerinde belirlenirken, Akman-98 çeşidinin ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.28). LEA-3 geninin aynı koşullar bakımından yapraktaki ifadesine bakıldığında ise tüm çeşitlerde benzer şekilde genin ifadesinde kontrole göre istatistiki olarak anlamlı artışlar olduğu bulunmuştur. Kökte olduğu gibi yaprakta da LEA-3 geninin ifadesi en fazla Göynük-98 (174 kat) ve Yunus-90 (142 kat) çeşitlerinde artmıştır (Şekil 4.29). Ancak LEA-3 geninin Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinde kök ve yapraktaki ifade düzeyleri karşılaştırıldığında kökteki ifadenin yaprağa göre Yunus-90 çeşidinde yaklaşık 2 kat Göynük-98 çeşidinde yaklaşık olarak 20 kat daha fazla olduğu görülmektedir.

Kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin köklerinde stresin 27. saatinde Göynük-98, Yunus-90 ve Eskişehir-855 çeşitleri haricinde diğer tüm çeşitlerdeki LEA-3 geni ifadesinin kontrol seviyesinin altında olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.28). Karacaşehir-90 çeşidi haricindeki diğer tüm çeşitlerde gen ifadesinde kontrole göre meydana gelen farklılaşmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. LEA-3 geninin yapraktaki ifadesine bakıldığında ise yine kökte olduğu gibi Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinde ifadenin en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29).

Tuz stresine maruz kalmış fasulye çeşitlerinin köklerinde stresin 3. saatinde LEA-3 geni ifadesinin tüm çeşitlerde kontrole göre istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.30). En yüksek artışlar Göynük-98 (368 kat) ve Yunus-90 (800 kat) çeşitlerindedir. LEA-3 geni fasulye çeşitlerinin yapraklarında da benzer bir profil sergilemiştir. Tüm fasulye çeşitlerinin yapraklarında LEA-3 geni ifadesi kontrol

seviyesinden yüksek bulunmuştur. Köklerde olduğu gibi LEA-3 geni ifadesinin en yüksek olduğu çeşitler yine Göynük-98 (72 kat) ve Yunus-90 (65 kat) çeşitleridir (Şekil 4.31). 3 saat tuz stresi altında kök ve yapraklardaki gen ifadelerinin mukayese edilmesi durumunda Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitleri bakımından kökteki artışın yapraktakinden fazla olduğu dikkat çekmektedir.

Tuz stresinin 27. saatinde Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitleri haricindeki diğer tüm çeşitlerin köklerinde LEA-3 geni ifadesinin kontrolün altında olduğu ve gen ifadesinde istatistiki olarak anlamlı ciddi düşüşler olduğu görülmektedir (Şekil 4.30). Yapraklarda da benzer bir durum söz konusudur. Göynük-98 çeşidi haricinde tüm çeşitlerin yapraklarında LEA-3 geni ifadesi kontrolün altında düşüş sergilemiştir (Şekil 4.31). Diğer tüm koşullardada olduğu gibi Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerindeki LEA-3 geninin ifadesinin diğer çeşitlere göre ve özellikle kökte daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tüm Real-Time PCR verilerinin birlikte değerlendirilmesi durumunda stresle ilişkili olduğu düşünülen LEA-3 geninin Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinde sürekli olarak kontrol seviyesinin üzerinde ifade olduğu gözlenmektedir. Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinin gen ifadelerinin mukayese edilmesi durumunda ise Göynük-98'deki LEA-3 geni ifadesinin tüm koşullar altında hem yaprak hemde kökte Yunus-90 çeşidinden daha fazla olduğu belirlenmiştir.

RT-PCR ve MDA verilerinin birlikte değerlendirilmeleri durumunda Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinde stres koşulları altında kontrole ve diğer tüm çeşitlere göre MDA düzeylerinin düşük, LEA-3 geninin ifade seviyesinin yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitlerinin çalışılan diğer çeşitlere oranla 100 mM tuz ve PEG streslerine karşı daha toleranslı olduklarının göstergesi olabilir. Literatürde bu fasulye çeşitleriyle ulusal ve uluslararası ölçekte gerçekleştirilmiş gen ifadesi çalışmasına rastlanmamıştır ve dolayısıyla karşılaştırma yapılması mümkün değildir. Ancak Terzi vd. (2010) gerçekleştirdikleri çalışmada Göynük 98, Karacasöğür 90, Söğür 90, Eskişehir 855 ve Yunus 90 kuru fasulye

çeşitlerinin kuraklık stresi altında antioksidan enzim aktivitelerini ve MDA düzeylerini incelemişlerdir. Bu çalışmada en düşük MDA seviyesi Göynük 98 çeşidinde gözlenirken diğer tüm parametreler değerlendirildiğinde kuraklığa en toleranslı çeşit Yunus 90 çeşidi olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmadan elde ettiğimiz MDA sonuçlarının tutarlı bir şekilde Terzi vd.'nin (2010) çalışmasıyla örtüştüğü gözlenmektedir.

