T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONVANSİYONEL FASULYE(*Phaseolus vulgaris L.*) YAPRAKLARINDAN SSH YÖNTEMİYLE İZOLE EDİLEN GENLERİN TANIMLANMASI

MİNE KUÇAK

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

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT

İSTANBUL, 2015

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KONVANSİYONEL FASULYE (*Phaseolus vulgaris L.*) YAPRAKLARINDAN SSH YÖNTEMİYLE İZOLE EDİLEN GENLERİN TANIMLANMASI

Mine KUÇAK tarafından hazırlanan tez çalışması 25.11.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Semiha ERİŞEN

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

Ahi Evran Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2015-01-07-YL01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her konuda yönlendiren, bilgi ve sevgisini esirgemeyerek bana sürekli destek olan danışman hocam, **Sayın Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT**' a,

En büyük destekçim, varlığıyla huzur veren, eşim **Sayın Araş. Gör. Ramazan Alper KUÇAK**'a,

Dostluğuyla her daim yanımda olan **Özlem TURAN**'a,

Biyoinformatik analizler konusunda kullanılan programların kurulması ve kullanımında yardımcı olan **Sayın Araş. Gör. Munise YURTSEVER**'e,

Tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini yanımda hissettiğim Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümündeki değerli bilim insanlarına,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2015

Mine KUÇAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

ÇİZELGE LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2

BÖLÜM 2

FASULYE VE KONVANSİYONEL TARIM 3

2.1 *Phaseolus vulgaris* 3
2.1.1 Besin Maddesi Olarak Fasulye 3
2.1.2 Fasulye ve Azot Döngüsü 4
2.2 Konvansiyonel Tarım 5
2.2.1 Türkiye'de Konvansiyonel Tarım 6
2.2.2 Konvansiyonel Tarım ve Organik Tarım Arasındaki Farklar 7
2.3 Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH) 8
2.4 Biyoinformatik Analizler 12

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD 13

3.1 Bitki Materyalinin Hazırlanması 13
3.2 Besiyerleri 13
3.2.1 *E.coli* Büyütme Besiyeri 13
3.3 Tamponlar ve Solüsyonlar 15
3.4 Moleküler Markırlar 17
3.5 Enzimler 17
3.6 Kitler 17
3.7 Vektör ve Bakteri Suşları 18
3.8 Oligonükleotidler 18
3.9 Bilgisayar Programları ve Veritabanları 18
3.9.1 Chromas/Pro 18
3.9.2 BioEdit 18
3.9.3 CAP3 19
3.9.4 BLAST 19
3.9.5 UniProt 19
3.10 Fasulye Yapraklarından Total RNA İzolasyonu 19
3.10.1 Homojenizasyon 19
3.10.2 Fazların Ayrılması 20
3.10.3 RNA Çöktürme 20
3.10.4 RNA Yıkama 20
3.10.5 RNA'yı Yeniden Çözündürme 20
3.10.6 RNA'nın Temizlenmesi 20
3.10.7 Total RNA Miktarının Belirlenmesi 21
3.10.7.1 UV Spektrofotometre İle Total RNA Miktarının Belirlenmesi 21
3.10.7.2 Nanodrop ile Total RNA Miktarının Belirlenmesi 21
3.10.8 Total RNA'nın Denatüre Edici Formaldehit Jel Üzerinde Analizi 21
3.10.8.1 Jelin Hazırlanması 21
3.10.8.2 RNA Örneklerinin Hazırlanması 21
3.11 Total RNA' dan mRNA İzolasyonu 22
3.11.1 mRNA Miktarının Belirlenmesi 22
3.11.1.1 Spot Testi İle mRNA Miktarının Belirlenmesi 22
3.11.1.2 Nanodrop İle mRNA Miktarının Belirlenmesi 22
3.12 cDNA Sentezi 22
3.12.1 cDNA Sentez Primerinin Bağlanması 23
3.12.2 Birinci Zincir cDNA Sentezi 23
3.12.3 İkinci Zincir cDNA Sentezi 24
3.12.4 cDNA Uçlarının Kütleştirilmesi 25
3.12.5 Tester ve Driver cDNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi 25
3.12.6 *RsaI* Kesimi 25
3.13 Adaptör Ligasyonu 26
3.14 Birinci Hibridizasyon 28
3.15 2. Hibridizasyon 30
3.16 1. PZR Çoğaltımı 30
3.16.1 1. PZR Amplifikasyonu PZR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz 31
3.17 2. PZR Amplifikasyonu 32
3.17.1 2. PZR Amplifikasyonu PZR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz 33

3.18 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması 33
3.18.1 Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Spektrofotometrede Miktar Analizi .. 33
3.19 cDNA' ların pGEM®-T Easy Vektörüne Ligasyonu 33
3.20 *E.coli*' ye Transformasyon 35
3.21 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması 35
3.22 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi 36
3.23 Biyoinformatik Analizler 36

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 37

4.1 Birleştirilmiş Total RNA'nın UV-Spektrofotometre Sonuçları 37
4.2 Temizlenmiş Birleştirilmemiş Total RNA'nın MOPS Jeli Sonuçları 38
4.3 Total RNA'nın Nanodrop Sonuçları 38
4.4 mRNA SPOT Testi 39
4.5 mRNA'nın Nanodrop ile Ölçülmesi 40
4.6 cDNA Agaroz Jel Sonucu 41
4.7 Birinci ve İkinci PZR Agaroz Jel Sonucu 42
4.8 İkinci PZR'ın Spektrofotometre Sonucu 43
4.9 Tekrarlanan 2.PZR'ın Agaroz Jel Sonucu 43
4.10 Pürifiye Edilmiş Birinci ve İkinci PZR'ın Agaroz Jel Sonucu 44
4.11 Rekombinant Hücrelerin Belirlenmesi 44
4.12 Beyaz Kolonilerin Seçilmesi ve Kolonilerin Analize Gönderilmesi 44
4.13 cDNA Kütüphanesinin Biyoinformatik Analizleri 45
4.13.1 EST'lerin Hazırlanması 45
4.13.2 BLASTn ve BLASTx Analizleri 45
4.13.3 Konsensus Oluşturulması ve BLASTx Analizi 48
4.13.4 Kontig Oluşturulması ve BLASTx Analizi 52
4.13.5 Biyoinformatik Analizlerinin Değerlendirilmesi 53
4.14 Öneriler 56

KAYNAKLAR 58

EK-A

KONVANSİYONEL VE ORGANİK FASULYELERİN NANODROP SONUÇ GRAFİKLERİ 62

EK-B

FASULYE BİTKİSİNİN YAPRAK DOKUSUNA AİT 57 EST' NİN BLASTN VE BLASTX ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ 67

ÖZGEÇMİŞ 89

SİMGE LİSTESİ

ds	Çift zincirli
ha	Hektar alan
g	Gram
kb	Kilobaz
Lt	Litre
Mg	Miligram
Ml	Mililitre
mM	Milimolar
U	Unit
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/ hacim
µl	Mikrolitre
w/v	Ağırlık/ hacim

KISALTMA LİSTESİ

bp	Base Pair(Baz Çifti)
BLAST	Dizi homolojisi arama motoru
°C	Sentigrat derece
DNA	Deoksiribonükleik Asit
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
EST	Anlatımı yapılan dizi işaretleri (Expressed Sequences Tags)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
IPTG	İzopropil β-D- tiogalaktozit
LB	Luria Broth
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Ortam Reaksiyonu (Power of Hydrogen)
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika (Revolutions Per Minute)
RT	Revers Transkriptaz enzimi
SSH	Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D- galaktozit

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Azot döngüsü 5
Şekil 2. 2 Organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulyeler 6
Şekil 2. 3 Konvansiyonel Tarımın Girdileri 7
Şekil 3. 1 Promega pGEM®-T Easy vektör haritası 34
Şekil 4. 1 Temizlenmiş birleştirilmemiş total RNA'nın MOPS jeli 38
Şekil 4. 2 cDNA Agaroz Jel Sonucu 41
Şekil 4. 3 Birinci ve İkinci PZR Agaroz Jel Sonucu 42
Şekil 4. 5 Tekrarlanan 2.PZR Agaroz Jel Sonucu 43
Şekil 4. 6 Pürifiye Edilmiş Birinci ve İkinci PZR Agaroz Jel Sonucu 44
Şekil 4. 7 BLASTn Sonuç Sayfasının Ekran Görüntüsü 46
Şekil 4. 8 BLASTx sonucu ekran görüntüsü ve dizinin protein veritabanındaki benzerlikleri 48

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Bazı baklagillerdeki mineral değerleri[5] 4
Çizelge 3. 1 LB besiyeri bileşimi 14
Çizelge 3. 2 SOB besiyeri bileşimi 14
Çizelge 3. 3 Kullanılan tampon çözeltiler ve solüsyonlar 15
Çizelge 3. 4 Kullanılan moleküler belirteçler 17
Çizelge 3. 5 Kullanılan enzimler 17
Çizelge 3. 6 Kullanılan kitler 17
Çizelge 3. 7 Kullanılan vektör ve bakteri suşları 18
Çizelge 3. 8 Kullanılan oligonükleotidler 18
Çizelge 3. 9 cDNA sentez aşamasının bileşen ve miktarları 23
Çizelge 3. 10 1. zincir sentez aşamasının bileşen ve miktarları 24
Çizelge 3. 11 2.zincir sentez basamağının bileşen ve miktarları 24
Çizelge 3. 12 *RsaI* enzimi ile kesim basamağı bileşen ve miktarları 26
Çizelge 3. 13 Adaptör ligasyonu için master karışımın bileşen ve miktarları 27
Çizelge 3. 14 Adaptör ligasyonu reaksiyon bileşen ve miktarları 27
Çizelge 3. 15 Organik cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri 28
Çizelge 3. 16 Konvansiyonel cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri 29
Çizelge 3. 17 Kontrol cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri 29
Çizelge 3. 18 1. PZR bileşen ve miktarları 31
Çizelge 3. 19 2.PZR bileşen ve miktarları 32
Çizelge 3. 20 Ligasyon reaksiyonu bileşenleri 34
Çizelge 4. 1 Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye total RNA'sının spektrofotometre sonuçları ve miktar analizi 37
Çizelge 4. 3 Organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye DNA'sının 2.PZR'ının spektrofotometre sonuçları ve miktar analizi 43
Çizelge 4. 4 Konsensus dizinlerinin BLASTx analizi tablosu 49

ÖZET

KONVANSİYONEL FASULYE(*Phaseolus vulgaris L.*) YAPRAKLARINDAN SSH YÖNTEMİYLE İZOLE EDİLEN GENLERİN TANIMLANMASI

Mine KUÇAK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

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

Dünya nüfusunun büyük bir çoğunluğu beslenme alışkanlıklarında protein ihtiyaçlarını baklagillerden sağlamaktadırlar. Bitkisel protein kaynakları arasında en fazla protein, yemeklik tane baklagillerden alınmaktadır. Fasulye, yemeklik tane baklagiller arasında ekim alanı ve üretim miktarı bakımından dünyada ilk sırayı almaktadır. Ülkemizde ise TÜİK 2014 verilerine göre 91.000 ha alandan 215.000 ton fasulye üretimi gerçekleştirilmiştir.

Konvansiyonel tarım, kimyasal ilaç, gübre, hormon ve GDO'lu tohum kullanımını mümkün kılan tarımsal üretim biçimidir. Konvansiyonel tarımda amaç birim alandan maksimum verimi en ekonomik şekilde elde etmektir.

Bu çalışmada konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye (*Phaseolus vulgaris)* bitkisinde anlatımı artan genler, organik koşullarda yetiştirilen fasulyede anlatımı artan genlerle karşılaştırılarak klonlanmıştır. Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu(SSH) yöntemi kullanılarak, *Phaseolus vulgaris* yapraklarından cDNA kütüphanesi kurulmuştur. Yaprak kütüphanesinden 58 klon için dizin analizi yaptırılmıştır. cDNA dizinlerinin EST dizinleri olarak değerlendirilmesi için biyoinformatik analizler yapılmıştır. Dizinler NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a ait GenBank veritabanıyla BlastN ve BlastP uygulaması kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Blast sonuçları incelendiğinde elde edilen dizinlerinin; 5-metiltetrahidropteroltri-glutamat-homosistein metil transferaz, asit fosfataz, aktin, endopeptidaz, kallus proteini, sisteince zengin salım proteini, Klorofil A- B binding, Klorofil manganez stabilizasyon proteini, sitokrom, D-alanin-D-alanin ligaz, DNAj protein, ekstraselüler dermal protein, format dehidrogenaz, fruktoz bifosfat aldolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, histon, endopeptidaz, late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein, metiyonin sentaz, patogenez ilişkili protein, proteaz, sintaksin, s-adenozil metiyonin dekarboksilaz, tohum olgunlaşma proteini, squamous hücreli karsinoma antijen recognized by T-cell like, tioredoksin, transkripsiyon faktörü MYB44, translationally-controlled tumor protein like, universal stress protein, vignain protein kodlayıcı genlere benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bulunan proteinlerin, fotosentez ve karbonhidrat metabolizmasında görev alan ve hücre yapısına katılan proteinler olduğu tespit edilmiştir.

Bunlardan özellikle; gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz, fruktoz bifosfat aldolaz enzimleri; bitkinin karbonhidrat ve protein metabolizmasında görev almasından, tohum olgunlaşma proteini ise, bitkide embriyo gelişimini sağlamasından dolayı önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Konvansiyonel tarım, *Phaseolus vulgaris,* Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyon Yöntemi, EST, Biyoinformatik, Blast

ABSTRACT

DEFİNİNG OF GENES ISOLATED FROM CONVENTİONAL COMMON BEAN LEAVES BY USING SSH METHOD

Mine KUÇAK

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

The vast majority of world population, supply their protein demand from cereals. The largest amount of protein can be obtained the granular leguminous seeds among vegetable protein sources. In terms of growth area and production amount common bean have the first place in the world among the other granular leguminous seeds which are used for cooking. According to FAO (Food and Agriculture Organization) 2009 statistics, in our country growth area and amount of production is recorded as 169.000 He and 784.000 tons respectively.

Conventional agriculture is a type of agricultural production which makes it possible to use chemical pesticides, fertilizers, hormone and genetically modified seed. The goal of conventional agriculture is to gain the maximum efficiency from per unit area with the most economical way .

Common bean plants grown in conventional conditions (Phaseolus vulgaris) in this study was done an analysis of the increasing genes. The cDNA library are established from the leaves of Phaseolus vulgaris by using Suppression Substractive hybridization (SSH) method. Sequence analysis of 58 clones from the leave library was built. Bioinformatics analyzes were carried out to be evaluated the EST sequences of the cDNA sequences. Sequences were compared by the GenBank database belonging to

NCBI (National Center for Biotechnology Information) by using the BLAST and BLASTP application.

Blast results indicated that 5-methyltetrahydropteroyltri-glutamate-homocysteine methyl transferase 1 isoform, acid phospatase, actin, endopeptidase, callus protein, cysteine-rich secretory protein, chlorophyll a-b binding protein, chloroplast manganese stabilizing protein-II, cytochrome P450 like TBP, D-alanine D alanine ligase, DNAj protein, extracellular dermal glycoprotein, formate dehydrogenase, fructose biphosphate aldolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, histone, KDEL-tailes cystein endopeptidase CEP1, late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein, glutathione transferase, methionine syntase, phatogenesis related protein, protease htpx, putative syntaxin-24, s-adenosylmethionine decarboxylase, seed maturation protein PM37, squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cell like, thioredoxin-like protein CDSP32, transcription factor MYB44, translationally-controlled tumor protein like, universal stress protein, vignain encoding coding genes.

Especially; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose bisphosphate aldolase enzymes are important due to taking role in the plant's carbonhydrate and protein metabolism, seed maturation protein's significancy is ensuring the development of the plant's embryo.

Keywords: Convensional agriculture, *Phaseolus vulgaris,* Supression Substractive Hybridization, EST, Biyoinformatics, Blast

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Ülkemizde en fazla üretimi yapılan sebze türlerinden birisi *Phaseolus vulgaris*' tir. Türkiye İstatistik Kurumu(TÜİK) verilerine göre; Dünya çapında 2013 yılındaki fasulye üretiminde 4. sırada yer alan Türkiye'de 632.301 ton fasulye üretilmektedir. Bu da dünyadaki üretim oranının %3'üne tekabül etmektedir. TÜİK 2014 verilerine göre ise; 91.000 ha alandan 215.000 ton fasulye üretimi gerçekleştirilmiştir[1].

Fasulye çevresel koşullar bakımından seçiciliği fazla olan, yemeklik tane baklagil türüdür. Bir bölgedeki fasulye yetiştiriciliğini, verim ve kaliteyi; fiziksel (yağış, sıcaklık, gün uzunluğu, topoğrafya, toprak tipi vs.), biyolojik (hastalık ve zararlılar) ve sosyo-ekonomik faktörler etkilemektedir[2], [3], [4].

Orta Amerika kökenli olan bu kültür bitkisi 250 yıl önce Anadolu'ya gelmiş ve çok geniş bir yayılım alanı bulmuştur. Besin değeri çok yüksektir bu nedenle neredeyse dünyanın her yerinde bol miktarda tüketilir. Fasulye taze, konserve ve kuru olmak üzere değişik şekillerde raflarda yer alır. Taze fasulye A, B1, B2 ve C vitaminlerince zengindir. Taze fasulyede vücutta biriken asidi nötralize edebilecek baz fazlalığı da mevcuttur. Fasulyenin hazım olabilirlik oranı %84.1'dir. Hatta fasulye baklalarında bulunan fasol (phasol) ve faseolin (phaseolin) maddelerinin şeker hastalığında kullanılan insülin karekterinde olduğu ve bu yüzden kandaki şeker miktarının düşürülmesinde kullanıldığı bildirilmektedir[5].

Türkiye'de fasulyenin daha çok konvansiyonel koşullarda üretimi gerçekleşmektedir. Konvansiyonel tarım, birim alandan en fazla verim almak amacıyla; sentetik girdilerin

kullanılabildiği geleneksel tarım biçimidir. Türkiye'de 2014 yılı verilerine göre, kullanılabilir tarım alanlarının %7'sinde fasulye üretimi gerçekleştirilmektedir [1].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, konvansiyonel koşullarda yetişmiş fasulye (*Phaseolus vulgaris)* bitkisinin yaprak dokularında anlatımı artan genlerin, organik koşullarda yetiştirilmiş fasulyede anlatımı artan genlerle karşılaştırılarak baskılayıcı çıkarım hibridizasyon yöntemiyle klonlanması hedeflenmiştir. Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu yönteminin kullanılmasının nedeni, konvansiyonel koşullarda yetişen fasulyede anlatımı artan genler bakımından zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kurulmasıdır. Kütüphanelerde bulunan klonların dizin analizi yaptırılacak ve bunların EST dizinleri olarak değerlendirilebilmesi için biyoinformatik analizler gerçekleştirilecektir.