Barrera-Figueroa vd.'nin (2007) Meksikan *Pinto Villa* çeşidinde blotlama yöntemiyle gerçekleştirdikleri çalışmada *PvLEA3* geninin tuz, kuraklık ve soğuk stresi altında köklerde yüksek oranda ifade olduğunu belirlemişlerdir. Bu genin özellikle kuraklıkla ilgili bir gen olduğunu ve bu konudaki moleküler çalışmaların devamının gelmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlarda bu çalışmayla benzer şekilde LEA-3 geninin tuz ve kuraklık stresine karşı savunmada rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda bu genin farklı fasulye çeşitlerinin tuz ve kuraklık tolerans yeteneklerinin saptanmasında erken seleksiyon çalışmaları açısından kullanılabileceği düşünülmektedir.

Colmenero-Flores vd. (1999) yılındaki çalışmasında, fasulye bitkisinde yeni bir LEA proteini olarak *PvLEA-18* proteinini tanımlamışlardır. Bu proteinin ve onu kodlayan gen transkriptinin su stresi altındaki miktarlarına bakmışlar ve bu proteinin ve kodlayan gen transkriptlerinin stres altında özellikle kök meristematik dokularında daha fazla olduğunu ispatlamışlardır.

Gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında stresin LEA-3 geni üzerindeki erken ve geç etkilerini araştırmak amacıyla 3 ve 27. saatler seçilmiştir. Tüm stres parametreleri göz önünde bulundurulduğunda LEA-3 geninin tüm çeşitlerde 3. saatte 27. saate göre daha fazla ifade olduğu görülmektedir. Hatta Göynük-98 ve Yunus-90 çeşitleri haricinde diğer tüm fasulye çeşitlerinde 27. saatteki LEA-3 geni ifadesinin kontrolün altında düşüş sergilediği belirlenmiştir. Şimdiye dek farklı bitkilerde tanımlanmış ve analiz edilmiş LEA genlerinin büyük çoğunluğunun çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak kuraklık periyodunun başlangıcında en üst seviyelerde ifade olduğu ve

ilerleyen saatlerde keskin düşüşler sergilediğine dair literatur bilgisi bulunmaktadır (Brands ve Ho 2002, Wang vd. 2002, Barrera-Figueroa vd. 2007, Kavar vd. 2008).

Gerçekleştirilen tez çalışmasından elde edilen bulgular LEA-3 geninin fasulye çeşitlerinde strese karşı olan savunmada rol oynayabileceğini gözler önüne sermektedir. Ayrıca LEA-3 geninin farklı fasulye çeşitlerinin tuz ve kuraklık streslerine karşı olan dayanıklılıklarının değerlendirilmesinde bir moleküler markör olarak kullanılabileceği görüşünü ortaya koymaktadır. Bilindiği üzere gelecekte artacağı tahmin edilen dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için gerekli temel besin maddelerinin üretiminin artırılmasına ihtiyaç vardır. Markörler yardımıyla erken seleksiyon önemli bir konu oluştururken, genetik manupulasyonlar kullanılarak strese karşı dayanıklı çeşitler geliştirmek de günümüz bitki biyoteknolojisinin özel konuları arasındadır. Genetik manupulasyonların yapılması için öncelikle şüpheli olan genlerin kontrollü şekilde sınanmaları gerekmektedir. Bu çalışma ile LEA-3 geninin fasulye bitkisinde bu ileri çalışmalar için iyi bir aday gen olduğu gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Artus, N.N., Uemura, M., Steponkus, P.L., Gilmour, S.J., Lin, C. and Thomashow, M.F. 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13404-13409.
- Abba, S., Ghignone, S. and Bonfante, P. 2006. A dehydration-inducible gene in the truffle *Tuber borchii* identifies a novel group of dehydrins. *BMC Genomics*, 7, 39-53.
- Ali-Benali, M.A., Alary, R., Joudrier, P. and Gautier, M.F. 2005. Comparative expression of five *Lea* genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1730, 56-65.
- Almoguera, C. and Jordano, J. 1992. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular weight heat- shock protein and *Lea* mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 19, 781-792.
- Amara, I., Capellades, M., Ludevid, M. D., Pagès, M. and Goday, A. 2013. Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing *LEA Rab28* gene. *Journal of plant physiology*, 170(9), 864-873.
- Anonim. 2013. Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Web Sitesi: <http://www.ataem.gov.tr/tesces.asp?s1=147&s2=59>, Erişim Tarihi: 20.01.2014.
- Anonim. 2011. Web Sitesi: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, Erişim Tarihi: 26.01.2014.
- Anonim. 2012. TÜİK Web Sitesi: <http://www.tuik.gov.tr/Start.do>. Erişim Tarihi: 03.01.2014.
- Anonymous. 2011. FAOSTAT Web Sitesi: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. Erişim Tarihi: 04.01.2014.
- Ashraf, M. 1999. Interactive effect of salt (NaCl) and nitrogen form on growth, water relations and photosynthetic capacity of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Annals of Applied Biology*, 135, 509-513.
- Ashraf, M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199, 361-376.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.

- Baker, J., Steele, C. and Dure, L. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*, 11, 277–291.
- Barrera-Figueroa, B., Pena-Castro, J., Acosta-Gallegos, J.A., Ruiz-Medrano, R. and Xoconostle-Cazares, B. 2007. Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. *Functional Plant Biology*, 34, 368-381.
- Ben Ammar, W., Nouairi, I., Tray, B., Zarrouk, M., Jemal, F. and Ghorbel, M.H. 2005. Cadmium effects on mineral nutrition and lipid contents in tomato leaves (in French). *Journal de la Société de Biologie*, 199, 157-163.
- Bhagi, P., Zhawar, V.L. and Gupta, A.K. 2013. Antioxidant response and *Lea* genes expression under salt stress and combined salt plus water stress in two wheat cultivars contrasting in drought tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 746-757.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R. and Delseny, M. 2008. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 67, 107–124.
- Boscaui, M., Bautista, C.L.I., Donat, P., Mayoral O. and Vicente, O. 2008. Plant responses to abiotic stress in their natural habitats. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 65(1), 53-58.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443-448.
- Brands, A. and Ho, T-HD. 2002. Function of a Plant Stress-Induced Gene, HVA22. Synthetic Enhancement Screen with Its Yeast Homolog Reveals Its Role in Vesicular Traffic, *Plant Physiology*, 130, 1121-1131.
- Bray, E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103, 1035 - 1040.
- Breton, G., Danyluk, J., Charron, J.B. and Sarhan, F. 2003. Expression profiling and bioinformatics analyses of a novel stress-regulated multispanning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 64-74.
- Browne, J.A., Dolan, K.M., Tyson, T., Goyal, K., Tunnacliffe, A. and Burnell, A.M. 2004. Dehydration-Specific Induction of Hydrophilic Protein Genes in the Anhydrobiotic Nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell*, 3, 966-975.
- Büyük, İ., Aydın, S. ve Aras, S. 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (2), 97-110.

- Cheeseman, K.H. 1993. Lipid peroxidation and cancer. In: DNA and Free Radicals. Halliwell, B., Aruoma, O.I. Eds, New York: Ellis Horwood, pp. 109-144.
- Chen, J.B., Wang, S.M., Jing, R.L. and Mao, X.G. 2009. Cloning of PvP5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its response to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 166, 12–16.
- Cheng, Z., Targolli, J., Huang, X. and Wu, R. 1959. Wheat LEA genes, PMA80 and PMA enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 10, 71-82.
- Chiba, H., Hattori, T., Yamada, H. and Iwata, M. 2006. Comparison of the effect of chemical anesthesia and electroanesthesia on plasma cortisol level in the Japanese eel *anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 72, 693-695.
- Chomczynski, P. and Mackey, K. 1995. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques Short technical report*, 19(6), 942-945.
- Çırak, C. ve Esendal, E. 2006. Soyada Kuraklık Stresi. *Omü Zir. Fak. Dergisi*, 21(2), 231-237.
- Close, T.J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Plant Physiology*, 97, 795–803.
- Cohen, S., Tyrrell, D. A. J. and Smith, A. P. 1991. Psychological stress and susceptibility to the common cold. *New England Journal of Medicine*, 325, 606-612.
- Cortez-Baheza, E., Cruz-Fernandez, F., Peraza-Luna, F., Aguado-Santacruz, G.A., Serratos-Arevalo, J.C., Ponce, P.P., Gonzalez-Chavira, M.M., Torres-Pacheco, I., Guevara-Olvera, L. and Guevara-Gonzalez, R.G. 2008. A New Lea Gene is Induced During Osmopriming of *Capsicum annuum* L. Seeds. *International Journal of Botany*, 4, 77-84.
- Cruz de Carvalho, M.H., Laffray, D. and Louguet, P. 1998. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 40, 197–207.
- Cuming, A. 1999. LEA proteins. In R Casey, PR Shewry, eds, *Seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 753–780, Netherlands.
- Dunnet, C.W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50, 1096-1121.
- Dure, L. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal*, 3, 363–369.