1.3 Hipotez

Günümüzde birçok organizma için tüm genlerinin dizin analizinin yapıldığı genom projeleri tamamlanmıştır. Bu aşamada genlerin işlevlerinin bulunabilmesi, biyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının açığa kavuşması için işlevsel genom projeleri başlatılmıştır. Bunların kapsamında bir organizmada belirli bir koşulda anlatımı artan tüm genlerin analizini transkriptom ve proteom düzeyinde analizleri yapılmaktadır.

Fasulye bitkisi, tüm canlılar için önemli bir protein ve mineral kaynağıdır. Ucuz olması diğer protein kaynaklarına göre ulaşılabilirliğini artırmaktadır.

Konvansiyonel tarım ülkemizde ve dünyada yaygın şekilde görülmektedir. Kimyasal ilaç, sentetik gübre ve bitki geliştirici hormon kullanımı serbest olduğundan birim alandan maksimum verim almak hedeflenmektedir. Geleneksel yöntemlerle üretilmiş bitkiler organik koşullarda yetiştirilmiş bitkilere göre gen anlatım düzeyinde farklılıklar göstermektedir [6], [7].

Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulyenin yaprak dokusundan anlatımı artan tüm genler klonlanacaktır. Sonuçlar analizlenerek konvansiyonel koşullarda hangi genlerin daha aktif olduğu tespit edilecektir. Bunun için işlevsel genomik yöntemlerden biri olan Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu kullanılacaktır.

BÖLÜM 2

FASULYE VE KONVANSİYONEL TARIM

2.1 *Phaseolus vulgaris*

Fasulye; olgunlaşmamış meyve, olgun tohum ile bakla veya yalnızca olgun tohumu tüketilebilen bir bitkidir. *Plantae*(bitki) alemi, *Magnoliophyta*(Kapalı tohumlular) bölümü*, Magnoliopsida*(İki çenekliler) sınıfı*, Fabales* takımı, *Fabaceae* (tahıl) familyasının *Phaseolus* cinsinden bir bitkidir. Yeşil halde veya kurutulmuş şekilde tüketilebilir. Fasulye türleri arasında en fazla tanınan ve tarımı yapılan bitkidir. Baklagil ailesinden en çok tüketilen sebzelerdendir[8]. Ekim alanları en çok Karadeniz bölgesinde yaygın olup, bunu orta güney (Kayseri, Konya, Nigde, Nevsehir) ve orta kuzey (Eskisehir, Kütahya, Usak, Yozgat) bölgeleri izlemektedir [9].

2.1.1 Besin Maddesi Olarak Fasulye

Baklagiller eski dönemlerden beri önemli bir bitkisel protein kaynağı olmuştur. İçerisinde lisin, lösin ve izolösin aminoasitlerinden bolca bulunmaktadır. Taze fasulye A vitamini yönünden oldukça zengin bir besindir.

Çizelge 2. 1 Bazı baklagillerdeki mineral değerleri[5]

	Demir(mg)	Çinko(mg)	Magnezyum(mg)	Kalsiyum(mg)
Fasulye	7.0	30	197	250
Bezelye	7.36	3.01	96	132
Nohut	6.96	3.54	124	155
Mercimek	7.5	3.73	71	129
Soya Fasulyesi	6.64	4.18	201	220

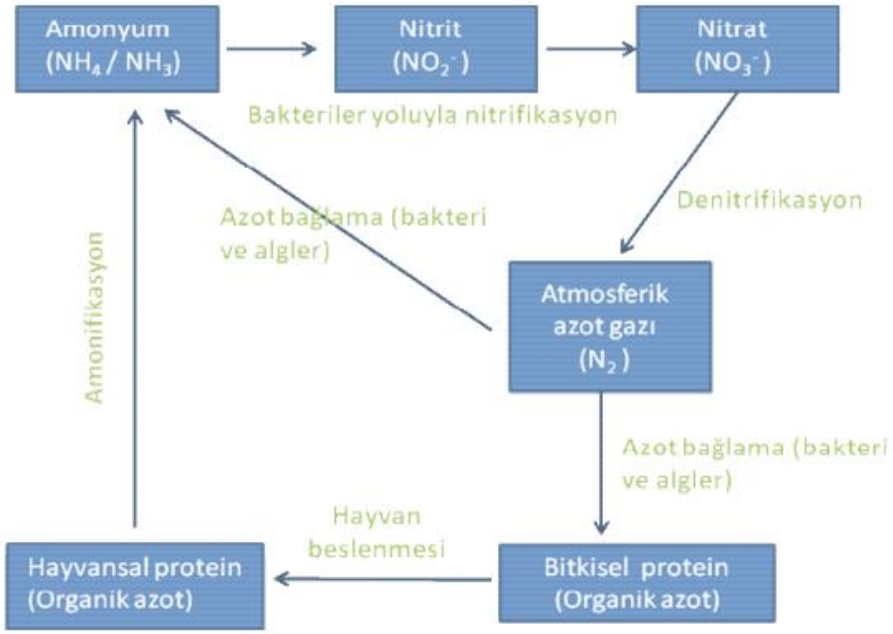
Baklagil ailesinin önemli bir üyesi olan fasulye, içerdiği protein ve mineraller bakımından canlıların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Et, süt, yumurta gibi protein kaynaklarına göre daha ucuz olması tercih sebebidir[5].

İçerisinde bulunan Phaseolin, antifungal bir maddedir[10]. Fasulyenin içerisindeki protein, karbonhidrat ve lif yapıları sayesinde; obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklara karşı önleyici bir rolü olduğu bilinmektedir[11].

2.1.2 Fasulye ve Azot Döngüsü

Nitrojen bitki büyüme ve gelişmesinde kritik bir sınırlayıcı elementtir [12]. Canlılığın temeli olan protein ve nükleik asitlerin esas kısmını Nitrojen oluşturur. Fakat Nitrojen, canlılar tarafından doğrudan kullanılamaz[13]. Atmosferde bulunan inorganik azot çeşitli canlı grupları tarafından organik azota çevrilir. Biyolojik nitrojen fiksasyonu ilk kez Beijerinck tarafından 1901 yılında özelleşmiş bir prokaryot canlı grubunda keşfedilmiştir[14].

Fasulye azot döngüsüne önemli katkı sağlayan baklagil ailesinin üyesidir. Diğer baklagillere oranla daha düşük azot fiksasyonu gerçekleştirdiği tespit edilmiş fakat bazı çevre şartlarının değiştirilmesiyle bu oranın artırılabildiği gözlemlenmiştir[15].



Şekil 2. 1 Azot döngüsü[16], [17]

2.2 Konvansiyonel Tarım

Dünya nüfusunun hızla artışı tarımsal üretim artışı zorunluluğunu da beraberinde getirmiştir. Fasulye üretiminde çiftçinin karşılaştığı sorunlar; gübreleme, sulama, hastalık, zararlıların kontrolü konularında ortaya çıkmaktadır [18]. Zararlılarla mücadeleye yönelik, tarımsal üretim artışı için yoğun olarak kimyevi gübre ve ilaç kullanılmaya başlanmış, üretim belli bir noktaya kadar artmıştır ancak bu durum da yoğun çevre kirliliğini beraberinde getirmiştir[19].

Konvansiyonel tarımda son günlerde amaç; birim alandan maksimum verim ve ekonomik üretim olmuştur. Bu amaçla pestisit, gübre, hormon, genetiği değiştirilmiş bitkilerin tohumları gibi unsurların kullanımı yaygınlaşmıştır[20].

Şekil 2. 3 'te görüldüğü üzere; konvansiyonel tarımda uygulanan gübre sayesinde bitki, organik bitkiye göre fiziksel olarak daha fazla gelişir.



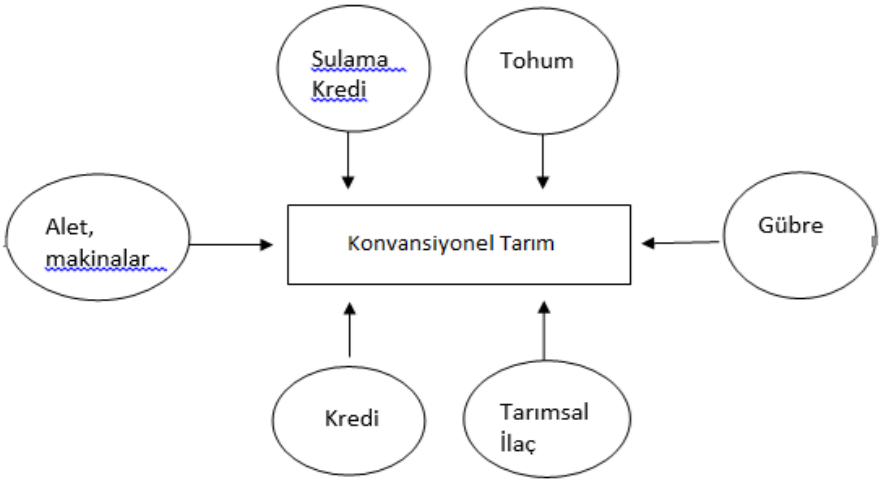
Şekil 2. 2 Organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulyeler.

2.2.1 Türkiye'de Konvansiyonel Tarım

Türkiye bulunduğu coğrafik konum itibariyle birçok medeniyete ev sahipliği yapmıştır. Bu uygarlıklarda tarımsal faaliyetler, bölgenin iklim çeşitliliği ve ticaret merkezi olması nedeniyle çok çeşitli alanlarda yoğun şekilde yapılmıştır. Türkiye'de arazi kullanımı ile coğrafi bölgelerin arazi yapısı ve iklim özellikleri arasında uyumlu bir ilişki söz konusudur. Bu durum, Türkiye'ye farklı ekolojik bölgelerde, o bölgelere özel tarımsal ürünleri üretme imkanı vermektedir[1].

Türkiye'nin 77.9 milyon hektar olan toprak varlığının 26.3 milyon hektarını tarım arazileri oluşturmaktadır. İşlenen tarla alanının %60'ında tahıl, %7'sinde baklagil, %6'sında endüstri bitkileri, %3'ünde yağlı tohumlar, %2'sinde yumru bitkiler ve %2'sinde yem bitkileri yetiştirilmektedir. TÜİK verilerine göre; Türkiye'de yılda yaklaşık 632.301 ton fasulye üretilmektedir. Bu da dünyadaki üretim oranının %3'üne tekabül etmektedir [21].

Konvansiyonel tarımın girdileri sulama suyu, tohum, gübre, tarımsal ilaç, kredi, tarım alet ve makinalarıdır[1].



Şekil 2. 3 Konvansiyonel Tarımın Girdileri

Çiftçi açısından kolay uygulanabilir olması bakımından Dünya'da olduğu gibi Türkiye'de de konvansiyonel tarım daha fazla tercih edilmektedir. Üretimde kullanılan hibrit tohumlar veya sentetik gübreler bitki büyümesini hızlandırdığından hasatın miktarı artar, süresi azalır.

2.2.2 Konvansiyonel Tarım ve Organik Tarım Arasındaki Farklar

Organik tarımın konvansiyonel tarımdan farkı, tohumundan gübresine kadar her girdinin sentetik katkıya sahip olmaması ve Tarım Bakanlığı'ndan sertifikalı olmasıdır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından organik tarımın esasları ve uygulanmasına ilişkin, resmi gazetede yönetmelik yayınlanmıştır [22].

Literatürde organik ve konvansiyonel tarımın moleküler düzeyde karşılaştırılmasıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. Örneğin; konvansiyonel yöntemlerle, entegre pest yöntemiyle ve organik tarım metotlarıyla yetiştirilmiş domateslerin; protein, C vitamini ergosterol, askorbik asit, β karoten, likopen, salisilik asit içerikleri karşılaştırıldığında organik domateslerin protein ve salisilik asit düzeylerinin yüksek C vitamini ve likopen içeriklerinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir.[23] Organik ve konvansiyonel gübrelenmiş topraklarda yetiştirilmiş ürünlerin besin elementi özellikleri karşılaştırılmış ve organik ürünlerin konvansiyonellere göre daha yüksek fosfor ve kuru madde oranı, daha düşük nitrojen ve nitrat içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir [6].

Organik ve konvansiyonel tarım arasındaki farkı analiz etmek amacıyla yapılan çalışmalara diğer bir örnek; İngiltere Rothemstad Araştırma Enstitüsü'nde Hereward (ekmeklik buğday varyetesi) kullanılarak yapılan bir çalışmada; bitkilere organik veya inorganik gübre verilerek iki grup arasındaki gen anlatım farkı EST'ye dayalı mikroarray testi ile değerlendirilmiş ve aralarında dramatik farklar gözlemlenmiştir. Ayrıca organik gübre verilerek yetiştirilmiş bitkilerde özellikle azotlu bileşik metabolizmasında görev alan genlerin ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada aminoasit, lignin, flavanoid biyosentezi ve glikoliziste görevli protein ailelerine benzerlikler tespit edilmiştir. Bu enzimlerden bazıları; nitrilaz, nitrat redüktaz ve fosfogliserat mutazdır [7].

Bir diğer çalışmada ise; organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilen buğdayın yapraklarından çıkarılan RNA'lar üzerinde kantitatif Realtime PZR metodu kullanılarak belirli genlerin (18S ve 16S gibi ribosomal RNA , aktin, tubulin, uzama faktörü kodlayıcı genler gibi halihazırda refererans olarak kullanılan genler yanında nitrat transporter, rubisco aktivaz, ferrodoksin kodlayıcı genler gibi farklı metabolik yolaklarda görev alanlar) ekspresyon düzeyleri arasındaki farklar değerlendirilmiş, actin-2, ferrodoksin ve cyclophilin kodlayıcı genlerin her iki koşulda da stabil olarak anlatım yaptığı belirlenmiştir[24].

Son yıllarda Avrupa Birliği tarafından desteklenen organik tarım ve ürünlerle ilgili "Safefood" adlı entegre proje kapsamında organik ve konvansiyonel koşullarda ve dört farklı kombinasyonda organik veya konvansiyonel gübre kullanılarak yetiştirilmiş sante patates genotipi yumrularında transkriptom farklılıklarının belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmada mikroarray yöntemi kullanılarak RNA'lardan hazırlanan problar ile aynı proje kapsamında önceden hazırlanan mikroarrayler taranmıştır. Çalışma sonucunda organik ve konvansiyonel koşullarda organik ve konvansiyonel gübre kullanımıyla anlatımı değişen genlerin bütününe bakarak bunlarla ilgili lipoksigenaz, nişasta sentezi gibi yolaklar belirlenmiştir[25].

2.3 Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH)

Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu (SSH), iki örneğin farklı anlatım yapan genlerinin karşılaştırılmasına dayanan, PZR metodu temelli, özelleşmiş bir çıkarım

yöntemidir[26], [27]. SSH metodu, keşfinden bu yana biyoteknoloji alanında pek çok araştırmacı tarafından, farklı anlatım yapan genler bakımından zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kurularak, bu genlerin izolasyonlarında kullanılmıştır. Bitkilerde yapılan çalışmalar özellikle farklı gelişim evrelerinde; çeşitli biyotik ve abiyotik streslerle anlatımı artan genlerin belirlenmesinde SSH yönteminin kullanılmasına yoğunlaşmaktadır. Örneğin *Camellia sinensis* (çay) bitkisinin genç ve olgun evrelerindeki sekonder metabolit olan kateşin molekülünün düzenlenme mekanizmaları karşılaştırılmış; çay bitkisinde flavanoid sentezinin düzenlenmesinin gelişim evrelerine göre değişiklik gösterdiği anlaşılmıştır [28]. *Solanum lycopersicum* (domates) bitkisinde yapılan bir çalışmada ise; yüksek tuzluluk stresine maruz kalan domateste, SSH metodu sayesinde yapılan incelemede daha önce tuzluluk ile ilişkilendirilememiş olan bazı genler belirlenmiştir [29] .

SSH metodunun bazı tür kanser dokularında kullanıldığı da bilinmektedir. Böbrek karsinoma hücreleri genellikle kimyasallar ve radyasyona karşı dirençli olduğu için, hastalığın tanısında biyolojik belirteçlere ihtiyaç duyulmuş ve buna yönelik normal ve kanserli böbrek hücreleri SSH yöntemiyle kıyaslanmıştır. Sonuçta bazı genlerin sadece kanserli hücrede eksprese edildiği bazılarının ise normal hücrelere göre aşırı eksprese edildiği saptanmıştır [30] .