- Dure, L., Crouch, M., Harada, J.J., Ho, T., Mundy, J., Quatrano, R.S., Thomas, T.L. and Sung, Z.R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 12, 475–486.
- Dure, L., Greenway, S.C. and Galau, G.A. 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20, 4162.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sucgang, R. and Berriman, M. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435, 43–57.
- Ellialtıoğlu, Ş. ve Tıprıdamaz, R. 1998. Doku Kültürünün Tuz Stresine Dayanıklılıkta Kullanımı. Bitkilerde stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu, 70-81, Bornova-Izmir.
- Espelund, M., De Bebout, J.A., Outlaw, W.H. and Jacobsen, K.S. 1995. Environmental and hormonal regulation of barley late embryogenesis abundant (Lea) mRNAs is via different signal transduction pathways. *Plant, Cell and Environment*, 18, 94–949.
- Flora, S.J. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology*, 53, 1-2.
- Freytag, G.F. and Debouck, D.G. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. *Sida Botanical Miscellany*, 23, 1–300.
- Gal, T.Z., Glazer, I. and Koltai, H. 2004. An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *Febs Letters*, 577, 21–26.
- Galau, G.A. and Close, T.J. 1992. Sequences of the cotton group 2 LEA/RAB/dehydrin proteins encoded by LEA-3 cDNAs. *Plant Physiology*, 98, 1523–1525.
- Galau, G.A., Hughes, D.W. and Dure, L. 1986. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Leu) mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 155-170.
- Gao, C., Wang, C., Zheng, L., Wang, L. and Wang, Y. 2012. A LEA Gene Regulates Cadmium Tolerance by Mediating Physiological Responses. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 5468-5481.
- Gaubier, P., Raynal, M., Hull, G., Huestis, G.M., Grellet, F., Arenas, C., Page`s, M. and Delseny, M. 1993. Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Molecular General Genetics*, 238, 409–18.

- Gaur, A. and Grupa, S.K. 1994. Lipid components of mustard seeds (*Brassica juncea* L.) as influenced by cadmium levels. *Plant Foods for Human Nutrition*, 46, 93-102.
- Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N. F. and Young, N.D. 2005. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiology*, 137, 1228–1235.
- Gilmour, S.J., Artus, N.N. and Thomashow, M.F. 1992. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 18, 13–21.
- Gosti, F., Bertauche, N., Vartanian, N. and Giraudat, J. 1995. Absciscic acid-dependent and independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 246, 10–18.
- Goyal, K., Pinelli, C., Maslen, S. L., Rastogi, R. K., Stephens, E. and Tunnacliffe, A. 2005. Dehydration-regulated processing of late embryogenesis abundant protein in a desiccation-tolerant nematode. *FEBS Letters*, 579, 4093-4098.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1998. Mechanisms Of Damage To Cellular Targets By Oxidative Stress: Lipid Peroxidation. In: *Free Radicals In Biology And Medicine*, Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (eds), Oxford Science Publication, 284–306, Oxford.
- Hand, S., Jones, D., Menze, M. and Witt, T. 2007. Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology*, 307, 62 - 66.
- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T. and Kuboi, T. 2003. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217, 290-298.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463–499.
- Henle, T., Deppisch, R., Beck, W., Hergesell, O., Hansch, G. and Ritz, E. 1999. Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 14, 1968-1975.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604–611.

- Holmberg, N. and Bulow, L. 1998. Improving Stress Tolerance In Plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 3(2), 61-66.
- Honjoh, K.I., Yoshimoto, M., Joh, T., Kajiware, T., Miyamoto, T. and Hatano, S. 1995. Isolation and Characterization of Hardening-Induced Proteins in *Chlorella vulgaris* C-27: Identification of Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Plant and Cell Physiology*, 36, 1421-1430.
- Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D. and Sarhan, F. 2004. Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Journal of Plant Biotechnology*, 2, 381-387.
- Hughes, D.W. and Galau, G.A. 1989. Temporally modular gene expression during cotyledon development. *Genes and Development*, 3, 358-369.
- Hughes, D.W. and Galau, G.A. 1991. Developmental and environmental induction of Leu and LeuA mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *Plant Cell*, 3, 605-618.
- Hundertmark, M. and Hinch, D.K. 2008. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9, 118.
- Husaini, A.M. and Abidin, M.Z. 2008. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science*, 174, 446-455.
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A. and Takagi, M. 1996. A Lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170, 243-248.
- Ingram, J. and Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377-403.
- Iturriaga, G., Schneider, K., Salamini, F. and Bartels, D. 1992. Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 20, 555-558.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007. Water deficit stress Mitigation by Calcium Chloride in *Catharanthus Roseus*. Effects on Oxidative Stress, Proline Metabolism and Indole Alkaloid Accumulation. *Biointerfaces*, 60, 110-116.
- Kacar, B., Katkat, V. ve Öztürk, Ş. 2002. Bitki fizyolojisi. Uludağ Üniversitesi güçlendirme vakfı yayını, yayın no: 74, 563, Bursa.
- Kadioğlu, A. 2004. *Plant Physiology, Practice Guide*. Trabzon, Turkey.

- Kahn, T.L., Fender, S.E., Bray, E.A. and O'Connell, M.A. 1993. Characterization of expression of drought- and abscisic acid-regulated tomato genes in the drought-resistant species *Lycopersicon pennellii*. Plant Physiology, 103, 597-605.
- Kalefetoğlu, T. and Ekmekçi, Y. 2005. The effect of drought on plants and tolerance mechanisms. G. U. Journal of Science, 18 (4), 723- 740.
- Karanlık, S. 2001. Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık Ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi (Basılmamış), 162, Adana.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretilade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F. and Alaoui, H. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature, 414, 450–453.
- Kavar, T., Maras, M., Kidric, M., Sustar-Vozic, J. and Meglic, V. 2008. Identification of Genes Involved in the Response of Leaves of *Phaseolus vulgaris* to Drought Stress. Molecular Breeding, 21, 159–172.
- Kazuoka, T. and Oeda, K. 1994. Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. Plant and Cell Physiology, 35, 601–611.
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A. and Okuda, T. 2006. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. Biochemical and Biophysical Research Communications, 348, 56 – 61.
- Kim, H.S., Lee, J.H., Kim, J.J., Kim, C.H., Jun, S.S. and Hong, Y.N. 2005. Molecular and functional characterization of CaLEA6, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annuum*. Gene, 344, 115–123.
- Knight, J.A., Pieper, R.K. and McClellan, L. 1988. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: Its use in studies of lipid peroxidation. Clinical Chemistry, 34, 2433-2438.
- Kocaçalışkan, I. 2003. Bitki Fizyolojisi. DPÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Yayını, 420.
- Krupa, Z. and Baszynski, T. 1989. Acyl lipid composition of thylakoid membranes of cadmium – treated tomato plants. Acta Physiologiae Plantarum, 11, 111-116.
- Kuşvuran, Ş. 2004. Kavunda (*Cucumis melo* L.) Tuz Stresine Toleransın Belirlenmesinde Antioksidant Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonundan Yararlanma Olanakları. Ankara Üniversitesi Fen Bil. Enst., Yüksek Lisans Tezi, 104, Ankara.
- Kütevin, Z. ve Türkeş, T. 1987. Sebzeçilik ve Genel Sebze Tarımı Prensipleri ve Pratik Sebzeçilik Yöntemleri, İnkilap Kitabevi, İstanbul.