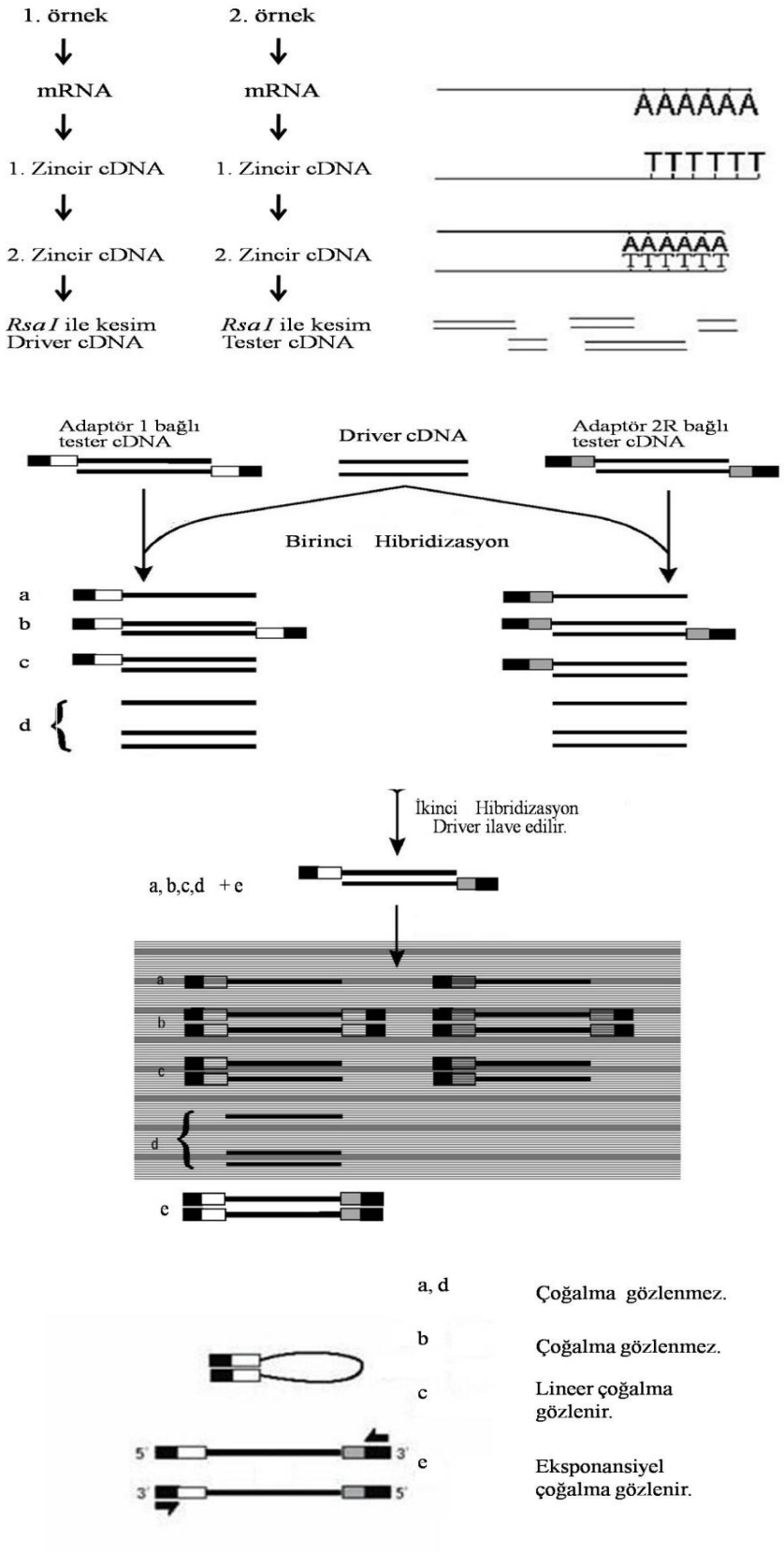
SSH metodu; iki hücre grubunda nadir ve yaygın olarak anlatımı yapılan genlerin düzeyi normalize edilmektedir. Belirli bir koşulda tester olarak adlandırılan örnekte driver olarak adlandırılan örneğe göre fazla anlatım yapan genler; art arda iki hibridizasyon, iki PZR yoluyla belirlenir. Öncelikle karşılaştırmak istenen iki hücre grubundan izole edilen mRNA' lar ayrı ayrı cDNA' ya dönüştürülür. cDNA' lar dar bir boyut aralığı oluşturmak için *Rsa1* enzimi ile kesilir. Tester olarak adlandırılan örnek iki gruba ayrılır ve her grubun 5' ucuna adaptör1 ve adaptör 2R olmak üzere iki ayrı adaptör takılır. Adaptör 1 ve adaptör 2R, kitte hazır olarak bulunmaktadır.

Birinci hibridizasyon işleminde driver örneğinin aşırı miktarı ayrı ayrı iki tester grubuna da katılır. Amaç hibridize olamayan cDNA'ların dışlanmasıdır. Testerde aynı konsantrasyonda bulunan cDNA' larla driverde eşit miktarda veya daha fazla bulunan cDNA' larla driverda daha az bulunan cDNA' lara göre hızlı bir biçimde hibridizasyon

gerçekleşir. Bu da testerda daha yüksek oranda bulunan tek zincirli türlerin zenginleşmesine yol açar. Tek zincirli türlerin konsantrasyonunun normalizasyonu ayrıca yaygın olarak bulunan cDNA' ların nadir bulunanlara göre daha hızlı dubleks oluşturması ile de sağlanır.

İkinci hibridizasyonda; ilk hibridizasyonun ürünleri karıştırılır ve yine aşırı miktarda driver DNA katılır. İki hibridizasyonda da çıkarıma uğramamış biri adaptor1 diğeri adaptör 2R içeren cDNAlar çoğaltılabilir dubleksler oluşturur (Şekil 2.3' te numaralandırılan moleküller arasında beklenen hibrit e hibritleri olarak gösterilmiştir). Hibridizasyon reaksiyonlarından sonra küt uçlu cDNA' lar oluşturmak için DNA polimeraz enzimi kullanılır. e hibritleri farklı ekspres edilen cDNA' lardır ve uç doldurma işleminden sonra yalnız bunlar nested primerler için bağlanma bölgeleri içerir.

Hibridizasyondan sonra dubleksler adaptörlerin içerisinde dizini bulunan primer1 kullanılarak PZR' la çoğaltılır. Şekilde a ve b olarak gösterilen moleküller, primer dizinini içermediklerinden dolayı çoğaltılamazlar. İki zincirinde de aynı adaptörün taşındığı b molekülleri ise adaptörlerin kendi arasında komplementer olması nedeniyle çoğaltılamazlar. c molekülleri yalnızca bir tane adaptör taşıdığı için, tek bir primere ait bağlanma bölgesi vardır ve lineer olarak çoğaltılabilir. Yalnızca, ucunda iki farklı adaptör olan e molekülleri eksponansiyel olarak çoğaltılabilir. İkinci PZR, farklı anlatım yapan genleri daha da zenginleştirmek amacıyla, nadir bulunan genlerin ortaya çıkmasına olanak verdiği için iki adaptörde de dizinleri bulunan nested primerler kullanılarak gerçekleştirilir.



Şekil 2. 4 Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu [26]

Reaksiyon sonunda PZR ürünleri T/ A vektörlerine ya da adaptörlerde bulunan kesim bölgelerinin yardımıyla uygun vektörlere konularak *E. coli*' ye aktarılır ve bir çıkarımlı cDNA kütüphanesi oluşturulmuş olur[26]. Kütüphanelerin analizini yapmak için çıkarım yapılmamış tester ve driver çıkarım yapılmış tester ve driver olmak üzere dört ayrı cDNA grubundan hazırlanan problarla taranıp pozitif klonlar seçilebilir ya da kütüphanedeki tüm cDNA' lar dizin analizine gönderilerek biyoinformatik analizler yapılabilir. Bu çalışmada tüm cDNA'lar dizin analizine gönderilmiş ve ardından biyo informatik analizler yapılmıştır.

2.4 Biyoinformatik Analizler

Genomların karşılaştırılabilmesi için gen dizilerini çözmek, genlerin fonksiyonlarını bulmak gerekir. Genomun tamamından, sadece genlerin kodlandığı bölgelere geçiş yapmak için cDNA sentezinin yapılması gerekir. Elde edilen cDNA'ların dizin analizi ve ardından çeşitli biyoinformatik programları kullanılarak yapılan araştırmalar işleri oldukça kolaylaştırmaktadır.

Sentezlenen cDNA' lardan kütüphaneler kurulur ve buradaki cDNA ların nükleotit dizi bilgisinin çözülmesi ile EST' ler oluşturulur. EST oluşturulmasının amacı tüm bir organizma ya da organizmaların istenilen hücre, doku veya organları için özgün olarak anlatımı yapılan genlerin belirlenmesidir [31].

EST (ekspres olmuş dizi işaretleri) dizin analizi sonucu elde edilen genom parçalarıdır [60]. EST' ler bilinmeyen genlerin tanımlanması ve yerlerinin tespit edilmesinde, gen ekspresyonu ve düzenlenmesi hakkında veri toplanması ve genom haritalarının oluşturulması konusunda kısa süreli ve ekonomik bir yol sağlar.

Genomun büyük bir kısmı gen kodlamayan bölgelerden oluştuğu için genomik dizilerden genlerin tespit edilmesi zordur. İşlevsel genomik çalışmalarda elde edilen cDNA dizinlerinin EST olarak değerlendirilebilmesi için ham dizinlerin işlenmesi ve birleştirilmesi gereklidir. İşlenme, ham EST dizilerinin içerdiği vektör, adaptör ve düşük değerli dizilerin uzaklaştırılması ve verilerin daha iyi incelenmesi için temizlenmesidir. Vektör dizinlerin temizlenmesi için CHROMAS programı kullanılır [32]. EST'ler NCBI BLASTn ve BLASTx yapılır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Bitki Materyalinin Hazırlanması

Asgen Tarım Tic. A.Ş. firmasından temin edilen Organik Askız çeşidi fasulye tohumu ve aynı firmanın Konvansiyonel Askız çeşidi tohumu üretim materyali olarak kullanılmaktadır. Çalışma kontrol ve deney grupları olmak üzere iki grupta gerçekleştirilmektedir. Kontrol grubunu organik koşullar, deney grubunu ise konvansiyonel koşullar oluşturmuştur. Kontrol grubunda Organik Askız çeşidi fasulye tohumu ve organik sertifikalı toprak, deney grubunda ise Konvansiyonel Askız çeşidi fasulye tohumu ve entansif tarım yapılan yerden alınan olan toprak kullanılmıştır. Diğer büyüme ve gelişme faktörleri (su, ışık, sıcaklık, nem, vs.) her iki grup için de sabit tutulmuştur. Deney iki tane kontrol, iki tane de deney grubunu temsil etmek üzere dört bitki örneği ile gerçekleştirilmektedir. Bitki gelişimini takiben 55. güne ulaşıldığında bitki yaprakları kesilerek moleküler işlemler için hazırlanmıştır. Alınan örnekler sıvı azota konularak -80ºC' de bekletilmiştir.

3.2 Besiyerleri

3.2.1 *E.coli* Büyütme Besiyeri

Luria Broth (LB)

Çizelge 3. 1 LB besiyeri bileşimi

Besin çeşidi	**Miktarı**
Tripton	10 g
Yeast extract(maya özütü)	5 g
NaCl	10 g

LB hazırlamak için Tripton, Maya Özütü ve NaCl maddelerinden tablodaki miktarlar tartılarak üzerine 1 litreye tamamlayacak şekilde distile su ilave edilir. pH 7'ye ayarlandı. Besiyeri sıvı halde kullanılacaksa direkt olarak 121˚C'de 20 dakika otoklavlanır. Katı halde kullanılacaksa 1lt sıvı LB içerisine 15g Agar ilave edilerek 121˚C'de 20 dakika otoklavlanır.

Çizelge 3. 2 SOB besiyeri bileşimi

Besin çeşidi	**Miktarı**
Tripton	5 g
Yeast extract	1,25 g
NaCl	0,145 g
MgCl2	0,507 g
KCl	0,046 g

250 ml. SOB besiyeri hazırlamak için tablodaki miktarlar üzerine distile su ilave edilerek 250ml'ye tamamlandı. Hazırlanan SOB 121˚C'de 20 dakika otoklavlandı.

SOC hazırlamak için otoklavlanmış SOB'ye %2 oranında (49ml 'ye 1ml olacak şekilde) steril glikoz eklendi.

3.3 Tamponlar ve Solüsyonlar

Bu tez çalışmasında kullanılan tampon çözeltiler ve bazı özel solüsyonlar aşağıdaki tablodaki gibidir.

Çizelge 3. 3 Kullanılan tampon çözeltiler ve solüsyonlar

Tampon - çözelti	**Hazırlanma şekli**
Ampisilin stok solüsyonu	İstenen oranda tartım yapılıp, 100 mg/ml distile su ilave edildi. Filtre sterilizasyonu yapıldıktan sonra – 20 ^{o}C' de saklandı.
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1' lik solüsyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
Etanol	% 75- 80 stok solüsyonu hazırlandı.
dNTP karışımı	20 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.
Etidyum bromid stok solüsyonu (EtBr)	5 mg/ ml EtBr' e steril deiyonize su ilave edildi.
Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (25: 24: 1)	25 ml Fenol, 24 ml Kloroform ve 1 ml Izoamil alkol karıştırıldı.
IPTG stok solüsyonu	1 M (240 mg/ml) izopropanol β-D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20 ^{o}C' de saklandı.

Çizelge 3. 3 Kullanılan tampon çözeltiler ve solüsyonlar(devam)

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

3.4 Moleküler Markırlar

Jelde kontrol için 2 adet moleküler markır(belirteç)kullanılmıştır.

Çizelge 3. 4 Kullanılan moleküler belirteçler

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

3.5 Enzimler

Kullanılan enzimler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Çizelge 3. 5 Kullanılan enzimler

Taq polimeraz	Promega Corporation
50 X advantage cDNA polimeraz	Clontech

3.6 Kitler

Yapılan çalışmada kullanılan kitler aşamalarına göre sırasıyla mRNA izolasyon kiti, SSH kiti, PZR pürifikasyon kitidir.

Çizelge 3. 6 Kullanılan kitler

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

3.7 Vektör ve Bakteri Suşları

Çizelge 3. 7 Kullanılan vektör ve bakteri suşları

pGEM®-T Easy, JM 109,	Ampisillinde mavi- beyaz seçilim gözlenir (Promega).
DH5α	Laboratuvar ortamında kimyasal kompetant hale getirildi.

3.8 Oligonükleotidler

Adaptör 1 ve adaptör 2R primerleri SSH kitinden hazır olarak temin edilmiştir.

Çizelge 3. 8 Kullanılan oligonükleotidler

Primer adı	**Primer dizini**
Adaptör 1	5’ GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGG CAGGT -3’ , 3’-CCCGTCCA-5’
Adaptör 2R	5’ TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGG GCGGT -3’ , 3’-GCCTCCCGCCA-5’

3.9 Bilgisayar Programları ve Veritabanları

3.9.1 Chromas/Pro

Dizin analizinden gelen sonuçların renkli kromatogram olarak gözlemlenmesini sağlayan, bu verilerden vektör dizinlerinin kesip çıkarılmasını ve FASTA formatında dizin elde edebilmeyi sağlayan bilgisayar programıdır.

3.9.2 BioEdit

Konsensus dizi oluşturmada kullanılan bilgisayar programıdır.

3.9.3 CAP3

Kontig oluşturmada kullanılan bilgisayar programıdır.

3.9.4 BLAST

FASTA formatındaki verilerin BLASTn, BLASTp ve BLASTx analizlerinin gerçekleştirildiği ve elde edilen benzerliklerin literatür araştırmasının yapıldığı veritabanıdır.

3.9.5 UniProt

Benzerlik bulunan protein ailelerinin moleküler ve yapısal fonksiyonlarının araştırıldığı veritabanıdır.

3.10 Fasulye Yapraklarından Total RNA İzolasyonu

RNA molekülleri ribonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır ve bir süre sonra ortamda RNAz kontaminasyonu oluşmaktadır. Bu durumu önlemek amacıyla Applichem DEPC solüsyonu kullanıldı. RNA izolasyonundan önce kullanılacak havan ve havanelleri, tüm cam ve plastik malzemeler % 0,1' lik DEPC' li su içerisinde bir gece bekletildi; kullanılacak Tris dışındaki tüm solüsyonlara ve saf suya % 0,1 oranında DEPC ilave edildi daha sonra 121 ^{o}C' de 20 dakika otoklavlandı. Tris, önceden DEPC katılıp otoklavlanmış çift distile suda hazırlandı.

Fasulye yapraklarından total RNA izolasyonu Trizol Reagent (Invitrogen) ile 5 aşamada gerçekleştirildi.

3.10.1 Homojenizasyon

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

3.10.2 Fazların Ayrılması

Bir önceki aşamada toz hale getirilen homojenize örnekler 12000 xg hız, 4˚C, 25 dakika santrifüjlendi. Üst faz 2 ml'lik yeni tüplere alındı. 1 ml Trizol Reagent için 0,2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.

3.10.3 RNA Çöktürme

3 dk oda sıcaklığında bekletilen örnekler 12000 xg hızda 4 ^{o}C' de 15 dakika santrifüjlendi. Üst faz dikkatli bir şekilde yeni işaretlenen 2 ml'lik tüplere alındı. 1 ml Trizol Reagent için 0,5 ml olacak şekilde izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

3.10.4 RNA Yıkama

Tüpler 12000 xg hızda 4˚C'de 30 dakika santrifüjlendi. RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant(üstteki sıvı kısım) atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml Trizol Reagent için 1 ml %70' lik soğuk etanol eklendi ve 1200 xg hızda 4 ^{o}C' de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dökülüp pellet şeffaf olarak gözlemleninceye kadar kurutuldu.

3.10.5 RNA'yı Yeniden Çözündürme

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

3.10.6 RNA'nın Temizlenmesi

Qiagen RNeasy plant mini kit kullanılmış olup kitin önerdiği protokole uyulmuştur. Total RNA tüplerine 350 µl RLT Tamponu eklenip pipetaj yapıldı. Tüplere 250 µl absolut etanol eklenip tekrar pipetaj yapıldı. Örnekler mini spin column içine alınarak 10000 rpm hızda 30 saniye santrifüjlendi. Alt kısım uzaklaştırılarak tüplere 450 µl RPE tamponu eklendi. 10000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlendi. Alt kısım uzaklaştırıldı. Tüplere tekrar 300 µl RPE tamponu eklendi, 10000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendi.

Alt kısım uzaklaştırıldı. 1. elüsyon için filtreli kısma 65 ˚C'de ısıtılmış 35 µl RNaz free su eklenip oda sıcaklığında 10000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendi. 2. elüsyon için filtreli kısım yeni bir tüp içerisine konuldu. 50 µl RNaz free su eklendi. 10000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendi.

3.10.7 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

3.10.7.1 UV Spektrofotometre İle Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Trizolle izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları UV spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. RNA'ların konsantrasyonları;

" OD_{260} x 40 µg/ml x sulandırma faktörü " formülüyle hesaplandı.

3.10.7.2 Nanodrop ile Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Total RNA örneklerinden 2'şer µl alınarak nanodropta miktar tayini yapıldı.

3.10.8 Total RNA'nın Denatüre Edici Formaldehit Jel Üzerinde Analizi

3.10.8.1 Jelin Hazırlanması

Tüm elektroforez aparatları DEPC' li su ile yıkanarak temizlendi. % 1' lik jel hazırlamak için, 0,75 g Agaroz (Applichem), 15 ml 5 X MOPS çözeltisi, 46,875 ml DEPC' li su ile çözüldü ve 60^{o}C' ye soğutuldu. İçerisine 60 ^{o}C' ye ısıtılmış 13,125 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü. Donması beklendi.

3.10.8.2 RNA Örneklerinin Hazırlanması

Her bir RNA örneğinden Ek A' da verilen miktarlarda, 2 µl 5 X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 0,5 µl Etidyum Bromid ilave edilerek, 55 ^{o}C' de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

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

3.11 Total RNA' dan mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu Oligotex mRNA Spin- Column Protokolu kullanılarak yapıldı. Bitki örneklerinden çıkarılan total RNAlar, toplam miktar 0,25- 0,50 mg ve son hacim 500 µl olacak şekilde 500 µl RNaz free water, 30 µl Oligotex süspansiyonu ve 500 µl OBB tamponu ile karıştırılarak mRNA izolasyonunda kullanıldı.