- Laffray, D. and Louguet, P. 1990. Stomatal responses and drought resistance. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 137 (1), 47-60.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, 506, Berlin.
- Levitt, J. 1972. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, New York.
- Levitt, J., 1980. *Responses of Plants to environmental stresses*. Academic Press, 496, U.S.A.
- Lichtenhaler, H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.
- Litts, J.C., Colwell, G.W., Chakerian, R.L. and Quatrano, R.S. 1987. The nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the wheat Em protein. *Nucleic Acids Research*, 15, 3607–3618.
- Livak, J. K. and Schmittgen, D. T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25, 402–408.
- Malik, D., Sheoran, I.S. and Singh, R. 1992. Lipid composition of thylakoid membranes of cadmium treated wheat seedlings. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 29, 350-354.
- Martin, J., Mayhew, M., Langer, T. and Hartl, F.U. 1993. The reaction cycle of GroEL and GroES in chaperonin-assisted protein folding. *Nature*, 366, 228–233.
- Mueller, J.P., Bukusoglu, G. and Sonenshein, A.L. 1992. Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes: control of *gsiA* by the ComP-ComA signal transduction system. *Journal of Bacteriology*, 174, 4361-4373.
- Mundy, J. and Chua, N.H. 1988. Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal*, 7, 2279-2286.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239-250.
- Ndong, C., Danyluk, J., Wilson, K.E., Pocock, T., Huner, N.P.A. and Sarhan, F. 2002. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analysis. *Plant Physiology*, 129, 1368-1381.

- Nouairi, I., Ben Ammar, W., Ben Youssef, N., Ben Miled Daoud, D., Habib Ghorbal, M. and Zarrouk, M. 2006. Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Science*, 170, 511-519.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T. and Welin, B.V. 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 45, 263–279.
- Ouariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherif, A. and Ghorbal, M. H. 1997. Cadmium- and copper- induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, 45, 1343-1350.
- Özcan, S., Babaoğlu, M. and Gürel, E. 2004. Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği Ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- Özdem, M.A. 2012. Dünya ve Türkiye’de Kuru Baklagiller. *TEPGE Bakış*, 1303-8346, Ankara.
- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J. 1994. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: Roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell*, 6, 1567–1582.
- Plaut, Z. 1995. Sensitivity of crop plants to water stress at specific developmental stages: reevaluation of experimental findings. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43, 99-111.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Mäkelä, P., Svensson, J., Heino, P. and Palva, E.T. 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 54, 743-753.
- Rajesh, S., Raveendran, M., Sivakumar, P. and Manickam, A. 2008. Overexpression Analysis of *emv2* gene coding for Late Embryogenesis Abundant Protein from *Vigna radiata* (Wilczek). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 4(3), 9-16.
- Rao, K.V.M., Raghavendra, A.S. and Janardhan, K. 2005. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, 1–14, Netherlands.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P. and Sumithra, K. 2004. Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 33–42.
- Rorat, T. 2006. Plant dehydrins-tissue location, structure and function. 2006. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(4), 536-56.
- Roscoe, J. T. 1975. *Fundamental research statistics for the behavioral sciences*. New York: Holt, Rinehart and Winston, Inc. 63.

- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B. and Vidal, S. 2006. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*, 45, 237–249.
- Sairam, R.K. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science*, 86, 407–421.
- Salisbury, F.B. and Marinos N.G. 1985. The ecological role of plant growth substances. *Encyclopedia Plant Physiol*, 11, 707-766.
- Savitri, E.S., Basuki, N., Aini, N. and Arumingtyas, E.L. 2013. Identification and characterization drought tolerance of gene LEA-D11 soybean (*glycine max* L. Merr) based on PCR-sequencing. *American Journal of Molecular Biology*, 3, 32-37.
- Schubert, S. and Lauchli, A. 1990. Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. *Plant Soil*, 123, 205–209.
- Shannon, M.C. and Grieve, C.M. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78, 5-38.
- Shen, Q., Chen, C.N., Brands, A., Pan, S.M. and Ho, T.H. 2001. The stress- and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. *Plant Molecular Biology*, 45, 327–340.
- Shen, Q., Uknes, S.J. and Ho, T.H. 1993. Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 23652–23660.
- Shih, M.D., Lin, S.C., Hsieh, J.S., Tsou, C.H., Chow, T.Y., Lin, T.P. and Hsing, Y.I. 2004. Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology*. 56, 689-703.
- Singh, N.K., Handa, A.K., Hasegaura, P.M. and Bressan, R.A. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*, 79, 126-37.
- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J.M., Al-Niemi, T., Dyer, W.E., Ho, T.H.D. and Qu, R. 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Science*, 155, 1-9.
- Smirnoff, N. 2005, *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Pub. Ltd., ISBN 10-1-4051-2529-2.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057–1060.

- Soydam, S., Büyük, İ. and Aras, S. 2013. Relationships Among Lipid Peroxidation, Enzyme Activity and Gene Expression Profiles of Superoxide Dismutase (SOD) In *Lycopersicum Esculentum* L. Exposed To Cold Stress. *Genetics and Molecular Research*, 12 (3), 3220-3229.
- Stacy, R. and Aalen, R. 1998. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206, 476–478.
- Tal, M. 1983. Selection for stress tolerance. In: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. I: Techniques for Propagation and Breeding*. Evans, D.A., Sharp, W.R. Ammirato, P.V. Yamada, Y. (eds), MacMillan Publishing Co, 461-488, New York.
- Terzi, R., Saglam, A., Kutlu, N., Nar, H. and Kadioglu, A. 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photo system II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 34, 1-10.
- Tsai, Y.C., Wu, M.T., Hsieh, J.S., Hsing, Y.I.C. and Shih, M.D. 2008. Expression of *Glycine max* physiologically mature genes in soybean (*Glycine max* L.) tissues. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 19, 168-181.
- Tunnacliffe, A. and Wise, M.J. 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94, 791–812.
- Uygan, D., Hakgören, F. and Büyüktaş, D. 2006. Eskişehir Sulama Şebekesinde Drenaj Sularının Kirlenme Durumu ve Sulamada Kullanma Olanaklarının Belirlenmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1), 47-58.
- Van Breusegem, F. and Dat, J.F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141, 384-390.
- Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inze, D. 1998. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 3, 330–334.
- Vassilev, A. 2004. Cadmium-induced changes in chloroplast lipids and photosystem activities in barley plants. *Biologia Plantarum*, 48, 153-156.
- Veldhuizen, E.J., Creutzberg, T.O., Burt, S.A. and Haagsman, H.P. 2007. Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in streak tartare. *Journal of Food Protection*, 70 (9), 2127-2132.
- Vilardell, J., Goday, A., Freire, M.A., Torrent, M., Martinez, M.C., Torne, J.M. and Pages, M. 1990. Gene sequence, developmental expression and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. *Plant Molecular Biology*, 14, 423–432.

- Vinocur, B. and Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 123-132.
- Volker, U., Engelmann, S., Maul, B., Riethdorf, S., Voelker, A., Schmid, R., Mach H. and Hecker, M. 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 140, 741-752.
- Walton, DC. 1980. Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 453-89.
- Wang, S.C, Xu, L.L., Li, G.J., Chen, P.Y., Xia, K. and Zhou, X. 2002. An ELISA for the determination of salicylic acid in plants using a monoclonal antibody. *Plant Science*, 162, 529-535.
- Wang, X.S., Zhu, H.B., Jin, G.L., Liu, H.L., Wu, W.R. and Zhu, J. 2007. Genome-scale identification and analysis of LEA genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 172, 414-420.
- Wery, J. and Grinac, P. 1983. Uses of legumes and their economic importance, In: *Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation*, FAO, Rome, Italy.
- Wise, M.J. 2002. The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics (Suppl 1)*, 18, 38–45.
- Wise, M.J. 2003. LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics*, 4, 52.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N. and Xiong, L. 2007. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the Weld conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 115, 35-46.
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho T, H, D. and Wu, R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110, 249-257.
- Yang, Z.B., Eticha, D., Albacete, A., Rao, I.M., Roitsch, T. and Horst, W.J. 2012. Physiological and molecular analysis of the interaction between aluminium toxicity and drought stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*, 63, 3109-3125.
- Yaşar, F. 2003. Tuz Stresi Altındaki Patlıcan Genotiplerinde Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin in vitro ve in vivo Olarak İncelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri, Doktora Tezi, 139, Van.

- Zegzouti, H., Jones, B., Marty, C., Lelie Ávre, J.M., Latche Â, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M. 1997. ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive Lea-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Molecular Biology*, 35, 847-854.
- Wu, C.A., Yang, G.D., Meng, Q.W. and Zheng, C.C. 2004. The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant Cell Physiology*, 45, 600-607.
- Zhu, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124, 941-948.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İlker BÜYÜK

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 28.07.1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Rıfat Canayakın Süper Lisesi (2004)

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2008)

Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji A.B.D. (Eylül 2008-Haziran 2010)

Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D. (Eylül 2010-Nisan 2014)

Çalıştığı Kurumlar

Bozok Üniversitesi, Araştırma Görevlisi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D., 2009-2011

Ankara Üniversitesi, Öğretim Görevlisi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji A.B.D., 2011-Halen devam etmekte.