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

3.11.1 mRNA Miktarının Belirlenmesi

3.11.1.1 Spot Testi İle mRNA Miktarının Belirlenmesi

mRNA miktarını belirlemek amacıyla, 0.2 g Agaroz, 20 ml 1XTBE ile çözüldü, 60 ^{o}C' ye soğutuldu. İçerisine10 µl Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

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

3.11.1.2 Nanodrop İle mRNA Miktarının Belirlenmesi

3.12 cDNA Sentezi

Organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilen *Phaseolus vulgaris* yapraklarından cDNA sentezi Clontech PZR-select cDNA Substraction kiti protokolünde belirtildiği gibi 2µg mRNA kullanılarak yapıldı. Organik koşullarda yetiştirilmiş *Phaseolus vulgaris* yapraklarından elde edilen mRNAlardan driver cDNA; konvansiyonel koşullarda

yetiştirilmiş *Phaseolus vulgaris* yapraklarından elde edilen mRNAlardan tester cDNA; kit içerisinde bulunan kontrol mRNA ise kontrol cDNA olarak hazırlandı.

3.12.1 cDNA Sentez Primerinin Bağlanması

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

Çizelge 3. 9 cDNA sentez aşamasının bileşen ve miktarları

	Yaprak tester (konvansiyonel)	**Yaprak driver(organik)**	**Kontrol**
polyA$^+$ RNA	12 µl	12 µl	1 µl
cDNA sentez primeri (10 µM)	2 µl	2 µl	1 µl
dIH_2O (µl)	-	-	3µl
Toplam	14 µl	14 µl	5 µl

3.12.2 Birinci Zincir cDNA Sentezi

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

Çizelge 3. 10 1. zincir sentez aşamasının bileşen ve miktarları

	Yaprak tester (konvansiyonel)	**Yaprak driver (organik)**	**Kontrol**
Primer bağlanmış rxn	14 µl	14 µl	5 µl
5 X birinci zincir tamponu	4 µl	4 µl	2 µl
dNTP karışımı (10mM)	1 µl	1 µl	1 µl
Steril H_2O	-	-	1 µl
RT enzim(AMV 20 u/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Toplam	**20 µl**	**20 µl**	**10 µl**

3.12.3 İkinci Zincir cDNA Sentezi

Birinci zincir reaksiyonunun üzerine tampon çözeltiler kitteki miktarlar doğrultusunda çizelgedeki gibi ilave edildi. Tüpler 16 ^oC' de thermal cycler' da 2.5 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 11 2.zincir sentez basamağının bileşen ve miktarları

	Yaprak tester	**Yaprak driver**	**Kontrol**
Birinci zincir cDNA	20 µl	20 µl	10 µl
5X ikinci zincir tamponu	16 µl	16 µl	16 µl
dNTP karışımı (10mM)	1,6 µl	1,6 µl	1,6 µl
20X ikinci zincir enzim kokteyli	4 µl	4 µl	4 µl
Steril H_2O	38,4 µl	38,4 µl	38,4 µl
Toplam	**80 µl**	**80 µl**	**80 µl**

3.12.4 cDNA Uçlarının Kütleştirilmesi

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

cDNA uçlarının kütleştirilmesinden sonra reaksiyonu durdurmak ve pellet görülmesini sağlamak amacı ile tüplere 4 µl 20X EDTA/ Glikojen mix eklendi. Ardından tüplere 100 µl Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (10: 10: 0,4) eklenerek 14000 rpm hızda 10 dakika 23˚C'de santrifüjlendi. Akışkan üst faz ayrı tüp içerisine alınarak tüplere 100 µl Kloroform/ Izoamil alkol (24: 1) eklendi ve aynı santrifüj koşullarında tekrar santrifüjlendi. Üst faz yeni bir tüp içerisine alındı. cDNA'nın çökmesini sağlamak amacı ile tüplerin içerisine 40 µl 4M NH_4OAc ve 300 µl % 95'lik etanol eklendi. Tüpler 14000 rpm hızda 40 dakika 4˚C'de santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 500 µl %80'lik etanol tüplere eklendi. Etanol eklenen tüpler 14000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelletler etanolün uçması için oda sıcaklığından 10 dakika bekletildi.

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

3.12.5 Tester ve Driver cDNA'ların Agaroz Jel Üzerinde Analizi

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

3.12.6 *RsaI* Kesimi

Belirli bir uzunluk aralığında küt uçlu cDNA' lar oluşturmak için dört bazda kesim yapan *RsaI* enzimiyle kitteki miktarlar doğrultusunda ve çizelgede verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. Tüpler 37 ^oC' de thermal cycler' da 1.5 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 12 *RsaI* enzimi ile kesim basamağı bileşen ve miktarları

	Yaprak tester	**Yaprak driver**	**Kontrol**
ds cDNA	44 µl	44 µl	44µl
10 X *RsaI* kesim tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
***RsaI* enzimi**	1 µl	1 µl	1 µl
Toplam	**50 µl**	**50 µl**	**50 µl**

İnkübasyondan sonra kesim reaksiyonunun durdurulması için tüplere 2,5 µl EDTA/ Glikojen mix eklendi. 50 µl Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (25: 24: 1) katılarak, 14000 rpm hızda 10 dakika 23 ^{o}C' de santrifüj yapıldı. Süpernatant yeni tüplere alındı ve tüplere 50 µl Kloroform/ İzoamil alkol eklendi. 14000 rpm hızda 10 dakika 23 ^{o}C' de santrifüj yapıldı. Üst faz yeni tüplere alınarak 25 µl 4 M NH_4OAc ve 187,5 µl %95'lik etanol katıldı. Vortekslenen tğpler 23 ˚C'de 14000 rpm hızda 20 dakika santrifüjlendi.

Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 200 µL %80 Etanol katıldı, 14000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlendi. Pelletler, Etanolün uçması için 20 dakika bekletildi. Kuruyan pelletler 6 µl distile su içinde çözündürüldü.

3.13 Adaptör Ligasyonu

Örneklerin hazırlamak için *RsaI* enzimi ile kesilmiş cDNA' lardan 1 µl alınarak 5 µl dI H_2O seyreltildi. Geriye kalan cDNA' lardan 3 µl' si birinci hibridizasyon için, 1 µl' si ikinci hibridizasyon için kullanıldı.

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

Çizelgedeki şekilde master karışım hazırlandı.

Çizelge 3. 13 Adaptör ligasyonu için master karışımın bileşen ve miktarları

	Bir reaksiyon için	**6,5 reaksiyon için**
Steril H_2O	3,5 µl	22,75 µl
5X Ligasyon Tamponu	2 µl	13 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl	6,5 µ
Toplam	**6,5 µl**	**42,25 µl**

Master karışım hazırlandıktan sonra çizelgedeki miktarlar doğrultusunda reaksiyonlar kuruldu.

Çizelge 3. 14 Adaptör ligasyonu reaksiyon bileşen ve miktarları

	O1	**O2**	**K1**	**K2**	**C1**	**C2**
***RsaI* kesilmiş cDNA**	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Adaptör 1	1,5 µl	-	1,5 µl	-	1,5 µl	-
Adaptör 2R	-	1,5 µl	-	1,5 µl	-	1,5 µl
Master karışım	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl	6,5 µl
Toplam	**10 µl**	**10 µl**	**10 µl**	**10 µl**	**10 µl**	**10 µl**

Çizelge 3.6 adaptör ligasyonu için reaksiyonların kurulması(O1= 1. adaptörlü organik tester, O2= 2. adaptörlü organik tester, K1= 1. adaptörlü konvansiyonel driver, K2= 2. adaptörlü konvansiyonel driver, C1= 1. adaptörlü kontrol, K2= 2. adaptörlü kontrol).

Hazırlanan 10 µl hacmindeki reaksiyonlardan organik driver unsubtracted kontrol için yeni bir tüp içerisinde 2 µl organik 1 ve 2 µl organik 2R reaksiyonlarından birleştirildi. Konvansiyonel tester unsubtracted kontrol için yeni bir tüp içerisinde 2 µl

konvansiyonel 1 ve 2 µl konvansiyonel 2R reaksiyonlarından birleştirildi. Kontrol unsubtracted kontrol için ise yeni bir tüp içerisinde 2 µl kontrol 1 ve 2 µl kontrol 2R reaksiyonlarından birleştirildi.

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

3.14 Birinci Hibridizasyon

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

Çizelge 3. 15 Organik cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

	1 (Adaptör 1)	**2 (Adaptör 2R)**
***Rsaı* ile kesilmiş adaptörsüz driver (konvansiyonel)**	1,5 µl	1,5 µl
Adaptör 1 takılmış organik	1,5 µl	-
Adaptör 2Rtakılmış organik	-	1,5 µl
4x Hibridizasyon Tamponu	1 µl	1 µl
Toplam	**4 µl**	**4 µl**

Çizelge 3. 16 Konvansiyonel cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

	1 (Adaptör 1)	**2 (Adaptör 2R)**
***RsaI* ile kesilmiş adaptörsüz driver (organik)**	1,5 µl	1,5 µl
Adaptör 1 takılmış konvansiyonel	1,5 µl	-
Adaptör 2R takılmış konvansiyonel	-	1,5 µl
4X Hibridizasyon Tamponu	1 µl	1 µl
Toplam	**4 µl**	**4 µl**

Çizelge 3. 17 Kontrol cDNA için hazırlanan reaksiyon bileşenleri

	1 (Adaptör 1)	**2 (Adaptör 2R)**
***RsaI* ile kesilmiş adaptörsüz driver (kontrol)**	1,5 µl	1,5 µl
Adaptör 1 takılmış kontrol	1,5 µl	-
Adaptör 2R takılmış kontrol	-	1,5 µl
4X Hibridizasyon Tamponu	1 µl	1 µl
Toplam	**4 µl**	**4 µl**

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

3.15 2. Hibridizasyon

4 X Hibridizasyon tamponu, hibridizasyon öncesi oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Örnekler çizelgedeki gibi ilave edildi.

Çizelge 3. 18 2.Hibridizasyon bileşenleri

	Kullanılan Miktar
Driver cDNA	1 µl
4 X Hibridizasyon Tamponu	1 µl
Steril su	2 µl
Toplam	**4 µl**

Yukarıdaki çizelgede hazırlanan karışımdan; konvansiyonel, organik ve kontrol grupları için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Kullanılan driver *RsaI* ile kesilmiş adaptörsüzdür. Konvansiyonel grubu için driver organik, kontrol grubu için driver ϕX174/ *Hae* lll kontrol DNA, organik grubu için driver konvansiyoneldir.

Tüplerin üzerlerine 8 µl mineral yağ ilave edildi. Örnekler 98 ^{o}C' de 1.5 dakika inkübe edildi.

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

3.16 1. PZR Çoğaltımı

Unsubtracted ve subtracted örnekler kullanılarak 1. PZR kuruldu. Unsubtracted örnekler 100 defa dilue edildi ve dilue edilen örneklerden 1 µl kullanıldı. Subtracted örneklerden ise 1 µl kullanıldı.

Çizelge 3. 19 1. PZR bileşen ve miktarları

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

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

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

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

3.16.1 1. PZR Amplifikasyonu PZR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz

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

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

3.17 2. PZR Amplifikasyonu

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

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

Çizelge 3. 20 2.PZR bileşen ve miktarları

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

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

3.17.1 2. PZR Amplifikasyonu PZR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz

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

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

3.18 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

2. PZR ürünleri BioBasic Pürifikasyon Kit kullanılarak saflaştırıldı.

Tüplere örnek miktarının 3 katı kadar Binding Tamponu eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 25˚C'de 10000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlendi. Dipte kalan sıvı dökülerek kolon içerisine 750 µl Yıkama Tamponu ilave edildi. Aynı santrifüj koşullarında tekrar santrifüjlendi.

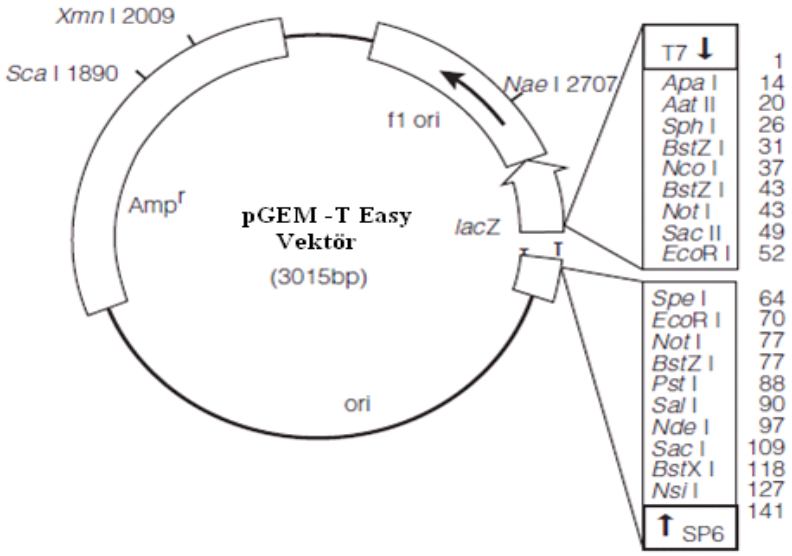
Kolonun alt tüpleri yenilendi. 15 µl distile su ilave edildi. 37 ^{o}C sıcaklıkta 2 dakika bekletildi. 2 dakika, 10.000 rpm hızda 25˚C'de santrifüj edildi ve 1. elüsyon hazırlandı.15 µl distile su ilave edilerek 2 dakika, 10.000 rpm hızda 25˚C'de santrifüj edildi ve 2. elüsyon hazırlandı. Örnekler - 20 ^{o}C' ye kaldırıldı. Örneklerden 1 µl alınarak spektrofotometrede miktar tayini yapıldı.

3.18.1 Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Spektrofotometrede Miktar Analizi

Saflaştırılmış PZR ürünlerinin konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. DNA' ların konsantrasyonları OD_{260} x 50 µg/ml x sulandırma faktörü formülüyle hesaplandı.

3.19 cDNA' ların pGEM®-T Easy Vektörüne Ligasyonu

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



Şekil 3. 1 Promega pGEM®-T Easy vektör haritası

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

Çizelge 3. 21 Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

	O	**K**
2 X Rapid ligasyon tamponu	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy vektör (50 ng/ µl)	1 µl	1 µl
İnsert	3 µl	4 µl
T4 DNA ligaz (3 u/ µl)	1 µl	1 µl
H_2O	1 µl	-
Toplam	**11 µl**	**11 µl**

Çizelgedeki doğrultuda reaksiyon kuruldu. Tüpler 4 ^oC' de 48 saat inkübe edildi.

3.20 *E.coli*' ye Transformasyon

Transformasyon işlemi için iki ayrı kompetan hücre kullanılmıştır. Bunlar ticari olarak alınan JM109 ve laboratuvar şartlarında hazırlanmış olan DH5α hücreleridir.

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

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

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

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

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

3.21 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması

Katı LB petrilerinde büyümüş olan beyaz koloniler steril kürdanlar ile 96' lık Greiner kaplarına ekildi ve 37 ^{o}C' de çalkalayıcıda bir gece büyütüldü. İnkübasyon sonrasında

yeni bir 96'lık Greiner kabına yeni besiyeri dökülüp kürdanla inkübe olmuş örneklerden ekim yapılarak her bir kuyucuğun replikası yapıldı. Örnekler -80 ^{o}C' de saklandı.

3.22 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi

-80 ^{o}C' de saklanan örnekler ertesi gün analizi yaptıracak olan BioGen Medikal Aletler Ltd.Şti. firma görevlisine teslim edildi.

3.23 Biyoinformatik Analizler

Dizin analizinden gelen sonuçlarda başarılı okumalar öncelikle Chromas programı ile açıldı, kromatogramları gözlemlendi. Ardından vektör dizinleri uzaklaştırılarak FASTA formatında kaydedildi. NCBI sayfasında Nükleotid BLAST ve BLASTX analizi yapılarak sonuçlar kaydedildi.

Konsensus diziler oluşturularak bu dizilere de BLASTX analizi yapıldı. Çıkan sonuçlar birbiri ile kıyaslandı ve örtüştüğü gözlemlendi.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Birleştirilmiş Total RNA'nın UV-Spektrofotometre Sonuçları

Konvansiyonel koşullarda yetiştirilen yaprak dokuları 1.bitkiden 4; 2.bitkiden de 5 örnek olmak üzere 2 grup ve 9 örnek olarak elde edildi. Daha sonra bu örnekler birleştirilerek C1 ve C2 olarak 2 grupta toplandı. Spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Çizelge 4. 1'de verildiği gibidir.

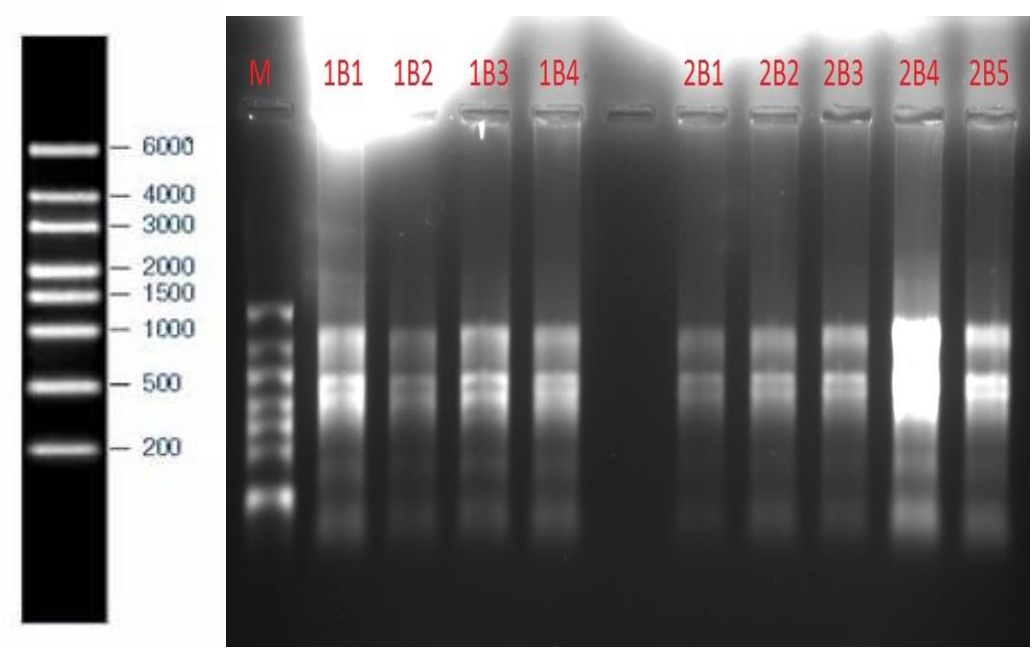
Ölçümlerde UV Spektrofotometre kullanılmıştır. Cihazın verdiği OD(Optical Density) değeridir. Ölçülen RNA molekülü ise miktar tayininde "OD(260 nm) × 40 × dF" formülü kullanılır. dF, dilüsyon faktörünü ifade etmektedir.