Yayınlar (SCI)

1. M.H. Öz, H. Vurgun, M. Bakır, **İ. Büyük**, C. Yüksel, H.M. Ünlü, K. Çukadar, B. Karadoğan, Ö. Köse and A. Ergül, Molecular analysis of East Anatolian traditional plum and cherry accessions using SSR markers, Genetics and Molecular Research 12 (4): 5310-5320, 2013.

2. Soydam S., **Büyük İ.**, Aras S. Expression of SOD gene and evaluating its role in stress tolerance in NaCl and PEG stressed Lycopersicum esculentum. Turkish Journal of Botany, doi:10.3906/bot-1305-1, 2013.

3. Soydam S., **Büyük İ.**, Aras S. Relationships Among Lipid Peroxidation, Enzyme Activity and Gene Expression Profiles of Superoxide Dismutase (SOD) In *Lycopersicum Esculentum* L. Exposed To Cold Stress. *Genetics and Molecular Research* 12 (3): 3220-3229, 2013.
4. Soydam S., Gökçe E., **Büyük İ.**, Aras S. Characterization of stress induced by copper and zinc on Cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters, *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2012, doi:10.1016/j.mrgentox.2012.03.005.
5. **Büyük İ.**, Tuğrul B., Yılmaz H., Onur E., Vatandaş G., Bozyiğit D. F. Association Between Idiopathic Generalized Epilepsy and *EFHC1* Gene Mutations of 662 G>A and 685 T>C, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2012, doi:10.5336/medsci.2011-25681.

Hakemli Dergiler

1. Soydam-Aydın S., **Büyük İ.**, Çelikkol B.B., Aras S. A role of catalase (CAT) in detoxification of reactive oxygen species (ROS) in tomato (*Lycopersicum esculentum*) contaminated with manganese (Mn^{2+}), *Biological Diversity and Conservation*, 6(3): 140-145, 2013.
2. Soydam-Aydın S., **Büyük İ.**, Çelikkol B.B., Aras S. A role of catalase (CAT) in detoxification of reactive oxygen species (ROS) in tomato (*Lycopersicum esculentum*) contaminated with manganese (Mn^{2+}), *Biological Diversity and Conservation*, 6(3): 140-145, 2013.

Ulusal Kongre Sunum

1. **Büyük İ.**, Tuğrul B., Vatandaş G., Bozyiğit F., Yılmaz H., Onur E. 2010. İdyopatik Jeneralize Epilepsi ile EFHC1 Genindeki 662G>A ve 685 T>C Polimorfizmi İlişkisinin Araştırılması. 1. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, Antalya, Türkiye.
2. **Büyük İ.**, ‘Epilepsi Genetiği’ İstanbul Teknik Üniversitesi III. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi, 17-20 Ağustos 2009, İstanbul, Türkiye.

Uluslararası Kongre Sunum

1. **Büyük İ.**, Aydın Soydam S., Bölükbaşı E., Aras S. Defence responses in tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) contaminated with different concentration of Cu^{2+} . *Journal of Biotechnology*, 161, p:30, 2012.

2. **Büyük İ.** Aydın Soydam S., Altunkaynak E., Aras S. Expression analysis of catalase and superoxide dismutase genes in *Lycopersicum esculentum* L. under zinc stress. *Journal of Biotechnology*, 161, p:31, 2012.
3. **Büyük İ.**, Kazancık B. A., Aras S. Reactive oxygen species and antioxidant response of catalase in *Helianthus annuus* L. subjected to Cd^{+2} stress. *Journal of Biotechnology*, 161, p:45, 2012.
4. **Büyük İ.**, Fazlıoğlu A., Aras S. Relation between different concentrations of Cd^{+2} treatment and mRNA levels of 17.7 kDa heat-shock protein gene in *Helianthus annuus* plants. *Journal of Biotechnology*, 161, p:45, 2012.
5. Soydam S., **Büyük İ.**, Aras S. Heavy metal induced gene expression profiles of catalase in *Lycopersicum esculentum* L. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(1), p:S74, 2011.