Çizelge 4. 1 Konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye total RNA'sının spektrofotometre sonuçları ve miktar analizi

	UV SPEKTROFOTOMETRE	
KONVANSİYONEL ÖRNEK	ABSORBANS DEĞERİ (260nm)	RNA MİKTARI (OD x 40 x df) (µg/µl)
C1	0,025	1
C2	0,013	0,52

4.2 Temizlenmiş Birleştirilmemiş Total RNA'nın MOPS Jeli Sonuçları

Total RNA'nın denatüre edici jel sonuçları Şekil 4. 1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 4. 1 Temizlenmiş birleştirilmemiş total RNA'nın MOPS jeli

(M:Markır, 1B1:1. Bitki 1.örnek, 1B2:1.Bitki 2.örnek, 1B3:1.Bitki 3.örnek, 1B4:1.Bitki 4.örnek, 2B1:2. Bitki 1.örnek, 2B2:2. Bitki 2.örnek, 2B3:2. Bitki 3.örnek, 2B4:2. Bitki 4.örnek, 2B5:2. Bitki 5.örnek)

4.3 Total RNA'nın Nanodrop Sonuçları

Yıldız Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği'ne ait Shimazdu Bio-Spec Nanodrop cihazı kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4. 2'de verildiği gibidir.

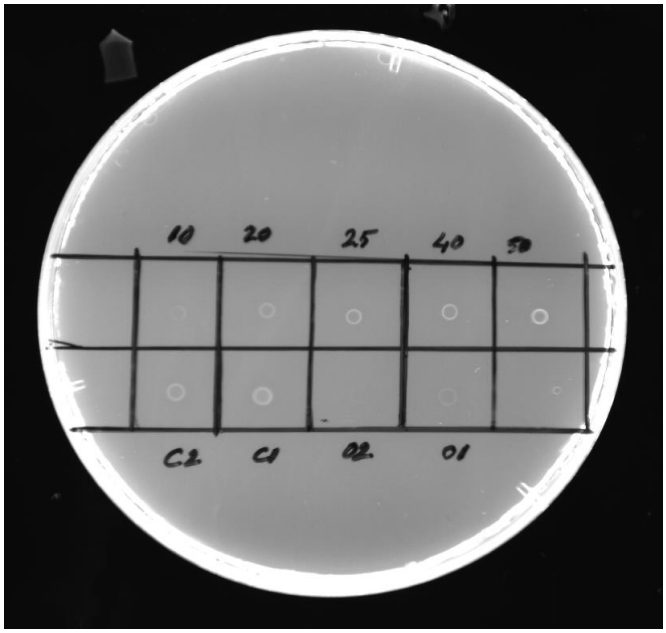
Çizelge 4. 2 Total RNA Nanodrop sonuçları

No.	Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/µL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	kontrol	15.02.27 14:35:32			9,42	-2,64	-0,07	-0,297	-0,622	-3,824	-0,532	0,192	1,000
2	o1b1	15.02.27 14:36:18			482,98	2,15	5,17	11,746	5,290	2,009	-0,329	0,192	1,000
3	o1b2	15.02.27 14:36:44			369,64	2,09	1,35	9,116	4,306	6,735	-0,125	0,192	1,000
4	o1b3	15.02.27 14:37:08			-57,45	1,59	0,43	0,073	0,607	-1,866	1,510	0,192	1,000
5	o1b4	15.02.27 14:37:45			376,05	2,06	1,24	9,895	5,051	8,093	0,494	0,192	1,000
6	o2b1	15.02.27 14:38:12			17,03	-105,69	-1,17	-0,118	-0,548	-0,907	-0,543	0,192	1,000
7	o2b2	15.02.27 14:38:39			261,37	2,29	-25,09	6,410	2,723	-0,384	-0,124	0,192	1,000
8	o2b3	15.02.27 14:41:20			-59,30	1,54	0,40	-0,697	-0,177	-2,941	0,785	0,192	1,000
9	o2b4	15.02.27 14:42:15			279,21	2,23	-34,22	6,350	2,499	-0,835	-0,631	0,192	1,000
10	c1b1	15.02.27 14:42:53			742,20	2,19	3,83	17,980	7,901	4,274	-0,574	0,192	1,000
11	c1b2	15.02.27 14:45:16			-55,78	1,46	0,38	-0,665	-0,225	-2,901	0,729	0,192	1,000
12	c1b3	15.02.27 14:46:01			865,52	2,18	3,83	21,150	9,427	5,160	-0,488	0,192	1,000
13	c1b4	15.02.27 14:46:37			1089,55	2,19	2,86	26,740	11,957	9,012	-0,499	0,192	1,000
14	c2b1	15.02.27 14:47:06			230,21	2,30	7,02	5,164	1,908	0,228	-0,591	0,192	1,000
15	c2b2	15.02.27 14:47:36			438,08	2,25	7,01	11,849	5,762	2,458	0,897	0,192	1,000
16	c2b3	15.02.27 14:48:03			516,49	2,20	4,92	12,295	5,239	2,007	-0,618	0,192	1,000
17	c2b4	15.02.27 14:48:24			685,52	2,19	4,11	16,537	7,217	3,572	-0,601	0,192	1,000
18	c2b5	15.02.27 14:49:06			625,12	2,20	3,91	15,052	6,534	3,423	-0,577	0,192	1,000
19	su	15.02.27 14:50:00			-65,12	1,47	0,40	-2,409	-1,886	-4,882	-0,781	0,192	1,000

4.4 mRNA SPOT Testi

Spot testi için %1'lik agaroz jel hazırlandı ve hazırlanan jel ince bir tabaka halinde petri içerisine döküldü. Konsantrasyonu 100 ng/ml olan kontrol mRNA'sından test için

spotlar hazırlandı (50ng/ml, 40ng/ml, 25ng/ml, 20ng/ml ve 10ng/ml). Sonuçlar Şekil 4. 2'teki gibidir.



Şekil 4. 2 mRNA Spot Testi Sonucu [33]

(Üst sıra:Kontrol mRNA'sının farklı konsantrasyonları, Alt Sıra: Konvansiyonel ve Organik mRNA'ların 2 grubu)

4.5 mRNA'nın Nanodrop ile Ölçülmesi

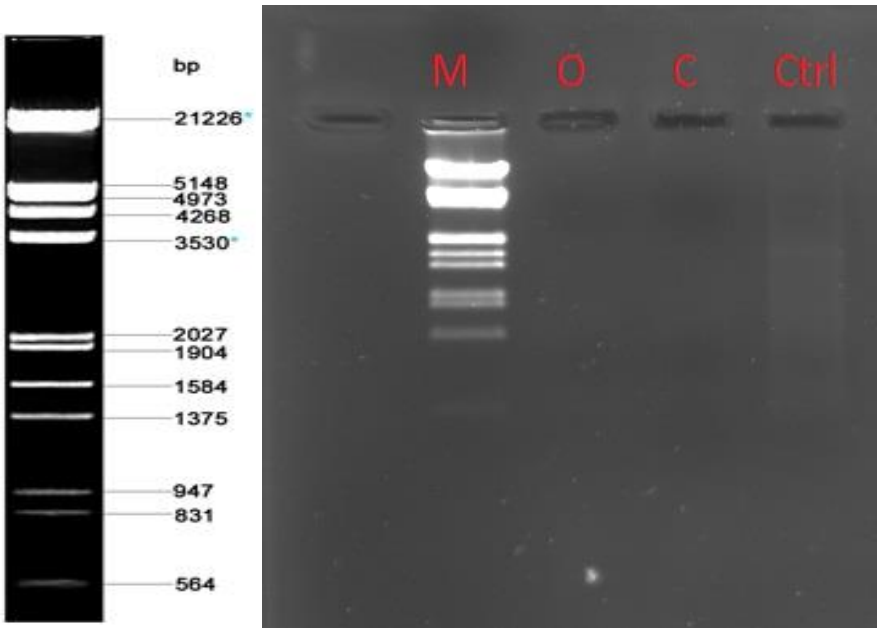
Sonuçlara ait grafikler Ek A'da verilmiştir. Sonuç çizelgesi Çizelge 4.3'te görüldüğü gibidir.

Çizelge 4. 3 mRNA'nın Nanodrop Sonuçları

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

4.6 cDNA Agaroz Jel Sonucu

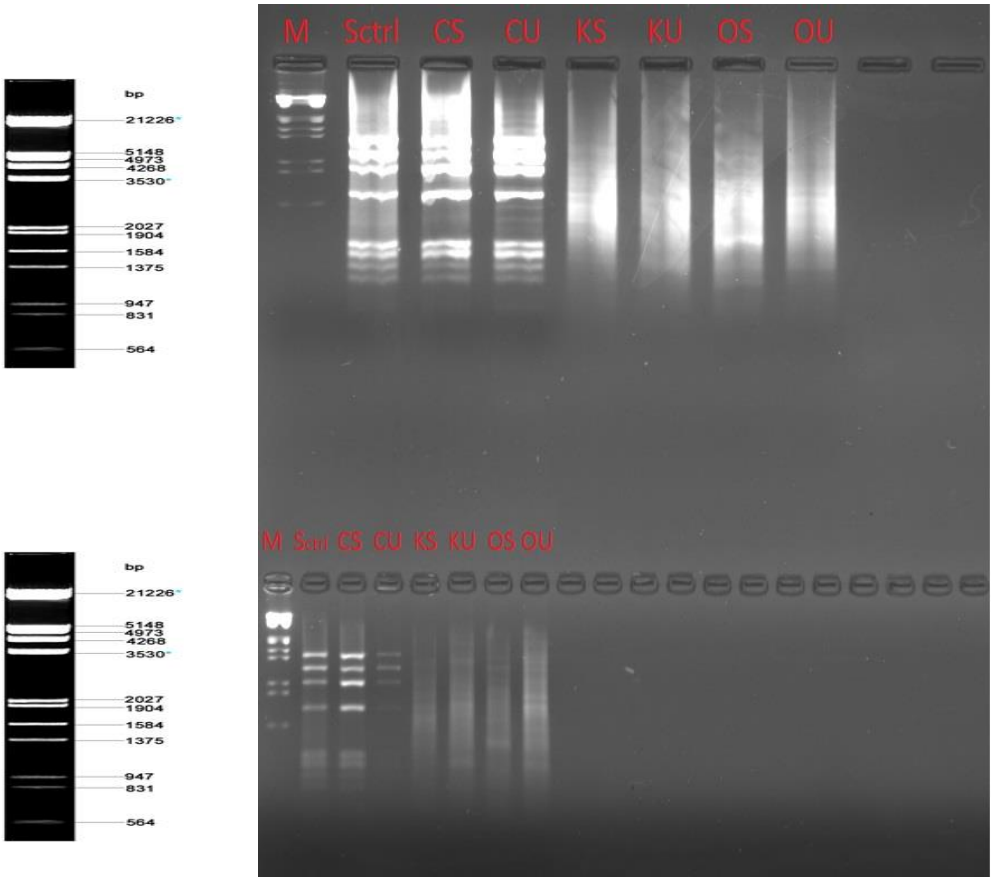
cDNA agaroz jel sonucu Şekil 4.5'te verildiği gibidir.



Şekil 4. 2 cDNA Agaroz Jel Sonucu

(M:Markır, O:Organik, C:Konvansiyonel, Ctrl:Kontrol)

4.7 Birinci ve İkinci PZR Agaroz Jel Sonucu



Şekil 4. 3 Birinci ve İkinci PZR Agaroz Jel Sonucu

Birinci ve ikinci PZR sonuç jel görüntüsü Şekil 4.6'da verildiği gibidir.

(Üst Jel: Birinci PZR M:Markır, Sctrl: Çıkarımı yapılmış kontrol, CS:Çıkarımı yapılmış konvansiyonel, CU:Çıkarımı yapılmamış konvansiyonel, KS:Çıkarımı yapılmış kontrol, KU:Çıkarımı yapılmamış kontrol, OS: Çıkarımı yapılmış organik, OU:Çıkarımı yapılmamış organik)

(Alt Jel: İkinci PZR M:Markır, Sctrl:Çıkarımı yapılmış kontrol, CS:Çıkarımı yapılmış konvansiyonel, CU:Çıkarımı yapılmamış konvansiyonel, KS:Çıkarımı yapılmış kontrol, KU:Çıkarımı yapılmamış kontrol, OS: Çıkarımı yapılmış organik, OU:Çıkarımı yapılmamış organik)

4.8 İkinci PZR'ın Spektrofotometre Sonucu

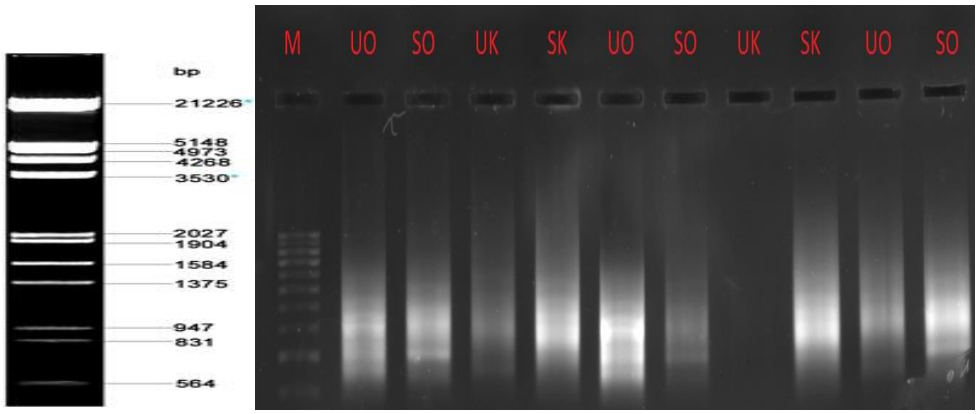
2.PZR'nin spektrofotometre ölçüm sonuçları Şekil 4.3'te verildiği gibidir.

Çizelge 4. 3 Organik ve konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş fasulye DNA'sının 2.PZR'ının spektrofotometre sonuçları ve miktar analizi

ÖRNEK	ABSORBANS DEĞERİ (260nm)	RNA MİKTARI (OD x 40 x df) (ng/µl)
K	0,003	150
O	0,004	200

4.9 Tekrarlanan 2.PZR'ın Agaroz Jel Sonucu

Tekrarlanan 2.PZR jel görüntüsü Şekil 4.7'deki gibidir.

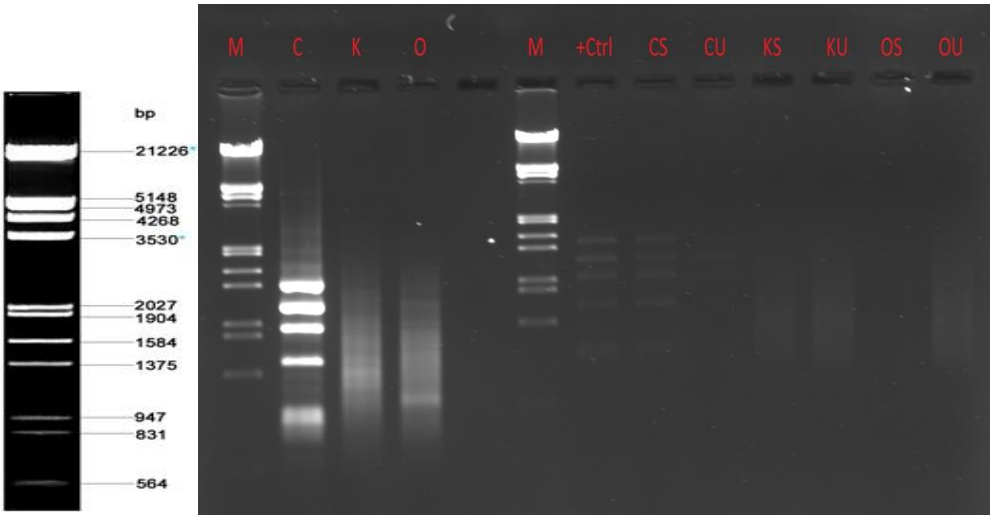


Şekil 4.4 Tekrarlanan 2.PZR Agaroz Jel Sonucu

(M:Markır, Sctrl: Çıkarımı yapılmış kontrol, CS:Çıkarımı yapılmış konvansiyonel, CU:Çıkarımı yapılmamış konvansiyonel, KS:Çıkarımı yapılmış kontrol, KU:Çıkarımı yapılmamış kontrol, OS: Çıkarımı yapılmış organik, OU:Çıkarımı yapılmamış organik)

4.10 Pürifiye Edilmiş Birinci ve İkinci PZR'ın Agaroz Jel Sonucu

Pürifiye edilmiş 1. Ve 2. PZR agaroz jel görüntüleri Şekil 4.8'deki gibidir.



Şekil 4. 5 Pürifiye Edilmiş Birinci ve İkinci PZR Agaroz Jel Sonucu

(M:Markır, Sctrl: Çıkarımı yapılmış kontrol, CS:Çıkarımı yapılmış konvansiyonel, CU:Çıkarımı yapılmamış konvansiyonel, KS:Çıkarımı yapılmış kontrol, KU:Çıkarımı yapılmamış kontrol, OS: Çıkarımı yapılmış organik, OU:Çıkarımı yapılmamış organik)

4.11 Rekombinant Hücrelerin Belirlenmesi

Mavi-beyaz seçim yöntemi ile rekombinant hücreler belirlendi. Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için β- galaktosidaz testi kullanıldığından mavi ve beyaz olmak üzere iki çeşit koloni gözlemlendi. Transformasyonun başarıyla gerçekleştirildiği koloniler beyaz; diğerleri ise mavi görüldü. Beyaz koloniler transformasyona uğramış yani fasulye cDNA' sını almış olanlardı.

4.12 Beyaz Kolonilerin Seçilmesi ve Kolonilerin Analize Gönderilmesi

Toplam 57 rekombinant koloninin stok kültürleri hazırlandı. Dizin analizi için BioGen Medikal Aletler Şirketi'ne gönderildi. Analiz sonuçlarının biyoinformatik analizleri yapıldı.

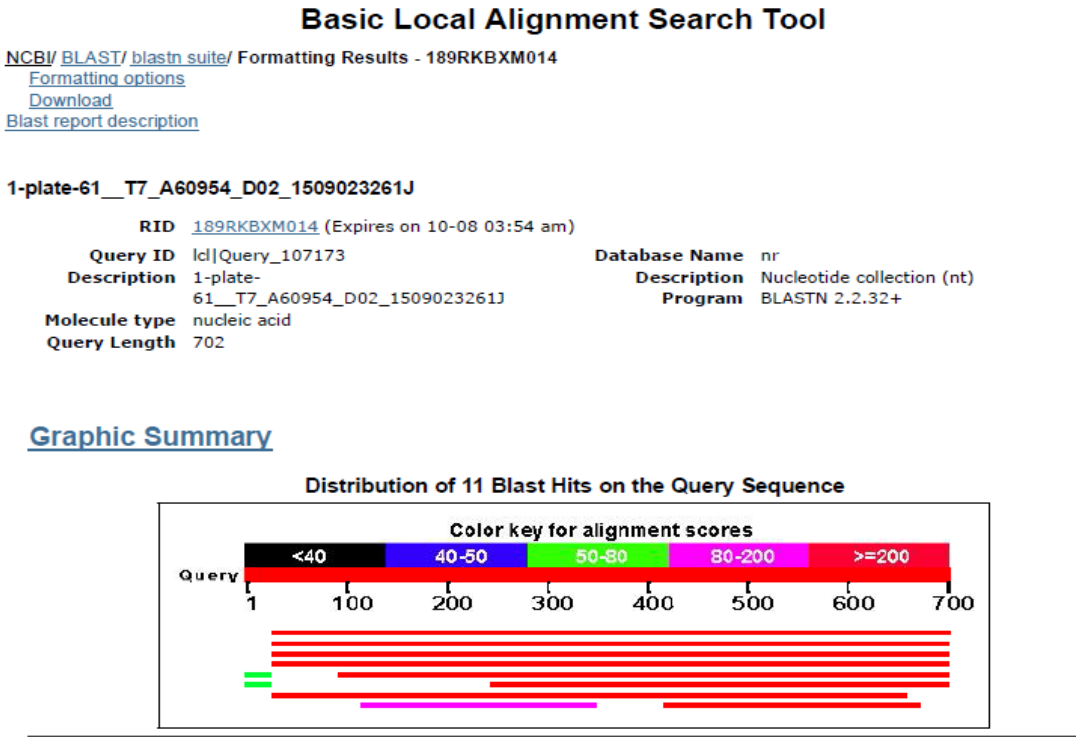
4.13 cDNA Kütüphanesinin Biyoinformatik Analizleri

4.13.1 EST'lerin Hazırlanması

Dizin analizinden e-mail yoluyla gelen dosya Chromas programı ile açıldı. Dizinlerden, vektör dizinlerinin uzaklaştırılması ve FASTA formatında elde edilmesi sağlandı.

4.13.2 BLASTn ve BLASTx Analizleri

NCBI sitesinden öncelikler nucleotide blast(blastn) analizi yapıldı. Blastn, nükleotid veritabanlı benzerlik araştırmasıdır.



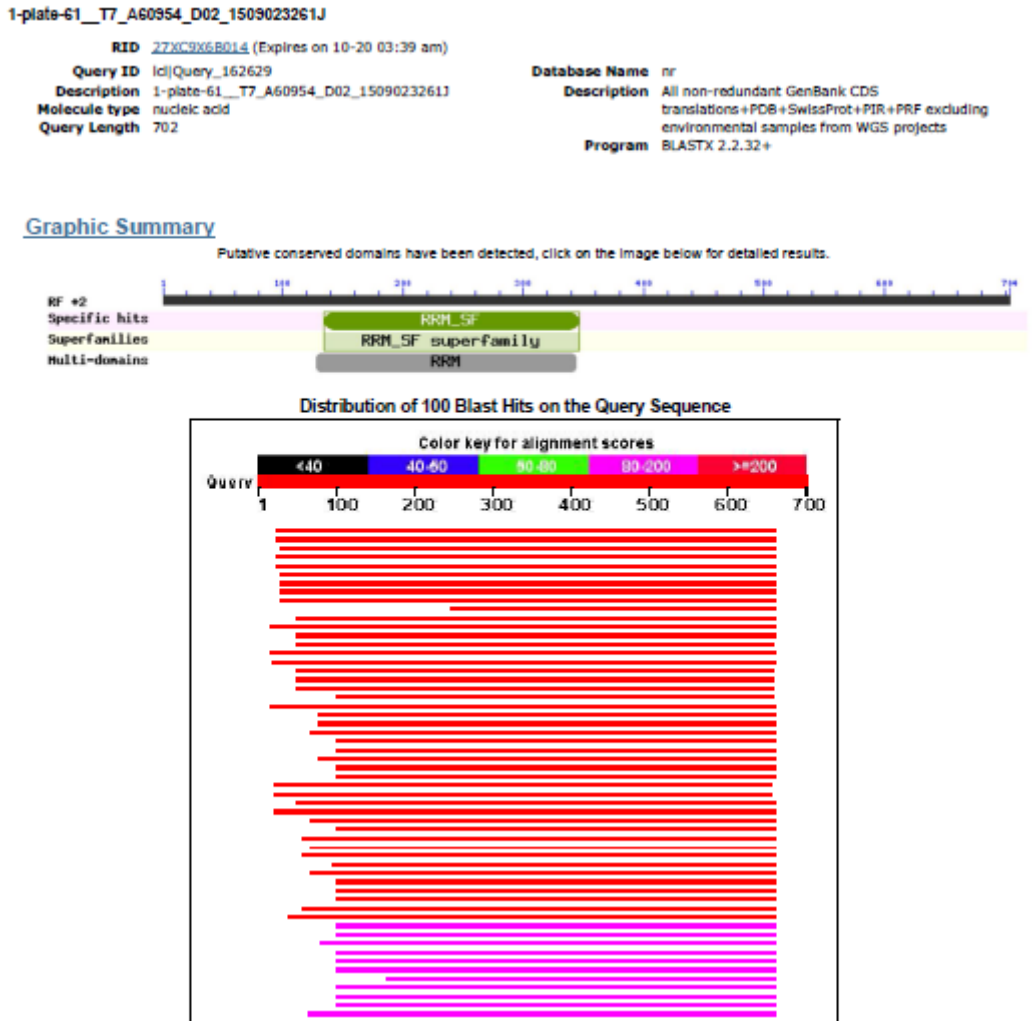
Şekil 4. 6 BLASTn Sonuç Sayfasının Ekran Görüntüsü

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G221600g) mRNA, complete cds	1247	1247	96%	0.0	100%	XM_007148531.1
PREDICTED: Glycine max squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like (LOC100794881), mRNA	935	935	96%	0.0	92%	XM_003548609.2
PREDICTED: Glycine max squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like (LOC100801333), transcript variant X1, mRNA	902	902	96%	0.0	91%	XM_003539332.2
PREDICTED: Glycine max squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like (LOC100801333), transcript variant X2, mRNA	887	887	96%	0.0	91%	XM_006592581.1
Soybean clone JCVI-FLGm-16H14 unknown mRNA	839	839	86%	0.0	92%	BT099112.1
PREDICTED: Glycine max squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like (LOC100801333), transcript variant X3, mRNA	586	586	64%	2e-163	90%	XM_006592582.1
Medicago truncatula embryo defective 140 protein mRNA	568	568	89%	7e-158	83%	XM_013588830.1
Trifolium pratense genome assembly redclover, chromosome : chr2	257	257	36%	2e-64	85%	LN846350.1
Ricinus communis Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells, putative, mRNA	180	180	33%	4e-41	80%	XM_002527776.1

Şekil 4. 7 BLASTn Sonuç Sayfasının Ekran Görüntüsü(devam)

Description(Tanım) kısmında sorgu dizisine tanımlama ismi verilir. Scores(Eşleşme sayısı) kısmında Max score ve total score olarak iki değer karşımıza çıkmaktadır. Max score; girilen dizi ile veri tabanındaki diziler arasındaki eşleşen kelime sayısı, total score ise diziler arasındaki sürekli eşleşme sayısını verir. E value(e-değeri) veri tabanında şans eseri benzer veya yakın eşleşme değeri verebilme ihtimalini gösterir. Bu değer ne kadar küçükse sonuçlar o kadar güvenilirdir. E değeri $1X10^{-50}$ 'den küçükse bulunan dizi girilen diziye çok yakındır ve evrimsel olarak ilişkilidir. E değeri $1X10^{-50}$ ile $1X10^{-2}$ değerleri arasındaysa bulunan dizi girilen diziye yakınlık gösterir ve ilişkili olabilir. $1X10^{-2}$ ile 1 arasında ise bulunan dizi girilen diziye çok az olasılıkta benzerlik gösterir. 1'den büyükse hiçbir dizi ile yakın benzerlik göstermez[34], [35] .

BLASTx, FASTA formatındaki dizinin protein veritabanında araştırılmasını sağlar. Elde edilen ekran görüntüsü BLASTn'deki gibidir. Örnek bir dizinin BLASTx sonucu Şekil 4.10; BLASTn sonucu Şekil 4.9'daki gibidir.



Şekil 4. 8 BLASTx sonucu ekran görüntüsü ve dizinin protein veritabanındaki benzerlikleri

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
hypothetical protein PHAVU_006G221600g [Phaseolus vulgaris]	441	441	90%	4e-146	99%	XP_007148583.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X1 [Glycine max]	390	390	90%	2e-126	86%	XP_003538380.1
hypothetical protein LR48_Vigan08g012900 [Vigna angularis]	384	384	90%	6e-126	88%	KOM49302.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X2 [Glycine max]	384	384	90%	3e-124	86%	XP_006592844.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like [Glycine max]	384	384	90%	5e-124	85%	XP_003548867.1
embryo defective 140 protein [Medicago truncatula]	318	318	90%	4e-99	75%	XP_013444284.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 isoform X1 [Cicer arietinum]	300	300	90%	2e-92	71%	XP_004486411.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 isoform X3 [Cicer arietinum]	300	300	90%	2e-92	71%	XP_004486413.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 isoform X2 [Cicer arietinum]	296	296	90%	9e-91	70%	XP_004486412.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X3 [Glycine max]	244	244	58%	5e-72	84%	XP_006592845.1
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells, putative [Ricinus communis]	236	236	87%	2e-68	59%	XP_002527822.1
hypothetical protein PRUPE_ppa008300mg [Prunus persica]	222	222	91%	3e-67	55%	XP_007222523.1
Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 [Theobroma cacao]	231	231	87%	2e-66	61%	XP_007023164.1
hypothetical protein B456_011G090800 [Gossypium raimondii]	222	222	86%	7e-65	58%	KJB70776.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 [Jatropha curcas]	224	224	91%	4e-64	57%	XP_012088130.1
hypothetical protein JCGZ_24895 [Jatropha curcas]	224	224	91%	5e-64	58%	KDP40898.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X4 [Gossypium raimondii]	222	222	86%	1e-63	58%	XP_012464808.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X3 [Gossypium raimondii]	222	222	86%	2e-63	58%	XP_012464808.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X1 [Gossypium raimondii]	222	222	86%	2e-63	58%	XP_012464805.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like isoform X2 [Gossypium raimondii]	222	222	79%	3e-63	62%	XP_012464807.1
PREDICTED: squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3 [Prunus mume]	221	221	91%	6e-63	55%	XP_008218833.1
hypothetical protein B456_009G114100 [Gossypium raimondii]	218	218	82%	4e-62	63%	KJB58278.1

Şekil 4. 9 BLASTx sonucu ekran görüntüsü ve dizinin protein veritabanındaki benzerlikleri(devam)

E-value değeri küçüldükçe yani sıfıra yaklaştıkça daha anlamlıdır. Değerlendirme yaparken sadece E-value değil, Total Score kısmı da kullanılır. Eşit e-value olan sonuçlarda toplam score'u yüksek olan daha çok benzerlik gösterir.

Tüm dizinlerin Blastx sonuçları ve diğer gerekli bilgilerin yer aldığı tablo Ek-B'de verilmiştir.

4.13.3 Konsensus Oluşturulması ve BLASTx Analizi

Forward ve reverse olarak okuması yapılan örnekler için, bu iki okuma BioEdit programı sayesinde 48 adet konsensus dizileri oluşturuldu. Bu konsensus dizileri NCBI BLASTX ile

analiz edildi. Konsensus BLASTx ile, EST'lerin BLASTx'lerinin aynı sonucu vermesi önemliydi. Konsensus dizinlerinin BLASTx analizi tablosu Çizelge 4.4'te görüldüğü gibidir.

Çizelge 4. 4 Konsensus dizinlerinin BLASTx analizi tablosu

Konsensus Dizin	Protein Benzerliği	Skor	Query cover	E-değeri	Accession
1	*Basic form of pathogenesis related protein 1 like [glycine max] *CAP, cysteine-rich secretory protein , antigen 5[Medicago truncatula] *PR1a precursor [glycine max]	189 168 166	27 % 26% 27%	1e-53 8e-46 5e-45	XP 003545772.1 XP 003593358.1 NP 001238168.1
6	*Basic form of pathogenesis related protein 1 like [glycine max] *CAP, cysteine-rich secretory protein , antigen 5[Medicago truncatula] *PR1a precursor [glycine max]	198 176 176	18% 18% 18%	8e-56 6e-48 2e-47	XP 003545772.1 XP 003593358.1 NP 001238168.1
8	*fructose biphosphate aldolase[Phaseolus vulgaris]	395	40%	7e-130	AGV54415.1
9	*elongation factor 1-alpha[phaseolus vulgaris]	459	40%	4e-153	AGV54713.1
10	*S-adenosylmethionine decarboxylase[phaseolus vulgaris]	321	31%	7e-102	AGV54395.1

Çizelge 4. 5 Konsensus dizinlerinin BLASTx analizi tablosu(devam)

11	*Protease HtpXlike2[glycine soja]	252	26%	2e-80	KHN09937.1
12	*Senesence associated protein[medicago truncatula] *Cytochrome P450 like[Nicotiana tabacum]	199 263	19% 33%	4e-57 4e-39	XP 013443005.1 BAA10929.1
17	*Histone H3[zea mays]	145	14%	1e-37	ACG38891.1
25	*Universal stress protein[glycine soja]	162	14%	6e-43	KHN30645.1
30	*Vignain[Glycine soja] *KDEL-tailed cysteine endopeptidase CEP1[Morus notabilis]	251 235	30% 31%	4e-76 3e-69	KHN38752.1 XP010099379.1
37	*Fructose biphosphate aldolase[phaseolus vulgaris]	390	33%	1e-126	AGV54415.1
39	*Translation machinery-associated protein 22-like isoform X2[Glycine max]	174	16%	4e-47	XP006587009.1
43	*Translationally-controlled tumor protein like[Glycine soja]	275	26%	4e-85	KHN14616.1
45	*Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase[phaseolus vulgaris]	601	62%	0	AHA84144.1
46	*Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein[Medicago truncatula]	429	49%	5e-145	XP013446435.1
47	*putative splicing factor Prp8[Medicago sativa]	51.2	9%	1e-04	AAZ32862.1

Çizelge 4. 6 Konsensus dizinlerinin BLASTx analizi tablosu(devam)

48	*Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	392	54%	2e-131	AGV54256.1
49	*Elongation factor 2[Glycine soja]	502	64%	1e-167	KHN27720.1
52	*Senesence associated protein, putative[Medicago truncatula]	407	41%	1e-103	XP 013442963.1
54	*Seed maturation protein PM37[Glycine max]	171	21%	1e-43	NP 001238341.1
57	*Serine/threonine protein kinase-like protein[Glycine max]	270	25%	6e-80	NP001235470.1
58	*Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	390	36%	4e-128	AGV54256.1
59	*Thioredoxin like protein[Glycine soja]	201	15	2e-56	KHN12593.1
66	*Seed maturation protein PM37[Phaseolus vulgaris]	384	36%	5e-124	AHA84223.1
67	*Basic form of pathogenesis related protein[Glycine max]	201	20%	7e-57	XP 003545772.1
69	*Glutathione transferase[Phaseolus vulgaris]	409	48%	2e-139	AEX37999.1
70	*Elongation factor 1-alpha[Phaseolus vulgaris]	454	48%	1e-152	AGV54713.1

Çizelge 4. 7 Konsensus dizinlerinin BLASTx analizi tablosu(devam)

71	*Putative extracellular dermal glycoprotein[Medicago truncatula]	184	27%	3e-48	XP 013462752.1
76	*Chlorophyll ab binding protein[Phaseolus vulgaris]	440	40%	1e-148	AFW90512.1
78	*Actin 97[Glycine soja]	379	31%	5e-123	KHN24335.1
81	*Cobalamin independent methionine synthase[Medicago truncatula]	509	86%	8e-128	XP 013451552.1
82	*Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase[phaseolus vulgaris]	595	60%	0	AHA84144.1
84	*Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein[Medicago truncatula]	424	48%	6e-143	XP 013446435.1
85	*Putative syntaxin-24[Glycine soja]	154	16%	1e-39	KHN02175.1
89	*D-alanine D-alanine ligase[Phaseolus vulgaris]	181	29%	5e-47	AGV54383.1
94	*Glutathione transferase[Phaseolus vulgaris]	409	38%	2e-137	AEX37999.1

4.13.4 Kontig Oluşturulması ve BLASTx Analizi

Kontig dizinlerinin BLASTx analizi tablosu Çizelge 4.5'teki gibidir.

Çizelge 4. 5 Kontig dizinlerinin BLASTx analizi tablosu

Kontig Numarası	Benzerlik Bulunan Protein Ailesi	Total Skor	E Değeri	Query Cover (Sorgulama kapsamı)	Dizi Erişim Numarası
1	basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max]	201	2e-56	18 %	XP_003545772.1
2	elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris]	457	1e-152	40 %	AGV54713.1
3	fructose-bisphosphate aldolase [Phaseolus vulgaris]	395	2e-128	32 %	AGV54415.1
4	oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max]	441	1e-149	49 %	XP_003548008.1
5	actin [Vicia faba]	377	2e-123	31 %	ACU27906.1
6	glutathione transferase [Phaseolus vulgaris]	409	2e-137	38 %	AEX37999.1

4.13.5 Biyoinformatik Analizlerinin Değerlendirilmesi

Dizin analizi sonuçlarına göre 96'lık plate'in 76 kuyucuğunda örnek vardı; 20 kuyucuk boştu. 76 kuyucuğun 38 tanesinde başarılı; 38 tanesinde ya hiç ya da çok düşük hücre

yoğunluğu olduğundan dolayı başarısız okuma gerçekleşmiştir. Bazı kuyucuklarda ise anormal bant okunmuş, boş vektörün buna neden olabileceği tahmin edilmiştir. Her kuyucuk T7 ve SP6 olarak 2 farklı primerle okunmuştur. Bazı örneklerde ise ya T7 ya da SP6 okuması başarılı olmuştur. Bütün bunların sonucunda 57 adet EST, 48 tane konsensüs, 6 tane de kontig dizini oluşturulmuştur.

Yapılan analizlerin sonucunda, konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş *Phaseolus vulgaris* bitkisinde anlatımı artan genler; 5-metiltetrahidropteroltri-glutamat-homosistein metil transferaz, asit fosfataz, aktin, endopeptidaz, kallus proteini, sisteince zengin salım proteini, Klorofil A- B binding, Klorofil manganez stabilizasyon proteini, sitokrom, D-alanin-D-alanin ligaz, DNAj protein, ekstraselüler dermal protein, format dehidrogenaz, fruktoz bifosfat aldolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, histon, endopeptidaz, late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein, metiyonin sentaz, patogenez ilişkili protein, proteaz, sintaksin, s-adenozil metiyonin dekarboksilaz, tohum olgunlaşma proteini, squamous hücreli karsinoma antijen recognized by T-cell like, tioredoksin, transkripsiyon faktörü MYB44, translationally-controlled tumor protein like, universal stress protein, vignain protein kodlayıcı genler olarak tespit edilmiştir.

5-metiltetrahidropteroltri-glutamat-homosistein metil transferaz geninden aynı adla kodlanan enzim, L-metiyonin biyosentez yolağının son basamağında görevlidir. Substratındaki homosistein grubunu metiyonine dönüştürür. Sonuçta S-adenozil metiyonin (SAMe) molekülü oluşur. Bu molekülün merkezi sinir sistemindeki transmetilasyon reaksiyonlarının başlıca verisini oluşturan doğal bir bileşik olduğu bilinmektedir. SAMe'nin antidepresan aktiviteyi güçlendirdiği gösterilmiştir [36].

Basic 7S Globulin-like protein geninin aynı adla kodladığı protein, tohum depo proteinidir. Özdeş proteinlerle seçici ve kovalent olmayan interaksiyonlar yapar. Protein metabolizmasında görevlidir ve aspartil tipte endopeptidaz aktiviteye sahiptir [37].

60s ribosomal protein L17, translasyonda görevlidir. Asit fosfataz, fasulye bitkisinde; inorganik fosfatı serbest bırakarak, fosforik monoesterlerin hidrolizini katalizler [38].

Klorofil a/b bağlanma proteini, klorofil ve metal iyon bağlanmasını sağlayarak; ışığı toplayıp depolama, fotosentez ve protein-kromofor bağlanması biyolojik proseslerde görev almaktadır [39].

Patogenez ilişkili proteinler bitkinin hipersensitif savunma sisteminde hayati rol oynarlar. Antifungal, antiviral, antibakteriyel aktivite gösterebilirler. *Glycine max* (soya) bitkisinde yapılan bir çalışmada; *Phytophthora sojae* ile enfekte edilmiş soya bitkisinde GmPRP(GenBank numarası: KM506762) ismi verilen yeni bir patogenez ilişkili protein belirlenmiştir. Bu proteinin soyanın savunma sisteminde önemli rol oynadığı saptanmıştır [40].

Sisteince zengin salgı proteini, patogenez ilişkili proteinlerin 5.grubuna ait bir protein çeşididir.

Fruktoz bifosfat aldolaz, glikolizde görevli bir enzimdir.

Karanfil bitkisinde S-adenozil metiyonin dekarboksilaz geninin aşırı ekspresyonu, transgenik tütün bitkilerinde abiyotik streslere karşı geniş spektrumlu bir tolerans oluşturmuştur. Bu transgenik bitkilerde tuz, düşük sıcaklık, asit ve absisik asit uygulaması gibi streslerden sonra klorofil parçalanması ve sararma semptomu olarak görülen stres nedenli zararlar hafifletilmiştir [41].

Universal stress proteini ailesi de bitkilerde çevresel streslere karşı oluşturulacak cevapları düzenler.

Vignain enziminin soya bitkisinde; 2-alkenal redüktaz [NAD(P)] aktivitesi(oksidoredüktazlar) gösterir ve peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirdiği bilinmektedir [42]. KDEL-kuyruklu sisteine endopeptidaz, peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirir [43].

Fruktoz bifosfat aldolaz enzimi, glikoliziste görevlidir [44].

Translasyon mekanizması ilişkili protein 22, RNA bağlanması ve translasyon başlama faktörü aktiviteleri gösterir [45].

Translasyon kontrol tümör proteini, kalsiyum bağlanması ve mikrotübül stabilizasyonunu gerçekleştirir [46].

Ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz, bitkinin kloroplastında bulunan fotosentezde görevli bir enzimdir.

Fotosistem II oksijen-evolving hızlandırıcı protein, fotosentezde görevlidir.

Yaşlılık ilişkili protein, oksidatif strese verilen hücresel cevap, yaprak yaşlanması, reaktif oksijen türlerinin metabolik prosesinde görev alır [47].

Serin/treonin protein kinaz proteini, ATP bağlanması, peptid reseptör aktivitesi, protein homodimerizasyon aktivitesi gerçekleştirerek protein otofosforilasyonunda görev alır [48].

Glutatyon transferaz enzimi detoksifikasyonda görevlidir.

Ekstraselüler dermal glikoprotein, aspartil tipte endopeptidaz aktivite gösterir.

Kobalamin bağımsız metiyonin sentaz, metiyonin biyosentezinin son basamağında görevlidir.

D-alanin-D-alanin ligaz enzimi; peptidoglikan biyosentezinde görev alarak, hücre duvarı oluşumunu sağlar [49].

4.14 Öneriler

Bu çalışmada konvansiyonel koşullara benzer koşullarda yetiştirilmiş *Phaseolus vulgaris*'te anlatımı artan genlerin organik koşullara benzer koşullarda yetiştirilmiş bitkilerde anlatımı artan genlerden çıkarılarak belirlenmesi amacıyla, yaprak dokularından SSH kütüphaneleri kurulmuştur.

Bu kütüphaneler dizin analizine gönderilmiş ve gelen sonuçlardan biyoinformatik analiz yapılmıştır. Öncelikle diziler Chromas programında açılmış, vektör dizinlerinden arındırılmış, BLAST analizine hazır FASTA formatlı hale getirilmiştir. Ardından NCBI BLASTn ve BLASTx analizleri yapılarak BLAST veritabanlarındaki benzerlikler aranmıştır. Sonuçlar incelendiğinde; fotosentez, karbonhidrat ve protein metabolizması, stres cevabı sağlayan protein kodlayıcı genlere benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bu durumun, konvansiyonel koşullarda yetiştirilen fasulye bitkisinde kullanılan girdilere bağlı olarak bitkide artan metabolik faaliyetlerle birlikte karbonhidrat yapım ve yıkımı,

protein yapım ve yıkımının arttığı ya da bitkide stres oluşturmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda, tespit edilen genlerin ekspresyon seviyelerine daha detaylı bakmak ve daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak için Real Time PZR yöntemiyle analizlere devam edilecektir. Ayrıca fasulye bitkisinin meyve kısmı için de aynı metod uygulanacak, bitki yaprak ve meyvesinin gen anlatımlarının birbiriyle karşılaştırılması gerçekleştirilecektir.

KAYNAKLAR

[1] Yavuz, F., (2005). "Türkiye'de Tarım", Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Yayınları, Ankara.

[2] Pekşen, E., (2005). "Samsun Koşullarında Bazı Fasulye (Phaseolus Vulgaris L.) Genotiplerinin Tane Verimi Ve Verimle İlgili Özellikler Bakımından Karşılaştırılması", J. of Fac. of Agric., OMU, 20: 88-95.

[3] Woolley, J. Ildefonso, R. ve Voss, J., (1991). "Bean cropping systems in the tropics and subtropics and their determinants".

[4] Altınışık, B.Ç., (2011). Çinko Eksikliği Durumunda Farklı Anlatım Yapan Arpa Genlerinin İzolasyonu İçin Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyon Kütüphanelerinin Kurulması Ve Biyoinformatik Analizleri. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi.

[5] McCollum, E. Simmonds, N. ve Pitz, W., (1917). "The dietary deficiencies of the white bean, phaseolus vulgaris", Journal of Biological Chemistry, 29: 521-536.

[6] Herencia, J.F. García-Galavís, P.A. Dorado, J.A.R. ve Maqueda, C., (2011). "Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil", Scientia horticulturae, 129: 882-888.

[7] Lu, C. Hawkesford, M.J. Barraclough, P.B. Poulton, P.R. Wilson, I.D. Barker, G.L. ve Edwards, K.J., (2005). "Markedly different gene expression in wheat grown with organic or inorganic fertilizer", Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 272: 1901-1908.

[8] Güvenç, İ. ve Güngör, F., (1996). "TÜRKİYE'DE TESCİLLİ FASULYE ÇEŞİTLERİNE AİT TOHUMLARIN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ VE BESİN BİLEŞİMLERİ/SEED CHARACTERISTICS OF REGISTERED BEAN CULTİVARS IN TURKEY", Journal of the Faculty of Agriculture, 27.

[9] Gülbahçe, E., Özkubat, B., Emine ARSLAN, (2010). "Konya Bölgesinden Toplanan Phaseolus vulgaris (Leguminosae) Populasyonları Arasındaki Genetik Çesitliligin SDS-PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi", Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 35: 59-64.

[10] Cruickshank, I. ve Perrin, D.R., (1963). "Phytoalexins of the leguminosae. Phaseolin from Phaseolus vulgaris L", Life Sciences, 2: 680-682.

[11] Hayat, I. Ahmad, A. Masud, T. Ahmed, A. ve Bashir, S., (2014). "Nutritional and health perspectives of beans (Phaseolus vulgaris L.): an overview", Critical reviews in food science and nutrition, 54: 580-592.

[12] Wagner, S.C., (2011). "Biological Nitrogen Fixation", Nature Education, 3: 15.

[13] Çakmakçı, R., (2005). "Bitki gelişimini teşvik eden rizobakterilerin tarımda kullanımı", Atatürk Üniv, 286: 97-107.

[14] Appleby, C.A., (1984). "Leghemoglobin and Rhizobium respiration", Annual Review of Plant Physiology, 35: 443-478.

[15] Unkovich, M.J. ve Pate, J.S., (2000). "An appraisal of recent field measurements of symbiotic N 2 fixation by annual legumes", Field Crops Research, 65: 211-228.

[16] Smil, V., (1997). "Global population and the nitrogen cycle", Scientific American, 277: 76-81.

[17] Şahinkaya, Y.D.D.E., (2015). "Çevre Mikrobiyolojiisi-II", : http://eng.harran.edu.tr/moodle/moodledata/26/Cevre_mikrobiyolojisi_2_erkan_sahinkaya.pdf. Erişim tarihi 23.11.2015, 2015.

[18] Önder, M. Ateş, M.K. Kahraman, A. ve Ceyhan, E., (2012). "Konya ilinde fasulye tarımında karşılaşılan problemler ve çözüm önerileri", Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 5: 143-148.

[19] Acar, M. Dok, M. ve Caner, Y.K., (2009). "Organik Ve Geleneksel Tarım Metodu İle Üretilen Nohut'un Verim, Maliyet Ve Kalite Kriterleri Bakımından Karşılaştırılması", GAP Organik Tarım Kongresi: 17-20.

[20] Unal, S., (2005). "Neden Organik Tarım".

[21] Müdürlüğü, T.C.T.v.H.B.B.Ü.G., (2015). "BÜGEM Faaliyetleri", : http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf. Erişim tarihi 05.11.15, 2015.

[22] Müdürlüğü, T.C.B.M.G.V.Y., (2015). "Organik Tarımın Esasları Ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik", : http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.14217&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=tar%C4%B1m. Erişim tarihi 05.11.15, 2015.

[23] Rossi, F. Godani, F. Bertuzzi, T. Trevisan, M. Ferrari, F. ve Gatti, S., (2008). "Health-promoting substances and heavy metal content in tomatoes grown with different farming techniques", European journal of nutrition, 47: 266-272.

[24] Tenea, G.N. Bota, A.P. Raposo, F.C. ve Maquet, A., (2011). "Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions", BMC research notes, 4: 373.

[25] Van Dijk, J.P. Cankar, K. Hendriksen, P.J. Beenen, H.G. Zhu, M. Scheffer, S. Shepherd, L.V. Stewart, D. Davies, H.V. ve Leifert, C., (2012). "The

identification and interpretation of differences in the transcriptomes of organically and conventionally grown potato tubers", Journal of agricultural and food chemistry, 60: 2090-2101.

[26] Diatchenko, L. Lau, Y. Campbell, A.P. Chenchik, A. Moqadam, F. Huang, B. Lukyanov, S. Lukyanov, K. Gurskaya, N. ve Sverdlov, E.D., (1996). "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries", Proceedings of the National Academy of Sciences, 93: 6025-6030.

[27] Ji, W. Wright, M.B. Cai, L. Flament, A. ve Lindpaintner, K., (2002). "Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes", Bmc Genomics, 3: 12.

[28] Park, J.-S. Kim, J.-B. Hahn, B.-S. Kim, K.-H. Ha, S.-H. Kim, J.-B. ve Kim, Y.-H., (2004). "EST analysis of genes involved in secondary metabolism in Camellia sinensis (tea), using suppression subtractive hybridization", Plant science, 166: 953-961.

[29] Ouyang, B. Yang, T. Li, H. Zhang, L. Zhang, Y. Zhang, J. Fei, Z. ve Ye, Z., (2007). "Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis", Journal of Experimental Botany, 58: 507-520.

[30] Stassar, M. Devitt, G. Brosius, M. Rinnab, L. Prang, J. Schradin, T. Simon, J. Petersen, S. Kopp-Schneider, A. ve Zöller, M., (2001). "Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization", British journal of cancer, 85: 1372.

[31] Primrose, S.B. ve Twyman, R., (2013). Principles of gene manipulation and genomics: John Wiley & Sons.

[32] Chen, Y.-A. Lin, C.-C. Wang, C.-D. Wu, H.-B. ve Hwang, P.-I., (2007). "An optimized procedure greatly improves EST vector contamination removal", Bmc Genomics, 8: 416.

[33] Maniatis T., F.E.F., Sambrook J. , (1982). Molecular cloning : a laboratory manual: Cold Spring Harbor, N.Y.

[34] Smith, T.F. ve Waterman, M.S., (1981). "Identification of common molecular subsequences", Journal of molecular biology, 147: 195-197.

[35] Campus, G.K., (1996). Jens Allmer, University of Münster, Germany.

[36] Schomburg, D. ve Stephan, D., (1996). 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase, ed. Enzyme Handbook 11. Springer, 63-66.

[37] UniProt, (2015). "UniProtKB - P13917 (7SB1_SOYBN)", : http://www.uniprot.org/uniprot/P13917. Erişim tarihi 06.11.15, 2015.

[38] EMBL-EBI, (2015). "GO:0016791 phosphatase activity": https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0016791. Erişim tarihi 06.11.15, 2015.

[39] UniProt, (2015). "UniProtKB - T2DNB0 (T2DNB0_PHAVU)", : http://www.uniprot.org/uniprot/T2DNB0. Erişim tarihi 06.11.15, 2015.

[40] Jiang, L. Wu, J. Fan, S. Li, W. Dong, L. Cheng, Q. Xu, P. ve Zhang, S., (2015). "Isolation and Characterization of a Novel Pathogenesis-Related Protein Gene (GmPRP) with Induced Expression in Soybean (Glycine max) during Infection with Phytophthora sojae", PloS one, 10: e0129932.

[41] Wi, S.J. Kim, W.T. ve Park, K.Y., (2006). "Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants", Plant cell reports, 25: 1111-1121.

[42] UniProt, (2015). "A0A0B2R1G3_GLYSO".

[43] UniProt, (2015). "W9SDL9_9ROSA", : http://www.uniprot.org/uniprot/W9SDL9. Erişim tarihi 22.11.2015.

[44] EMBL-EBI, (2015). "GO:0004332 fructose-bisphosphate aldolase activity", : http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0004332. Erişim tarihi 22.11.2015, 2015.

[45] UniProt, (2015). "P47089 (DENR_YEAST)", : http://www.uniprot.org/uniprot/P47089. Erişim tarihi 22.11.2015, 2015.

[46] UniProt, (2015). "Q944T2 (TCTP_SOYBN)", : http://www.uniprot.org/uniprot/Q944T2. Erişim tarihi 22.11.2015, 2015.

[47] UniProt, (2015). "G7K1Q0 (G7K1Q0_MEDTR)", : http://www.uniprot.org/uniprot/G7K1Q0. Erişim tarihi 22.11.2015, 2015.

[48] UniProt, (2015). "Q9FIJ6 (ACCR4_ARATH)", : http://www.uniprot.org/uniprot/Q9FIJ6. Erişim tarihi 22.11.2015, 2015.

[49] UniProt, (2015). "S5RYV8 (S5RYV8_RHIET)", : http://www.uniprot.org/uniprot/S5RYV8. Erişim tarihi 22.11.2015, 2015.

KONVANSİYONEL VE ORGANİK FASULYELERİN NANODROP SONUÇ GRAFİKLERİ

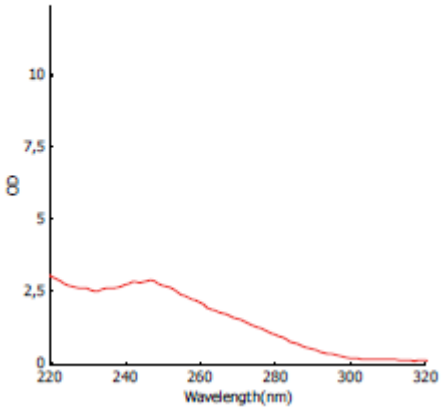
Konvansiyonel fasulye birinci örneğinin nanodrop sonuç grafiği;

Sample Name : C1
Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
Analyte : RNA

DateTime : 15.04.14 15:44:51

Nucleic Acid Conc : 81,42 ng/µL
OD260/280 : 2,26
OD260/230 : 0,81

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



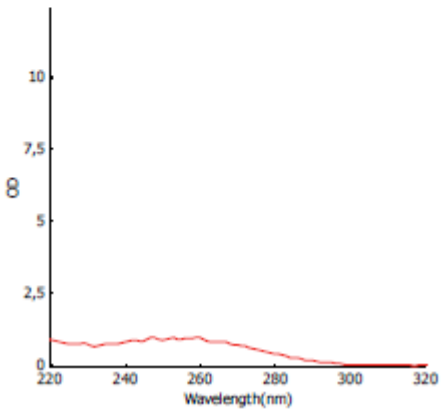
Konvansiyonel fasulye ikinci örneğinin nanodrop sonuç grafiği;

Sample Name : C2
Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
Analyte : RNA

DateTime : 15.04.14 15:45:25

Nucleic Acid Conc : 38,59 ng/µL
OD260/280 : 2,40
OD260/230 : 1,30

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



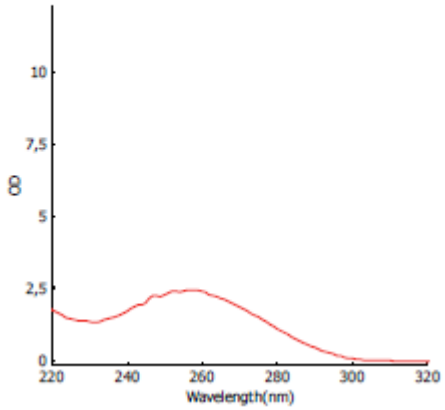
Kontrol grubu fasulye örneğinin nanodrop sonuç grafiği;

Sample Name : kontrol
Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
Analyte : RNA

DateTime : 15.04.14 15:41:35

Nucleic Acid Conc : 97,71 ng/µL
OD260/280 : 2,15
OD260/230 : 1,78

Item	Result
OD260	2,398
OD280	1,089
OD230	1,331
OD320	-0,045
Pathlength (mm)	0,192
Dilution	1,000



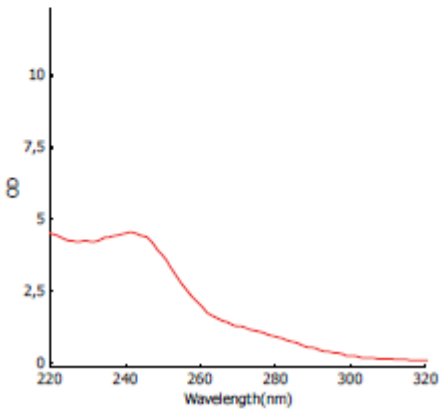
Organik fasulye birinci örneğinin nanodrop sonuç grafiği;

Sample Name : O1
Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
Analyte : RNA

DateTime : 15.04.14 15:43:18

Nucleic Acid Conc : 78,28 ng/µL
OD260/280 : 2,34
OD260/230 : 0,47

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



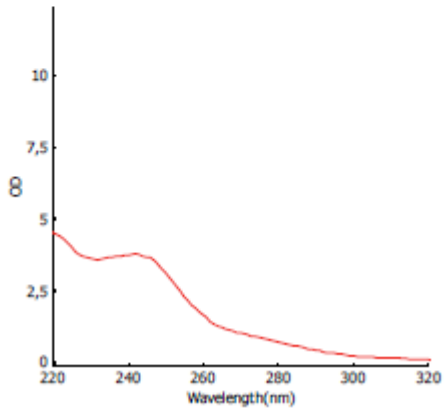
Organik fasulye ikinci örneğinin nanodrop sonuç grafiği;

Sample Name : O2
Measurement Mode : Simple Nucleic Acid Quant.
Analyte : RNA

DateTime : 15.04.14 15:44:09

Nucleic Acid Conc : 63,26 ng/µL
OD260/280 : 2,56
OD260/230 : 0,45

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



EK-B

FASULYE BİTKİSİNİN YAPRAK DOKUSUNA AİT 57 EST' NİN BLASTN VE BLASTX ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ

	DİZİNLER	**UZUNLUK (BP)**	**PGEM-T VE ADAPTÖR KESİLDİKTEN SONRA UZUNLUK (BP)**	**BLASTN**		**BLASTX**		**Benzerlik Bulunan Protein Ailesi**
				BENZERLİK	**SKOR**	**BENZERLİK**	**SKOR**	
FORWARD DİZİN	1T7	630	587	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	749	64% 63%	237 186	*hypothetical protein PHAVU_006G197200g [Phaseolus vulgaris] *basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max]

	6T7	1290	418	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	1653	90% 86%	198 155	*basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max] *CAP, cysteine-rich secretory protein, antigen 5 [Medicago truncatula]
	8T7	1050	619	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G039100g) mRNA, complete cds	503	%95 %95	396 377	*fructose-bisphosphate aldolase [Phaseolus vulgaris] *probable fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic-like [Glycine max]
	9T7	1315	818	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	1160	82% 82%	459 454	*elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris] *elongation factor-1A isoform X1 [Glycine max]
	10T7	846	801	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G044200g) mRNA, complete cds	902	57%	323	*S-adenosylmethionine decarboxylase [Phaseolus vulgaris]
	11T7	886	543	Phaseolus vulgaris hypothetical	544	68%	252	*Protease HtpX like 2 [Glycine soja]

				protein (PHAVU_001G094100g) mRNA, complete cds				
	12T7	1132	669	Sesbania drummondii clone SSH-31_01_B08_T3 mRNA sequence	678	60%	268	*uncharacterized protein LOC105976453 [Erythranthe guttatus]
	15T7	1216	665	Escherichia coli strain RR1, complete genome	1131	67%	306	*IS5 transposase and trans-activator [Escherichia coli K-12]
	17T7	911	821	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	824	48%	256	*elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris]
	19T7	1234	423	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G189200g) mRNA, complete cds	817	90%	254	*fructose-biphosphate aldolase [Phaseolus vulgaris]
	23T7	745	704	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G168501g) mRNA, complete cds	1026	41%	129	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Linaria vulgaris]
	25T7	1247	389	Phaseolus vulgaris	763	68%	161	*universal stress protein A-like

				hypothetical protein (PHAVU_007G214800g) mRNA, complete cds				protein [glycine soja]
	30T7	720	481	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G081100g) mRNA, complete cds	1882	81% 84%	252 235	*vignain [glycine soja] *KDEL-tailed cystein endopeptidase CEP1 [Morus notabilis]
	33T7	1205	818	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	1487	82%	459	*elongation factor 1-alpha[Phaseolus vulgaris]
	34T7	958	916	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G044200g) mRNA, complete cds	1631	49%	316	*S-adenosylmethionine decarboxylase [Phaseolus vulgaris]
	35T7	1161	544	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G094100g) mRNA, complete cds	1254	68% 70%	253 237	*Protease htpx like 2 [glycine soja] *M48 family peptidase [Medicago truncatula]

	36T7	1168	667	Sesbania drummondii clone SSH-31_01_B08_T3 mRNA sequence	719	46%	212	*hypothetical protein PHAVU_011G120500g [Phaseolus vulgaris]
	37T7	1265	616	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G039100g) mRNA, complete cds	1251	95%	394	*fructose-bisphosphate aldolase [Phaseolus vulgaris]
	39T7	964	443	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G231900g) mRNA, complete cds	992	61%	173	*Translation machinery-associated protein 22 [Glycine soja]
	41T7	1135	525	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G261000g) mRNA, complete cds	499	31%	82	*60S ribosomal protein L17 [Phaseolus vulgaris]
	43T7	1246	592	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G248700g) mRNA, complete cds	1110	80%	274	*Translationally-controlled tumor protein like [Glycine soja]

	45T7	1165	931	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds	1146	96%	605	*ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [Phaseolus vulgaris]
	46T7	955	703	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds	905	95%	441	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max]
	47T7	586	542	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G014800g) mRNA, complete cds	191	63%	209	*formate dehydrogenase [Phaseolus vulgaris]
	48T7	791	751	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G168500 1g) mRNA, complete cds	1160	79%	394	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Phaseolus vulgaris]
	49T7	1134	777	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_005G058100g) mRNA, complete cds	1194	94%	500	*elongation factor 2-like [Cucumis sativus]

	52T7	1268	961	Glycine max CDNA clone: GMFL01-21-C10	641	63%	407	*senescence-associated protein, putative [Medicago truncatula]
	54T7	1032	420	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G100000g) mRNA, complete cds	1371	87% 87%	167 160	*seed maturation protein PM37 [Phaseolus vulgaris] *dnaJ protein homolog [Cucumis sativus]
	57T7	1195	738	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_002G066400g) mRNA, complete cds	399	55%	268	*serine/threonine protein kinase-like protein [Glycine max]
	58T7	1178	676	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G168501g) mRNA, complete cds	1387	86%	390	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Phaseolus vulgaris]
	59T7	1249	348	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G002100g) mRNA, complete cds	1053	88% 94%	205 252	*chloroplast drought-induced stress protein [Phaseolus vulgaris] *thioredoxin-like protein CDSP32, chloroplastic-like [Glycine max]
	61T7	745	702	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	1301	90%	384	*squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3-like [Glycine max]

				(PHAVU_006G221600g) mRNA, complete cds				
	66T7	1134	698	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G100000g) mRNA, complete cds	896	93% 95%	395 359	*seed maturation protein PM37 [Phaseolus vulgaris] *dnaJ protein homolog [Malus domestica]
	67T7	1134	417	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	1064	90% 86% 89%	200 179 178	*basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max] *CAP, cysteine-rich secretory protein, antigen 5 [Medicago truncatula] *PR1a precursor [Glycine max]
	69T7	914	762	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G195600g) mRNA, complete cds	551	82%	409	*glutathione transferase [Phaseolus vulgaris]
	70T7	1060	818	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	1160	85%	454	*elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris]
	71T7	1255	776	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	824	56% 57%	219 184	*basic 7S globulin-like [Glycine max] *extracellular dermal glycoprotein [Medicago truncatula]

				(PHAVU_006G152800g) mRNA, complete cds				
	74T7	1227	436	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G199400g) mRNA, complete cds	1295	24%	70.5	*40S ribosomal protein S28-like isoform X1 [Glycine max]
	76T7	1260	760	Phaseolus vulgaris clone BE5d2286 LHCII type I chlorophyII a/b-binding protein mRNA, complete cds	1637	86%	440	*chlorophyll a/b-binding protein [Phaseolus vulgaris]
	77T7	1240	616	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G011000g) mRNA, complete cds	1160	91%	375	*Actin-97 [Glycine soja]
	78T7	1252	616	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G011000g) mRNA, complete cds		91%	375	*Actin-97 [Glycine soja]
	79T7	1253	405	Phaseolus vulgaris hypothetical protein		74% 74%	173 161	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max] *chloroplast manganese

				(PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds				stabilizing protein-II [Solanum tuberosum]
	81T7	1234	1191	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G113800g) mRNA, complete cds		93% 93%	584 539	*5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 isoform 1 [Glycine max] *methionine synthase [Carica papaya]
	82T7	1249	932	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds		94%	594	*ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [Phaseolus vulgaris]
	84T7	950	907	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds		73% 73%	437 409	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max] *chloroplast PsbO4 precursor [Nicotiana benthamiana]
	85T7	1218	601	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G194600g) mRNA, complete cds		47% 44% 44%	156 114 103	*Putative syntaxin-24 [Glycine soja] *Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family, putative [Theobroma cacao] *hairpin-inducing protein [Casuarina glauca]
	87T7	1272	326	Phaseolus vulgaris hypothetical		71%	94.4	*basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine

				protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds		70%	81.6	max] *CAP, cysteine-rich secretory protein, antigen 5 [Medicago truncatula]
	88T7	1233	633	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G240200g) mRNA, complete cds		28%	103	*transcription factor MYB44 [Glycine max]
	89T7	758	670	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G089700g) mRNA, complete cds		68%	316	*D-alanine-D-alanine ligase [Phaseolus vulgaris]
	94T7	1253	763	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G195600g) mRNA, complete cds		82%	409	*glutathione transferase [Phaseolus vulgaris]
REVERSE DİZİN	1SP6	1273	417	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	676	90% 86% 89%	200 179 178	*basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max] *CAP, cysteine-rich secretory protein, antigen 5 [Medicago truncatula] *PR1a precursor [Glycine max]
	6SP6	1242	418	Phaseolus vulgaris	675	90%	198	*basic form of pathogenesis-related

				hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds				protein 1-like [Glycine max]
	8SP6	1157	619	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G039100g) mRNA, complete cds	1062	95%	396	*fructose-bisphosphate aldolase [Phaseolus vulgaris]
	9SP6	1272	817	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	1413	88%	477	*elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris]
	10SP6	1229	504	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G044200g) mRNA, complete cds	845	91%	322	*S-adenosylmethionine decarboxylase [Phaseolus vulgaris]
	11SP6	1242	543	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G094100g) mRNA, complete cds	917	68%	252	*Protease HtpX like 2 [Glycine soja]
	12SP6	1239	668	Sesbania	114	48%	213	*hypothetical protein PHAVU_011G12050

				drummondii clone SSH-31_01_B08_T3 mRNA sequence	7			0g [Phaseolus vulgaris]
	17SP6	1172	608	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G253700g) mRNA, complete cds	976	35%	145	*histone H3 [Zea mays]
	19SP6	1240	423	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G189200g) mRNA, complete cds	701	90%	254	*fructose-bisphosphate aldolase[Phaseolus vulgaris]
	25SP6	1113	389	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_007G214800g) mRNA, complete cds	641	68%	161	*universal stress protein A-like protein [glycine soja]
	30SP6	1281	600	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G081100g) mRNA, complete cds	1018	65% 65%	252 236	*vignain[glycine soja] *senescence spesific cystein protease SAG-39 like [cicer arietinum]
	33SP6	1240	1169	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	1328	53%	409	*glutathione transferase

				(PHAVU_008G195600g) mRNA, complete cds				
	34SP6	1244	675	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G168501g) mRNA, complete cds	1142	87%	391	*glyceraldehyde 3 phospate dehydrogenase[phaseolus vulgaris]
	35SP6	1250	818	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	1421	85%	454	*elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris]
	36SP6	1222	417	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	676	92%	202	*basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max]
	37SP6	1263	616	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G039100g) mRNA, complete cds	1050	95%	391	*fructose-bisphosphate aldolase [Phaseolus vulgaris]
	39SP6	1277	446	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	737	61%	173	*Translation machinery-associated protein 22 [Glycine soja]

				(PHAVU_009G231900g) mRNA, complete cds				
	41SP6	1231	525	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G261000g) mRNA, complete cds	837	31%	82	*60S ribosomal protein L17 [Phaseolus vulgaris]
	43SP6	1246	592	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G248700g) mRNA, complete cds	994	80% 80%	274 266	*Translationally-controlled tumor protein like [Glycine soja] *callus protein P23 [Populus trichocarpa]
	45SP6	1296	930	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds	1631	95%	601	*ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [Phaseolus vulgaris]
	46SP6	1207	703	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds	1221	95% 95%	441 419	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max] *Photosystem II subunit O-2 [Theobroma cacao]
	47SP6	709	638	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	640	52%	171	*formate dehydrogenase [Phaseolus vulgaris]

				(PHAVU_004G014800g) mRNA, complete cds				
	48SP6	1075	676	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G168500 1g) mRNA, complete cds	1131	87%	394	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Phaseolus vulgaris]
	49SP6	877	777	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_005G058100g) mRNA, complete cds	1351	94%	504	*elongation factor 2-like [Glycine max]
	52SP6	1294	1223	Glycine max cDNA, clone:GMFL01-21-C10	1668	38%	324	*hypothetical protein PHAVU_011G120500g [Phaseolus vulgaris]
	53SP6	1039	738	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G202700g) mRNA, complete cds	399	30%	40	*putative uncharacterized protein ART2 [Hydra vulgaris]
	54SP6	1190	420	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G100000g) mRNA, complete cds	676	87% 87%	171 158	*seed maturation protein PM37 [Glycine max] *DnaJ-class molecular chaperone [Medicago truncatula]

	57SP6	1276	736	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_002G066400g) mRNA, complete cds	743	57%	271	*serine/threonine protein kinase-like protein [Glycine max]
	58SP6	1246	675	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G168501g) mRNA, complete cds	1142	87%	391	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Phaseolus vulgaris]
	59SP6	1234	348	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G002100g) mRNA, complete cds	562	88% 88%	205 201	*chloroplast drought-induced stress protein [Phaseolus vulgaris] *Thioredoxin-like protein CDSP32, chloroplastic [Glycine soja]
	61SP6	622	551	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G100200g) mRNA, complete cds	1273			Benzerlik bulunamadı
	62SP6	555	480	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G170500g) mRNA, complete cds	457	48%	123	*acid phosphatase [Phaseolus vulgaris]

	65SP6	1037	961	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_009G167000g) mRNA, complete cds	604	37%	90.5	*elongation factor 1 beta [Vigna unguiculata]
	66SP6	1253	698	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_011G100000g) mRNA, complete cds	1205	93% 93%	395 368	*seed maturation protein PM37 [Phaseolus vulgaris] *DnaJ-class molecular chaperone [Medicago truncatula]
	67SP6	1249	417	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	676	89% 86%	201 179	*basic form of pathogenesis-related protein 1-like [Glycine max] *CAP, cysteine-rich secretory protein, antigen 5 [Medicago truncatula]
	68SP6	1066	994	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds	285	18%	105	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max]
	69SP6	1264	763	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G195600g) mRNA, complete cds	1328	82%	409	*glutathione transferase [Phaseolus vulgaris]

	70SP6	1284	818	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_004G075100g) mRNA, complete cds	1421	85%	454	*elongation factor 1-alpha [Phaseolus vulgaris]
	71SP6	1260	775	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G152800g) mRNA, complete cds	1018	56% 57%	219 184	*basic 7S globulin-like [Glycine max] *extracellular dermal glycoprotein [Medicago truncatula]
	72SP6	1070	1000	Glycline max cDNA, clone:GMFL01-21-C10	577	42%	105	*cytochrome P450 like_TBP [Nicotiana tabacum]
	74SP6	1188	436	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G199400g) mRNA, complete cds	665	24%	68.2	*Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein [Theobroma cacao]
	76SP6	1225	760	Phaseolus vulgaris clone BE5d2286 LHCII type I chlorophyII a/b-binding protein mRNA, complete cds	1312	86%	442	*chlorophyll a/b-binding protein [Phaseolus vulgaris]
	77SP6	1236	616	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	1046	91%	375	*Actin-97 [Glycine soja]

				(PHAVU_008G011000g) mRNA, complete cds				
	78SP6	1304	616	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G011000g) mRNA, complete cds	1046	91%	372	*Actin-97 [Glycine soja]
	79SP6	1217	405	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds	647	74%	171	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max]
	81SP6	1292	1222	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G113800g) mRNA, complete cds	1958	91% 94%	550 563	*5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase [Glycine soja] *methionine synthase [Glycine max]
	82SP6	1273	930	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G234300g) mRNA, complete cds	1631	95%	601	*ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [Phaseolus vulgaris]
	84SP6	1232	703	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	1221	95%	441	*oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Glycine max]

				(PHAVU_003G249800g) mRNA, complete cds				
	85SP6	1227	601	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G194600g) mRNA, complete cds	939	47%	153	*Putative syntaxin-24 [Glycine soja]
	87SP6	1280	1210	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_006G197200g) mRNA, complete cds	514	23%	166	*pathogenesis-related protein PR-1 type-like [Glycine max]
	88SP6	1216	633	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_003G240200g) mRNA, complete cds	1088	28%	103	*transcription factor MYB44 [Glycine max]
	89SP6	1038	963	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G089700g) mRNA, complete cds	676	25%	151	*D-alanine-D-alanine ligase [Phaseolus vulgaris]
	94SP6	1240	763	Phaseolus vulgaris hypothetical protein	1328	82%	409	*glutathione transferase [Phaseolus vulgaris]

				(PHAVU_008G195600g) mRNA, complete cds				
	96SP6	1109	762	Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_008G195600g) mRNA, complete cds	1254	80%	382	*glutathione transferase [Phaseolus vulgaris]

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mine KUÇAK

Doğum Tarihi ve Yeri : 04.09.1989 / Bozüyük

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : minepeksoy@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans			
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lise	Fen Bilimleri	Bozüyük Anadolu Öğretmen Lisesi	2007

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2014-halen	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi