



**FASULYE *GST* GEN AİLESİNİN GENOM ÇAPLI
ANALİZİ ve FASULYE *dehidroaskorbat redüktaz 1*
(*PvDHAR1*) GENİNİN TÜTÜN (*Nicotiana benthamiana*)
BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİ ALTINDA AŞIRI
İFADE EDİLMESİ**

Selman MUSLU

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Emre İLHAN**

2024

Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

FASULYE *GST* GEN AİLESİNİN GENOM ÇAPLI ANALİZİ ve FASULYE
dehidroaskorbat redüktaz 1 (PvDHAR1)* GENİNİN TÜTÜN (*Nicotiana
***benthamiana*) BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİ ALTINDA AŞIRI İFADE**
EDİLMESİ

Selman MUSLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emre İLHAN

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2024

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**FASULYE *GST* GEN AİLESİNİN GENOM ÇAPLI ANALİZİ ve FASULYE
dehidroaskorbat redüktaz 1 (PvDHAR1) GENİNİN TÜTÜN (*Nicotiana
benthamiana*) BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİ ALTINDA AŞIRI İFADE
EDİLMESİ**

Prof. Dr. Emre İLHAN danışmanlığında, Selman MUSLU tarafından hazırlanan bu çalışma 25 / 12 / 2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **Oy birliği (5/5)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Murat AYDIN	İmza	:
Üye	: Prof. Dr. Emre İLHAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Gül KASAPOĞLU	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

25 / 12 / 2024

İmzası

Selman MUSLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FASULYE *GST* GEN AİLESİNİN GENOM ÇAPLI ANALİZİ ve FASULYE *dehidroaskorbat redüktaz 1 (PvDHAR1)* GENİNİN TÜTÜN (*Nicotiana benthamiana*) BİTKİSİNDE KURAKLIK STRESİ ALTINDA AŞIRI İFADE EDİLMESİ

Selman MUSLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emre İLHAN

Glutasyon S-transferazlar (GST) gelişmiş organizmalarda bulunan, reaktif oksijen türlerine karşı mücadelede önemli ve kilit rol oynayan izozimlerdir. GST'ler biyotik ve abiyotik streslerle mücadelede rol oynamakta ve özellikle bitkileri çeşitli stres koşullarından korumaktadır. Bu çalışmada biyoinformatik araçlar kullanarak *Phaseolus vulgaris* bitkisinde *GST* gen ailesinin genom çaplı analizini gerçekleştirerek yaprak dokusunda ayrı ayrı tuz ve kuraklık stresi altında ifade profillerini araştırmak amaçlanmıştır. Ek olarak GST'lerin DHAR alt ailesinin bir üyesi olan *DHAR1* geninin transgenik yaklaşımla tütün bitkisinde aşırı ifade edilmesiyle bu genin kuraklık stresine yanıtta fonksiyonunun araştırılması hedeflenmiştir. *Phaseolus vulgaris*'te 55 adet Pv-GST proteini belirlenmiştir. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 15,02 kDa ile 47,99 kDa, amino asit sayıları 132 ile 420 ve teorik izoelektrik noktaları ise 5,03 ile 9,61 arasında değişmektedir. *P. vulgaris*, *Glycine max* ve *Arabidopsis thaliana* türlerine ait protein dizi bilgileri ile filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Seçilen beş *GST* geni ile qRT-PCR çalışmaları yapılmış ve kuraklık, tuz ve melatonin uygulamalarında bu genlerin ifade seviyelerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Ek olarak *PvDHAR1* geninin tütün bitkisinde kuraklık stresi altında aşırı ifade edilmesi ile elde edilen sonuçlar bu genin kuraklık stresine karşı yanıtta görev aldığını doğrulamıştır. Aşırı ifade hatlarının artan H₂O₂ seviyeleri ile iyi bir şekilde başa çıktığı belirlenmiştir. Azalan MDA ve %EC değerleri de bu bulguları destekler niteliktedir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin fasulye *DHAR1* geninin kuraklık stresine karşı yanıtındaki rolü hakkında literatürdeki boşluğu doldurması beklenmektedir.

2024, 110 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glutasyon s-transferaz, Biyoinformatik, Filogenetik analiz, qRT-PCR, Transgenik

ABSTRACT

Ph.D

GENOME-WIDE ANALYSIS of the BEAN GST GENE FAMILY and OVER- EXPRESSION of the BEAN *dehydroascorbate reductase 1 (PvDHAR1)* GENE UNDER DROUGHT STRESS in TOBACCO (*Nicotiana benthamiana*)

Selman MUSLU

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Emre ILHAN

Glutathione S-transferases (GSTs) are isozymes found in advanced organisms that play an important and pivotal function in eliminating oxygen-containing reactive species. GSTs are involved in both stressors that are abiotic and biotic, providing protection to plants against different types of stress. This study aimed to conduct a genome-wide examination of the *GST* gene family in *Phaseolus vulgaris* using bioinformatics tools and to investigate their expression profiles in leaf tissue under conditions of salt and drought stress individually. In addition, it was aimed to investigate the function of *DHAR1* gene, a member of the DHAR subfamily of GSTs, in drought stress response by overexpressing this gene in tobacco plants using a transgenic approach. In *Phaseolus vulgaris*, 55 Pv-GST proteins were identified. These proteins ranged in molecular weight from 15.02 kDa to 47.99 kDa, amino acid counts from 132 to 420, and isoelectric points (theoretically) from 5.03 to 9.61. Phylogenetic analyses were performed with protein sequence information of *P. vulgaris*, *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana* species. qRT-PCR was performed with five selected *GST* genes and expression levels for each of them changed in response to drought, salt and melatonin treatments. In addition, the results obtained by overexpressing the *PvDHAR1* gene in tobacco plants under drought stress confirmed that this gene is involved in the response to drought stress. Overexpression lines were found to tolerate the increased H₂O₂ levels remarkably well. Decreased MDA and EC% values also support these findings. The data obtained from this study are expected to fill the gap in the existing literature on the role of bean *DHAR1* gene in drought stress response.

2024, 110 pages

Keywords: Glutathione s-transferase, Bioinformatics, Phylogenetic analysis, qRT-PCR, Transgenic

TEŞEKKÜR

Doktora öğretimim süresince TÜBİTAK BİDEB 2211-A kapsamındaki finansal desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. 2019-2023 yılları arasında YÖK 100/2000 kapsamında sağladığı finansal desteklerinden ötürü Yükseköğretim Kurulu'na şükranlarımı iletirim.

Doktora Tezi olarak yürütülmüş bu çalışmanın büyük bölümü Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (YÜTAM), diğer bölümleri ise Atatürk Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar için uygun ortam ve koşulları oluşturan YÜTAM ve Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlere aktaran, geleceğimizi bizlerle beraber düşünen ve akademik anlamda elimizden tutan, öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Emre İLHAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımıza her türlü desteği sunan, bilgisinden ve gösterdiği yollardan bizleri mahrum bırakmayan Sayın Prof. Dr. Murat AYDIN, Prof. Dr. Behcet İNAL, Doç. Dr. Hasan Onur ÇAĞLAR, Doç. Dr. Murtaza HACIZADE ve Dr. Fatma Necmiye KACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tüm aşamalarında arkadaşlıklarından sonsuz keyif aldığım, birlikte bilgi biriktirmeyi ve gerektiğinde paylaşmayı öğrendiğim, yarımlar yokmuşçasına laboratuvarında birlikte çalışabileceğim değerli arkadaşlarım ve yoldaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Esma YİĞİDER'e, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Gül KASAPOĞLU'na, Uzman Ahmed Sıdar AYGÖREN'e, Ziraat Yüksek Mühendisi Esra YAPRAK'a, Ziraat Yüksek Mühendisi Sümeyra UÇAR'a, Uzman Burak Muhammed ÖNER'e, Uzman Recep AYDINYURT'a ve Uzman Murat İSİYEL'e sonsuz kez teşekkür ederim.

Doktora sürecimde beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli eşim Öğr. Gör. Ayşegül KAYAR MUSLU'ya ne kadar teşekkür etsem azdır.

Hayatımın her anında yalnız olmadığımı hissettiren ve geçen yıllarda desteklerini esirgemeyen, ellerini sürekli omzumda hissettiğim sevgili ve değerli aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü bilgi paylaşımında bulunduğum Uzman Moleküler Biyolog Cihan Civan CIVAŞ'a, manevi desteği olan değerli arkadaşım Burak TÜRKMENOĞLU'na ve kuzenlerim Mithat Furkan KAYA'ya, Mirza Muaz KAYA'ya ve Hasan Emre ÖZER'e teşekkür ederim.

Geldikleri günden beri hayatlarımızı neşelendiren değerli yeğenlerime,

Zeynep Alya'ya...

Selman MUSLU

Ekim 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkiler, bakteriler ve plazmitler	17
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	17
3.1.3. Kullanılan cihazlar	18
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Tez çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	19
3.2.2. <i>GST</i> gen ailesi üyelerinin araştırılması	22
3.2.3. <i>GST</i> ailesinin genlerinin yapısı, gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerinin açıklığa kavuşturulması	23
3.2.4. Dizi hizalamaları, filogenetik analizler ve sinteni analizi	23
3.2.5. Pv- <i>GST</i> proteinlerinin hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi ve genlere ait promotörlerin analizleri	24
3.2.6. Proteinlerin tahmini üç boyutlu yapılarının analizleri	24
3.2.7. Fasulye <i>GST</i> 'lerin protein-protein etkileşimleri ve miRNA Analizi	24
3.2.8. In-silico gen ifade analizleri	25
3.2.9. Bitkilerin büyütülmesi, tuz ve kuraklık stresi ve melatonin uygulamaları	25
3.2.10. Fasulye bitkisinden total RNA izolasyonu	26
3.2.11. RNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi ve agaroz jel elektroforezi	27
3.2.12. cDNA sentezi	27
3.2.13. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) analizleri	28
3.2.14. Verilerin Değerlendirilmesi	29
3.2.15. Pv <i>DHAR1</i> geninin elde edilmesi ve klonlanması	29
3.2.16. PCR ürünlerinin jelden izole edilmesi	30

3.2.17. <i>PvDHAR1</i> geninin pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarımı	32
3.2.18. Vektörün doğrulanması	33
3.2.19. <i>E. coli</i> JM101 suşları ile kompetent hücrelerin hazırlanması ve klonlama vektörünün <i>E. coli</i> JM101'e transformasyonu	33
3.2.20. <i>PvDHAR1</i> genini taşıyan kolonilerin belirlenmesi	34
3.2.21. Pozitif sonuç veren kolonilerden plazmit izolasyonu	35
3.2.22. İzolasyon ile elde edilen plazmitlerin doğrulanması	36
3.2.23. Restriksiyon endonükleaz uygulamaları, <i>PvDHAR1</i> PCR ürününün kesilmesi ve pGFPGUS <i>Plus</i> binary vektörden GUS <i>Plus</i> bölgesinin çıkarılması ve jelden izolasyonlar	36
3.2.24. Jelden alınan parçaların ligasyonları, transformasyonları ve plazmitlerin çoğaltılması	37
3.2.25. Enzim kesim doğrulamaları	38
3.2.26. Kompetent <i>A. tumefaciens</i> AGL-1 suşlarının hazırlanışı ve pGFPGUS <i>Plus</i> :: <i>PvDHAR1</i> vektörünün transformasyonu	38
3.2.27. <i>Agrobacterium</i> -aracılı gen aktarımı için tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) bitkilerinin yetiştirilmesi	39
3.2.28. Bitki transformasyonu için bakterilerin büyütülmesi	39
3.2.29. Bitki materyallerinin bakteriler ile muamele edilmesi	40
3.2.30. Doku parçalarının toplanması ve ilk inkübasyon	40
3.2.31. Selektif bitki doku kültürü ortamlarının hazırlanması	40
3.2.32. Doku parçalarının seleksiyon ortamlarına aktarılması	41
3.2.33. Kallusların gelişmesi, bitkiciklerin oluşumu ve köklendirme ortamlarına aktarımlar	41
3.2.34. Köklenen bitkilerin aklimizasyonu ve T ₀ bitkilerinden örnek ve tohum elde edilmesi	42
3.2.35. Transgenik bitkilerin (T ₁) tespit edilmesi ve doğrulanması	42
3.2.36. T ₁ ve yabanıl tip bitkilere kuraklık stresi uygulaması ve stres toleranslarının belirlenmesi	43
3.2.37. Membran hasarlarının tespit edilmesi (% EC)	43
3.2.38. Klorofil miktarlarının belirlenmesi (SPAD)	44
3.2.39. Yaprak klorofil floresans ölçümleri	44
3.2.40. Malondialdehit (MDA) ölçümleri	44
3.2.41. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) ölçümleri	45
3.2.42. Verilerin istatistiksel analizleri	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	46
4.1. Araştırma Bulguları	46
4.1.1. <i>P. vulgaris</i> genomundaki <i>GST</i> genlerinin araştırılması	46
4.1.2. <i>GST</i> ailesinin gen yapısı, gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerinin belirlenmesi	48

4.1.3. Filogenetik analizler ve sinteni analizi.....	51
4.1.4. GST'lerin hücre içi lokasyonlarının belirlenmesi ve promotör analizleri	53
4.1.5. Proteinlerin tahmini üç boyutlu yapılarının analizi.....	56
4.1.6. Fasulye GST'lerin protein-protein etkileşimleri	57
4.1.7. In-silico gen ifade analizleri.....	58
4.1.8. Kantitatif real time (gerçek zamanlı) PCR (qRT-PCR) analizleri	59
4.1.9. <i>PvDHAR1</i> geninin elde edilmesi ve klonlanması, PCR ürününün jelden izolasyonu.....	61
4.1.10. <i>PvDHAR1</i> geninin pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarılması	62
4.1.11. <i>PvDHAR1</i> geninin pGFPGUS <i>Plus</i> vektörüne aktarılması.....	64
4.1.12. pGFPGUS <i>Plus</i> :: <i>PvDHAR1</i> aşırı ifade vektörünün <i>N. benthamiana</i> bitkilerine <i>Agrobacterium</i> -aracılı transformasyonu, T ₀ bitkilerinden tohum eldesi ve T ₁ bitkilerinin yetiştirilmesi	69
4.1.13. Yabani tip ve aşırı ifade hatlara kuraklık stresi uygulaması ve stres toleranslarının belirlenmesi	75
4.2. Tartışma.....	81
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR	90
EKLER.....	103
EK-1	103
EK-2	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°	Derece
μ	mikro
g	gram
g	yerçekimi ivmesi
k	kilo- (bin, $10^3 = 1000$)
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mL	mililitre
n	nano
ng	nanogram
t	ton
rpm	dakikadaki devir sayısı
t	ton

Kısaltmalar

At	Arabidopsis thaliana
cDNA	complementary DNA
CT	cycle threshold
dk	dakika
DNA	deoksiribonükleik asit
EC	electrical conductivity (elektriksel iletkenlik)
FAO	Food and Agriculture Organization
GFP	green fluorescent protein (yeşil floresan protein)
Gm	Glycine max
GSSH	glutasyon disülfid
GST	glutasyon s-transferaz
GUS	β-glukuronidaz

ha	hektar alan
LB	Luria-Bertani medyum (sıvı besiyeri)
MDA	malondialdehit
MS	Murashige ve Skoog bitki bazal besi ortamı
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon (polymerase chain reaction)
Pv	Phaseolus vulgaris
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dünyada kuru fasulye üretimindeki verim grafiği (Our World in Data adresinden edinilmiştir, Anonymous 2024b)	1
Şekil 1.2.	FAO verileri ile dünyada (solda) ve Türkiye’de (sağda) kuru fasulye üretim miktarlarını ton cinsinden gösteren grafikler (Anonymous 2024b).....	2
Şekil 1.3.	GST’lerin glutatyon ile ksenobiyotikleri konjuge etmesi (KingDraw v3 kullanılarak oluşturulmuştur)	6
Şekil 1.4.	DHAR enziminin 2 glutatyon dan gelen 2 adet hidrojeni kullanarak L-dehidroaskorbatı L-askorbata indirgemesini gösteren reaksiyon (KingDraw v3 kullanılarak oluşturulmuştur)	7
Şekil 1.4.	AsA-GSH yollarını gösteren şekil (AsA-GSH döngüsü, APX: askorbat peroksidaz, MDAR: monodehidroaskorbat, DHAR: dehidroaskorbat, GR: glutatyon redüktaz) (Anonymous 2017)	8
Şekil 2.1.	<i>Agrobacterium</i> ’un bir bitkiyi enfekte etmesinin şematik gösterimi (Anonymous 2024c’den düzenlenmiştir)	15
Şekil 2.2.	pGFPGUS <i>Plus</i> plazmidinin haritası (Anonymous 2024d’den alınmıştır)...	16
Şekil 3.1.	pJET1.2 klonlama vektörünün haritası(Anonymous 2024e)	33
Şekil 3.2.	Aşırı ifade için 35S:PvDHAR1:NOS kasetini içeren T-DNA bölgesinin şematik gösterimi	38
Şekil 4.1.	Kromozomlar ve <i>Pv-GST</i> genlerinin temsili konumlarını gösteren şekil (kromozomlar Pvul-Chr olarak evrensel isimlendirme yapılmıştır ve kırmızı çizgiler segmental duplike genleri göstermektedir)	48
Şekil 4.2.	<i>Pv-GST</i> genlerinin ekzon ve intronlarının gösterimi.....	49
Şekil 4.3.	<i>Pv-GST</i> proteinlerinde bulunan olası motiflerin şematik gösterimi, 10 farklı motif kendilerine ait renklerle gösterilmiş ve motif uzunlukları da şematize edilmiştir.....	51
Şekil 4.4.	<i>P. vulgaris</i> , <i>A. thaliana</i> ve <i>G. max</i> bitkilerinin GST protein dizileri ile çizilen filogenetik ağaç. Renkler GST’lerin alt sınıflarını (isimler görselde verilmiştir), daireler bootstrap değerlerini göstermektedir	52
Şekil 4.5.	<i>P. vulgaris</i> , <i>A. thaliana</i> ve <i>G. max</i> GST genlerinin karşılaştırmalı haritalaması (Yeşil çizgiler <i>G. max-P. vulgaris</i> genomları arasındaki ilişkiyi, kırmızı çizgiler <i>A. thaliana-P. vulgaris</i> genomları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bazı gen isimleri kromozom renklerine göre renklendirilmiştir).....	53
Şekil 4.6.	<i>GST</i> genlerinin 2000 bp yukarı akış bölgesinde bulunan <i>cis</i> -etkili elementler	56
Şekil 4.7.	<i>GST</i> proteinlerinin üç boyutlu modellemesi	57
Şekil 4.8.	<i>Pv-GST</i> gen ürünlerinin protein-protein etkileşimleri (PPI). Protein dairelerinin etrafındaki kırmızı bölge, o proteinin diğer <i>Pv-GST</i> proteinleriyle ne kadar etkileşime girdiğini göstermektedir	58
Şekil 4.9.	Farklı stres koşulları altında <i>P. vulgaris</i> yaprak dokularının <i>GST</i> gen ifade seviyelerini gösteren ısı-haritası.....	59

- Şekil 4.10.** %20 PEG6000 uygulaması ile kuraklık stresine maruz bırakılan Elkoca-05 ve Serra çeşitlerinin yaprak dokusunda 5 *Pv-GST* geninin ekspresyon düzeyleri (D: drought (kuraklık), M: melatonin, C: kontrol)..... 60
- Şekil 4.11.** 150 mM NaCl uygulaması ile tuz stresine maruz bırakılan Elkoca-05 ve Serra çeşitlerinin yaprak dokusunda 5 *Pv-GST* geninin ekspresyon düzeyleri (S: salt (tuz), M: melatonin, C: kontrol)..... 60
- Şekil 4.12.** Pvul-DHAR1-2 ile enzim kesim bölgesini içeren *PvDHAR1* geninin GeneJET jel ekstraksiyon kiti ile jelden ekstraksiyonu sonrasında elde edilen ürünün agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen görüntüsü (sağda, ladder #G193)..... 62
- Şekil 4.13.** pJET::PvDHAR1 vektörünün PCR ile doğrulanmasının ardından elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü..... 63
- Şekil 4.14.** Dizileme sonucunun BLAST'lanması sonucu elde edilen değerler..... 63
- Şekil 4.15.** Dizi bilgisi elde edilen genin (Sbjct) ve NCBI veri tabanındaki PHAVU_001G230400g dizisinin (Query) BLAST sonucunun eşleştirmeli görüntüsü..... 64
- Şekil 4.16.** Restriksiyon endonükleazlarla kesim işlemine tabi tutulan parçaların görüntüleri. A) plazmidin *BcuI* (*SpeI*) ve *Eco72I* (*PmlI*) enzimleri ile kesimin sonucunda jelde görülen 1832 bp uzunluğunda GUSPlus bandı (ikinci kuyu), B) pGFPGUSPlus::PvDHAR1 plazmidinin aynı enzimler ile kesilmesi sonucu oluşan bantlar (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder: #SM0311, sağda) 65
- Şekil 4.17.** Büyüyen kolonilere yapılan koloni PCR işleminin sonucu, NPTII primerlerinin PCR ürünü boyutları ~190 bp uzunluğunda olup taranan tüm kolonilerde pozitif sonuç vermiştir (NK: negatif kontrol, S: *E. coli* JM101 kolonileri, M: Marker)..... 65
- Şekil 4.18.** Kolonilerden alınan plazmitlerin kesimlerinin ardından agaroz jelde yürütülmesi..... 66
- Şekil 4.19.** A) plazmitlerin *MluI* ve *EcoRI* ile kesilmesinin ardından S4 kolonisinden ve kontrol plazmitten elde edilen görüntü, B) pGFPGUSPlus::PvDHAR1 plazmidinin *BcuI* ve *Eco72I* ile kesilmesi sonucu oluşan bantların jeldeki görüntüsü (M1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder, #SM0311, M2: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, #SM0371) 67
- Şekil 4.20.** Düzenlenmiş sekans verilerinin BLAST sonucu. Elde edilen dizi verisi PHAVU_001G230400g (*PvDHAR1*) ile %99,46 oranında benzerlik göstermiştir (eşleşmenin tam olarak kapsanmama nedeni 35S primerinden gelen junk DNA parçasıdır) 68
- Şekil 4.21.** MSII ortamlarına alınan yaprak diskler. a) ilk günkü görüntüler, b) aynı kültürlerin 3 gün sonraki görüntüsü (renklerinde sararma ve beyazlama olan doku parçalarında higromisin-B direnci yoktur ve bu dokular ölmüştür).... 70
- Şekil 4.22.** MSII kültür ortamlarının 20 gün sonraki görüntüsü (ölen ve kallus geliştiren bitki dokuları açıkça görülmektedir)..... 70
- Şekil 4.23.** MSII ortamlarında bulunan dokularda gelişen kalluslardaki bitki rejenerasyonu 70

Şekil 4.24. a) MSIII ortamında gelişen sürgünler, b) MSIII ortamında gelişen kalluslar, c) MSIII ortamlarında büyüyen bitkiler	71
Şekil 4.25. IAA içeren MSIII ortamlarında bulunan bitkilerde oluşan ilk kökler (b, e ve f) ve gelişen gerçek kökler (h görselinde açıkça görülmektedir)	71
Şekil 4.26. Gelişen bitkilerin toprağa aktarılmasını gösteren görseller. a) üzerinde poşetler olan alıştırma kavanozları ve önlerinde poşetleri çıkarılmış toprağa alışmış bitkiler, b) toprağa alışmış bitkilerin büyümesi, c) büyüyen bitkilerin saksıya alınması ve gelişmesi, d) çiçek açan bitkilerin çiçeklerinin kapatılması ve tohum eldesine gidilmesi	72
Şekil 4.27. 17 potansiyel T ₁ ve yabancı tip bitkiden alınan örneklerin PCR görüntüsü (M: marker, NK: negatif/su kontrol, PK: pozitif kontrol (S4 plazmidi), TK: yabancı tip tütün kontrol)	73
Şekil 4.28. T ₁ aşırı ifade (OE: Over Expressed) bitkilerinde <i>PvDHAR1</i> geninin ifade seviyelerini gösteren grafik	74
Şekil 4.29. Yabancı tip (kontrol) tütün ve aşırı ifade hatların 8 yapraklı dönemlerindeki gövde ve kök uzunlukları	74
Şekil 4.30. Kuraklık stresi altında bitkilerin yapraklarında ölçülen klorofil miktarlarını gösteren grafik	76
Şekil 4.31. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerin 6 farklı zaman noktasındaki H ₂ O ₂ miktarlarını gösteren grafik	77
Şekil 4.32. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerin farklı zamanlarda ölçülen MDA içerikleri	78
Şekil 4.33. Kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin fotokimyasal verimliliğini gösteren grafik	79
Şekil 4.34. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerdeki membran sızıntısının göreceli yüzdesini belirlemek için yapılan bağlı elektrik iletkenliği (%EC) ölçümlerinin sonuçları	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

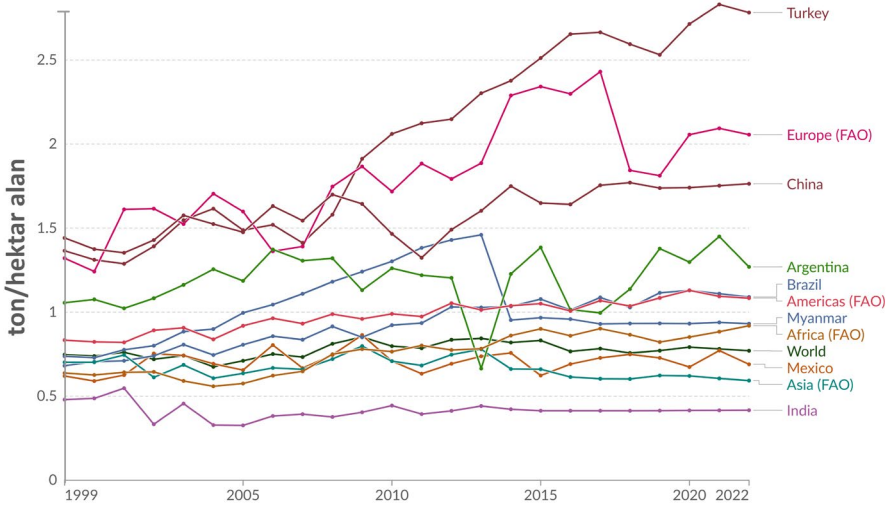
Çizelge 3.1. Tez çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçlarını gösteren çizelge	17
Çizelge 3.2. Tez çalışmalarında kullanılan cihazlar ve marka/model bilgilerini gösteren çizelge	18
Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	19
Çizelge 3.4. Deney dizaynı, fasulye çeşitleri ve uygulama konsantrasyonları	26
Çizelge 3.5. cDNA sentez karışımı	27
Çizelge 3.6. PCR bileşenleri ve miktarları	28
Çizelge 3.7. PCR koşulları	28
Çizelge 3.8. Fasulye GST genlerinden bazılarına ait primer bilgileri	29
Çizelge 3.9. Çalışmalarda kullanılan <i>PvDHAR1</i> genine ait vektöre özgün kesim bölgesini içeren ve diğer primerler	30
Çizelge 3.10. Plazmit izolasyonunda kullanılan çözeltiler	36
Çizelge 4.1. 55 aday GST geninin bazı bilgileri	46
Çizelge 4.2. Fasulye genomunda bulunan duplike <i>GST</i> gen çiftlerini gösteren ve bu genlerin evrimsel süreçleri hakkında bilgi veren çizelge	50
Çizelge 4.3. GST'lerin hücre içi yerleşimlerini gösteren çizelge	54
Çizelge 4.4. Sekans verilerinin düzenlenmiş hali (mavi ile işaretlenmiş bölge 35S primerinden gelen parça, sarı ile işaretlenmiş bölge ise <i>PvDHAR1</i> geninin başlangıç kodonu: metiyonin)	68

1. GİRİŞ

İnsan diyetinde büyük bir öneme sahip besin grubu baklagillerdir. Baklagiller içerdiği protein, karbonhidrat ve lif açısından değerli bir besin grubu olmasının yanı sıra içerdiği esansiyel amino asitler sayesinde de insan besinleri arasında oldukça önemli bir konumdadır. Dünya tarım alanları incelendiğinde baklagillerin ekim alanı tahıllardan sonra ikinci sırada yer alır ve bu da baklagilleri ekonomik açıdan değerli kılar. Baklagiller arasında ise ekim alanı açısından en yaygın olan fasulyedir (*Phaseolus vulgaris* L.). Fasulye, baklagiller ailesinin *Fabaceae* alt ailesinin *Phaseolus* cinsine ait bir bitkidir ve nispeten küçük bir genoma (~633 Mbp) ve $2n = 22$ kromozoma sahiptir (Arumuganathan and Earle 1991; Davidova et al. 2022). Fasulye genellikle kuru fasulye adı verilen kuru tohum olarak tüketilmekle birlikte yeşil sebze (taze fasulye) olarak da tüketilebilir. Ayrıca hasat sonrası yapraklar ve kalan bitkinin gövde kısımları da hayvancılıkta besin olarak kullanılabilir.

Kuru Fasulye Üretim Verimi, 1999-2022

Verim, ürünün yetiştirilmesi için kullanılan arazinin birim alanı başına üretilen miktar olarak ölçülmektedir.



Veri Kaynağı: UN Food and Agriculture Organization (FAO)

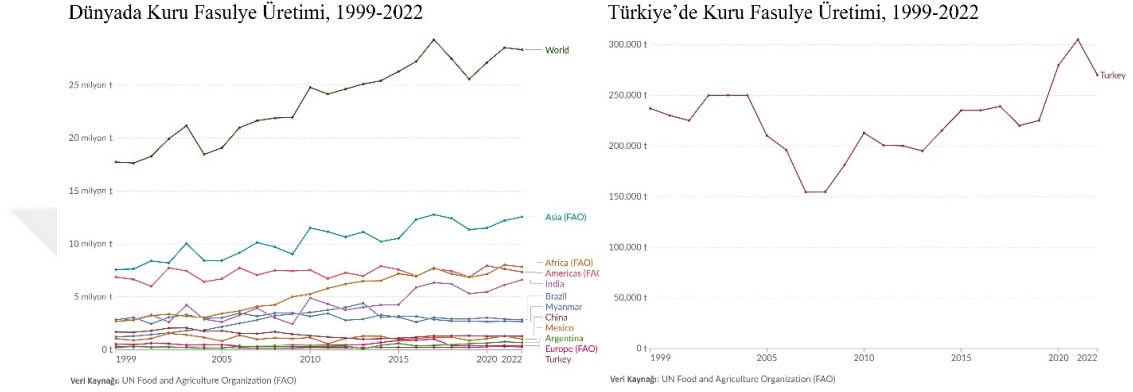
CC BY

Şekil 1.1. Dünyada kuru fasulye üretimindeki verim grafiği (Our World in Data adresinden edinilmiştir, Anonymous 2024b).

Türkiye fasulye üretimi ve yetiştiriciliği konusunda dünya ile kıyaslandığında aşağı sıralarda yer alıyor olsa da ekilen alandan elde edilen verim açısından Şekil 1.1’de gösterilen FAO verilerine göre (Anonymous 2024a) 2015 yılından itibaren dünyada birinci sıradadır. 2022 yılında FAO verilerine göre Türkiye’de yaklaşık 270 bin ton

1. GİRİŞ

fasulye (kuru) üretimi yapılmıştır. Bu üretim miktarı 97 bin hektar alandan elde edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda 2,78 t/ha üretim verimi ile dünyanın en büyük fasulye üreticisi olan Hindistan'dan (0,42 t/ha) yaklaşık 6,66 kat daha fazla verimli olduğu söylenebilir (Anonymous 2024b). Türkiye'nin fasulye üretim miktarlarında yıllar içerisinde artış olsa da dünyadaki üretim hızının gerisinde kalmış ve dünya fasulye üretimindeki yüzdesi azalmıştır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. FAO verileri ile dünyada (solda) ve Türkiye'de (sağda) kuru fasulye üretim miktarlarını ton cinsinden gösteren grafikler (Anonymous 2024b).

Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9 milyar ya da daha fazla olacağı öngörülmektedir. Artan nüfusun, iklim değişikliklerinin ve yetersiz tarımsal büyümlerin besin ihtiyacını giderek artırdığı düşünülmektedir. Açlık riski yaşayacak birey sayısının 2050 yılına kadar %18-20 arası olacağı ve bu değer de 1 milyarın üzerinde olabileceği düşünülmektedir (Rosegrant et al 2014). Bununla beraber uygun olmayan tarımsal uygulamalar, yetersiz sulama, iyi ve kaliteli özellikli tohum azlığı, kimyasal mücadele yöntemleri (pestisit ve herbisit) gibi nedenler tarımsal üretimin sorunları arasında sayılmaktadır (Dev 2014). Tüm bu kısıtlamaların yanı sıra sesil organizmalar olan bitkilerin mücadele etmek zorunda oldukları biyotik (biyolojik etmenli; böcek, bakteri, mantar, virüs) ve abiyotik (biyolojik olmayan etmenli; sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, donma, vb.) stres çeşitleri de bulunmaktadır. Değişen iklim koşullarından dolayı giderek artan su kıtlığı, hızla artan dünya nüfusu için gıda güvenliği ve üretimine yönelik en ciddi tehditlerden birisidir (Seki et al. 2003; Korgaonkar and Bhandari 2023). Fasulye bitkisi (*P. vulgaris*) hava sıcaklıklarından, bağıl nemden ve toprağın su kapasitesinden büyük ölçüde etkilenebilmektedir. Fasulyenin dünya çapında yetiştirilmesinde, bitkileri ve dolayısıyla verimi etkileyen hastalıkların sonrasında, ikinci büyük olumsuz etkinin

kuraklık olduğu düşünülmektedir (Schneider et al. 1997; Rosales-Serna et al. 2004). Fasulye genel olarak yağışlarla beslenen bir bitki türü olup, çevresel koşullarda yaşanan değişimlerden ciddi ölçüde etkilenmektedir. Kuraklık şiddeti arttıkça verimin düşmesi veya tam kayıplarının meydana gelmesi öngörülebilir.

Su, yaşam için en elzem moleküldür. Su, bitkilerde fotosentezden moleküller arası etkileşimlere kadar değişik fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenir. Değişen çevresel koşullar neticesinde bitkiler optimum su oranını koruyamaz. Bu durum fizyolojik süreçlerin bozulmasına neden olurken bitkinin büyüme ve gelişmesine ciddi olumsuz etkilerde bulunabilir. Değişen iklim koşullarından dolayı giderek artan su kıtlığı, artan dünya nüfusu için gıda güvenliği ve gıda üretimine yönelik en ciddi tehditlerden birisidir (Korgaonkar and Bhandari 2023). Küresel iklim değişikliği sıcaklıkların artmasına ve atmosferik karbondioksit seviyesinin yükselmesine neden olmaktadır. Topraktaki suyun buharlaşma hızı artar ve böylece yağış rejimi de değişiklik gösterir. Bu durum da dünya çapında kuraklık oluşumunu tetikleyerek bitkileri su stresine maruz bırakan etkilerin başlamasına neden olur (Dai 2011; Mishra and Singh 2011). Kuraklık, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yollara etki eden ve bitki gelişimine olumsuz etkilerde bulunan abiyotik stres faktörüdür. Bitkilerde çok çeşitli stres yanıt mekanizmaları bulunmaktadır (Bartels and Sunkar 2005). Bu yanıt mekanizmaları türlere göre farklılık gösterebilir ve çeşitli stresle-ilişkili genleri içerebilir (Korgaonkar and Bhandari 2023). Kuraklık stresi hücresel dehidrasyona yol açar, bu da ozmotik strese ve sitoplazmadan suyun hücre dışı boşluğa çıkmasına neden olarak sitozolik ve vakuolar hacmi azaltır. Diğer bir sonuç, reaktif oksijen türlerinin üretimidir, bu da daha sonra hücresel yapıları ve metabolizmayı olumsuz yönde etkiler. Su eksikliğine erken tepkiler, iyonik bileşenler dışında büyük ölçüde aynıdır. Bu benzerlikler, örneğin fotosentezde azalma gibi metabolik süreçleri veya bitki hormonu ABA'nın yükselen seviyeleri gibi hormonal süreçleri içerir (Bartels and Sunkar 2005). Yüksek hücre içi sodyum ve klorür iyon konsantrasyonları, tuzluluk stresi için ek bir problemdir. Tuzluluk ve kuraklığa adaptasyon, zayıflatılmış büyüme, genlerin aktivasyonu / artan ekspresyonu veya indüksiyonu, ABA seviyelerinde geçici artışlar, koruyucu proteinlerin birikimi, enerji tüketen yolların artan antioksidan seviyeleri gibi çeşitli karmaşık süreçler içerir. Ancak toleransı belirleyen anahtar süreçler ve bunları takip eden ikincil süreçlerin tanımlanmasında literatürde eksiklikler mevcuttur. Yüksek verimli DNA teknolojilerinin

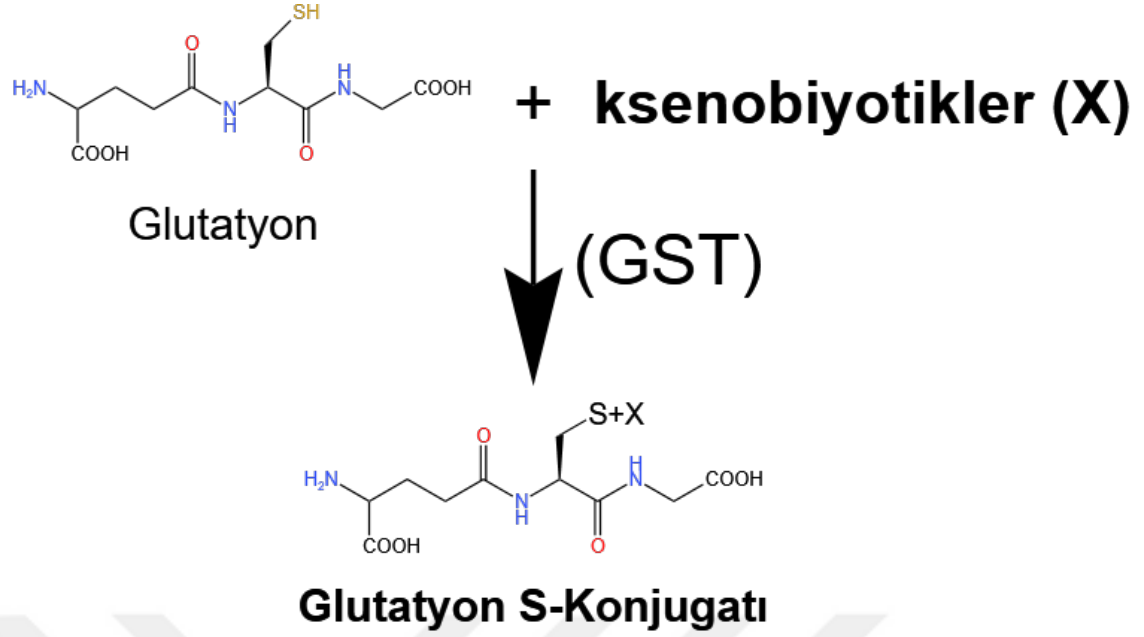
ilerlemesiyle, birkaç yüz stres kaynaklı veya yukarı regüle edilmiş gen tanımlanmıştır. Bununla birlikte, yalnızca sınırlı sayıda gen ürününün işlevi bilinmektedir. Biyoteknolojik yaklaşımlarla kültür bitkilerinde stres toleransını iyileştirmek için bu genlerin olası kullanımı üzerine daha detaylı çalışmalar ve belki de saha çalışmaları gereklidir (Bartels and Sunkar 2005).

Biyoinformatik, büyük ve karmaşık biyolojik verileri analiz etmeyi ve yorumlamayı sağlayan disiplinler arası bir bilim dalıdır. Biyoinformatikte gerekli analiz ve yorumların yapılabilmesi için biyoloji, kimya, fizik, bilgisayar bilimleri, programlama, matematik ve istatistik bilimlerine gerek vardır. Biyoinformatik tüm bu alanları birbirine bağlayan bir köprü görevi görerek biyolojik verilerin aydınlatılmasını sağlar. Bu veriler canlıların genetik yapısını, proteinlerin yapısını, metabolik yolları anlamaya yardımcı olmaktadır. Biyoinformatik bilimi, tüm bu verilerin anlaşılmasına yardımcı olmanın yanı sıra canlıların evrimsel süreçleri, hastalıkların oluşumu ve tedavilerin geliştirilmesi gibi konulara da odaklanmaktadır (Muslu vd. 2024). Biyoinformatik araçların ortaya çıkardığı bilgiler ışığında gen ve gen aileleri araştırılabilir ve işlevleri ortaya çıkarılabilir. Bu bilgiler sayesinde daha verimli, streslere karşı daha dayanıklı ve daha sağlıklı mahsuller geliştirilebilir. Kuraklığa dayanıklı mahsullerin yetiştirilmesi, artan gıda ihtiyacını karşılayabilme seçeneklerinden birisidir. Transgenik bitkilerin üretimi, bitki genomundaki çok çeşitli genlerin mahsulün iyileştirilmesi için büyük beklentiler yaratması nedeniyle tolerans için iyi bilinen yaklaşımlardan biridir (Xoconostle-Cazares et al. 2010; Lisar et al. 2012; Korgaonkar and Bhandari 2023). Kuraklık ile ilişkili genlerin manipülasyonu ile dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, bu zorlukların üstesinden gelmek için potansiyel bir yaklaşımdır. Bu bağlamda bitkilerde kuraklık direncinin düzenlenmesinde önemli roller üstlenen anahtar konumdaki genlerin derinlemesine araştırılması ve bu genlerin moleküler mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, kuraklık stresine adaptasyon ve stresin ürün verimi üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletebilmek adına büyük önem taşımaktadır (Yao et al. 2023).

Moleküler biyoloji ve genetikte transformasyon, bir hücrenin eksojen genetik materyali hücre zarı aracılığıyla doğrudan hücre içine alması ve kendi genetik materyali bünyesine eklemesi sonucu kalıcı bir genetik değişim oluşmasıdır (Johnston et al. 2014). Doğal bitki kök tümörü bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens* (yeni adıyla *Rhizobium*

radiobacter), bitkilere gen transfer etmede oldukça başarılı bir organizmadır. Barındırdığı T-DNA ile doğru genetik materyali kararlı ve kesin bir şekilde bitki genomuna entegre edebilmesinden dolayı *Agrobacterium*-aracılı transformasyon, sıkça tercih edilen ucuz, nispeten kolay ve başarılı bir tekniktir. Gen transferi yoluyla belirli bir özelliğin geliştirilmesi, günümüzde önemli bir teknik haline gelmiştir. Bu bağlamda *Agrobacterium* aracılı gen aktarımı yöntemi kullanılarak başarılı bitki transformasyonu çalışmaları elmadan (Zhao et al. 2021) fasulyeye (Mukeshimana et al. 2013), tütünden (Krügel et al. 2002; Verma et al. 2023), domatese (Shah et al. 2016) kadar birçok bitki türünde gerçekleştirilmiştir.

Glutasyon S-transferazlar (GST; EC 2.5.1.18), tripeptid glutasyonun (GSH) fitotoksik substratlar üzerindeki elektrofilik bölgelere olan bağlanmayı katalize eden hücresel detoksifikasyon enzimlerinin heterojen bir grubudur ve bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır (Mohsenzadeh et al. 2011; Ahmad et al. 2020). GST'ler bitkilerde ksenobiyotiklerin nötralizasyonunda ve stres mekanizmalarının zehirli etkilerinin giderilmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Şekil 1.3'te glutasyon s-transferazların glutasyon ile ksenobiyotikleri bağladığı tepkime görselleştirilmiştir. GST'ler birçok faz II enerji salan izozimlerin bir koleksiyonudur (Hayes et al. 2005). Ayrıca, tripeptid glutasyonun (GSH) çeşitli elektrofillere olan ilgisini artırır. Kükürt, azot veya karbon atomu içeren apolar yapıda toksik bir bileşik varsa indirgenmiş glutasyon bu bileşiğe saldırır ve bu nedenle de tiyoeter bağının oluşumunu katalizler, bu da apolar bileşiğin çözünürlüğünün artması ve metabolik yeterliliğin artırılması ile sonuçlanır. Sonuç olarak glutasyon ve ksenobiyotik konjugatı "efflux transporter"lar aracılığıyla hücre dışına atılır (Mazari et al. 2023).



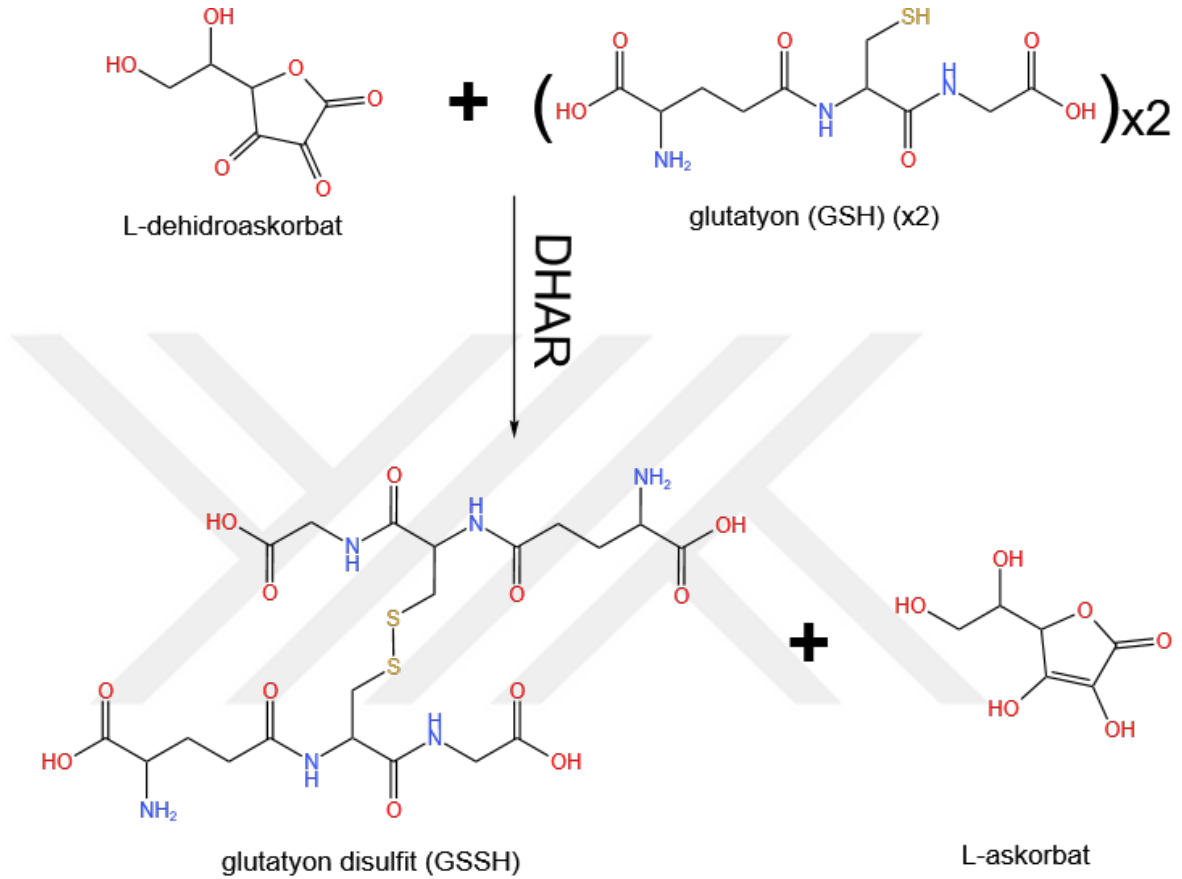
Şekil 1.3. GST'lerin glutatyon ile ksenobiyotikleri konjuge etmesi (KingDraw v3 kullanılarak oluşturulmuştur).

DHAR (dehidroaskorbat redüktaz; EC 1.8.5.1) indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak dehidroaskorbat'ın (DHA) askorbat'a (AsA) indirgenmesini katalize eden bir enzimdir. DHA'nın kararsız bir moleküldür ve hızlı bir biçimde AsA'ya indirgenmesi gereklidir. İndirgenmediği takdirde geri dönüşümsüz olarak 2,3-diketogulonat'a dönüşür ve bu yolak ise piruvat yolu ile ya da nükleotid şekeri metabolizması ile sonuçlanmaktadır (Deutsch 2000). Glutatyon redüktaz (GSR; EC 1.8.1.7), askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) glutatyon metabolizmasındaki en önemli üç enzim olarak değerlendirilebilir. Redoks reaksiyonları ve redoks katalizleri sayesinde askorbat-glutatyon (AsA-GSH) havuzunun korunmasında rol oynayan bu enzimler özellikle bitki antioksidan savunma mekanizmalarında büyük önemlere sahiptir (Eltayeb et al. 2006, 2011).

Askorbat (AsA), hücrelerde direkt olarak serbest radikallere bağlanıp onların uzaklaştırılmasında kullanılan bir antioksidandır. Askorbat bitkilerde redoks tamponu olarak (Pignocchi and Foyer 2003), birçok enzimin kofaktörü olarak (Smirnoff and Wheeler 2000), hücre bölünmesi ve büyümesinin regülatörü ve sinyal iletim molekülü olarak çalışabilir (Kerk and Feldman 1995; Noctor et al. 2000). Stres durumunun etkilerinin azaltılması ya da ortadan kaldırılması için AsA'nın rejenerasyonu büyük öneme sahiptir. AsA, bitkilerde birçok hücresel alanda gerçekleşen Halliwell-Foyer-

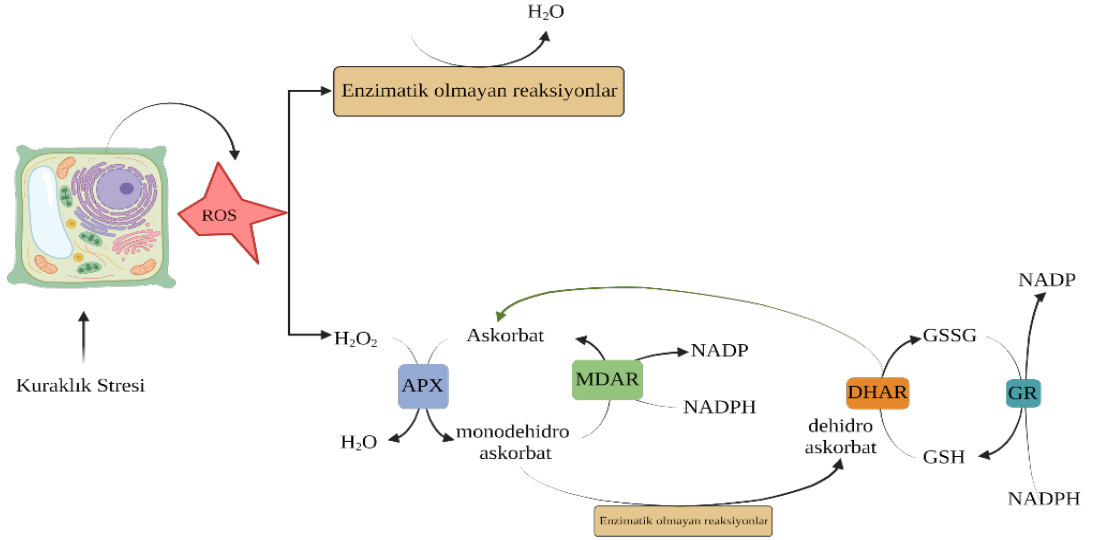
1. GİRİŞ

Asada döngüsü (AsA-GSH döngüsü) ile genellikle dehidroaskorbat (DHA) formundan askorbat formuna dönüşmesi ile gerçekleşmektedir (Horemans et al. 2000). Dehidroaskorbatın askorbata dönüşümünü katalizleyen enzim ise DHAR'dır ve bu tepkimeni şeması şekil 1.4'te verilmiştir.



Şekil 1.4. DHAR enziminin 2 glutatyondan gelen 2 adet hidrojeni kullanarak L-dehidroaskorbatı L-askorbata indirgemesini gösteren reaksiyon (KingDraw v3 kullanılarak oluşturulmuştur).

AsA-GSH döngüsünün enzimleri (APX, MDHAR, DHAR ve GR) kuraklığa bağlı oksidatif stres altında antioksidan savunma sistemlerinin önemli bileşenleri olarak işlev görmektedir (Sharma and Dubey 2005). Ayrıca maş fasulyesi fidelerinde Hossain ve Fujita (2010)'nın göstermiş olduğu gibi AsA-GSH döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin artması ile kısa süreli iyileşmiş kuraklık toleransı gözlenmekte olup, bu da düşük H_2O_2 ve MDA seviyeleri ile de doğrulanmıştır.



Şekil 1.4. AsA-GSH yollarını gösteren şekil (AsA-GSH döngüsü, APX: askorbat peroksidaz, MDAR: monodehidroaskorbat, DHAR: dehidroaskorbat, GR: glutatyon redüktaz) (Anonymous 2017).

Bitkilerde antioksidatif enzimler arasında *DHAR*'ın aşırı ifadesi ozon, tuz, PEG, kuraklık, ağır metal stresleri gibi çoklu çevresel streslere karşı gelişmiş tolerans kazandırmıştır (Eltayeb et al. 2006; Yin et al. 2010; Eltayeb et al. 2011). Kuraklık, tuz stresi ve herbisit kullanımı gibi bitkilere olumsuz çevre koşulları oluşturan etmenler, bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu teşvik eder. ROT'lar hücre zarı lipidleri, proteinler ve DNA/RNA ile reaksiyona girmekle beraber hızlı hücre hasarlarından sorumlu ana faktörler olarak görülmektedirler (Asada and Takashi 1987; Mittler 2002; Hung et al. 2005; Eltayeb et al. 2011). ROT'ların zararlı etkilerini temizleme ve azaltma, bitki hücrelerinde enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler tarafından gerçekleştirilmektedir. Askorbat (AsA), glutatyon (GSH) ve α -tokoferol gibi düşük moleküler ağırlıklı olan antioksidanlar (enzimatik olmayan) ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler (enzimatik), ROT'ların zararlı etkilerini önlemek ve kontrol altında tutmak için oldukça önemli hücre bileşenleridir (Noctor and Foyer 1998).

Bir genin aşırı ifadesi basitçe yüksek kopya sayılı ya da bir aşırı ifade promotörü altında istenen genin bir organizmada normalden fazla oranda olacak şekilde ifade ettirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Prelich 2012). Aşırı ifade çalışmaları genel olarak bir genin işlevini anlamak için fonksiyonel olarak kullanılan bir yöntemdir (Shastri 1995). Fonksiyonel genetik çalışmalarında bir genin işlevini anlamaya yönelik genin aşırı

ifade ettirilmesinin yanında genellikle aynı genin susturulması ya da baskılanması da gerçekleştirilmektedir. Aşırı ifade etme, bir genin bilim insanları tarafından kolaylıkla izlenebilmesini sağlayabilmektedir. Bitkinin kendinde doğal olarak bulunan, değişmemiş bir genin (wild-type gen) aşırı ifade edilmesiyle bitkilerde ilaç, insektisit ve ağır metal direncinde artış sergileyebilme potansiyeli bildirilmiştir (Kondou et al. 2010; Prelich 2012). Aynı şekilde bazı genlerin spesifik stres etmenlerine karşı gelişmiş yanıt sergilediği de rapor edilmiştir. Bunların yanı sıra bazı supresör genlerin aşırı ifadesi de oldukça önem arz etmektedir, çünkü bu supresör genler aşırı ifade edilebilirse fonksiyon kaybı mutasyonlarına benzer etkiler ortaya çıkarılabilir ve bu sayede bir genin fonksiyonu daha net bir şekilde gözlemlenebilir (Prelich 1999). Sonuç olarak bir genin aşırı ifade edilmesi, arzu edilen genin ya da bu genin direkt olarak etkileşime girdiği diğer genlerin fonksiyonlarını anlamak için önemli bir araçtır.

Fasulye bitkisinin dünya çapında önemi bilinmekte ve fasulyenin küresel ısınma tehdidi ile karşı karşıya kaldığı görülmektedir. *P. vulgaris* bitkisi özelinde gerçekleştirilen fonksiyonel genetik çalışmalarının literatürdeki azlığı dikkat çekmektedir. Mevcutta bulunan bir genin aşırı ifade edilmesinin, bitkinin mevcut direncini daha da artırdığı bildirilmiştir (Würdig et al. 2015). Sınıf 1 kitinaz geninin buğdayda aşırı ifade edilmesinin, ciddi oranda artan fungal enfeksiyon direnci geliştirdiği rapor edilmiştir (Maltseva et al. 2021). Elma bitkisinde *Rvi6* ve *Rvi15* genlerinin aşırı ifade edilmesi kabuk hastalığı oluşturduğu bilinen *Venturia inaequalis* mantarına karşı direnç geliştirmiştir (Broggini et al. 2013; Würdig et al. 2015). Çeltikte *SRWD1* geninin aşırı ifadesi ile *Xanthomonas oryzae*'ye karşı direnç geliştirildiği de raporlanmıştır (Xie et al. 2017). Tüm bunların yanında bazı ektopik aşırı ifade çalışmaları da bulunmaktadır. Ektopik ifade bir genin fonksiyonunu belirlemek adına, bir organizmadan alınan bir genin başka bir organizmada ifade ettirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Rodríguez-Trelles et al. 2005). Ektopik ifade yöntemleriyle mısır *ZmWRKY106* geninin kuraklık ve sıcaklık stresine karşı (Wang et al. 2018), çeltik *OsSta2* geninin tuz stresine karşı (Kumar et al. 2017), fasulye *PvERF35i* geninin tuz stresine karşı (Kavas et al. 2020) tolerans geliştirdiği rapor edilmiştir. Bunlarla birlikte birçok gen susturma yöntemiyle de bitkilerde bazı stres koşullarına karşı dayanıklılık geliştirildiği de rapor edilmiştir. VIGS (virüs kaynaklı gen susturma) yöntemi kullanılarak arpada (*Hordeum vulgare*) *Sgt1*, *Rar1* ve *Hsp90* genlerinin (Hein et al. 2005), buğdayda (*Triticum aestivum*) ise *Mlo* geninin

(Várallyay et al. 2011) susturulmasıyla pas hastalığına karşı direnç geliştirilmiştir. RNAi metotları kullanılarak çeltikte yağ asidi desaturaz geni olan *OsSSI2* geninin susturulması ile yaprak yanığı hastalığına karşı direnç geliştirildiği rapor edilmiştir (Jiang et al. 2009). Yine VIGS yöntemi kullanılarak arpada *HvATG6*, *HvEXPB7* genlerinin, buğdayda *TaBTF3*, *TaPGR5* ve *TaEFR3* genlerinin susturulması ile kuraklık stresine karşı direnç geliştirildiği gösterilmiştir (Kang et al. 2013; Rong et al. 2014; Wang et al. 2014; Zeng et al. 2017). *DHAR* geninin tütün (Eltayeb et al. 2006; Yin et al. 2010), patates (Eltayeb et al. 2011), çeltik (Kim et al. 2013, 2014, 2022), *Arabidopsis thaliana* (Ushimaru et al. 2006; Kidwai et al. 2019) gibi bilimsel, ekonomik ve tarımsal açıdan önemli bazı bitkilere aktarıldığı ya da bu bitkilerde aşırı ifade edildiği raporlanmıştır.

Bu tez çalışmasında temel olarak *PvGST* gen ailesi üyelerinin genom çaplı analizi ve karakterizasyonu; tuz, kuraklık ve melatonin uygulamalarının belirlenen *GST* genlerine olan etkilerinin araştırılması ve GST üyesi olan DHAR alt ailesinden *PvDHAR1* geninin tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkisinde aşırı ifade edilmesi amaçlanmıştır. Aşırı ifade edilen *PvDHAR1* geninin tütün bitkisinde kuraklığa karşı yanıtta rolünün belirlenmesi ve *PvDHAR1*'in potansiyelinin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Giderek artan sanayileşme ile birlikte yaşamımızı tehdit eden küresel hava ve su sıcaklıklarındaki artışlar, deniz seviyelerinde yükselme, mevsimsel değişimler, yağış rejimlerinin düzensizleşmesi gibi birçok olay tarımsal üretime etki etmektedir. Bu değişimlere atmosfere salınan sera gazlarının da sıcaklık tutucu etkisi eklendiğinde anormale varan sıcaklık artışları gözlenir ve sonucunda küresel ısınma adı verilen olay gerçekleşmektedir. Küresel ısınma şu anda tüm dünya hayatını, tarımsal ve denizcilik faaliyetlerini etkilemektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2023 yılında yayımladığı iklim değişikliği bildirisinde yaklaşık 3,6 milyar kişinin iklim değişimlerine oldukça duyarlı bölgelerde yaşadığı bildirilmiştir. Yine aynı bildiriye göre iklim değişikliklerinden kaynaklı stres faktörlerinin su ve gıda kaynaklı hastalık risklerini artırdığı ve 2020 yılında, çoğunluğu Afrika ve Asya'da olmak üzere 770 milyon kişinin açlıkla karşı karşıya kaldığı rapor edilmiştir. İklim değişikliği gıdanın bulunabilirliğini, gıdaya ulaşılabilirliği, gıdanın kalitesini ve çeşitliliğini etkileyerek gıda ve beslenme krizlerini şiddetlendirmektedir (Anonymous 2023).

Dünya nüfusun hızlı artışı sebebiyle gıda arzının gerekli talebi karşılayamama durumu oluşmaktadır. 1950'lerde yaklaşık 2,5 milyar olan dünya nüfusu 2022 yılında 8 milyara ulaşmış ve 2050 yılına kadar da 9,7 milyarı aşacağı tahmin edilmektedir. Günümüzdekine benzer şekilde ilerleyen yıllarda da tahıl ve baklagil tarımının küresel beslenmede önemli rolleri olacağı ön görülmektedir. Küresel tarım alanlarının %60 kadarının kuraklık tehlikesi ile yüz yüze geldiği tahmin edilmekle beraber giderek artan küresel ısınmanın bu sayıyı daha da artıracığı düşünülmektedir (Rosegrant et al. 2014; Castaneda et al. 2016; Korgaonkar and Bhandari 2023).

Bitki için düşük dozlarda toksik etkileri bulunmayan polietilen glikol-6000 (PEG6000), kuraklık stresinin simülasyonunda sıklıkla kullanılan bir kimyasaldır. PEG6000 moleküllerinin bitkinin köklerindeki suyu aldığı kanalları tıkayarak ya da su alımını azaltarak etki ettiği düşünülmektedir. Ayrıca PEG Na^+ ve K^+ gibi tek değerlikli katyonlarla kovalent olmayan bağlanmalar yaparak biyokimyasal dengeyi etkileyebilmektedir. Kuraklık stresini iyi simüle edebilmesinin bir nedeninin de Na ve K gibi bitkide su alımı ve diğer biyokimyasal süreçlerde oldukça etkili olan bu iyonları

tutması ve bitkiyi bu iyonlardan mahrum bırakmasıdır (Eltayeb et al. 2011; Breton et al. 2013; Muslu et al. 2024).

Kuraklık bitki verimliliğini etkileyen en ciddi çevresel streslerden birisidir. Bitkilerin taze gövdeleri yaklaşık %80 kadar su içerir. Su ayrıca büyüme, gelişim ve metabolizma faaliyetleri için hayati önemi olan moleküldür. Kuraklık ise bitkilerin ya mevcut suyunu kaybetmesiyle ya da ihtiyacı olan suyu alamamasıyla sonuçlanan kritik bir çevresel sorundur. Bazı araştırmacılar tarafından kuraklık, ana çevresel stres ve gelecekte de dünya gıda güvenliği için en büyük tehdit olarak görülmektedir. Kuraklık stresi, bitki büyümesinin yavaşlaması, biyokütlenin azalması gibi morfolojik; stomaların kapanması, fotosentezin durdurulması gibi fizyolojik ve fotokimyasal etkinliğin azalması, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi, oksidatif hasarlar gibi biyokimyasal zararlara neden olabilmektedir (Seleiman et al. 2021). Bitkilerde kuraklık kaynaklı reaktif oksijen türlerinin giderilmesinden sorumlu birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler bulunmaktadır. Askorbat (AsA), birçok yüksek organizmada radikal iyon taşıyıcı ROT'lara direkt olarak bağlanabilen oldukça önemli ve güçlü bir enzimatik olmayan antioksidan moleküldür. Askorbat, askorbat peroksidaz (APX) enzimi yardımıyla H_2O_2 'nin giderilmesinde başlıca molekül olup, H_2O_2 'den aldığı bir oksijen atomu ile yükseltgenerek monodehidroaskorbik aside dönüşür ve böylelikle H_2O_2 'yi H_2O 'ya dönüştürür. Monodehidro askorbat enzimi yükseltgenmiş monodehidroaskorbatı indirgeyerek askorbata dönüştürür. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi ise yükseltgenmiş dehidroaskorbatı 2 tane glutatyon molekülünden aldığı $2H^+$ ile indirgenmiş askorbata dönüştürür. Bunun sonucunda glutatyon disülfid(GSSH) oluşur. Bu yolağa ise glutatyon-askorbat döngüsü adı verilmektedir. Glutatyonlar, reaktif oksijen türleri, serbest radikaller, peroksitler, lipid peroksitler ve ağır metaller gibi kaynakların neden olduğu önemli hücresel bileşenlerin hasar görmesini önleyebilen organik moleküllerdir (Leterrier et al. 2005; Muslu et al. 2024). Glutatyon S-transferazlar (GST'ler), detoksifikasyon amacıyla indirgenmiş glutatyon (GSH) formunun ksenobiyotik substratlara konjugasyonunu katalize etme yetenekleriyle en iyi bilinen prokaryotik ve ökaryotik faz-II metabolik izozim ailesidir (Sheehan et al. 2001; Muslu et al. 2024). GST'ler 10 farklı alt aileye ayrılmış ve bunlar literatürdeki çalışmalarla gösterilmiştir. GST proteinlerinin en fazla üyesine sahip Tau ve Phi alt ailelerinin genellikle sitoplazmik GST üyeleri olduğu gösterilmiştir. Diğer alt ailelere nazaran daha

az üyeye sahip DHAR, EF1BG(γ) ve GHR (glutasyonil hidrokinon redüktaz) alt ailelerinin üyeleri ise genellikle sitoplazmada yoğunlaşmış olsa da kloroplast ve mitokondride de yer aldığı belirlenmiştir (Eltayeb et al. 2006; Kim et al. 2013).

Biyoinformatik araçlar kullanarak hedeflenen gen ailelerinin kimliklendirilmesi ve karakterizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. GST'lerin genom çaplı analizleri birçok bitkide yapılmış ve sonuçlar gösterilmiştir. Domateste GST genlerinin genom çaplı analizleri gerçekleştirilmiş ve 90 adet aday gen gösterilmiştir. Bu çalışma da GST'lerin 10 farklı alt aileye ayrıldığını ve en çok üye barındıran alt ailelerin Phi ve Tau aileleri olduğunu raporlamıştır. Fakat bu çalışmada domates GST Theta ailesinin bir üyesinin Phi ailesinde ve *Oryza sativa* GST Tau ailesinin bir üyesinin de Phi ailesinde gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bu durum GST sınıflarının ayrılmasının tek çenekliler ile çift çeneklilerin farklılaşmasından önce gerçekleşmesinden ve GST üyelerinin türe özgü farklılaşmasından kaynaklanmaktadır (Islam et al. 2017).

Glycine max'ta yapılan bir diğer genom çaplı taramada 49 yeni *GmGST* aday geni belirlenmiş ve önceden yapılan başka bir çalışmada (McGonigle et al. 2000) elde edilen 25 *GmGST* genleri ile birleştirilerek toplamda 74 *GmGST* geni literatüre kazandırılmıştır (Ahmad et al. 2020). Bu çalışmada ise GST'ler 8 farklı alt ailede toplanmıştır. Diğer çalışmaya göre eksik olan iki alt ailenin GHR ve MGST (Mikrozomal GST'ler) olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada hepsinin arındırıcı duplikasyon olduğu 12 gen duplikasyon olayı kaydedilmiştir.

GST gen ailesinin önemli bir üyesi olan DHAR geninin fonksiyonunun belirlenmesi ve işlevinin aydınlatılması amacı ile çalışmalar yapılmıştır. *Arabidopsis*'te ozon stresi *cytDHAR* geninin ifadesini ciddi oranda artırmıştır. *cytDHAR* geni susturularak elde edilen mutant *Arabidopsis*'te ozona karşı ciddi bir hassasiyetin geliştiği rapor edilmiştir (Yoshida et al. 2006). Yapılan bir diğer çalışmada ise *O. sativa* DHAR geni *Arabidopsis*'e aktarılmış ve aşırı ifadesi sağlanmıştır. *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen çeltik DHAR geninin bitkide tuz stresine karşı tolerans geliştirdiği rapor edilmiştir (Ushimaru et al. 2006). Bir başka çalışmada ise *Arabidopsis* DHAR geninin bütün bitkisinde aşırı ifadesiyle artan kuraklık toleransı rapor edilmiştir (Eltayeb et al. 2006). Tüm bu çalışmaların yanında 2003 yılında, insana ait DHAR geninin bütün bitkisinde aşırı

ifadesiyle herbisit (metil viologen), hidrojen peroksit, düşük sıcaklık ve tuz streslerine karşı tolerans geliştirdiği raporlanmıştır (Kwon et al. 2003).

Genetik transformasyon, ilk defa 1928’de İngiliz bakteriyolog Frederick Griffith’in “Griffith Deneyi” olarak da bilinen *Streptococcus pneumoniae* bakterileri kullanılarak gerçekleştirdiği genetik materyal aktarımıdır (Griffith 1928). Esasında bir hücrenin dışarıdan genetik materyal alması olarak kısaca tanımlanmaktadır. Bakteriler yatay gen transferini transformasyon, konjugasyon (plazmik zar köprü) ve transdüksiyon (viral aracılı) olmak üzere üç yolla gerçekleştirirler. Gen transferinde asıl sınırlama alıcı bakterinin yetkinliği ile ilişkilidir. Günümüzde birçok transformasyon yeteneğine sahip bakteri türü ve bu türlere ait suşlar tanımlanmıştır (Johnston et al. 2014). 1975 yılında yapılan bir çalışma ile ilk defa *Agrobacterium* Ti (tümör indükleyici)-plazmidi ile *nif* genleri aktarıldığı gösterilmiş ve Ti-plazmidin ve dolayısıyla *Agrobacterium*’un doğal bir vektör olabileceği kanıtlanmıştır (Schell and Montagu 1977). Bu yenilikleri takiben bitkiler için genetik mühendisliğinin başlangıcı sayılabilecek herbisit dirençli tütün bitkisi ilk transgenik bitki olarak üretilmiştir (Greef et al. 1989). Geçen yıllar ve giderek artan bilimsel bilgi birikimi neticesinde birçok başarılı transformasyon tekniği geliştirilmiştir. Fakat tüm bunlara karşın, istikrarlı, yüksek verimli, basit ve nispeten ucuz olması gibi nedenlerle *Agrobacterium*-aracılı gen transferi yaygın olarak kullanılan popüler bir tekniktir (Nester 2015; Gelvin 2017).

Agrobacterium-aracılı transformasyon ilgilenilen bir geni bitki hücresine aktarmak ve transgenik bitkiler üretmek için *Agrobacterium*’un kullanıldığı bir süreçtir. Esasında *Agrobacterium* toprak kökenli (soil-borne) patojen bir bakteridir. Bu bitki patojeni, yaralanmış dikotiledon bitkilerde taç-ur (crown-gall) veya tüylü kök hastalığına neden olur. *Agrobacterium*’lar Ti plazmiti taşırlar. Ti-plazmiti, üzerinde T-DNA adı verilen bölgeyi bitki genomuna aktarır. Bu T-DNA bölgesi *Agrobacterium*’un hayatta kalması ve bitki enfeksiyonları için önemli birtakım gen taşır. Ti plazmidleri üzerinde bulunan genler arasında *vir* genleri olarak adlandırılan bazı virülans genleri *Agrobacterium*’daki Vir proteinlerini kodlar. Bu *vir* genlerinden *virA* ve *virG* *Agrobacterium*’da iki bileşenli düzenleyici sistem oluşturur. Bu sistem bitkiden gelen sinyal molekülleriyle *virA*’nın uyarılması ve bu sayede *virG*’nin aktifleşerek oktopin-tip Ti-plazmitte 14 *vir* operonunun ekspresyonunu aktifleştirir. *vir* bölgesinin içerisindeki en

2. KAYNAK ÖZETLERİ

büyük operon olan *virB*'nin ekspresyonunun uyarılması sonucunda 11 *virB* proteini üretilir ki bu proteinler T-DNA'nın bitki hücrelerine ilerlemesinde ve genoma entegre olmasında rol oynarlar (Ward et al. 1988). *virD* operonu ise T-DNA'nın konjugasyon köprüsünden ilerlemesinde rol alan 4 adet *virD1-D4*, *virD2* ve *virD3* proteinlerini kodlar (Cooley et al. 1991).



Şekil 2.1. *Agrobacterium*'un bir bitkiyi enfekte etmesinin şematik gösterimi (Anonymous 2024c'den düzenlenmiştir).

pGFPGUS*Plus* (Plasmid #64401) plazmidi hem ökaryotik yeşil floresan protein (GFP) hem de β -glukuronidaz genlerini (GUS) CaMV 35S promotör akışında taşıyan bir aşırı ifade vektörüdür (Şekil 2.2). Bu vektörün geliştirilebilmesi amacıyla pCAMBIA1305.1 plazmidine 35S:GFP:NOS kaseti, 35S:GUS*Plus*:NOS kasetinin yukarı akış bölgesine ve ters oryantasyonunda olacak şekilde çoklu klonlama bölgesindeki *Hind*III ve *Eco*RI kesim enzim bölgelerine ligasyon ile eklenmiştir (Vickers et al. 2007). Bu sayede iki raportör gen de CaMV 35S promotör kontrolü altında plazmitte yer almaktadır. CaMV 35S promotörü bitkilerde rekombinant proteinleri ifade etmek için bir araç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Saidi et al. 2009). Bu raportör genler ve bir adet *HygR* (higromisin-B direnç geni), pGFPGUS*Plus* plazmidinin T-DNA (left border T-DNA repeat; right border T-DNA repeat) bölgesinde yer alır. Bu T-DNA'nın transformasyonunun başarılı olduğu bitkilerde higromisin-B direnci yanında yeşil floresans ışıması ve histokimyasal boyamalar ile GUS aktivitesi görülecektir.

Created by SnapGene



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bitkiler, bakteriler ve plazmitler

Tez çalışmasında kullanılan *Phaseolus vulgaris* cv. “Serra” ve “Elkoca-05” ve transformasyon çalışmalarında kullanılan *Nicotiana benthamiana* bitkileri Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiştir. Klonlama çalışmaları ve plazmiti çoğaltmak için *Escherichia coli* JM101, gen aktarımı çalışmaları da *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 bakterileri kullanılmıştır. Hedeflenen DNA parçasının (genin) çoğaltılması için CloneJET (Thermo Scientific, #K1231) klonlama vektörü, genin bitkiye aktarımı ve aşırı ifade edilmesi için biklonal pGFPGUS*Plus* vektörü kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçlarını gösteren çizelge.

Kimyasalların Adı	Kullanım Amaçları
6-benzil amino pürin	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Agar	Doku kültürü ve bakteri çalışmalarında besiyeri katılaştırıcı ajan olarak kullanılmıştır.
Agaroz	Jel elektroforezi için kullanılmıştır.
Ampisilin	Bakteri seleksiyonu için kullanılmıştır.
Borik asit	Agaroz jel elektroforezi tampon solüsyonunda kullanılmıştır.
Bromofenol mavisi	Agaroz jel elektroforezinde yükleme boyası solüsyonunda (6X yükleme boyası) kullanılmıştır.
cDNA sentez kiti	cDNA sentezinde kullanılmıştır.
CTAB	DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
EDTA	Agaroz jel elektroforezi tampon solüsyonunda, RNA yükleme boyasında (2X RNA yükleme boyası) ve DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Etanol (EtOH)	Genel sterilizasyonda ve izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Etidyum bromür	Agaroz jel elektroforezi çalışmalarında DNA görüntüleme ajanı olarak kullanılmıştır.
Fenol (fenol-kloroform)	DNA ve RNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. (Devam)

Gliserol	Bakterilerin uzun süreli dondurulmasında kriyoprotektan ajan olarak kullanılmıştır.
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Hidrojen peroksit analizi çalışmalarında kullanılmıştır.
Hidroklorik asit	Tampon çözelti hazırlamada ve pH ayarlamada kullanılmıştır.
Higromisin-B	Bitki seleksiyon ortamlarında kullanılmıştır.
Hoagland solüsyonu	Hidrofonik ortamda bitki büyütmede kullanılmıştır.
İndol-3-asetik asit	Bitki doku kültürü çalışmalarında köklendirme hormonu olarak kullanılmıştır.
İzopropanol	DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Kanamisin	Bakteri seleksiyon ortamlarında kullanılmıştır.
Luria-Bertani besiyeri	Bakteri büyütme ortamı olarak kullanılmıştır.
Melatonin	Stres iyileştirici ajan olarak kullanılmıştır.
MES Hidrat	Bitki doku kültürü ortamlarında tampon olarak kullanılmıştır.
MS temel besiyeri	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
MS Vitamin solüsyonu	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
NaCl	Tuz stresi uygulamasında kullanılmıştır.
Poli-etilen glikol 6000 (PEG6000)	Kuraklık stresi uygulamasında kullanılmıştır.
PVP-40	DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Rifamisin	Bakteri seleksiyon ortamlarında kullanılmıştır.
Sefotaksim	Agrobacterium eliminasyonunda kullanılmıştır.
Sodyum hidroksit (NaOH)	Tampon çözelti hazırlamada ve pH ayarlamada kullanılmıştır.
Sodyum hipoklorit	Yüzey sterilizasyonunda kullanılmıştır.
Streptomisin	Bakteri seleksiyon ortamlarında kullanılmıştır.
Sükroz	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
SYBR-Green	qPCR çalışmalarında kullanılmıştır.
Taq-DNA polimeraz	PCR çalışmalarında kullanılmıştır.
Tiyobarbitürik Asit	MDA analizi çalışmalarında kullanılmıştır.
TRIzol çözeltisi (TRI-reagent)	RNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
Trikloroasetik asit (TCA)	MDA analizi çalışmalarında kullanılmıştır.
Tris	Agaroz jel elektroforezinde tampon çözelti olarak ve DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
YEB besiyeri	Bakteri büyütme ortamı olarak kullanılmıştır.
α -naftalin asetik asit	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
β -merkaptetanol	DNA izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmalarında kullanılan cihazlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmalarında kullanılan cihazlar ve marka/model bilgilerini gösteren çizelge.

Cihaz Adı	Marka/Model
4°C Soğutucu	Simens/KD56NAW35N
-80°C Soğutucu	ThermoFisher/FDE40086FV
Bitki Büyütme Kabini	Wisd/SWGC-450
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng/ZHWY-2102C
Doku Parçalayıcı	Qiagen/TissueLyser LT
EC Metre	Mettler Toledo/SevenGo Duo

Çizelge 3.2. (Devam)

Elektroforez Sistemi	Bio-rad/PowerPac Basic
Emniyet Kabini	Biobase/BSC-700IIA2
Etüv	Wisd/WIR-150
Hassas Terazı	Shimadzu/ATX224
İnkübatör	Memmert/IN110
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-rad/Universal Hood III
Klorofil Florometrekare	Hansatech/Handy PEA
Klorofil Ölçer Spektrometre	Konica Minolta/SPAD 502
Manyetik Karıştırıcı	Wisd/MSH-20D
Mikrodalga	Altus
Mikropipet Takımı	Mikrosantrifüj
Otoklav	Hirayama/HV-50L
PCR	SensoQuest/LabCycler Gradient
pH Metre	Mettler Toledo/SevenCompact
Real Time PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q
Santrifüj	Hettich/1406
Sınıf II Laminar Flow Kabin	Esco/NC2-4L8
Spektrofotometre	ThermoFisher/Multiskan Go
Su Banyosu	Wisd/WB-11

3.2. Yöntem

3.2.1. Tez çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin adları ve hazırlanışı Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tez çalışmasında kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözeltiler	Hazırlanışları
%1'lik NaOCl solüsyonu	Ticari olarak temin edilen Güldal marka %5'lik NaOCl'den 100 mL alarak son hacim 500 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.
%10'luk Gliserol solüsyonu	Saf gliserolden 1 mL alınarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
%2'lik CTAB stok solüsyonu	10 g CTAB ve 4,1 g NaCl alınarak 50 mL saf suda ısı yardımıyla çözündürülmüştür. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmış ve otoklav ile sterilize edilmiştir.
%20'lik PEG6000 solüsyonu	200 g PEG6000 tartılmıştır ve bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
%5 Trikloasetikasit (TCA) solüsyonu	5 g TCA 50 mL saf suda çözündürülmüş ve son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.
%5,4'lük PVP40 stok solüsyonu	5,4 g PVP40 alınarak 70 mL saf suda çözündürülüp son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
%70'lik EtOH	%99,8 saflıkta olan etil alkolden 700 mL alınmış son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su ile hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. (Devam)

0,5 M EDTA solüsyonu	37,22 g EDTA alınarak 150 mL saf su ile çözündürülmüştür. NaOH kristalleri kullanılarak pH: 8.0'a ayarlanmıştır. Son hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanmış ve otoklav ile sterilize edilerek kullanıma hazırlanmıştır.
0,5 M Tris solüsyonu	12,11 g tris alınarak 100 mL saf su ile çözündürülmüştür. 1 N HCl kullanılarak pH: 8.0'a ayarlanmıştır. Son hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanmış ve otoklav ile sterilize edilmiştir.
1 mg/ml Benzilaminopurin (BAP) stok solüsyonu	100 mg Benzilaminopurin (Sigma, B3408) alınarak bir miktar saf su ile ve 3 mL 1 N NaOH ilave edilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözündükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
1 mg/ml İndol asetik asit (IAA) stok solüsyonu	100 mg indol asetik asit (Sigma, I3750) alınarak 5 mL EtOH içerisinde çözündürüldükten sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
1 mg/ml Naftalin asetik asit (NAA) stok solüsyonu	100 mg naftalin asetik asit (Sigma, N0640) alınarak bir miktar saf su ile ve 3 mL 1 M NaOH ilave edilerek tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
100 mg/ml Ampsilin stok solüsyonu	1 g Ampsilin (Sigma, A9393) 10 mL distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edildikten sonra daha küçük hacimlere bölünerek kullanıma hazırlanmıştır.
100 mg/ml Kanamisin stok solüsyonu	1 g Kanamisin sülfat (Gibco, 11815-024) 10 mL distile suda çözündürülmüş ve stok solüsyon elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Solüsyon daha küçük hacimlere bölünerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
100 mM Asetosiringon stok solüsyonu	19,62 mg Asetosiringon (Thermo Scientific, Cat. No: 115540050) 500 µl DMSO'da çözündürülüp son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilip kullanıma hazır hale getirilmiştir.
10X TBE Buffer stok solüsyonu	22,0 g borik asit, 43,2 g tris alınarak 200 mL saf suda çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltiye 0,5 M EDTA solüsyonundan 8 mL eklenmiştir. pH: 8.0'a ayarlandıktan sonra son hacim saf su ile 400 mL'ye tamamlanmış ve otoklav ile sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
1X TBE Buffer'ın hazırlanışı	10X TBE Buffer'dan 50 mL alınıp 450 mL saf suyla 500 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
150 mM NaCl solüsyonu	8,766 g NaCl tartılmıştır ve bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlanıp otoklavlanarak steril edilmiştir.
20 mM CaCl ₂ solüsyonu	CaCl ₂ ·2H ₂ O (kalsiyum klorür dihidrat)'dan 294,02 g tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve ardından 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.
200 mg/ml Sefotaksim stok solüsyonu	2 g Sefotaksim sodyum (Gold Bio, C-104-1) 10 mL suda çözündürülerek stok solüsyon elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve daha küçük hacimlere bölünerek kullanıma hazırlanmıştır.
25 mg/ml Higromisin stok solüsyonu	250 mg Higromisin (Gold Bio, H-270-1) 10 mL suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Hazırlanan çözelti daha küçük hacimlere bölünerek saklanmıştır.

Çizelge 3.3. (Devam)

25 mg/ml Rifamisin stok solüsyonu	250 mg Rifamisin (Duchefa, R0146) 10 mL DMSO'da çözündürülmüştür. Çözelti daha küçük hacimlere bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.
5 M NaCl solüsyonu	292,4 g NaCl alınarak bir miktar saf suda çözündükten sonra son hacim 1 L'ye tamamlanmış ve otoklavlanarak sterilize edilmiştir.
50 mg/ml Streptomisin stok solüsyonu	500 mg Streptomisin sülfat (Duchefa, S0148) tartılarak 10 mL suda çözündürülmüş ve hazırlanan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirildikten sonra eşit hacimlere bölünerek -20°C'de saklanmıştır.
DNA izolasyon solüsyonu	%2'lik CTAB solüsyonundan 10 mL, 5 M NaCl solüsyonundan 14 mL, 0,5 M EDTA solüsyonundan 2 mL, %5,4'lük PVP40 solüsyonundan 18,5 mL ve 0,5 M Tris solüsyonundan 5,5 mL alınarak hazırlanmıştır.
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) reaksiyon solüsyonu	0,0272 g KH ₂ PO ₄ bir miktar saf suda çözündürülerek, KOH ile pH: 7,0'a ayarlanmıştır. Sonrasında çözeltiye 3,32 g KI eklenerek son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. H ₂ O ₂ ölçümünde blank olarak kullanılmak üzere 290, 580, 870 µM H ₂ O ₂ çözeltileri (100 mL'de sırasıyla 2,5, 5 ve 7,5 µl) hazırlanmış ve kullanılmıştır.
İndüksiyon ortamı	YEB ortamı içeriği ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 mL saf suda çözündürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8'e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Her birinden 1 mL olacak şekilde 100 mM asetosiringon, 100 mg/mL kanamisin, 25 mg/mL rifamisin, 100 mg/mL ampsilin ve 50 mg/mL streptomisin antibiyotikleri eklenerek son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanan solüsyon 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamına eklenmiştir.
Kloroform: İzamil alkol (24:1) solüsyonu	48 mL kloroform ve 2 mL izamil alkol alınarak 50 mL'lik stok solüsyon olacak şekilde hazırlanmıştır.
Luria-Bertani (LB) broth besi ortamı	10 g Triptofan, 10 g NaCl ve 5 g maya ekstraktı içeren ticari olarak temin edilmiş LB broth ortamından 25 g alınarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanarak steril edilmiştir.
LB agar besi ortamı	1 litre besi ortamı elde etmek için LB broth'tan 25 g ve agardan 12 g alınarak saf su ile 1 L'ye tamamlanmış ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Ardından petri kaplarına dökülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.
MDA reaksiyon solüsyonu	20 g TCA ve 0,5 g Tiyobarbütirik asit (TBA) 50 mL saf suda çözündürülmüş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
MMA ortamının	4,3 g MS tuzu, 20 g sükroz ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 mL saf suda çözündürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8'e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanarak steril edilmiştir. Soğuduktan sonra ortama 1 mL MS vitamin (1000x) (Sigma M3900) ve 9 mL saf sudan oluşan solüsyon 0,22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek eklenerek MMA ortamı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. (Devam)

MS besi ortamının	4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz, 8 g agar ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 mL saf suda çözödürölmüş ve 1N KOH çözöltisi kullanılarak ortamın pH=5,8'e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanarak steril edilmiştir. Soğuduktan sonra ortama 1 mL MS vitamin (1000x) ve 9 mL saf sudan oluşan solösyon 0,22 µm selöloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamının içörisine eklenerek MS besi ortamı hazırlanmıştır.
MSII besi ortamının	4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz, 8 g agar ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 mL saf suda çözödürölmüş ve 1N KOH çözöltisi kullanılarak ortamın pH=5,8'e ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edilmiştir. Soğuduktan sonra, 1 mg/mL BAP, 0,1 mg/mL NAA, 25 mg/mL higromisin ve 200 mg/mL sefotaksim olacak şekilde bileşöenler ve 1 mL MS vitamini (1000x) eklenerek son hacim 10 mL'ye tamamlanan solösyon 0,22 µm selöloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamına eklenmiş ve selektif antibiyotik içöeren MSII besi ortamı hazırlanmıştır.
MSIII besi ortamının	4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz, 8 g agar ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 mL saf suda çözödürölmüş ve 1N KOH çözöltisi kullanılarak ortamın pH=5,8'e ayarlanmış ve otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra, 25 mg/mL higromisin, 200 mg/mL sefotaksim ve 1 mg/mL IAA olacak şekilde bileşöenler ve 1 mL MS vitamini (1000x) eklenerek son hacim 10 mL'ye tamamlanan solösyon 0,22 µm selöloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamına eklenmiş ve kök büyümesini stimöüle edecek MSIII besi ortamı hazırlanmıştır.
YEB besi ortamının	5 g sığıır (beaf) ekstraktı, 1 g maya ekstraktı, 5 g pepton, 5 g süktroz ve 0,5 g MgCl ₂ alınarak 1 L saf su ile hazırlanmış ve otoklavlanarak steril edilmiştir.

3.2.2. GST gen ailesi üyelerinin araştırılması

Phaseolus vulgaris genomundaki GST gen ailesinin dizi bilgilerine PANTHER (Thomas et al. 2022) veri tabanından elde edilen PANTHER ID ile (PTHR11260) Phytozome veri tabanından (Goodstein et al. 2012) ulaşılmıştır. Aynı ID kullanılarak *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* verilerine de Phytozome veri tabanı aracılığıyla erişilmiştir. GST protein dizileri ile Phytozome veri tabanında bulunan Blastp ve Hidden Markov Model (HMM) taraması gerçekleştirilmiştir. GST üyelerinin kodlanan DNA (CDS), genomik, transkript ve promotör dizi verileri yine aynı veri tabanından elde edilmiştir. GST genleri, *P. vulgaris* kromozomlarında işaretlenmiş ve gerekli kodlamalar yapıldıktan sonra TBtools programı ile kromozom haritası çizilmiştir (Chen et al. 2020). Gen duplikasyonları TBtools programı (Chen et al. 2020) kullanılarak belirlenmiştir. Bunlara ilaveten gen ürünlerinin amino asit uzunluğu,

moleküler ağırlığı ve teorik izoelektrik noktalarına ExPASy server aracılığıyla ulaşılmıştır (Wilkins et al. 1999).

3.2.3. *GST* ailesinin genlerinin yapısı, gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerinin açıklığa kavuşturulması

GST genlerinin intron-ekzon bölgeleri hakkında bilgi sahibi olmak için Gene Structure Display Server v2.0 kullanılmıştır (Guo et al. 2007; Hu et al 2015). Genom dizi bilgisi ve kodlanan DNA (CDS) verileri *GST* genlerinin pozisyonlarının tahmininde kullanılmıştır. Ardından yine Phytozome v12.1 veri tabanı kullanılarak *GST* genlerinin kromozomlardaki konumları ve büyüklükleri tespit edilmiştir.

GST genlerinin ikili çiftler arası non-sinonim oranları (Ka), sinonim oranları (Ks) ve evrimsel zorlama (Ka/Ks) değerleri PAL2NAL (Suyama et al. 2006) PAML web arayüzünde (Yang 2007) hesaplanmıştır.

GST proteinlerinin ek korunmuş motif analizlerini yapmak için “Multiple EM for Motif Elicitation (MEME Suit)” aracı kullanılmıştır (Bailey et al. 2006). MEME Suit aracının kullanımı Aygören et al. (2023) tarafından verilen yönergelerle gerçekleştirilmiştir. Belirlenen motifler, InterProScan veritabanında varsayılan ayarlar kullanılarak taranmıştır (Quevillon et al. 2005).

3.2.4. Dizi hizalamaları, filogenetik analizler ve sinteni analizi

Filogenetik analizler, 1000-tekrar “bootstrap” değeri ile komşu katılım (NJ: Neighbor-joining) metodu (Saitou and Nei 1987) kullanılarak yapılmıştır. *GST* proteinlerinin dizileri ClustalW (in MEGA v7) kullanılarak hizalanmıştır (Thompson et al. 1997). MEGA v7 programı kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir (Kumar et al. 2016). Ardından bu filogenetik ağaç, İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) arayüzü kullanılarak şekillendirilmiş ve belirginleştirilmiştir (Letunic and Bork, 2011).

Sinteni analizleri, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* ve *Arabidopsis thaliana* *GST* genlerinin ortologları Phytozome v12.1 veri tabanından elde edilmiş ve kolineer genler belirlenip TBtools programı kullanarak sinteni haritası oluşturulmuştur.

3.2.5. Pv-GST proteinlerinin hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi ve genlere ait promotörlerin analizleri

Fasulye *GST* gen ailesi ürünlerinin hücre içi lokalizasyonu WoLFPSORT web arayüzü kullanılarak tahmin edilmiştir (Horton et al. 2007).

Pv-GST genlerinin 2000 bp yukarı akış bölgelerine Phytozome v12.1 veritabanı kullanılarak erişilmiş ve bu bölgelerde PlantCARE arayüzü (Lescot et al. 2002) kullanılarak incelemeler gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte literatürde geniş çaplı tarama yapılmış ve bulunan *cis*-acting elementlerin stresler ile olan ilişkisi taranmıştır. Ardından *cis*-acting elementlerin genlerin promotör bölgelerindeki konumları TBtools programı ile görselleştirilmiştir.

3.2.6. Proteinlerin tahmini üç boyutlu yapılarının analizleri

Proteinlerin dizi bilgisinin elde edilmesinin ardından bu dizi bilgileri “Protein Homology/analogY Recognition Engine v2.0 (Phyre²)” veri tabanına girilip “intense” mod aktif edilerek tarama yapılmıştır (Kelley et al. 2015) ve bu sayede proteinlerin 3 boyutlu tahmini görselleri elde edilmiştir.

3.2.7. Fasulye GST’lerin protein-protein etkileşimleri ve miRNA Analizi

Protein-protein etkileşimlerinin fiziksel, fonksiyonel ve deneysel (diğer çalışmalardan elde edilen sonuçların veri tabanına eklenmesi ile elde edilen veriler) etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla STRING (<https://string-db.org/>) veri tabanı kullanılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar veri tabanının kendi Cytoscape aktarım aracı kullanılarak Cytoscape programına aktarılmış ve görselleştirilmiştir.

Ayrıca tüm bunların yanı sıra taraması yapılan *Pv-GST* genleri ile ilişkili miRNA'lar "A Plant Small RNA Target Analysis Server (psRNATarget)" veri tabanı kullanılarak taranmıştır (Dai et al. 2018).

3.2.8. In-silico gen ifade analizleri

Bu analizi yapmak için Illumina RNAseq veri seti NCBI SRA (Sequence Read Archive) veri tabanından elde edilmiştir. Bu deney için SRR957668 (tuz stresi uygulanmış yaprak), SRR955869 (tuz uygulaması kontrol) (Hiz et al. 2014) ve SRR8284481 (kuraklık stresi uygulanmış yaprak), SRR8284480 (kuraklık uygulaması kontrol) (Gregorio Jorge et al. 2020) verileri kullanılmıştır. *P. vulgaris*'in yaprak dokusundaki *Pv-GST* genlerinin ifade profilleri belirlenmiştir. In silico ifade profilleri RPKM (Reads per Kilobase Million: Transcript per kilobase, transkript ifadesinin normalleştirilmiş hali) değerlerinin $\log_2$ dönüşümü oluşturularak hesaplanmış ve CIMMiner algoritması ile "heatmap" elde edilmiştir (Weinstein et al. 1997).

3.2.9. Bitkilerin büyütülmesi, tuz ve kuraklık stresi ve melatonin uygulamaları

Çalışmada kullanılan fasulye tohumları %70 EtOH ile 5 dakika yıkanmıştır. Ardından 3 defa ddH₂O ile yıkanmış ve alkolden arındırılmıştır. Takibinde %1'lik NaOCl çözeltisinde 15 dakika boyunca yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril edilen tohumlar, steril perlit içeren saksılara ekilmiş ve bu ortam 1/10 Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. Saksılar 24°C'de %60 bağıl nem ve 250 mmol m⁻²s⁻¹ foton akısına sahip bitki büyütme odasına alınmıştır. Bitkiler 3 yapraklı döneme gelene kadar büyütülmüştür. Aynı büyüklükte bitkiler seçilerek 1/10 Hoagland çözeltisi içeren hidrofonik ortama aktarılmıştır. Eşit büyüklükteki bitkilere stres uygulaması yapılmadan 24 saat önce 0 ve 200 µM konsantrasyonlarda melatonin (MEL), spreyleme yöntemi ile yapraklara uygulanmıştır. Aynı koşullar altında kontrol grubu hariç birtakım bitkiye 9 gün boyunca 150 mM NaCl ile tuz stresi ve diğer bitkilere 24 saat boyunca %20 PEG6000 ile kuraklık stresi uygulaması gerçekleştirilmiştir (Aygören et al. 2023). İki farklı fasulye çeşidi ile gerçekleştirilen deney dizaynı Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Deney dizaynı, fasulye çeşitleri ve uygulama konsantrasyonları

Uygulama	Fasulye Çeşidi	MEL (µM)	NaCl (mM)	PEG6000 (%)
Kontrol grubu	Elkoca-05	0	0	0
Kontrol grubu	Serra	0	0	0
Tuz	Elkoca-05	0	150	0
Tuz	Serra	0	150	0
MEL	Elkoca-05	200	0	0
MEL	Serra	200	0	0
Kuraklık	Elkoca-05	0	0	20
Kuraklık	Serra	0	0	20
Tuz + MEL	Elkoca-05	200	150	0
Tuz + MEL	Serra	200	150	0
Kuraklık + MEL	Elkoca-05	200	0	20
Kuraklık + MEL	Serra	200	0	20

3.2.10. Fasulye bitkisinden total RNA izolasyonu

Tuz ve kuraklık stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yaprak dokusundan TRIzol® reagent (Invitrogen Life Technologies) kullanılarak RNA izolasyonu aşağıdaki protokole göre üreticinin talimatına uygun olarak yapılmıştır.

1. Daha önce havanda öğütülen örnekler 50 – 100 mg doku gelecek şekilde tartılarak mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
2. Denatürasyon solüsyonundan mikrosantrifüj tüplerine 0,5 mL bırakılmıştır.
3. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. 0,5 mL ekstraksiyon solüsyonu eklenerek hızlı bir şekilde 15 sn elle çalkalanmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
5. 12000×g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
6. En üstteki faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
7. RNA'yı çöktürmek için 0,5 mL izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
8. 12000×g'de 4°C'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatant uzaklaştırılmış ve RNA peletine 1 mL %75 EtOH eklenerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır.
10. 7500×g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
11. EtOH uzaklaştırılmış ve 5 dakika hava kurutması yapılmıştır.
12. RNA peleti 100 µL DEPC muameleli su ile çözündürülmüştür.

13. Solüsyon 10 – 15 dakika 55°C’de bekletilmiştir.
14. Konsantrasyonları ölçülen RNA’lar kullanılıncaya kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2.11. RNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi ve agaroz jel elektroforezi

Total RNA konsantrasyonları Nanodrop’da ölçümleri yapılarak $A_{260/280}$ O.D. değerindeki veriler alınmıştır. %1,2’lik agaroz jel hazırlanıp 3 µl 10 mg/ml etidyum bromür (EtBr) eklenmiştir. 3 µl yükleme boyası, 6X loading dye, 1000 ng eşitinde RNA örneği 90 Voltta, 40 dk boyunca yürütülmüştür. Jel, Bio-Rad marka ChemiDoc MP UV-Transilluminator cihazında görüntülenmiştir.

3.2.12. cDNA sentezi

Ölçümleri yapılan toplam RNA’ların konsantrasyonları eşitlenmiş ve Thermo RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (#K1622) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda cDNA sentez işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. cDNA sentez karışımının hazırlanması aşağıdaki Çizelge 3.5’e göre yapılmıştır

Çizelge 3.5. cDNA sentez karışımı

Toplam RNA (0,5 µg/µl)	---
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl
5X Reaction Buffer	4 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
Oligo(dT) ₁₈ Primer 100 µM, 0.5 µg/µl (15 A_{260} u/ml)	1 µl
Nükleaz-âri su	----
Toplam	20 µl

2. PCR cihazında 42°C’de 60 dakika inkübasyon yapılmıştır.
3. Sentez işlemini sonlandırmak için 70°C’de 5 dakika bekletilmiştir.
4. -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Sentezlenen cDNA’lar fasulye β -actin (XM_068616709.1) ileri primeri (5'-TGAGCAAGGAGATTACAGCATTGG-3') ve geri primeri ile (5'-

3. MATERYAL ve YÖNTEM

CATACTCTGCCTTCGCAATCCAC-3') Çizelge 3.6'da verilen PCR bileşenleriyle birlikte ve Çizelge 3.7'de verilen PCR koşulları altında doğrulanmıştır.

Çizelge 3.6. PCR bileşenleri ve miktarları

PCR bileşeni	Miktarı
Kalıp DNA (10 ng/μL)	2 μl
Forward Primer (1 μM/μL)	0,5 μl
Reverse Primer (1 μM/μL)	0,5 μl
Buffer	2 μl
MgCl ₂	2 μl
Ultra Saf Su	12,2 μl
dNTP	0,5 μl
Taq Polimeraz	0,3 μl
TOPLAM	20 μl

Çizelge 3.7. PCR koşulları

Ön denatürasyon	95°C	5 dk
Denatürasyon *(d)	94°C	45 s
Bağlanma *(d)	52°C	30 s
Uzama *(d)	72°C	45 s
Son uzama	72°C	7 dk
Bekleme	4°C	∞

*(d): döngüye dahil olan basamaklar, toplam 35 döngü gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) analizleri

Pv-GST genlerine ait spesifik primerler IDT OligoAnalyzer aracı yardımıyla tasarlanarak qRT-PCR denemeleri gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR deneyleri gerçek zamanlı qPCR sistem olan RotorGene-Q (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazı ile ve ThermoFisher Fast SYBR® Green Master Mix (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. 95°C'de 10 dakika hold ve ardından 40 döngü olacak şekilde 95°C'de 15 saniye, 58-63°C'de 30 saniye ve ardından 65°C'den 94°C'ye 3 saniye/sıcaklık olacak şekilde melt curve analizi gerçekleştirilmiştir.

İyileştirici etkisinin olabileceği düşünülen melatonin (Arnao and Hernández-Ruiz 2009) ile birlikte stres koşullarına maruz bırakılan fasulye bitkilerinde *Pv-*

EF1BG-2, *Pv-GSTU-2*, *Pv-GSTU-3*, *Pv-GSTU-14* ve *Pv-GSTU-26* genlerinin ifade seviyesi incelenmiştir. İncelenen genlere ait primer bilgileri Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Fasulye GST genlerinden bazılarına ait primer bilgileri

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer
Pv-EF1BG-2	GTTCCACCTGTTGCTTCTTTC	TCCTCCTCTGCCTCTACTTT
Pv-GSTU-2	GAGAGGTTGGAAGAAGTGCTAA	CTGTCACTCTAATCCAGCTCAA
Pv-GSTU-3	TCAGGGTTGGTTCAAGGTTTAG	CAGTGTGACTCCCTCTTCTTATTC
Pv-GSTU-14	GATTTGTTTCTCCGACCCTACA	CAGACCTTGTCTTCGATCACT
Pv-GSTU-26	TGGAGGGCTTGAAGGAATTG	AGGTGGAGAAAGGGATGAGA

3.2.14. Verilerin Değerlendirilmesi

Kuraklık ve tuz stresi uygulanmış bitkilerde *GST* genlerine ait ifade profilleri fasulye β -actin geninin ifade profili ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001) metoduna göre değerlendirilmiş ve kontrol ile uygulamalar arasındaki fark One Way ANOVA (Dunnett testi) ile analiz edilmiştir (Dunnett 1955).

Normalizasyon işlemi, Ct değerleri ve housekeeping olarak kullanılan β -actin gen ifade verileri ile yapılmıştır. Bu verilere ait istatistiksel anlamlılık dereceleri, ortalamaları ve standart sapmaları Graphpad Prizm 9 programı ile hesaplanmış ve görselleştirilmiştir.

3.2.15. *PvDHAR1* geninin elde edilmesi ve klonlanması

PvDHAR1 geninin açık okuma çerçevesine (ORF; open reading frame) Phytozome v12 veri tabanı aracılığı ile erişim sağlanmıştır. Öncelikle cDNA’dan PCR ile alınacak bölgeyi içeren primerler (Pvul-DHAR1) ve ardından bölgeyi çoğaltması için kullanılacak vektöre özgü *Pml*I (5'-CAC▼GTG-3') ve *Spe*I (5'-A▼CTAGT-3') enzimlerinin kesim bölgelerini içeren primerler (Pvul-DHAR1-2) (Çizelge 3.9) tasarlanmıştır. Ardından bu primerler kullanılarak Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilen talimatlarla cDNA’dan çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR sonucunda elde edilen ürünler %1,2’lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan *PvDHAR1* genine ait vektöre özgün kesim bölgesini içeren primerler ve çalışmada kullanılan diğer primerler.

Primer Adı	Geri Primer	İleri Primer
Pvul-DHAR1	ATGTCCACTGCGAGAGTTCAAGT TTCG	TTAGCCTTCTACTTTAGGACGCCA
Pvul-DHAR1-2	*ACTAGTATGTCCACTGCGAGAG TTCAAGTT	*CACGTGTTAGCCTTCTACTTTAGGA CGCCA
pJET 1.2	AAGAACATCGATTTTCCATGGCA G	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
35S CaMV	TCATTGCGATAAAGGAAAGGCTA TC	CATCCCTTACGTCAGTGGAGATATC
GUS	ATCGCCGCTTTGGACATACCATC CGTA	AGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGA AC
NOS	TGCATGACGTTATTTATGAGATG GG	GATAATTTATCCTAGTTTGC GCGCT
M13pUCR	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	AGCGGATAACAATTCACACAGG
HPTII	ACAGCGTCTCCGACCTGATG	TTCTTTGCCCTCGGACGAGTG
NPTII	GAAGATGAACAAAGCCCTGAAA AGA	TTAAATGGAGTGTCTTCTTCCCAGT

*işaretli bölgeler spesifik enzim kesim bölgelerini içeren adaptörlerdir.

3.2.16. PCR ürünlerinin jelden izole edilmesi

Jel elektroforezi sonrası uygun bant büyüklüğüne (789 bp) sahip amplikon, Thermo Scientific GeneJET Jel ekstraksiyon kiti (#K0692) kullanılarak aşağıda verilen talimatlar doğrultusunda jelden izole edilmiştir.

- 1- DNA fragmentini içeren parça çok kısa bir süre olacak şekilde UV ışık altında görüntülendikten sonra temiz bir bisturi ya da jilet yardımıyla mümkün olan en küçük şekilde kesilip önceden tartılıp darası alınmış 1,5 mL santrifüj tüpüne alınmıştır.
- 2- 1:1 (hacim:ağırlık) oranı olacak şekilde (100 mg jel için 100 µL) Binding Buffer eklenmiştir.
- 3- Jel ve Binding Buffer karışımı 50-60°C arası 10 dakika inkübasyon yapılmış ve jelin tampon çözelti içerisinde erimesi/çözünmesi sağlanmıştır (Bu aşamada jelin tamamen çözünmesi kritik bir süreç olup süre arttırılabilir). Ardından hafifçe vortex ya da dip-tap işlemi yapılarak karışım iyice homojen hale getirilmiştir. [Bu aşamada karışımın rengi kontrol edilmiştir. Eğer karışım sarı renkli ise pH optimaldir ve işlemlere devam edilmiştir. Karışımın rengi turuncu veya mor renklere kaymış ise

- karışımın üzerine 10 µL 3M sodyum asetat çözeltisi (pH: 5,2) eklenmiş ve karışımın rengi sarıya dönüştürülmüştür]
- 4- Eğer elde edilmesi istenilen DNA fragmentinin boyutu:10Kbç'den büyük ise (örneğin pGFPGUS*Plus* plazmidi için) karışımın üzerine 1 hacim olacak şekilde distile su (dH₂O) eklenmiş (100mg jel kesiti için 100µL dH₂O eklenir) ve iyice karışması sağlanmıştır.
 - 5- En çok 800 µL karışım olacak şekilde, DNA fragmentini içeren karışım GeneJET saflaştırma kolonuna aktarılmış ve 12000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı dökülmüş ve kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
 - 6- GeneJET saflaştırma kolonuna 100 µL Binding Buffer eklenmiş ve yeniden 12000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir (bu aşamada santrifüj öncesi, tüplerin oda sıcaklığında 1 dakika kadar inkübe edilmesinin verimi arttırdığı düşünülmektedir). Toplama tüpüne akan sıvı dökülmüş ve kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
 - 7- Kolona, üreticinin talimatı doğrultusunda önceden etanol ile seyreltilmiş Wash Buffer'den 700 µL eklenmiş, bir miktar (20-30 saniye) oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dakika 12000×g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı dökülmüş ve kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
 - 8- GeneJET saflaştırma kolonu ve toplama tüpü boş olarak son bir kez daha kolonda alkol kalıntısı bırakmamak için 1 dakika 12000×g'de santrifüj edilmiştir.
 - 9- GeneJET saflaştırma kolonu boş ve steril 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Kolonun tam merkezine olacak şekilde 20-100 µL Elution Buffer eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
 - 10- Son olarak 12000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve ampikon toplama tüpüne alınmıştır.
 - 11- Jelden alınan ve saflaştırılan ampikon kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.17. *PvDHAR1* geninin pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarımı

Jelden elde edilen bölge pJET1.2/blunt klonlama vektörüne (Şekil 3.1) üreticinin talimatı doğrultusunda aşağıdaki yapışkan uçlu klonlama protokolü (PCR ürünlerinin sonuna gerekli adaptörler kit vasıtası ile eklenerek PCR ürünleri küt uçlu forma getirildikten sonra) ile aktarılmıştır.

1- Küt uçlama reaksiyonu buz üzerinde hazırlanmıştır:

- 2X Reaksiyon Tamponu (10 µL)
- PCR ürünü (1 µL) (50 ng PCR ürünü)
- DNA Blunting Enzim (1 µL)
- Karışım 18 µL'ye kadar ddH₂O ile tamamlanmıştır

2- Karışım 3-5 saniye kadar düşük güçte vortekslenmiştir.

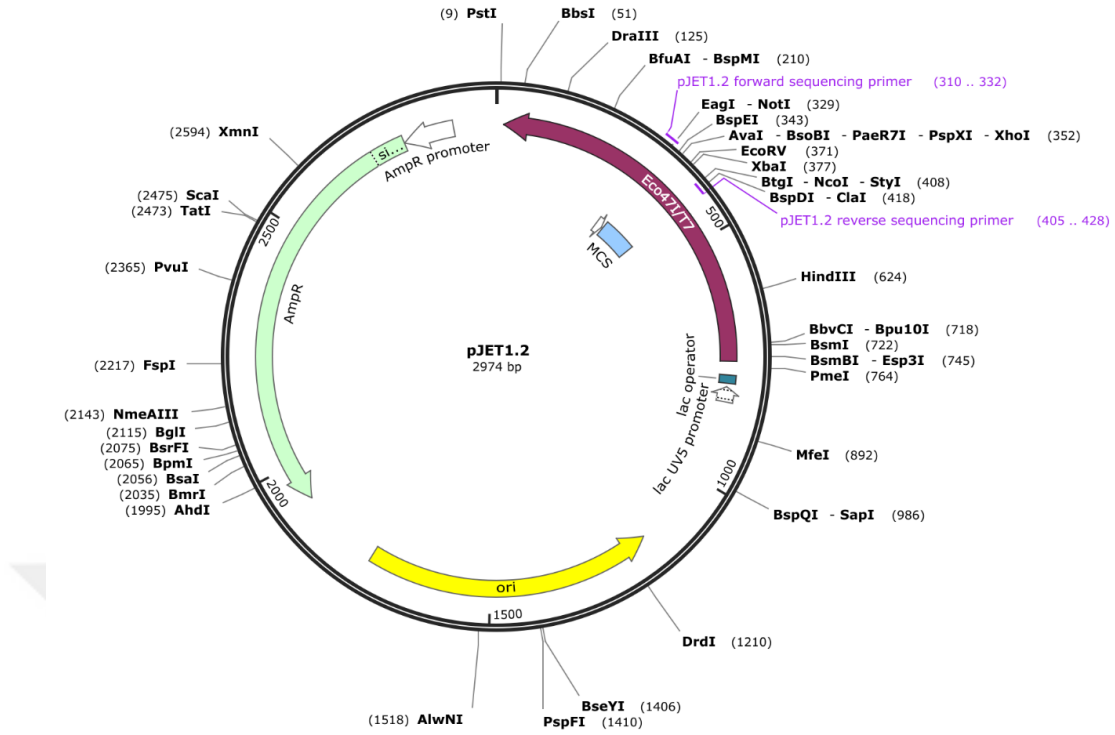
3- Karışım 70°C'de 5 dakika inkübe edilerek hemen ardından buza alınmıştır.

4- Buz üzerinde ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır (toplam reaksiyon hacmi 20 µL)

- pJET1.2/blunt klonlama vektörü (1 µL)
- T4 DNA Ligaz (1 µL)

5- Karışım 3-5 saniye kadar düşük güçte vorteklenmiştir.

6- Ligasyon karışımı oda sıcaklığında (22-24°C) 5 dakika inkübe edilmiş ve bir gece (12 saat) 4°C'de buz dolabında bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. pJET1.2 klonlama vektörünün haritası (Anonymous 2024e)

3.2.18. Vektörün doğrulanması

PvDHAR1 geninin vektöre aktarımının yapılmasının ardından Çizelge 3.9’da verilen primerler ile kombinasyon yapılarak PCR doğrulanması yapılmıştır: pJET-F+PvuI-DHAR1-R; pJET-R+ PvuI-DHAR1-F; PvuI-DHAR1-2-F+ PvuI-DHAR1-2-R. PCR sonrası ürünler %1,2’lik agaroz jelde yürütülmüş ve istenilen bant büyüklüğünde (~800 bp) bantlar elde edilmiştir.

3.2.19. *E. coli* JM101 suşları ile kompetent hücrelerin hazırlanması ve klonlama vektörünün *E. coli* JM101’e transformasyonu

Tek bir bakteri kolonisinden alınan bakteriler bir miktar LB sıvı besiyerinde bir gece 37°C’de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Bu kültürden 1 mL alınarak steril 40 mL LB sıvı besiyerine aktarılmıştır. Bu kültür de OD₆₀₀=0,6 olana kadar 37°C’de 200-250 rpm değerleri ile çalkalayıcı inkübatörde inkübe edilmiştir. İstenilen OD değerine ulaşan kültürler 15 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. Buzda bekletilen kültürler 4000 rpm 4°C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve çöken bakterilerin

üzerine 10 mL soğuk 20 mM CaCl_2 çözeltisi eklenmiş ve hafifçe çalkalanarak bakteriler çözülmüş ve ardından bu bakteriler 10 dakika buzda bekletilmiştir. Buzda bekletilen bakteriler 2500 rpm ve 4°C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve aynı işlemler bir kez daha tekrarlanmıştır. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından çöken bakterilerin üzerine 2 mL soğuk CaCl_2 çözeltisi eklenmiş, hücreler hafifçe çalkalanarak iyice çözdürülmüş ve bir gece buz dolabında inkübe edilmiştir. Buz dolabında bekletilen bakteriler inkübasyonun sonunda steril 1,5 mL’lik santrifüj tüplerine 100’er μL olacak şekilde eşit hacimli bölünmüştür. Bu bakteriler ya hızlı bir şekilde en çok bir hafta içerisinde kullanılmış ya da sıvı azot yardımıyla şok dondurma uygulanarak -80°C’de birkaç aya kadar saklanmıştır (en çok 3 aya kadar depolama yapılmıştır).

Jelden izole edilen ve ligasyon ile pJET1.2/blunt klonlama vektörüne eklenmiş geni taşıyan pJET1.2::*PvDHAR1* plazmidini içeren tüpten 5 μL (yaklaşık 0,1 μg plazmit) alınmış ve buz üzerinde çözdürülen ve bekletilen kompetent hücrelerin içerisine eklenmiştir. Tüplerin dip kısmına hafif ve dikkatli bir şekilde vurarak plazmitlerin hücre süspansiyonu içerisinde iyice karışması sağlanmıştır. Bu karışım 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Buzdan alınan tüpler 42°C’ye ısıtılmış su banyosunda 2 dakika bekletilmiş ve ardından hemen yine buza alınmıştır. Buz üzerinde 2 dakika bekletilen tüplere 200 μL LB sıvı besiyeri eklenmiş ve tüpler 250 rpm’de 37°C’de çalkalamalı inkübatörde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyonun ardından içerisinde 100 $\mu\text{g/mL}$ ampisilin olan LB Agar katı besiyerlerine 50 μL bakteri yayma ekim yöntemi ile ekilmiş ve 37°C’de inkübe edilmiştir.

3.2.20. *PvDHAR1* genini taşıyan kolonilerin belirlenmesi

Ampisilin içeren besiyerinde büyüyen kolonilerden 10 taneye kadar seçilmiş ve steril pipet ucu yardımıyla kolonilere dokunulmuştur. Bakteriler, içerisine 5 μL ddH₂O bulunan PCR tüplerine pipetaj yapılarak iyice karıştırılmıştır. Bu karışımdan alınan 2 μL örnek koloni PCR işlemlerinde kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Geri kalan bakterilerin üzerine bakterilerin yaşamasına devam etmesi için 100 μL kadar LB sıvı besiyeri eklenmiş ve 37°C’de bekletilmiştir. Koloni PCR işlemlerinde, Çizelge

3.9’da verilen PvuI-DHAR1-2-ilere + pJET1.2-geri ve PvuI-DHAR1-2-geri + pJET1.2-ilere şeklinde kombinasyon yaparak primerler kullanılmış ve Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7 verilen yönergeler doğrultusunda PCR yapılmıştır. PCR sonrası ürünler %1,2’lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Beklenen bant büyüklüğünde sonuç veren ürünler kaydedilmiş ve bu plazmidi taşıyan bakteriler ileri çalışmalar için sıvı besiyerinde büyütülmüş ve stoklanmıştır.

3.2.21. Pozitif sonuç veren kolonilerden plazmit izolasyonu

Vektörü taşıyan bakteriler 50 mL falconlara eklenen 25 mL besiyerine aseptik koşullarda inoküle edilmiş ve 14-16 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Plazmit izolasyonları EURX marka Plasmid Miniprep DNA Purification Kit’e (#E3500) birtakım modifikasyonlar yaparak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10’daki çözeltiler kullanılmıştır). İnkübasyon sonunda bakteriler 2 mL santrifüj tüplerine aktararak 12000×g’de 2 dakika santrifüjlenmiş ve çöktürülmüştür. Çöken bakterilerin üzerine 250 µL Çözelti R eklenmiş ve bakteriler yavaşça döndürme hareketi ve pipetajla iyice çözdürülmüş ve oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilmiştir. Ardından çözünen bakterilerinin üzerine 250 µL Çözelti L eklenmiş ve çok yavaş bir şekilde ve sarsmadan tüpler alt-üst edilmek suretiyle homojen hale gelmesi sağlanmıştır ve yeniden oda sıcaklığında 2 dakika kadar bekletilmiştir. Beklemenin ardından karışımın üzerine 350µL Çözelti N eklenmiş ve yine dikkatli bir şekilde yavaşça alt-üst edilmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 12000×g’de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kolon-santrifüj tüplere aktarılmış ve 12000×g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlara 600µL isopropil alkol eklenmiş ve 12000×g’de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpüne biriken sıvı uzaklaştırılmış ve toplama tüpü yeniden kolona yerleştirilmiştir. Kolonlara 600 µL %70 etil alkol eklenmiş ve yeniden 12000×g’de santrifüjlendikten sonra toplama tüpüne geçen sıvı yeniden uzaklaştırılmıştır. Toplama tüpü ve kolon boşken kalan alkolün iyice uzaklaşması için yeniden 12000×g’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Son olarak kolonlar yeni, boş ve steril tüplere yerleştirilmiş ve üzerine 50-100 µL oda sıcaklığında bekletilmiş ultra saf su eklenmiştir. Tüpler 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 12000×g’de 1 dakika santrifüj yapılarak plazmitler elde edilmiştir.

Çizelge 3.10. Plazmit izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Çözelti R	50mM Tris-HCl, pH: 8,0; 10mM EDTA; 100mg/mL Rnase A, (4°C)
Çözelti L	0,2M NaOH; %1 (w/v) SDS
Çözelti N	3M Potasyum asetat, pH: 5,5

3.2.22. İzolasyon ile elde edilen plazmitlerin doğrulanması

Bölüm 3.2.20’de anlatılan koloni PCR işlemlerinin aynısı, sadece kalıp DNA’nın izolasyon ürünü olması şeklinde modifiye edilmiş ve uygulanmıştır.

Klonlama vektörüne Pvul-DHAR1-2 ve pJET primerleri ile çift yönlü dizileme analizi yapılmıştır. Dizileme verileri BioEdit v7 programı ve MS Word (Office 365, Microsoft, ABD) kullanılarak düzenlenmiş, Phytozome ve NCBI veri tabanlarında taranmış ve doğruluğu tespit edilmiştir.

3.2.23. Restriksiyon endonükleaz uygulamaları, *PvDHAR1* PCR ürününün kesilmesi ve *pGFPGUSPlus* binary vektörden *GUSPlus* bölgesinin çıkarılması ve jelden izolasyonlar

İzole edilen vektörlerin konsantrasyonları ölçülerek uygun konsantrasyonlara ayarlanmış, restriksiyon karışımı aşağıda verilen ölçüler ile hazırlanmış ve *SpeI* (*BcuI*: 400U; #ER1251) ve *PmII* (*Eco72I*: 2000U; #ER0361) enzimleri ile ikili kesime tabi tutulmuştur (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, ABD):

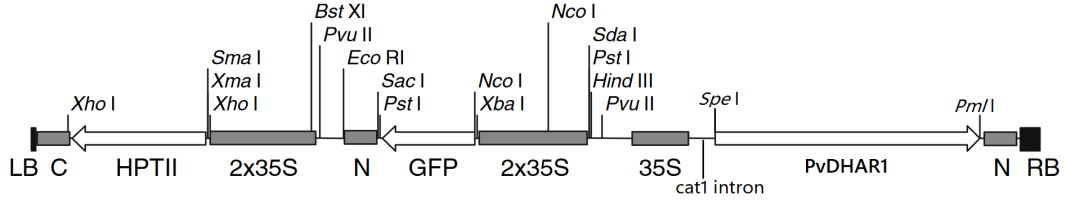
- 1000 ng vektör
- 4 µL Tango Buffer (her bir enzim için 2µL)
- 0,5 µL *BcuI* (*SpeI*)
- 0,5 µL *Eco72I* (*PmII*)
- 50 µL’ye kadar ultra saf su ile tamamlanmıştır

Restriksiyon karışımı oluşturulmuş ve 37°C’de 4 saat inkübasyona bırakılmış ve ardından *Eco72I* inaktivasyonu için 65°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir (*BcuI* için bir inaktivasyon bulunmamaktadır). Bu kesimler ile hem pJET1.2 klonlama vektöründen *PvDHAR1* geni ve pGFPGUS*Plus* vektöründen GUS*Plus* bölgesi çıkarılmıştır.

Kesim işleminin ardından örnekler %1,2’lik agaroz jelde yürütülmüş ve el UV lambası ile kısa süreliğine görüntülenip jelden kesilerek alınmıştır. Jelden alınan parçalara Bölüm 3.2.16’da anlatıldığı üzere izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.24. Jelden alınan parçaların ligasyonları, transformasyonları ve plazmitlerin çoğaltılması

Jelden iki parça olacak şekilde hem *PvDHAR1* geni hem de GUS*Plus* bölgesi çıkarılmış pGFPGUS*Plus* vektörü izole edilmiştir. Bu parçalar T4 DNA Ligaz enzimi (#EL0011) kullanılarak *PvDHAR1* genini içeren bir pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektörü oluşturulmuştur. Şekil 3.2’de verilen 35S:*PvDHAR1*:NOS kasetini içeren pGFPGUS*Plus*::*PvDHAR1* plazmidinin Bölüm 3.2.19’da anlatıldığı şekilde *E. coli* JM101’e transformasyonu gerçekleştirilmiş ve içerisinde 100 µg/mL kanamisin bulunan LB katı besiyerlerine ekilmiştir. Bu besiyerleri 37°C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında bu koloniler Bölüm 3.2.20’de anlatıldığı üzere 35S, *PvDHAR* primerleri ve NPTII primerleri kullanılarak doğrulanmıştır. Doğrulan kolonilerden Bölüm 3.2.21’de anlatıldığı üzere plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmitler kalıp DNA olarak kullanılmış ve *PvDHAR* primerleriyle PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri yeniden çift yönlü dizileme analizine tabi tutulmuştur. Plazmitlerin doğrulanması Bölüm 3.2.22’de anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiş ve pozitif sonuç veren koloniler ileri çalışmalarda da kullanılabilme adına hem -20°C’de hem de -80°C’de uzun süreli stoklara alınmıştır.



Şekil 3.2. Aşırı ifade için 35S:PvDHAR1:NOS kasetini içeren T-DNA bölgesinin şematik gösterimi.

3.2.25. Enzim kesim doğrulamaları

Enzim kesim doğrulamaları için seçilen enzimler *SacI*, *BamHI*, *XbaI*, *MluI*, *PmlI* ve *SpeI* enzimleridir. *SacI* enzimi *DHAR1* genini tek bir noktadan ve pGFPGUSPlus plazmidini de tek bir noktadan kesmektedir ve sonuç olarak büyüklükleri 3151 ve 10551 bp (baz çifti) olan iki bant beklenmektedir. Bu bilgi doğrultusunda *SacI* ile yapılan kesim sonrasında *PvDHAR1* geninin vektöre aktarıldığı şeklinde bir ek doğrulama yapılabilmektedir. *BamHI*+*XbaI* kesiminden elde edilmesi gereken bantlar 2338 ve 11364 bp uzunluğundadır. Aynı şekilde *SacI* gibi *BamHI* ve *XbaI* enzimleri de hem *PvDHAR1* genini bir noktadan hem de plazmitte tek bir noktadan kesmektedir. *MluI* enzimi ise *GUS* genini keserken *PvDHAR1* genini kesmemektedir, yani *MluI* enzimi ile kesim gerçekleşmeyen plazmidin *DHAR1* genini taşıdığı söylenebilir. Son olarak *PvDHAR1* geni *PmlI* ve *SpeI* enzimleri tarafından uç noktalardan kesilip yaklaşık 800 bp boyutunda *PvDHAR1* geni direkt olarak pGFPGUSPlus::*PvDHAR1* içerisinde kesilmiştir.

3.2.26. Kompetent *A. tumefaciens* AGL-1 suşlarının hazırlanışı ve pGFPGUSPlus::*PvDHAR1* vektörünün transformasyonu

Kompetent *A. tumefaciens* AGL-1 Bölüm 3.2.19’da anlatıldığı gibi 20 mM CaCl_2 kullanılarak hazırlanmıştır. Transformasyon işlemi ise yine Bölüm 3.2.19’da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş fakat bakterilerin 2 dakika bekletildiği sıcaklık 37°C olarak değiştirilmiştir. Isı-şok yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen transformasyon işleminden sonra bakteriler içerisinde 100 µg/mL kanamisin bulunan katı besiyerlere ekilmiştir. Petriler 28°C’de 72 saate kadar inkübe edilmiştir.

Bu işlemlerin ardından pGFPGUS*Plus::PvDHAR1* vektörünü taşıdığı düşünülen kolonilerle Çizelge 3.9’da verilen HPTII primeri kullanılarak koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Pozitif olarak belirlenen koloniler bitki transformasyon çalışmalarında kullanılmak üzere uygun ortamlarda büyütülmüştür.

3.2.27. *Agrobacterium*-aracılı gen aktarımı için tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkilerinin yetiştirilmesi

Erzurum Teknik Üniversitesinden sağlanan *Nicotiana benthamiana* tohumları steril koşullarda bitki büyütme topraklarına ekilmiş ve 25°C 16-8 saat gün/gece döngüsü uygulanmak koşuluyla büyütülmüştür. Büyüyen bitkilerin orta büyüklükte olan genç yaprakları toplanmıştır. Toplanan yapraklar %20 klorit bazlı ağartıcı (çamaşır suyu) içerisinde 10 dakika hafifçe çalkalandıktan sonra 3 defa steril saf su kullanılarak yıkanmış ve %70’lik EtOH içerisinde 10 dakika hafifçe çalkalandıktan sonra 3 defa steril saf su ile son yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapraklar bir miktar steril saf su içerisinde uygulama yapılana kadar bekletilmiştir.

3.2.28. Bitki transformasyonu için bakterilerin büyütülmesi

Stokta bulunan AGL-1 suşlarından 100 µL alınarak içerisinde 25 mL LB Broth ve antibiyotikler (100 µg/mL Ampisilin, 25 µg/mL Rifampisin, 50 µg/mL Streptomisin, 100 µg/mL Kanamisin) bulunan tüplere eklenmiş ve 1 gece inkübe edilmiştir. Ardından bu kültürden 1 mL alınarak içerisinde 5 mL YEB besiyeri (12 g/L Difco Nutrient Broth, 1 g/L yeast extract, 5 g/L sucrose, 0,5 g/L MgCl₂) (100 µg/mL Ampisilin, 25 µg/mL Rifampisin, 50 µg/mL Streptomisin, 100 µg/mL Kanamisin) olan tüplere aktarılmış ve bu kültür de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen kültürden 1 mL alınmış ve içerisinde 100 µM asetosiringon (Acetosyringone) içeren indüksiyon besiyeri (Induction Buffer: YEB besiyeri + 10 mM MES Hydrate + 100 µM acetosyringone) içerisine aktarılmış ve OD₆₀₀=0,8 olana kadar büyütülmüştür.

3.2.29. Bitki materyallerinin bakteriler ile muamele edilmesi

İndüksiyon tampon içerisinde büyütülen bakteriler 4000×g'de 20 dakika santrifüj edilmiş, besiyeri uzaklaştırılmış ve çöken bakterilerin üzerine 50 mL MMA tamponu eklenmiş ve bakteriler iyice çözdürülmüştür. Uygulama için, yapraklar steril doku makası ile yaklaşık 1 cm² olacak şekilde kesilmiştir. Kesilerek parçalara ayrılmış yaprak örnekleri bakteri süspansiyonu içerisine alınmış ve 1 saat steril kabin içerisinde (yaklaşık oda sıcaklığı) inkübe edilmiştir.

3.2.30. Doku parçalarının toplanması ve ilk inkübasyon

Bakteri süspansiyonu ile inkübasyonun ardından doku parçaları steril kurutma kağıtları üzerine alınmış ve bir miktar beklenerek süspansiyonun süzülmesi sağlanmıştır. Kuruyan parçaların bir miktarı, içerisinde Whatman Filter kağıt olan petrilere aktarılmıştır. Petrilerin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık olması sağlanmış ve 72 saat süresince 16-8 saat gün/gece döngüsü ile 25°C'de, bitkilerin savunma sistemlerini bir miktar inhibe etmek adına inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu 72 saatlik süreç ilk inkübasyon olarak adlandırılmıştır

3.2.31. Selektif bitki doku kültürü ortamlarının hazırlanması

MS Ortamı: 2,15 g/L MS Salt (vitamin içeren), 20 g/L sükroz, 10 mM MES hidrat, pH: 5,7-5,8, 8 g/L Agar içerecek şekilde aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

MS tuzu, sükroz ve MES hidrat tartılarak ve beher içerisine aktarılmıştır. Üzerine bir miktar saf su konulduktan sonra karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Homojen hale gelen karışıma pH ayarlaması yapılmış ve son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 1 litrelik kapaklı şişelere aktarılmış ve üzerine agar eklenmiştir. Ardından şişenin ağzı bir miktar boşluklu kalacak şekilde kapatılmış ve otoklavlanmıştır. Otoklavın ardından bir miktar soğutulan besiyerlerinin içerisine vitaminler eklenmiştir. Ardından petri kaplarına dikkatli bir şekilde dökülmüş ve donması sağlanmıştır.

MSII Ortamı: MS ortamının içerisine gerekli vitaminler eklendikten sonra, 1 mg/L 6-benzilaminopürin (BAP) ve 0,1 mg/L naftalin asetik asit (NAA), 25 mg/L higromisin ve 200 mg/L sefotaksim içerecek şekilde bu bileşenler eklenmiş ve homojen hale getirildikten sonra petri kaplarına dökülerek donması sağlanmıştır.

MSIII Ortamı: MS ortamının içerisine gerekli vitaminler eklendikten sonra, 1 mg/L indol-3-asetik asit (IAA) ve 0,1 mg/L naftalin asetik asit (NAA), 25 mg/L higromisin ve 200 mg/L sefotaksim içerecek şekilde bu bileşenler eklenmiş ve homojen hale getirildikten sonra petri kaplarına dökülerek donması sağlanmıştır.

3.2.32. Doku parçalarının seleksiyon ortamlarına aktarılması

İlk inkübasyonun ardından doku parçaları 500 mg/L sefotaksim içeren solüsyonda 30 dakika yıkanmıştır. Yıkamanın ardından 200 mg/L sefotaksim ve sırasıyla 20, 30 ve 50 mg/L konsantrasyonlarda higromisin içeren MSII ortamlarına aralarına yaklaşık eşit mesafeler bulunacak şekilde ve 15 doku parçası olacak biçimde, yaprakların üst kısımları yukarı dönük bir biçimde yerleştirilmiştir. Petri kaplarının etrafı iki defa parafilm kullanılarak kapatılmıştır. Ortamlar gözlem altına alınmış ve inkübasyona devam edilmiştir. Kültürler yaklaşık 14 günlük olduklarında kallus oluşumları gözlemlenmeye başlanmıştır.

3.2.33. Kallusların gelişmesi, bitkiciklerin oluşumu ve köklendirme ortamlarına aktarımlar

Ortamlarda gelişen kalluslardan bitkicik oluşumuna devam eden dokulardan seçim yapılmıştır. Dokular ortamlardan steril kurutma kağıtları üzerine alınmış ve alkol içerisinde bekletilerek steril hale getirilen pensler yardımıyla bitkicikler kalluslardan uzaklaştırılmıştır. Kallus parçaları yeniden MSII ortamlarına aktarılmıştır. Kallustan ayrılan bitkicikler kök gelişimini teşvik etmek için MSIII ortamlarına, sap kısımları ortama girecek ve yaprak kısımları ortama temas etmeyecek şekilde aktarılmıştır.

3.2.34. Köklenen bitkilerin aklimizasyonu ve T₀ bitkilerinden örnek ve tohum elde edilmesi

MSIII ortamında köklenmesi gerçekleşen bitkiler 121°C’de 15 dakika süre ile otoklavlandıktan sonra steril hale getirilen topraklara aktarılmıştır. Aktarma işlemi kontaminasyonu en aza indirmek için MS ortamları ve köklere bağlı olarak gelişen kalluslar da köklerden dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Sera etkisi oluşturmak ve bitkilerin toprağa alışma süreçlerini kolaylaştırmak adına topraklı ortamların üzeri naylon poşet yardımıyla kapatılmış ve hava almasını sağlayacak birkaç delik açılmıştır. Bu ortamlar 25 °C’de 16/8 saat aydınlık/karanlık döngüsü ile inkübasyona bırakılmıştır.

Köklenen ve toprağa aktarılan bitkiler büyütülmüş, büyüyen bitkilerden uygun büyüklüğe gelen ve bitkiyi öldürmeyecek büyüklükte olan yapraklar dikkatli bir şekilde doku makası yardımıyla kesilmiş ve hızlıca sıvı azot içerisinde aktararak dondurulmuştur. Geri kalan bitkiler tohum verinceye kadar büyütülmüş ve bu bitkilerden tohum elde edilmiştir. Son olarak, yaşamının son evrelerine gelen bu bitkiler transgenik olması dolayısıyla, herhangi olası gen kaçışını önlemek amacıyla otoklavlanarak öldürülmüştür.

3.2.35. Transgenik bitkilerin (T₁) tespit edilmesi ve doğrulanması

Bölüm 3.2.28’de aktarıldığı şekilde T₀ bitkilerinden alınan tohumlara yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Steril tohumlar Higromisin-B içeren MS besiyerlerine steril koşullarda ekilmiştir. Bu aşamanın amacı higromisine direnç geninin aktarıldığı tohumları ilk seleksiyona tabi tutmaktır. Bu tohumlar 24°C’de 16/8 saatlik fotoperiyot altında büyütülmüştür. Büyüyen bitkilerin yapraklarından Bölüm 3.2.10’da belirtildiği gibi RNA izolasyonu ve takibinde Bölüm 3.2.12’de belirtildiği gibi cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Sonrasında elde edilen cDNA örnekleri HPTII ve Pvul-DHAR1 primerleri ile PCR işlemine tabi tutulmuş ve agaroz jelde yürütülerek bant veren bitki örnekleri tespit edilmiştir. Ayrıca T₁ bitkilerinde *PvDHAR1* geninin kopya sayısının değişimi

belirlenmiştir. Bu belirleme için qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. T₁ ve yabancı tip bitkilerde *PvDHAR1* geninin kopya sayısındaki değişimler Nb- β -actin (JQ256516.1-ileri primer: 5'-TGGACTCTGGTGATGGTGTC-3' ve geri primer: 5'-CCTCCAATCCAAACACTGTA-3') ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Bölüm 3.2.13'te anlatıldığı şekilde değerlendirilmiştir.

3.2.36. T₁ ve yabancı tip bitkilere kuraklık stresi uygulaması ve stres toleranslarının belirlenmesi

Bitkiler uygun koşullar altında 8 yapraklı döneme kadar büyütülmüştür. Kuraklık stresi denemeleri için benzer büyüme gösteren bitkiler seçilmiş ve 1/10 Hoagland çözeltisi içeren hidrofonik ortama alınmıştır. Hidrofonik ortamdaki bitkilere son konsantrasyon %10 olacak şekilde PEG6000 eklenmiştir (Qi et al. 2023). Bitkiler 24°C'de 16/8 fotoperiyotta 24 saat süre ile kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Bu süre zarfında 0., 1., 3., 6., 12., ve 24. saatlerde bitkilerin yapraklarında nispi klorofil içeriği ve klorofil floresans parametreleri kaydedilmiştir. MDA ve H₂O₂ ölçümleri için her zaman noktasında yaprak örnekleri alınmıştır. Bunlarla beraber membran hasarını belirlemek adına 0. saat ve 24. saatlerde tüm bitkilerin yapraklarından disk örnekler alınmıştır. Tüm uygulamalardan önce T₁ ve yabancı tip bitkilerin kök ve gövde uzunlukları kaydedilmiştir.

3.2.37. Membran hasarlarının tespit edilmesi (% EC)

Yaprak örneklerinin orta kısmından 2 cm kadar alınarak saf su ile yıkanmış ve membran hasarı (% electrical conductivity: % EC) ölçümü yapmak için hazır hale getirilmiştir. Ardından yaprak örnekleri 15 mL saf su içeren tüplere alınmış ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda SevenGo Duo pH/Cond meter SG23 EC Metre (Ohio, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı kullanılarak EC1 değeri ölçülmüştür. Daha sonra bu yaprak örnekleri 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve örneklerin sıcaklıklarının 25°C'ye gelmesi beklendikten sonra yeniden ölçüm yapılarak EC2 değerleri elde edilmiştir.

3.2.38. Klorofil miktarlarının belirlenmesi (SPAD)

Yabanıl tip ve *PvDHAR1* aşırı ifade hatların klorofil miktarlarını belirlemek amacıyla 6 farklı zamanda bitkilerin yaprak dokularında ölçüm yapılmıştır. Her biri 3 tekrarlı olacak şekilde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için Konica Minolta SPAD-502Plus klorofilmetre cihazı kullanılmıştır. Yaprığın iki dalga boyu arasında absorbansının ölçülerek oransal klorofil miktarının hesaplandığı bu yöntemde bitkilerin aynı gelişim aşamalarında olan yapraklarından faydalanılmıştır (Shams 2019).

3.2.39. Yaprak klorofil floresans ölçümleri

Klorofil floresans analizi stres durumlarında fotosentetik süreçlerin tayini için yaygın olarak kullanılan güçlü bir yöntemdir (Kasapoğlu 2024). F_v/F_m oranı, bitkinin fotosentez performansını yansıtan bir göstergedir ve bu verilerdeki yükselme veya azalma fotoaktivasyon veya fotoinhibisyon varlığına işaret eder. Bu durum da net bir şekilde PSII (photosystem II / su-plastokinon oksidoredüktaz)'nin etkinliğinin göstergesidir (Guidi et al. 2019). İlk floresans (F_0), maksimum floresans (F_m), değişken floresans (F_v) ve PSII'nin maksimum kuantum etkinliği (F_v/F_m) parametreleri Handy PEA+ cihazı (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, İngiltere) ile ölçülmüştür. Tüm ölçümlerin 3 tekrarlı olduğu analizde T_1 bitkileri ve yabanıl tip bitki ile 6 farklı zamanda ölçümler yapılmıştır. Ölçüm için yapraklarda karanlık ortam oluşturan klipsler yerleştirilmiş ve 30 dakika bekletildikten sonra ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.40. Malondialdehit (MDA) ölçümleri

Lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit konsantrasyonu Shams (2019)'a göre belirlenmiş ve değerlendirilmiştir. Bitkilerden stres başlatılmadan önce, stres zamanında ve stresin sonlandırıldığı zamanlarda olmak üzere 6 farklı zamanda örnekler alınmıştır. Sıvı azot ile toz haline getirilen örneklerden 200 mg tartılmış ve 5 mL %5 TCA çözeltisi eklenerek TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) cihazı kullanılarak 7 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4°C'de 15 dk 5000×g'de santrifüj edilmiş ve süpernatanttan 2 mL alınarak 2 mL MDA

reaksiyon çözeltisiyle karıştırılmıştır. Bu karışım 95 °C’de 45 dk sıcak su banyosunda inkübe edilmiş ve ardından 10 dk süre ile buza yerleştirilerek soğuması sağlanmıştır. Soğuyan örneklerden 3 tekrar sayısı içerecek şekilde 450 nm, 532 nm ve 600 nm dalga boylarında absorbans değerleri elde edilmiştir. Lipit peroksidasyonu $6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Okla et al. 2023).

3.2.41. Hidrojen peroksit (H₂O₂) ölçümleri

Shams (2019) tarafından belirtilen metot uygulanarak H₂O₂ miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Sıvı azot ile toz haline getirilen bitki örneklerinden 200 mg alınmış ve üzerlerine 5 mL %5 TCA çözeltisi eklenmiştir. Karışımlar TissueLyser LT (Qiagen, Hilden, Germany) cihazı kullanılarak 7 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenizatlar 4°C’de 15 dk 12000 rpm’de santrifüj edilmiş ve süpernatant, steril mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 4°C’de 60 dk inkübe edilmiştir. Ardından 96-well plate kuyularına 50 µL süpernatant ve 150 µL H₂O₂ reaksiyon çözeltisi eklenmiştir. Kör (boş-blank) olarak 290 µM, 580 µM ve 870 µM konsantrasyonlarda 3 tekrarlı olacak şekilde 96-well plate kuyularına 200 µL H₂O₂ reaksiyon çözeltilerinden eklenmiştir. Örneklerin 390 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.42. Verilerin istatistiksel analizleri

Bu çalışmadaki örnekler 3 tekrarlı bir şekilde çalışılmıştır. Uygun olan yaprak örnekleri de biyokimyasal analizler için 3 tekrarlı olacak şekilde kullanılmıştır. qRT-PCR işlemleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve One-Way ANOVA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen tüm veriler GraphPad Prism v9 (Boston, ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. *P. vulgaris* genomundaki *GST* genlerinin araştırılması

P. vulgaris'te *GST* genlerinin varlığını ve potansiyel rollerini anlamak, bu genleri tanımlamak ve karakterize etmek için genom üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Phytozome veri tabanında *P. vulgaris* genomu üzerinde anahtar kelimesi araması ile *Pv-GST* ve *A. thaliana* ve *G. max* *GST* genlerine ulaşılmıştır. Bu tarama sonrasında 55 aday *GST* gen tespit edilmiştir. Bu 55 aday genin kromozomal konumları, amino asit sayıları, moleküler ağırlıkları (kilodalton: kDa) ve teorik izoelektrik noktaları (pI) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

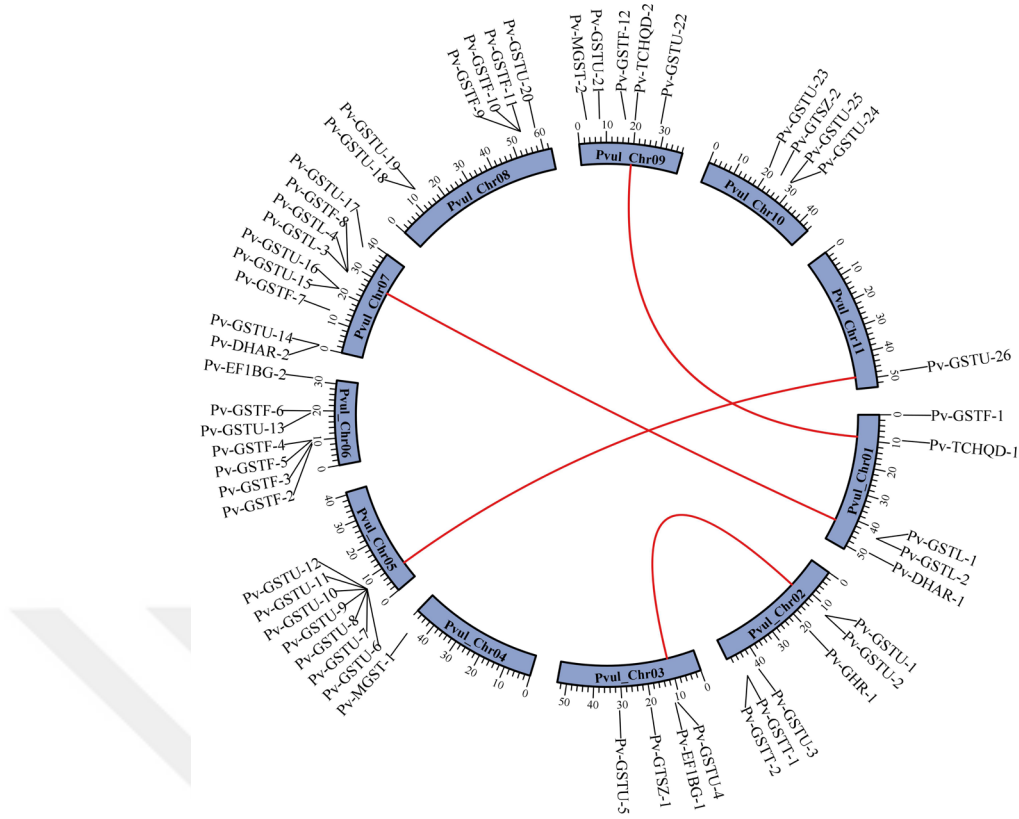
Çizelge 4.1. 55 aday *GST* geninin bazı bilgileri

Gen Adı	Phytozome ID	Kromozomal konum	aa	MA (kDa)	pI
Pv-DHAR-1	Phvul.001G230400	Chr01:48452325..48457854 (-)	262	29,30	8,33
Pv-DHAR-2	Phvul.007G009800	Chr07:704149..707407 (+)	213	23,37	5,89
Pv-EF1BG-1	Phvul.003G075200	Chr03:11870757..11873729 (-)	420	47,83	6,01
Pv-EF1BG-2	Phvul.006G220100	Chr06:31117300..31119830 (-)	419	47,99	5,84
Pv-GHR-1	Phvul.002G098300	Chr02:19933154..19939967 (-)	334	38,03	6,33
Pv-GSTF-1	Phvul.001G002000	Chr01:138928..140068 (+)	219	24,54	8,36
Pv-GSTF-2	Phvul.006G020800	Chr06:8626154..8627742 (-)	215	24,96	5,59
Pv-GSTF-3	Phvul.006G022600	Chr06:9176065..9177788 (-)	215	25,01	5,75
Pv-GSTF-4	Phvul.006G023400	Chr06:10026279..10027294 (-)	225	26,27	5,26
Pv-GSTF-5	Phvul.006G023500	Chr06:10011388..10012803 (-)	215	24,95	5,75
Pv-GSTF-6	Phvul.006G087500	Chr06:19947357..19949404 (-)	214	24,34	6,66
Pv-GSTF-7	Phvul.007G107200	Chr07:13181195..13182905 (-)	218	24,76	5,98
Pv-GSTF-8	Phvul.007G164900	Chr07:27778543..27780161 (-)	219	24,79	5,52
Pv-GSTF-9	Phvul.008G195400	Chr08:53942173..53943568 (-)	215	24,75	5,74
Pv-GSTF-10	Phvul.008G195500	Chr08:53966666..53968018 (-)	215	24,81	5,83
Pv-GSTF-11	Phvul.008G195600	Chr08:53977691..53978888 (-)	215	24,73	5,83
Pv-GSTF-12	Phvul.009G105900	Chr09:16444483..16447481 (+)	216	25,36	6,1
Pv-GSTL-1	Phvul.001G173300	Chr01:43013695..43015686 (+)	235	26,79	5,35
Pv-GSTL-2	Phvul.001G173500	Chr01:43023123..43025799 (+)	237	27,23	5,03
Pv-GSTL-3	Phvul.007G161900	Chr07:27348469..27351064 (+)	237	27,11	5,45
Pv-GSTL-4	Phvul.007G162000	Chr07:27356355..27359180 (+)	237	27,33	5,32

Çizelge 4.1. (Devam)

Pv-GSTT-1	Phvul.002G288500	Chr02:45748680..45752980 (-)	253	28,55	8,35
Pv-GSTT-2	Phvul.002G288600	Chr02:45753555..45756656 (-)	250	28,33	9,61
Pv-GSTU-1	Phvul.002G080100	Chr02:12494974..12495969 (+)	232	26,16	5,82
Pv-GSTU-2	Phvul.002G080200	Chr02:12507747..12509167 (+)	227	25,80	5,28
Pv-GSTU-3	Phvul.002G241400	Chr02:41360778..41362757 (+)	228	26,55	6,25
Pv-GSTU-4	Phvul.003G071300	Chr03:10972710..10973987 (-)	224	25,46	8,38
Pv-GSTU-5	Phvul.003G123300	Chr03:30853748..30856141 (-)	218	25,18	5,81
Pv-GSTU-6	Phvul.005G053100	Chr05:6948526..6952266 (+)	218	25,09	5,88
Pv-GSTU-7	Phvul.005G053200	Chr05:6954392..6955532 (+)	217	25,51	5,71
Pv-GSTU-8	Phvul.005G053300	Chr05:6956817..6957865 (-)	220	25,63	5,64
Pv-GSTU-9	Phvul.005G053900	Chr05:7031688..7032753 (-)	219	25,83	5,91
Pv-GSTU-10	Phvul.005G054000	Chr05:7049900..7051313 (+)	222	25,82	5,82
Pv-GSTU-11	Phvul.005G054100	Chr05:7061633..7062892 (+)	222	25,79	6,25
Pv-GSTU-12	Phvul.005G054200	Chr05:7076257..7077524 (-)	222	25,80	6,33
Pv-GSTU-13	Phvul.006G079600	Chr06:19161658..19162870 (+)	219	25,31	5,92
Pv-GSTU-14	Phvul.007G013200	Chr07:930387..931521 (-)	218	25,214	6,71
Pv-GSTU-15	Phvul.007G134700	Chr07:21092438..21093465 (-)	222	25,99	5,83
Pv-GSTU-16	Phvul.007G134800	Chr07:21105664..21110685 (-)	207	24,22	6,07
Pv-GSTU-17	Phvul.007G250000	Chr07:37255758..37257601 (+)	225	25,62	5,33
Pv-GSTU-18	Phvul.008G113600	Chr08:13221659..13223083 (-)	225	25,56	5,29
Pv-GSTU-19	Phvul.008G113700	Chr08:13237819..13238946 (-)	225	25,71	5,55
Pv-GSTU-20	Phvul.008G241100	Chr08:58979265..58980499 (+)	221	25,33	5,56
Pv-GSTU-21	Phvul.009G034600	Chr09:7645049..7645761 (-)	175	20,02	5,75
Pv-GSTU-22	Phvul.009G187800	Chr09:28484109..28485936 (+)	231	26,41	5,93
Pv-GSTU-23	Phvul.010G074600	Chr10:19605209..19606645 (+)	224	25,63	6,33
Pv-GSTU-24	Phvul.010G074700	Chr10:28553623..28554138 (+)	132	15,02	7,34
Pv-GSTU-25	Phvul.010G075400	Chr10:28323708..28325462 (+)	220	25,07	5,7
Pv-GSTU-26	Phvul.011G178400	Chr11:48957780..48959271 (-)	219	25,41	5,35
Pv-GTSZ-1	Phvul.003G089700	Chr03:20175145..20186144 (-)	224	25,44	7,1
Pv-GTSZ-2	Phvul.010G084100	Chr10:24294955..24300339 (-)	231	26,32	6,16
Pv-MGST-1	Phvul.004G150900	Chr04:45286729..45292805 (-)	313	35,06	9,06
Pv-MGST-2	Phvul.009G009900	Chr09:3261238..3263903 (+)	305	34,41	9,06
Pv-TCHQD-1	Phvul.001G068100	Chr01:8703572..8705987 (+)	267	31,79	9,23
Pv-TCHQD-2	Phvul.009G130200	Chr09:19713007..19716458 (-)	267	31,48	9,34

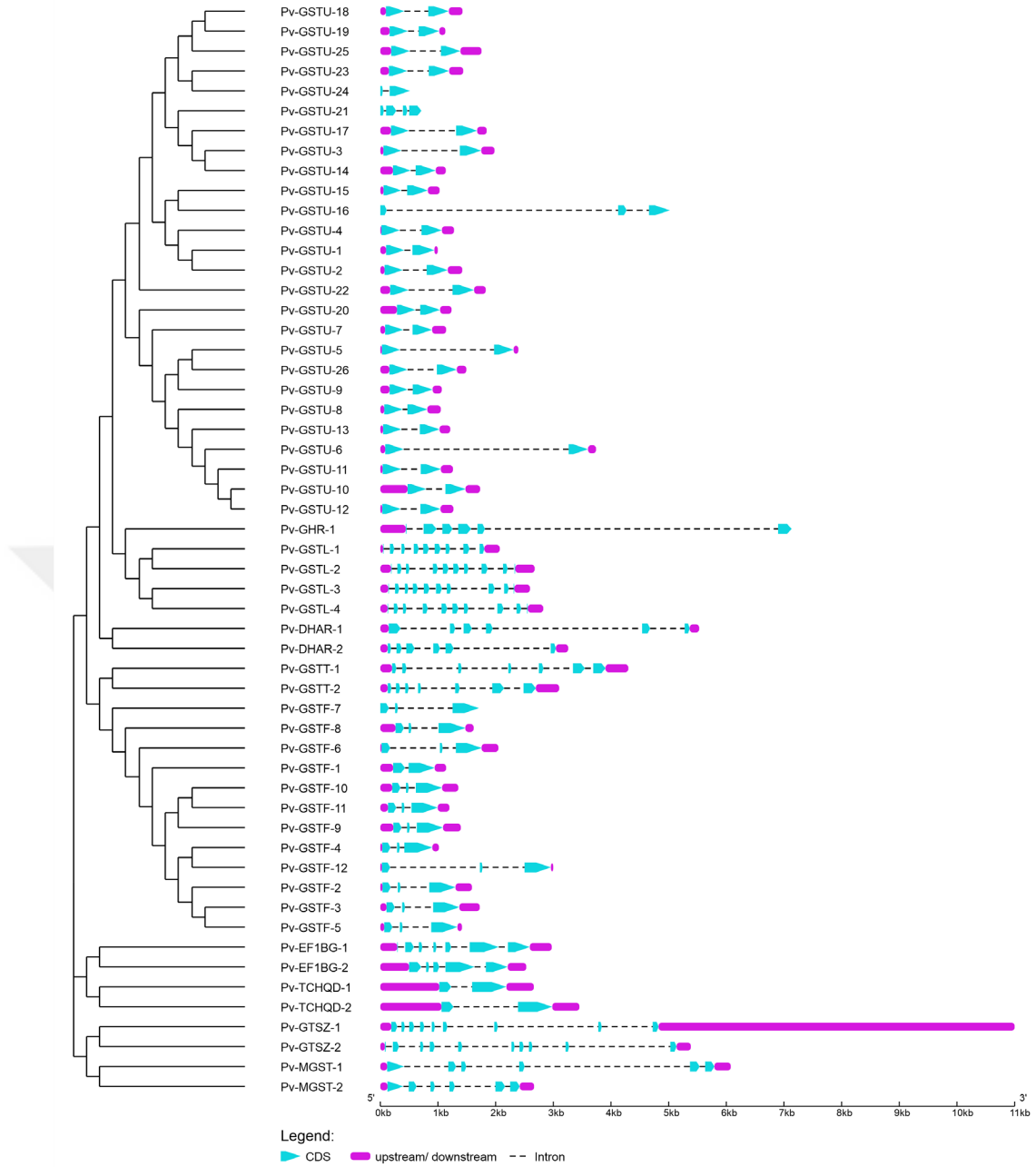
GST genlerinin fasulye kromozomlarındaki dağılımı ve bazı genler arasındaki segmental duplikasyon olayları Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Kromozomlar ve *Pv-GST* genlerinin temsili konumlarını gösteren şekil (kromozomlar Pvul-Chr olarak evrensel isimlendirme yapılmıştır ve kırmızı çizgiler segmental duplike genleri göstermektedir).

4.1.2. *GST* ailesinin gen yapısı, gen duplikasyonları ve korunmuş motiflerinin belirlenmesi

GST genlerinin yapısı hakkında bilgi edinmek için GSDS web arayüzü kullanılmıştır. Aday genlerin kodlanan DNA bölgeleri (ekzon), intron ve aşağı/yukarı akış bölgeleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. *Pv-GST* genlerinin ekzon ve intronlarının gösterimi

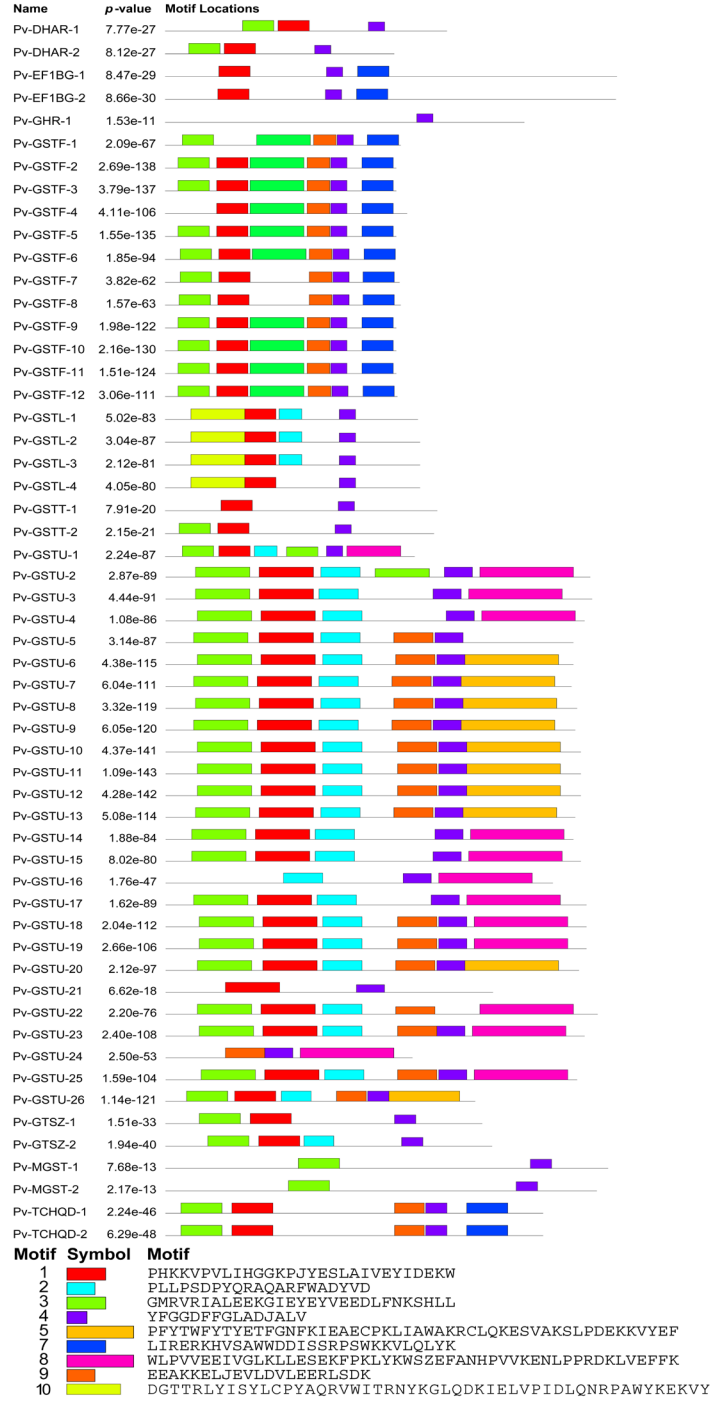
Gen duplikasyonları analizleri sonucunda *Pv-GSTL-1/Pv-GSTL3*, *Pv-GSTU-1/Pv-GSTU-4*, *Pv-GSTU-6/ Pv-GSTU26*, *Pv-TCHQD-1/ Pv-TCHQD-2* segmental duplike genler olarak belirlenmiştir. Bu genler arasındaki Ka, Ks değerleri ve Ka/Ks oranı (dN/dS) ve bu genlerin ayrışma zamanı Çizelge 4.2’de verilmiştir. Ayrışma zamanının hesaplanmasında kullanılan formül ise $T=Ks/2\lambda$ ($\lambda = 6,56 \times 10^{-9}$) şeklindedir ve Çizelge 4.2’de M.Y.Ö. (milyon yıl önce) olarak gösterilmiştir (Büyük et al. 2016). Ka/Ks oranı 1’den büyük ise bu, genin evrimi süresince pozitif seleksiyon olduğunu, 1’den küçük olması arındırıcı seleksiyon olduğunu ve 1’e eşit olması durumu ise doğal seleksiyonu

gösterir (Juretic et al. 2005; Muslu et al. 2024). Çalışmadan elde edilen veriler, *P. vulgaris*'teki segmental duplike genlerin Ka/Ks oranı 1'den küçük olmasından dolayı, *P. vulgaris* bitkisinin evrimi boyunca yüksek oranda arındırıcı seleksiyonun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. Fasulye genomunda bulunan duplike *GST* gen çiftlerini gösteren ve bu genlerin evrimsel süreçleri hakkında bilgi veren çizelge.

Gen_1	Gen_2	Ka	Ks	Ka/Ks	Seleksiyon baskısı	M.Y.Ö.
<i>Pv-GSTL-1</i>	<i>Pv-GSTL-3</i>	0,183	0,661	0,250	Arındırıcı	50,404
<i>Pv-GSTU-1</i>	<i>Pv-GSTU-4</i>	0,366	1,458	0,180	Arındırıcı	111,136
<i>Pv-GSTU-6</i>	<i>Pv-GSTU-26</i>	0,296	1,202	0,199	Arındırıcı	91,610
<i>Pv-TCHQD-1</i>	<i>Pv-TCHQD-2</i>	0,099	0,533	0,162	Arındırıcı	45,587

GST'lerin içerdiği korunmuş motifleri belirlemek amacıyla MEME Suite aracı kullanılmıştır. Elde edilen 10 farklı motif Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



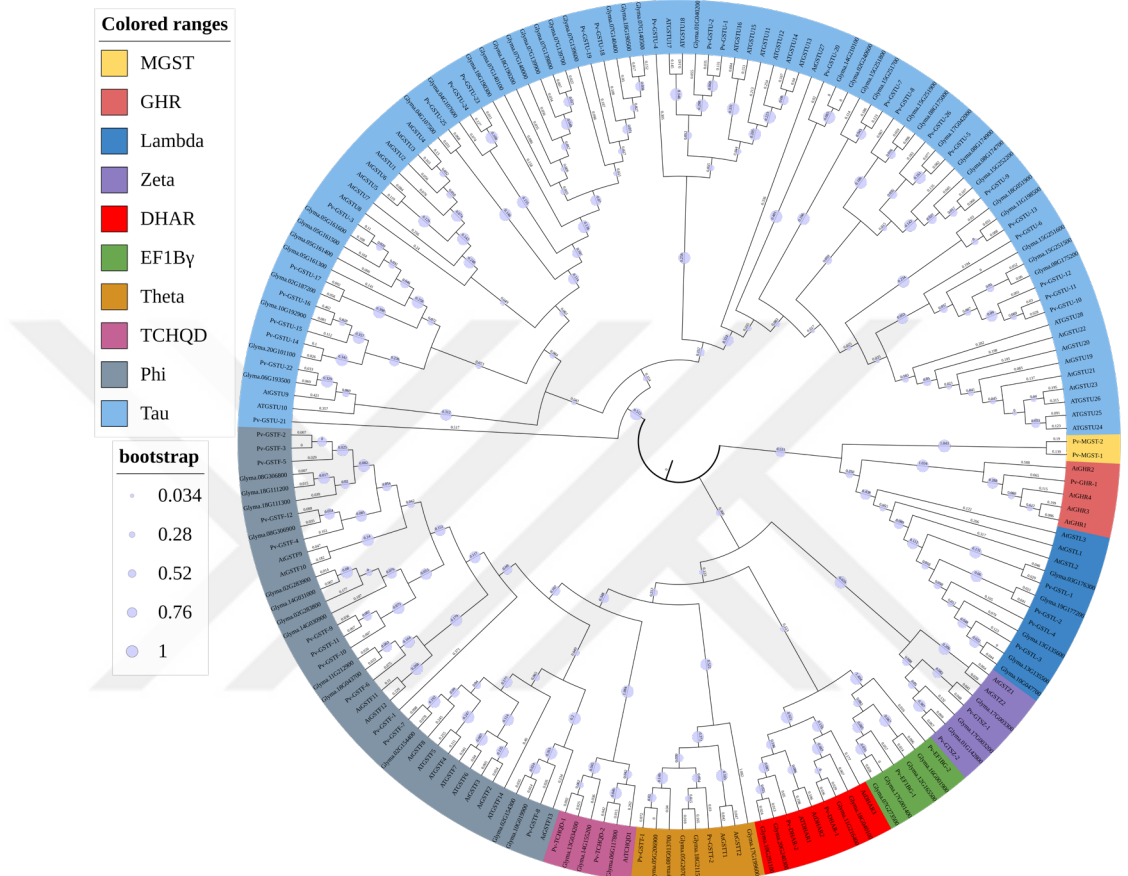
Şekil 4.3. Pv-GST proteinlerinde bulunan olası motiflerin şematik gösterimi, 10 farklı motif kendilerine ait renklerle gösterilmiş ve motif uzunlukları da şematize edilmiştir.

4.1.3. Filogenetik analizler ve sinteni analizi

Pv-GST proteinleri (EK-1) arasındaki bağlantıları göstermek için *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* bitkilerinin GST dizileri kullanılarak bir filogenetik ağaç

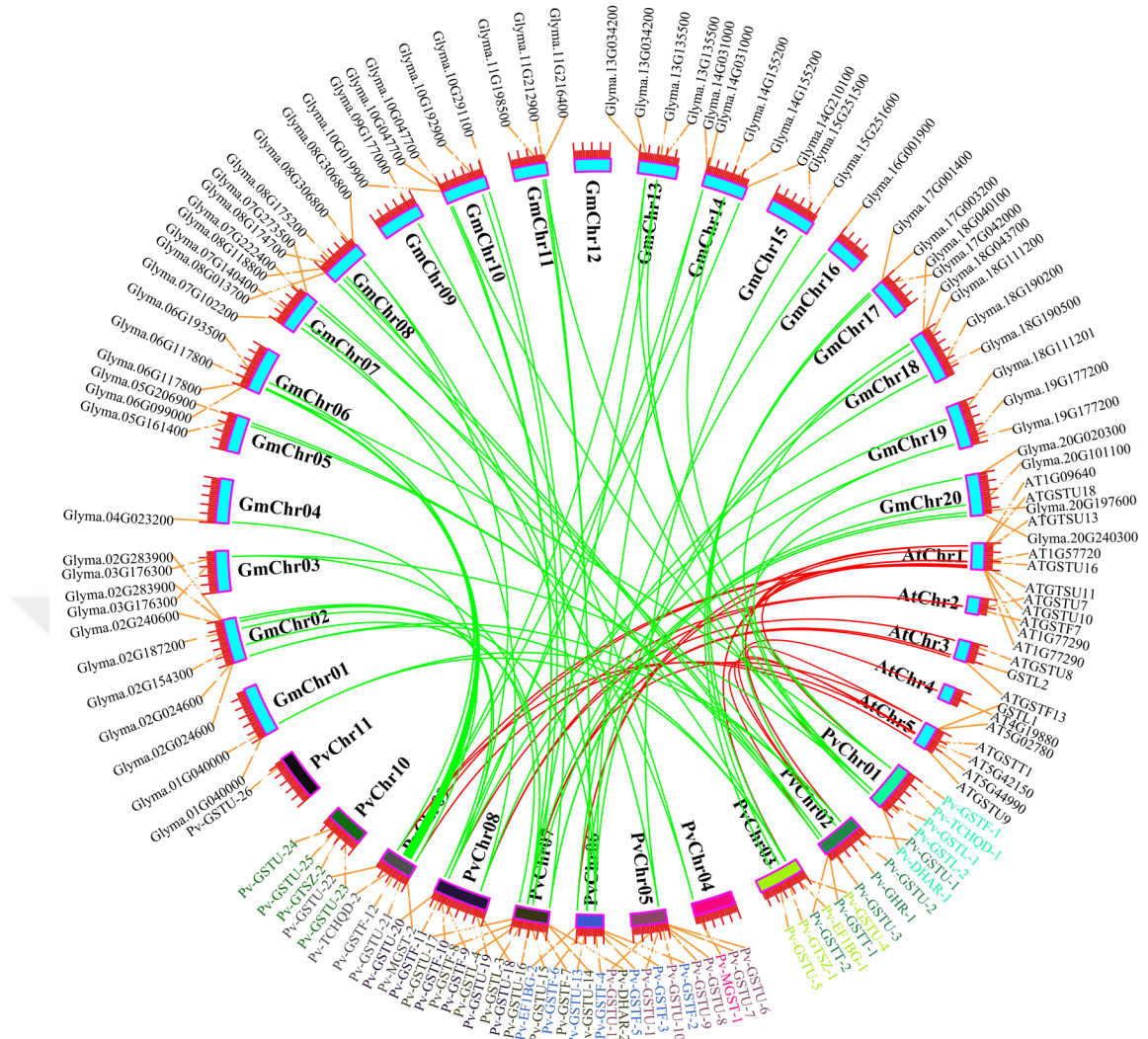
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

oluşturulmuştur. MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) programı ve Neighbor-Joining yöntemiyle, GST proteinlerinin amino asit dizileri kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 4.4). MEGA programı ile oluşturulan filogenetik ağaç iTOL web arayüzünde şekillendirilmiştir.



Şekil 4.4. *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* bitkilerinin GST protein dizileri ile çizilen filogenetik ağaç. Renkler GST'lerin alt sınıflarını (isimler görselde verilmiştir), daireler bootstrap değerlerini göstermektedir.

Phytozome veri tabanı kullanılarak elde edilen *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* dizi bilgileri ile yapılan analizler sonrasında TBtools programı yardımıyla sinteni haritası elde edilmiş ve Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* GST genlerinin karşılaştırmalı haritalaması (Yeşil çizgiler *G. max*-*P. vulgaris* genomları arasındaki ilişkiyi, kırmızı çizgiler *A. thaliana*-*P. vulgaris* genomları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bazı gen isimleri kromozom renklerine göre renklendirilmiştir).

4.1.4. GST'lerin hücre içi lokasyonlarının belirlenmesi ve promotör analizleri

GST proteinlerinin lokasyonları WoLFPSORT arayüzü yardımıyla belirlenmiştir. Çizelge 4.3'te *GST* gen ürünlerinin hücre içi lokasyonları verilmiştir. Fasulye GST proteinlerinin genel olarak sitoplazmada kümелendiği tahmin edilmiştir. Buna ek olarak GST'lerin mitokondri ve kloroplastlarda lokalize olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun bir nedeni GST'lerin ROT'lar ile mücadele görev almasıdır ki bu sebeple yüksek oranda ROT üretilen hücresel kompartmanlarda lokalize olduğu belirlenmiştir.

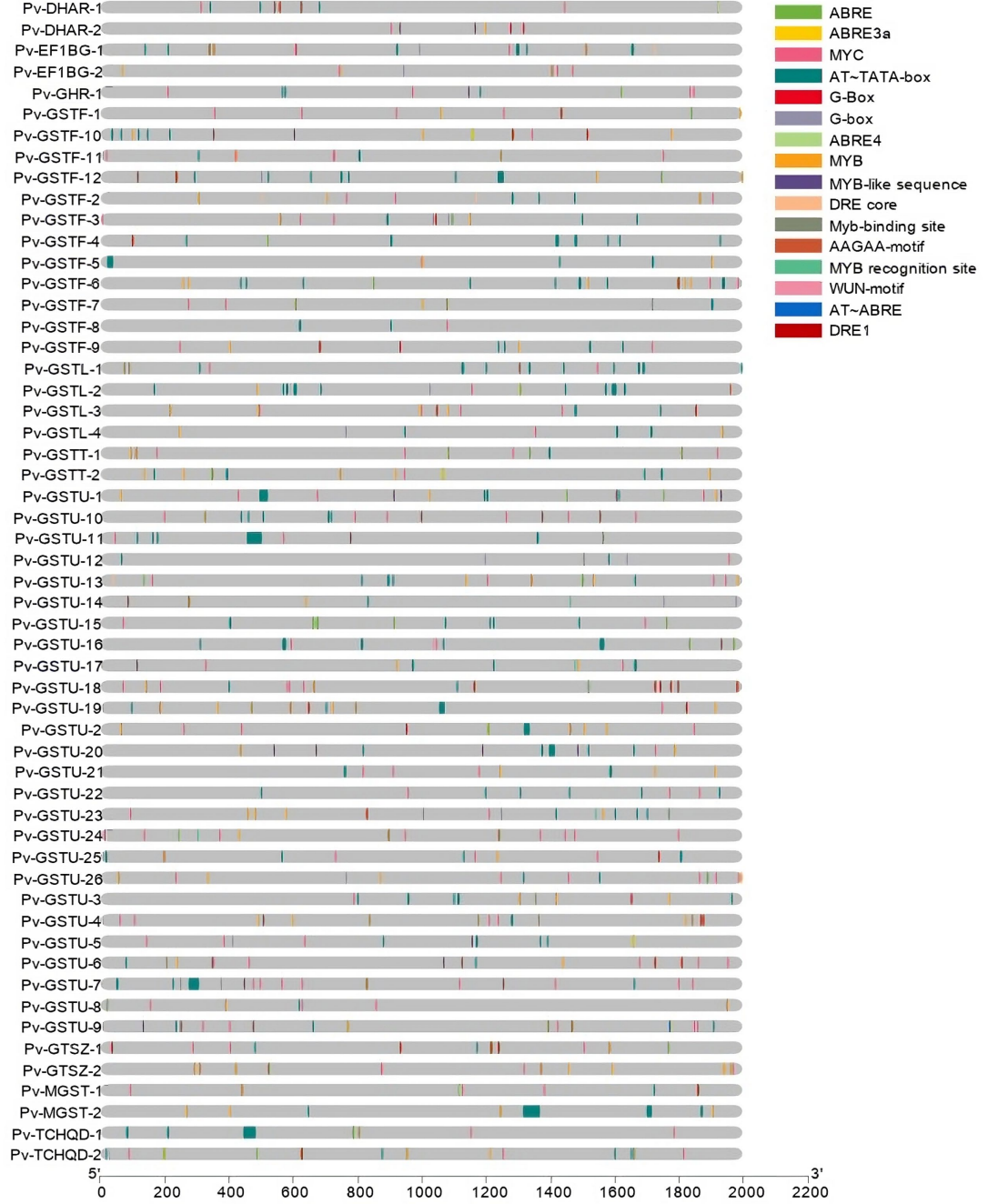
Çizelge 4.3. GST'lerin hücre içi yerleşimlerini gösteren çizelge

Gen Adı	Hücre içi lokasyon
Pv-DHAR-1	chlo: 13, E.R._vacu: 1
Pv-DHAR-2	cyto: 10.5, cyto_E.R.: 6, chlo: 2, extr: 1
Pv-EF1BG-1	cyto: 13, chlo: 1
Pv-EF1BG-2	cyto: 13, chlo: 1
Pv-GHR-1	cyto: 6, nucl: 3, chlo: 2, plas: 1, vacu: 1, cysk: 1
Pv-GSTF-1	chlo: 10, mito: 2, extr: 1, E.R.: 1
Pv-GSTF-2	mito: 7, cyto: 4, chlo: 1, plas: 1, E.R.: 1
Pv-GSTF-3	mito: 6, cyto: 5, chlo: 1, plas: 1, E.R.: 1
Pv-GSTF-4	cyto: 8.5, cyto_E.R.: 5.5, chlo: 2, E.R.: 1.5, extr: 1, cysk: 1
Pv-GSTF-5	cyto: 4, mito: 4, nucl: 3, chlo: 2, plas: 1
Pv-GSTF-6	cyto: 12, nucl: 1, plas: 1
Pv-GSTF-7	chlo: 9, mito: 3, nucl: 1, cyto: 1
Pv-GSTF-8	cyto: 10, chlo: 4
Pv-GSTF-9	cyto: 11, chlo: 2, mito: 1
Pv-GSTF-10	mito: 5, cyto: 4, chlo: 3, nucl: 2
Pv-GSTF-11	cyto: 10, chlo: 3, mito: 1
Pv-GSTF-12	cyto: 9.5, cyto_E.R.: 6, E.R.: 1.5, chlo: 1, nucl: 1, cysk: 1
Pv-GSTL-1	cyto: 5, chlo: 3, nucl: 3, plas: 3
Pv-GSTL-2	cyto: 8, cyto_nucl: 5.5, chlo: 3, plas: 1, cysk: 1
Pv-GSTL-3	cyto_nucl: 6, cyto: 5, nucl: 3, chlo: 2, mito: 2, plas: 2
Pv-GSTL-4	cyto: 4, chlo: 3, mito: 3, nucl: 2, plas: 1, extr: 1
Pv-GSTT-1	pero: 9, nucl: 2, cyto: 2, golg: 1
Pv-GSTT-2	pero: 8, cyto: 3.5, cyto_nucl: 3, nucl: 1.5, golg: 1
Pv-GSTU-1	cyto: 6.5, cyto_E.R.: 4, chlo: 3, mito: 1, plas: 1, extr: 1, vacu: 1
Pv-GSTU-2	chlo: 5, cyto: 5, mito: 3, plas: 1
Pv-GSTU-3	cyto: 7.5, cyto_E.R.: 5, nucl: 3, E.R.: 1.5, chlo: 1, cysk: 1
Pv-GSTU-4	nucl: 6, chlo: 5, cyto: 2, mito: 1
Pv-GSTU-5	cyto: 14
Pv-GSTU-6	cyto: 10, golg: 2, chlo: 1, nucl: 1
Pv-GSTU-7	cyto: 9.5, cyto_E.R.: 5.5, nucl: 2, chlo: 1, golg: 1
Pv-GSTU-8	cyto: 11.5, cyto_E.R.: 6.5, nucl: 1, golg: 1
Pv-GSTU-9	cyto: 9, cysk: 3, nucl: 1, golg: 1
Pv-GSTU-10	cyto: 10.5, cyto_E.R.: 6, cysk: 2, nucl: 1
Pv-GSTU-11	cyto: 8, cysk: 3, chlo: 1, nucl: 1, extr: 1
Pv-GSTU-12	cyto: 10.5, cyto_E.R.: 6.5, E.R.: 1.5, nucl: 1, extr: 1
Pv-GSTU-13	cyto: 7, nucl: 3, extr: 3, cysk: 1
Pv-GSTU-14	cyto: 4.5, cyto_E.R.: 3.5, chlo: 2, mito: 2, E.R.: 1.5, nucl: 1, plas: 1, extr: 1
Pv-GSTU-15	cyto: 8, chlo: 2, nucl: 1, extr: 1, pero: 1, cysk: 1
Pv-GSTU-16	cyto: 9, nucl: 2, chlo: 1, E.R.: 1, cysk: 1
Pv-GSTU-17	chlo: 8, mito: 3, cyto: 2, nucl: 1

Çizelge 4.3. (Devam)

Pv-GSTU-18	cyto: 4, E.R.: 3.5, E.R._plas: 3, mito: 2, plas: 1.5, nucl: 1, extr: 1, vacu: 1
Pv-GSTU-19	extr: 3, vacu: 3, chlo: 2, cyto_nucl: 2, nucl: 1.5, cyto: 1.5, E.R.: 1, pero: 1, gol: 1
Pv-GSTU-20	cysk: 12, cyto: 2
Pv-GSTU-21	cyto: 8.5, cyto_E.R.: 5, nucl: 2, chlo: 1, cysk: 1, golg: 1
Pv-GSTU-22	cyto: 8.5, cyto_E.R.: 5.5, mito: 2, E.R.: 1.5, chlo: 1, nucl: 1
Pv-GSTU-23	golg: 3, plas: 2.5, E.R._plas: 2.5, nucl: 2, cyto: 2, E.R.: 1.5, mito: 1, extr: 1
Pv-GSTU-24	mito: 4, cyto: 2.5, extr: 2, cyto_nucl: 2, chlo: 1, plas: 1, vacu: 1, E.R.: 1, pero: 1
Pv-GSTU-25	cyto: 10.5, cyto_E.R.: 6, plas: 2, nucl: 1
Pv-GSTU-26	cyto: 14
Pv-GTSZ-1	cyto: 8.5, cyto_E.R.: 5, nucl_plas: 2.5, nucl: 2, extr: 1, cysk: 1
Pv-GTSZ-2	nucl: 6, cyto: 3, chlo: 2, extr: 2, mito: 1
Pv-MGST-1	mito: 8, chlo: 5, golg: 1
Pv-MGST-2	mito: 7.5, chlo: 6, cyto_mito: 4.5
Pv-TCHQD-1	cyto: 5, cysk: 5, nucl: 3, extr: 1
Pv-TCHQD-2	nucl: 5, cyto: 4, cysk: 3, chlo: 1, extr: 1

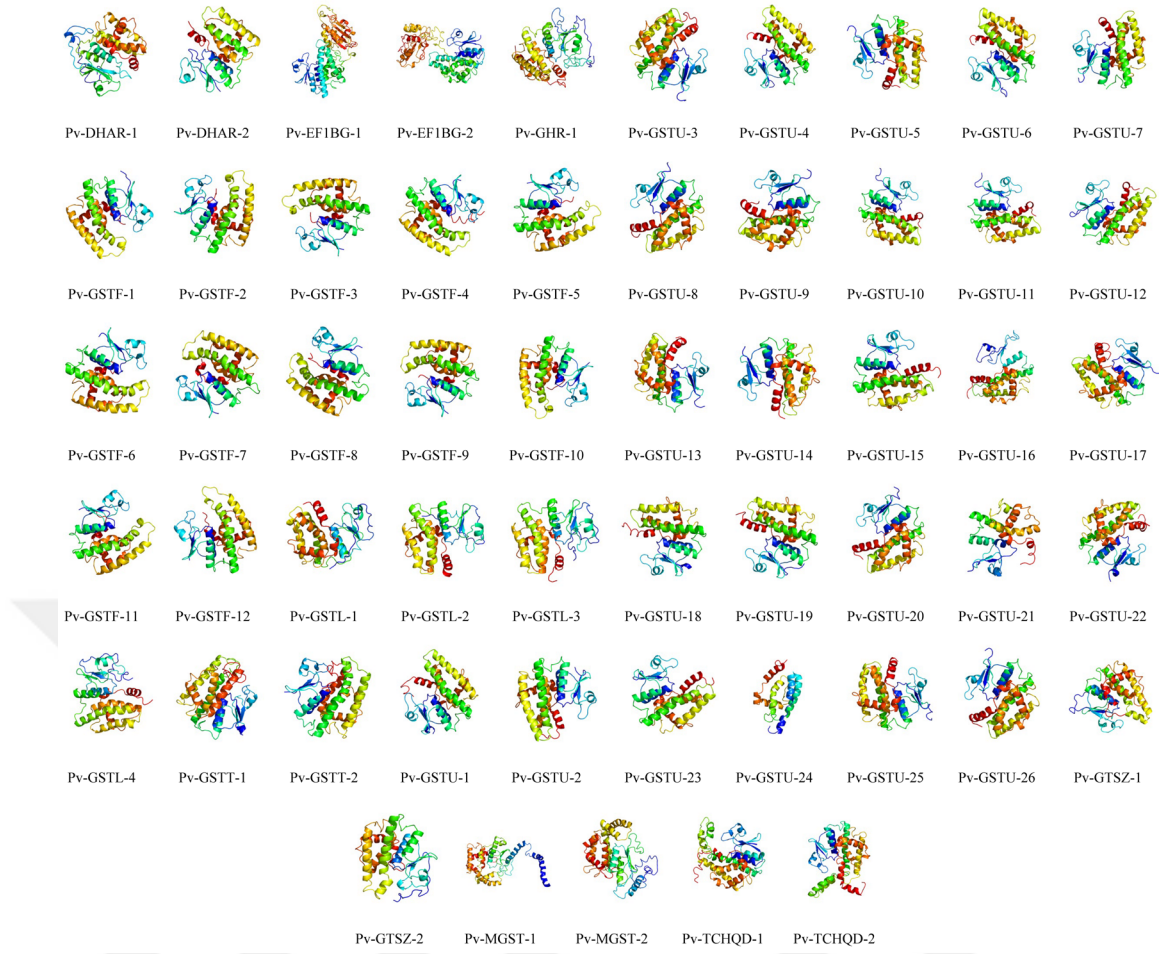
Genlerin promotörlerinin belirlenmesi amacıyla, genlerin 2000 baz çifti yukarı akış bölgesi dizi bilgilerine Phytozome veri tabanı aracılığıyla ulaşılmıştır. Bu veriler kullanılarak TBtools programı vasıtasıyla promotör bölgelerin konumları görselleştirilmiş ve Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. GST genlerinin 2000 bç yukarı akış bölgesinde bulunan *cis*-etkili elementler

4.1.5. Proteinlerin tahmini üç boyutlu yapılarının analizi

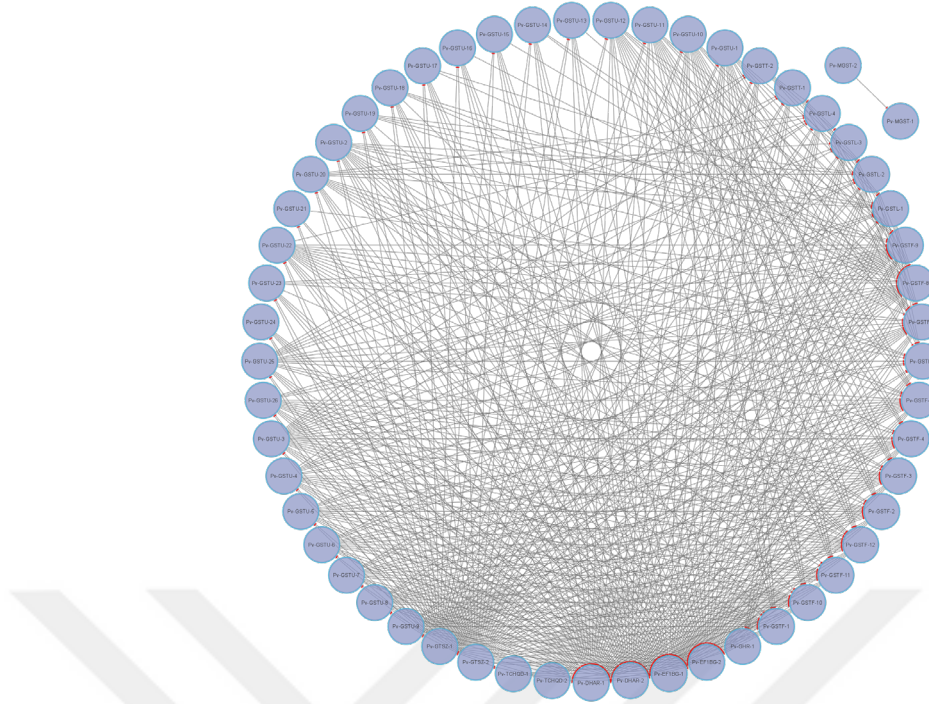
Protein dizi bilgileri ile Phyre² aracı kullanılarak üç boyutlu protein yapıları elde edilmiştir ve bu yapılar Şekil 4.7’de verilmiştir. GST proteinlerinin aynı alt ailede bulunan üyelerinin 3 boyutlu yapılarının α -helix ve β -sarmal yapıları açısından benzer olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. GST proteinlerinin üç boyutlu modellemesi

4.1.6. Fasulye GST'lerin protein-protein etkileşimleri

STRING veri tabanından elde edilen veriler Cytoscape programı kullanılarak görselleştirilmiş ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

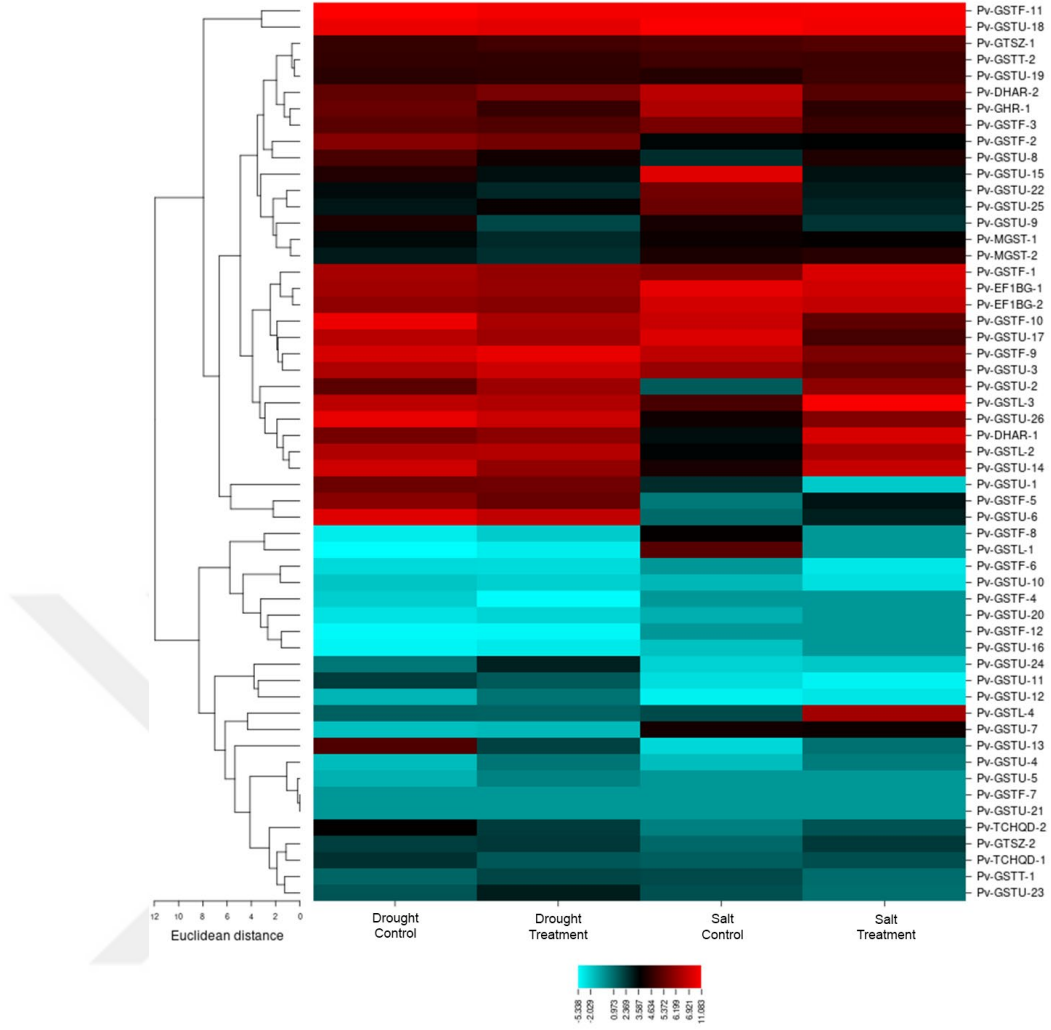


Şekil 4.8. *Pv-GST* gen ürünlerinin protein-protein etkileşimleri (PPI). Protein dairelerinin etrafındaki kırmızı bölge, o proteinin diğer *Pv-GST* proteinleriyle ne kadar etkileşime girdiğini göstermektedir.

GST'ler ile ilişkili olduğu düşünülen mikroRNA (miRNA)'lar psRNA Target veri tabanından elde edilmiştir (EK-2). miR159a.1'in *Pv-GSTU-18*, *Pv-GSTZ-1* ve *Pv-GSTZ-2* olmak üzere 3 geni hedeflediği, miR319c'nin *Pv-GSTF-3*, *Pv-GSTF-5*, *Pv-GSTU-18* ve *Pv-GSTZ-2* olmak üzere 4 geni hedeflediği tespit edilmiştir. Ayrıca, *Pv-GSTU-18* ve *Pv-GSTZ-2* genlerinin iki miRNA (miR159a.1 ve miR319c) tarafından da hedeflendiği tespit edilmiştir. *Pv-GSTF-8* geninin miR2119 tarafından hedeflendiği bulunmuştur.

4.1.7. In-silico gen ifade analizleri

NCBI SRA veri bankasından elde edilen verilerin log₂ dönüşümü yapılmış ve değerler CIMMiner ile analiz edilip görselleştirilmiştir. Elde edilen ısı-haritası Şekil 4.9'da verilmiştir.



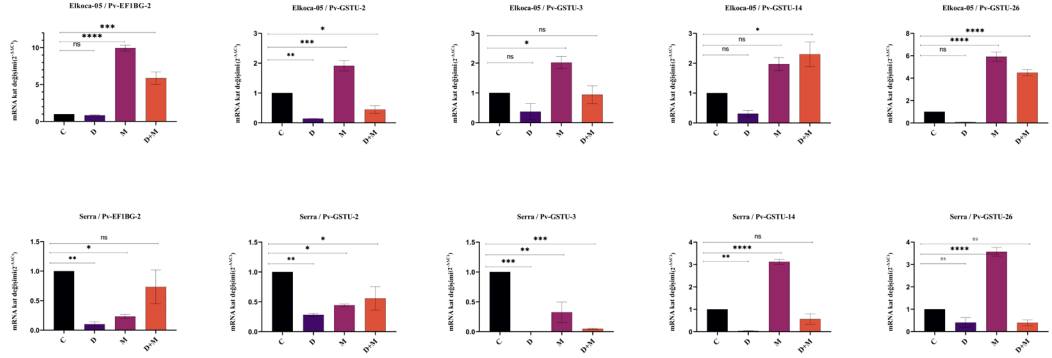
Şekil 4.9. Farklı stres koşulları altında *P. vulgaris* yaprak dokularının *GST* gen ifade seviyelerini gösteren ısı-haritası.

4.1.8. Kantitatif real time (gerçek zamanlı) PCR (qRT-PCR) analizleri

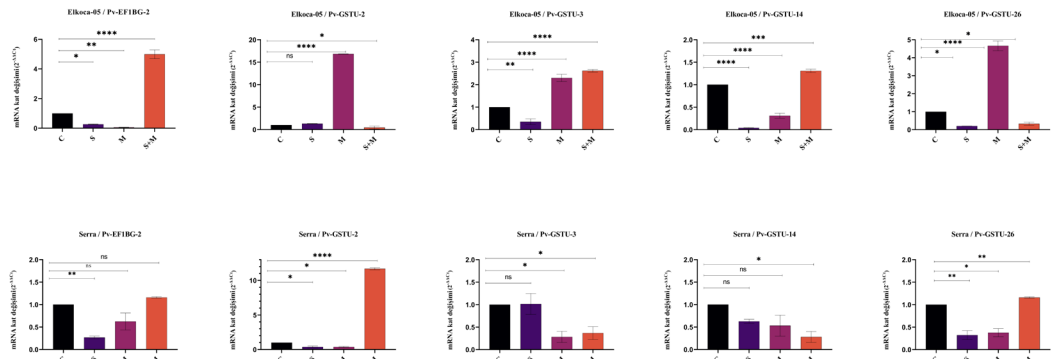
RNAseq verileri ve CDS verileri qRT-PCR gerçekleştirmek üzere primerler tasarlamak için kullanılmıştır. *Pv-GST* genlerinin ifade düzeylerini belirlemek için, ayrı ayrı olacak şekilde bitkilere tuz ve kuraklık stresi uygulaması yapılmıştır. İki fasulye çeşidinden (Elkoca-05 ve Serra) yaprak dokuları ile qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. *Pv-EF1BG-2*, *Pv-GSTU-2*, *Pv-GSTU-3*, *Pv-GSTU-14* ve *Pv-GSTU-26* genlerinin ifade düzeyleri araştırılmış ve Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verilmiştir (bu genlerin primer dizileri Çizelge 3.8’de verilmiştir). Bu genlerin kuraklık stresi (%20 PEG6000 ile), tuz stresi (150 mM NaCl ile) ve melatonin uygulamaları (200 μ M) altındaki ifade değişimleri değerlendirilmiştir. Kuraklık stresinde, Elkoca-05’teki 5 *Pv-GST* genlerinden sadece *Pv-GSTU-2*’nin ifade seviyesinde önemli bir düşüş görülürken, diğer genlerde herhangi bir

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

değişiklik gözlenmemiştir. Melatonin uygulamasında ise *Pv-GSTU-14* dışındaki tüm genlerin ifade düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. %20 PEG6000 uygulaması ile kuraklık stresine maruz bırakılan Elkoca-05 ve Serra çeşitlerinin yaprak dokusunda 5 *Pv-GST* geninin ekspresyon düzeyleri (D: drought (kuraklık), M: melatonin, C: kontrol).



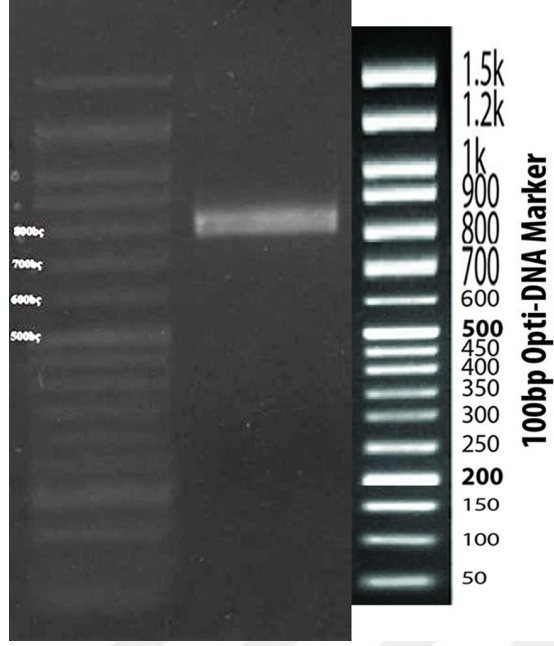
Şekil 4.11. 150 mM NaCl uygulaması ile tuz stresine maruz bırakılan Elkoca-05 ve Serra çeşitlerinin yaprak dokusunda 5 *Pv-GST* geninin ekspresyon düzeyleri (S: salt (tuz), M: melatonin, C: kontrol).

Her iki uygulamaya bakıldığında, *Pv-EF1BG-2*, *Pv-GSTU-14* ve *Pv-GSTU-26*'nın ifade düzeyleri artmıştır. Serra'da kuraklık stresi altında *Pv-GSTU-26* hariç diğer *Pv-GST* genlerinin ifade seviyelerinde önemli bir düşüş tespit edilmiştir. Melatonin tek başına uygulandığında *Pv-EF1BG-2*, *Pv-GSTU-2* ve *Pv-GSTU-3* genlerinin ifade düzeylerinde önemli bir azalma gözlenirken, diğer genlerde artış gözlenmiştir. Kuraklıkla birlikte melatonin uygulandığında ise *Pv-GSTU-2* ve *Pv-GSTU-3* genlerinin ifade düzeylerinde önemli bir azalma görülürken, diğer genlerde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Tuz stresi altında, Elkoca-05'te *Pv-GSTU-2* hariç *Pv-GST* genlerinin ifade seviyelerinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Sadece melatonin uygulandığında, *Pv-EF1BG-2* ve *Pv-GSTU-14*'ün ifade seviyelerinde önemli bir düşüş gözlenirken, diğer genlerin ifade seviyelerinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Tuz ile birlikte melatonin uygulandığında ise *Pv-EF1BG-2*, *Pv-GSTU-3* ve *Pv-GSTU-14* genlerinin ifade düzeylerinde önemli bir artış gözlenirken diğerlerinde azalma olmuştur. Serra'da tuz stresi *Pv-EF1BG-2*, *Pv-GSTU-2* ve *Pv-GSTU-26* genlerinin ifade düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Melatonin uygulaması *Pv-GSTU-2*, *Pv-GSTU-3* ve *Pv-GSTU-26* ekspresyon seviyelerinde önemli bir düşüşe neden olmuştur. Hem tuz hem de melatonin uygulaması *Pv-GSTU-2* ve *Pv-GSTU-26*'nın ifade düzeylerini önemli ölçüde artırmış, *Pv-GSTU-3* ve *Pv-GSTU-14*'ün ifade düzeylerini azaltmış, ancak *Pv-EF1BG-2*'nin ifade düzeyinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

4.1.9. *PvDHAR1* geninin elde edilmesi ve klonlanması, PCR ürününün jelden izolasyonu

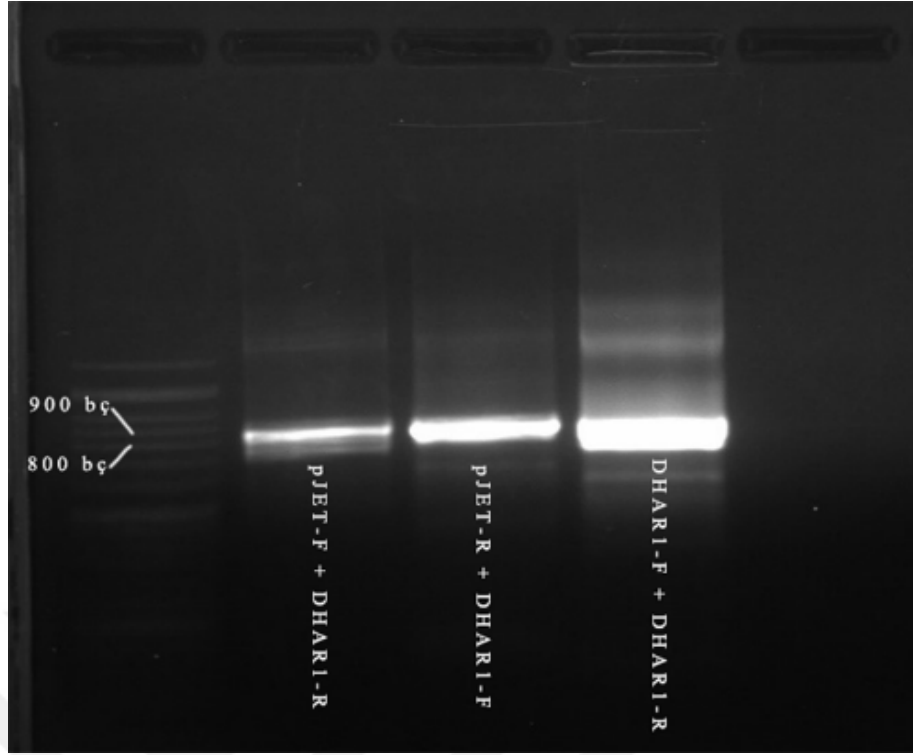
Spesifik enzim kesim bölgelerini barındıran primerler kullanılarak kuraklık stresine maruz bırakılmış fasulyeden elde edilmiş cDNA'dan *PvDHAR1* geni izole edilmiştir. Enzim kesim bölgeleriyle birlikte 801 bp (789 bp gen + 12 bp primer adaptörleri) uzunluğa sahip ampikon elde edilmiştir (Şekil 4.12). Elde edilen bu ampikon jelden izole edilmiştir.



Şekil 4.12. PvuI-DHAR1-2 ile enzim kesim bölgesini içeren *PvDHAR1* geninin GeneJET jel ekstraksiyon kiti ile jelden ekstraksiyonu sonrasında elde edilen ürünün agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen görüntüsü (sağda, ladder #G193).

4.1.10. *PvDHAR1* geninin pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarılması

Jelden elde edilen enzim kesim bölgelerini barındıran ampikon küt uçlama işlemi sonrasında pJET1.2 klonlama vektörüne ligasyonu yapılmıştır. Ligasyonun ardından vektör pJET primerleri ve PvuI-DHAR1-2 primerleri (ürün boyutu 789 bp) ile doğrulanmıştır (Şekil 4.13). Yalnızca DHAR primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonrası elde edilmesi beklenen bant büyüklüğü 789 bp iken pJET primerleri ile yapılan PCR işleminin sonucunda elde edilen bant büyüklüğü yaklaşık 850 bp olmuştur.



Şekil 4.13. pJET::PvDHAR1 vektörünün PCR ile doğrulanmasının ardından elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.

Doğrulan koloniler büyütülmüş ve plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen plazmitlere pJET1.2 (ileri ve geri) primerleri ile çift yönlü dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonuçlarının analizleri gerçekleştirilmiş ve BLAST sonucunun %99,62 oranında PHAVU_001G230400g (PvDHAR1) mRNA tüm CDS'ye benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.14). BLAST sonucunun eşleştirmeli görüntüsü Şekil 4.15'te verilmiştir.

DescriptionsGraphic SummaryAlignmentsTaxonomy

Sequences producing significant alignmentsDownloadSelect columnsShow100?

☐ select all1 sequences selected

GenBankGraphicsDistance tree of resultsMSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G230400g).mRNA, complete cds	Phaseolus vul...	1441	1441	98%	0.0	99.62%	1100	XM_007163324.1
☐ PREDICTED: Vigna angularis glutathione S-transferase DHAR3, chloroplastic-like (LOC108329... Vigna angularis		1258	1258	98%	0.0	95.44%	1051	XM_017563495.1
☐ PREDICTED: Vigna unguiculata glutathione S-transferase DHAR3, chloroplastic-like (LOC1141... Vigna unguicul...		1253	1253	98%	0.0	95.31%	1139	XM_028958267.1

Şekil 4.14. Dizileme sonucunun BLAST'lanması sonucu elde edilen değerler

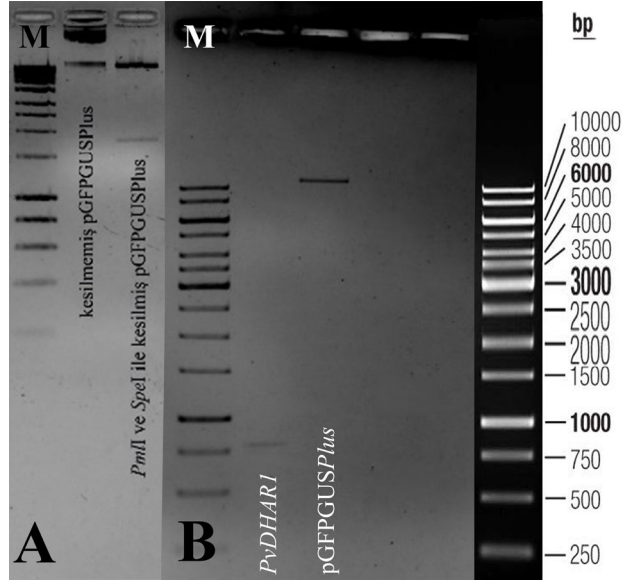
Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G230400g) mRNA, complete cdsSequence ID: [XM_007163324.1](#) Length: 1100 Number of Matches: 1Range 1: 147 to 935 [GenBank](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1441 bits(780)	0.0	786/789(99%)	0/789(0%)	Plus/Minus
Query 7	TTAGCCTTCTACTTTAGGACGCCAACCCTTCAATGACATCCTGTGGTTGTGCACTTGT	66		
Sbjct 935	TTAGCCTTCTACTTTAGGACGCCAACCCTTCAATGACATCCTGTGGTTGTGCACTTGT	876		
Query 67	AATGAACGATTCCCTCAAGAAAATGGCCTTCGTATAAGACTTCAAAGAGGTAAGCGAATC	126		
Sbjct 875	AATGAACGATTCCCTCAAGAAAATGGCCTTCGTATAAGACTTCAAAGAGGTAAGCGAATC	816		
Query 127	AGGTACTGTCCATTTCTTATAATGCCCCAGAGCAATCTCCAAATGATATAGCTTTGGTCC	186		
Sbjct 815	AGGTACTGTCCATTTCTTATAATGCCCCAGAGCAATCTCCAAATGATATAGCTTTGGTCC	756		
Query 187	AAGTGATAGGTGAGTCAGATATCTCATTACCGTTGATGAAAGGGCCATTTTCCTTTAT	246		
Sbjct 755	AAGTGATAGGTGAGTCAGATATCTCATTACCGTTGATGAAAGGGCCATTTTCCTTTAT	696		
Query 247	GTAATCATTGAAAGAGCTCAGTTCACTTAGTAATGCTTGTTCTGTTCCATCATTGGGATC	306		
Sbjct 695	GTAATCATTGAAAGAGCTCAGTTCACTTAGTAATGCTTGTTCTGTTCCATCATTGGGATC	636		
Query 307	CTTGCTCTGAGAAATCCAATAAATGTAGAAAAGATCTTTGACCCCACTGTGGCCTTTTC	366		
Sbjct 635	CTTGCTCTGAGAAATCCAATAAATGTAGAAAAGATCTTTGACCCCACTGTGGCCTTTTC	576		
Query 367	GGGTGGGGTCAACCAATGGTGGGCTAGGATACTTCTTCCCAATGTTTGAGTAATAACATC	426		
Sbjct 575	GGGTGGGGTCAACCAATGGTGGGCTAGGATACTTCTTCCCAATGTTTGAGTAATAACATC	516		
Query 427	TGAATCCGGAACCCACTTCTCATCAAACTTTATGACAGGAACTTTACCATCAGGATTGAC	486		
Sbjct 515	TGAATCCGGAACCCACTTCTCATCAAACTTTATGACAGGAACTTTACCATCAGGATTGAC	456		
Query 487	TGTACGGAACCATTTCTGGTATGTTGGTGAAATCCACCAACTTGGGTTTATAAGGCAGGTG	546		
Sbjct 455	TGTACGGAACCATTTCTGGTATGTTGGTGAAATCCACCAACTTGGGTTTATAAGGCAGGTG	396		
Query 547	TTTTTCTTCAGTGTTAGTAATACCTTTTGGCAAAAAGGACAGTCGCCGAGCCTATTGGG	606		
Sbjct 395	TTTTTCTTCAGTGTTAGTAATACCTTTTGGCAAAAAGGACAGTCGCCGAGCCTATTGGG	336		
Query 607	TGTGGTGAGGGTAGCTTTAACGGCGATTTTGAAGGGTTGGGAAGGGGGAACGGAAGACAT	666		
Sbjct 335	TGTGGTGAGGGTAGCTTTAACGGCGATTTTGAAGGGTTGGGAAGGGGGAACGGAAGACAT	276		
Query 667	TGACACCACCTCAGAGACTTCTCTCTGAAATGGTTGGTGAAGGAAACACGGCGTTTGG	726		
Sbjct 275	TGACACCACCTCAGAGACTTCTCTCTGAAATGGTTGGTGAAGGAAACACGGCGTTTGG	216		
Query 727	GCGGAGACGGAGGTGGTTGACGGCAGTGGAAAGCGGCACGCCGAAACTTGAACCTCTCGC	786		
Sbjct 215	GCGGAGACGGAGGTGGTTGACGGCAGTGGAAAGCGGCACGCCGAAACTTGAACCTCTCGC	156		
Query 787	AGTGGACAT	795		
Sbjct 155	AGTGGACAT	147		

Şekil 4.15. Dizi bilgisi elde edilen genin (Sbjct) ve NCBI veri tabanındaki PHAVU_001G230400g dizisinin (Query) BLAST sonucunun eşleştirmeli görüntüsü.

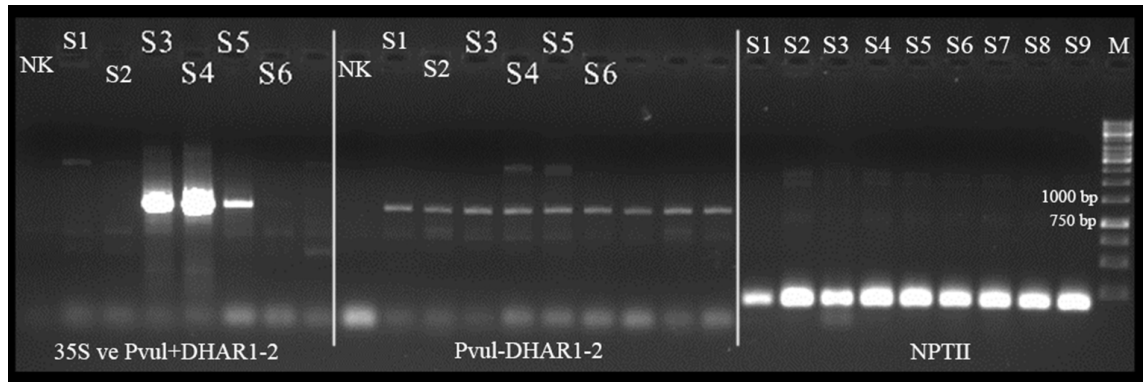
4.1.11. *PvDHAR1* geninin pGFPGUS*Plus* vektörüne aktarılması

Doğrulaması yapılan *PvDHAR1* genine ait PCR ürünleri ve pGFPGUS*Plus* plazmiti *BcuI* ve *Eco72I* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve ürünler agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.16-A). Agaroz jelden izolasyon işlemi ile parçalar elde edilmiş ve GUS*Plus* bölgesi çıkarılmış pGFPGUS*Plus* plazmidi ile *PvDHAR1* geni ligasyon ile birleştirilmiş ve pGFPGUS*Plus*::*PvDHAR1* vektörü elde edilmiştir (bu uygulamalar bölüm 3.2.23'te aktarıldığı gibi yapılmıştır). Ardından bu vektör yine aynı enzimlerle kesilmiş ve bu doğrulama işlemi de agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.16-B).



Şekil 4.16. Restriksiyon endonükleazlarla kesim işlemine tabi tutulan parçaların görüntüleri. A) plazmidin *BclI* (*SpeI*) ve *Eco72I* (*PmlI*) enzimleri ile kesimin sonucunda jelde görülen 1832 bp uzunluğunda *GUSPlus* bandı (ikinci kuyu), B) *pGFPGUSPlus::PvDHAR1* plazmidinin aynı enzimler ile kesilmesi sonucu oluşan bantlar (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder: #SM0311, sağda).

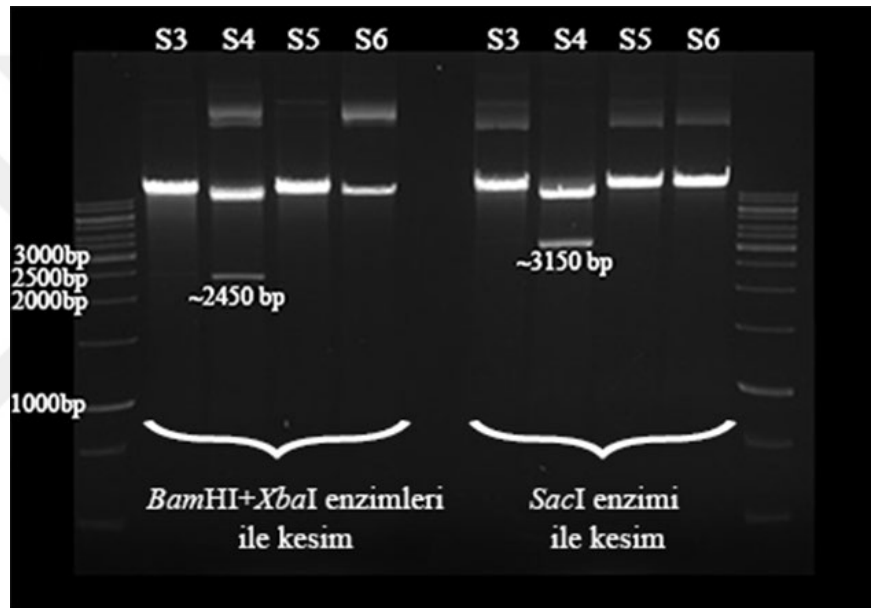
PvDHAR1 genini taşıyan plazmitler *E. coli* JM101 suşlarına aktarılmıştır. Besiyerinde büyüyen bakterilere 35S, *Pvul*-DHAR1-2 ve NPTII primerleriyle koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir (Şekil 4.17).



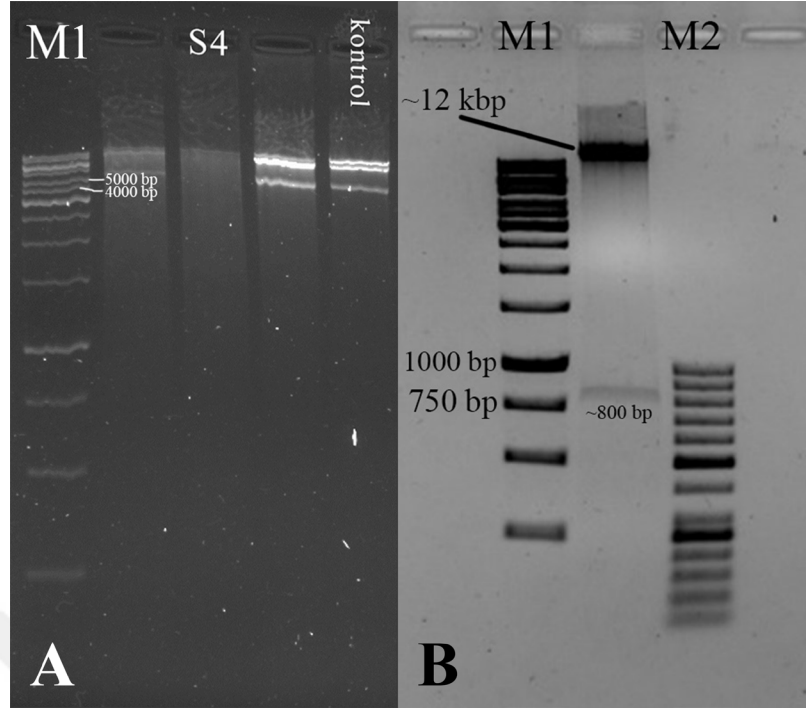
Şekil 4.17. Büyüyen kolonilere yapılan koloni PCR işleminin sonucu, NPTII primerlerinin PCR ürünü boyutları ~190 bp uzunluğunda olup taranan tüm kolonilerde pozitif sonuç vermiştir (NK: negatif kontrol, S: *E. coli* JM101 kolonileri, M: Marker).

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda S3, S4, S5 ve S6 kolonilerinin istenilen plazmidi taşıdığı görülmüş ve ileri doğrulama işlemi olarak Bölüm 3.2.23'te aktarıldığı

şekilde enzim kesimleri uygulaması yapılmıştır. Enzim kesimleri sonucunda *Bam*HI ve *Xba*I enzimleri ile aynı anda ve ayrıca *Sac*I enzimi ile kesimden yalnızca S4 kolonisinin pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18). Ardından bu S4 kolonisinden elde edilen plazmide *Mlu*I ve *Eco*RI enzimleri ile kesim denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu denemenin sonucunda *PvDHAR1* taşıyan plazmit düz zincirli forma gelmiştir, fakat *GUSPlus* bölgesi barındıran plazmidin iki defa kesilmesinden dolayı 4365 bp değerinde bant gözlenmiştir (Şekil 4.19). Son enzim kontrolü olarak S4 kolonisinden elde edilen plazmit *Bcu*I ve *Eco*72I enzimleri ile kesilmiş ve yaklaşık 800 bp uzunluğunda *PvDHAR1* ve pGFP*GUSPlus* plazmidi jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.18. Kolonilerden alınan plazmitlerin kesimlerinin ardından agaroz jelde yürütülmesi.



Şekil 4.19. A) plazmitlerin *MluI* ve *EcoRI* ile kesilmesinin ardından S4 kolonisinden ve kontrol plazmitten elde edilen görüntü, B) pGFPGUS*Plus::PvDHAR1* plazmidinin *BcuI* ve *Eco72I* ile kesilmesi sonucu oluşan bantların jeldeki görüntüsü (M1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder, #SM0311, M2: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, #SM0371)).

Son olarak restriksiyon enzim doğrulaması yapılan bu plazmit *A. tumefaciens* AGL-1 suşuna aktarılmadan önce yeniden sekansa gönderilmiş ve 35S (R) primeri ile Pvul-DHAR1-2 primeri kullanılarak çift yönlü okuma ile sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonrasında elde edilen sekans bilgileri düzenlenmiş ve plazmitteki gen bölgesinin doğruluğu teyit edilmiştir (Çizelge 4.4). Gerçekleştirilen BLAST sonucu Şekil 4.21’de verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.4. Sekans verilerinin düzenlenmiş hali (mavi ile işaretlenmiş bölge 35S primerinden gelen parça, sarı ile işaretlenmiş bölge ise *PvDHAR1* geninin başlangıç kodonu: metiyonin).

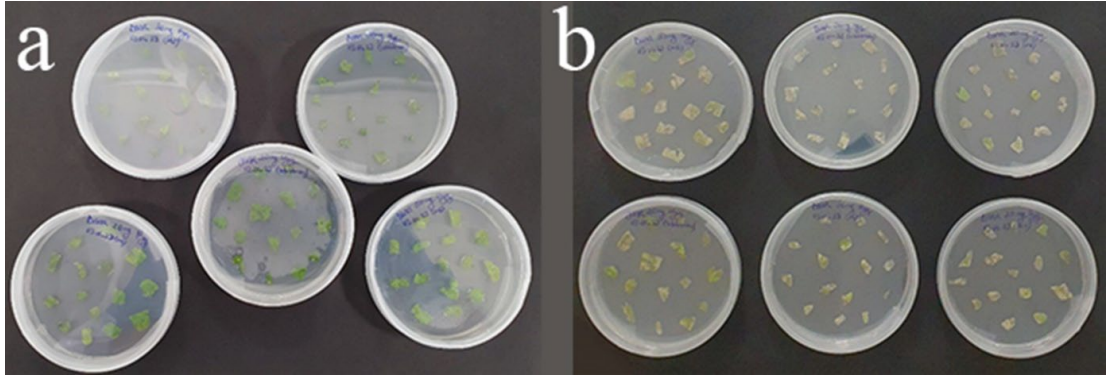
35S ve <i>PvDHAR1</i> primerleri ile elde edilen dizi bilgisi	AAGTGCCTGTAGTAGACGCTAGCACGTAATGGACCCCCACCCACGGAGGAGCAT CGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAT ATCTCCACTGACGTAAGGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTC CTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGAACACGGGGGACTCTTGACCATG GTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTTCTCCTTCATTTTCTTGTTAGGACCCTTT TCTCTTTTTATTTTTTTGAGCTTTGATCTTTCTTAAACTGATCTATTTTTTAATTGAT TGGTTATGGTGTAATATTACATAGCTTAACTGATAATCTGATTACTTTATTTTCGT GTGTCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCGACAACTAGTATGTTCCACTGCGA GAGTTCAAGTTTCGGCGTGCGCGCTTCCACTGCCGTCAACCACCTCCGTCTCCGCC CAAACGCCGTTGTTTCCTTACCAACCATTTCAGGAGGAAGTCTCTGAGGGTGGTG TCAATGTCTTCCGTTCCCCCTTCCCAACCCTTCGAAATCGCCGTTAAAGCTACCCTC ACCACACCCAATAGGCTCGGCGACTGTCTTTTTGCCAAAGGGTATTACTAACACT GGAAGAAAAACACCTGCCTTATGAACCCAAAGTTGGTGGATTTCACCAACATACCAG AATGGTTCCGTACAGTCAATCCTGATGGTAAAGTTCTGTATGATGATGATGATGATGAT AAGTGGGTTCCGGATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT AAGTGGGTTCCGGATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT CCCACCATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT CATTATTGGATTCTCAGGAGCAAGGATCCCAATGATGGAACAGAAACAAGCATTAA CTAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT CGGTAATGAGATATCTGCAGCTGACCTATCACTTGGACCAAAGCTATATCATTGG AGATTGCTCTGGGGCATTATAAGAAATGGACAGTACCTGATTCGCTTACCTCTTTG AAGTCTTATACGAAGGCCATTTTCTTGAGGGAATCGTTCATTAAACAATTGCACG CGACAAAGAAATGAAGACGCAAAATAATCTAA
---	--

Job Title	Nucleotide Sequence	Filter Results
RID	UWE47VTK016 Search expires on 12-31 08:01 am Download All	Organism only top 20 will appear exclude
Program	BLASTN Citation	Type common name, binomial, taxid or group name
Database	nt See details	+ Add organism
Query ID	Id Query_52575	Percent Identity E value Query Coverage
Description	None	to to to
Molecule type	dna	Filter Reset
Query Length	1214	
Other reports	Distance tree of results MSA viewer	
Descriptions	Graphic Summary Alignments Taxonomy	
Sequences producing significant alignments		
Download Select columns Show 100		
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer		
select all 1 sequences selected		
Description	Scientific Name	Max Score Total Score Query Cover E value Per. Ident. Acc. Len Accession
Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_001G230400g).mRNA, complete cds	Phaseolus vulg...	1349 1349 61% 0.0 99.46% 1100 XM_007163324.1
PREDICTED: Vigna angularis glutathione S-transferase DHAR3, chloroplast-like (LOC108329329).mRNA	Vigna angularis	1171 1171 61% 0.0 95.15% 1051 XM_017563495.1
PREDICTED: Vigna unguiculata glutathione S-transferase DHAR3, chloroplast-like (LOC114173710).mR	Vigna unguiculata	1166 1166 61% 0.0 95.01% 1139 XM_028058267.1

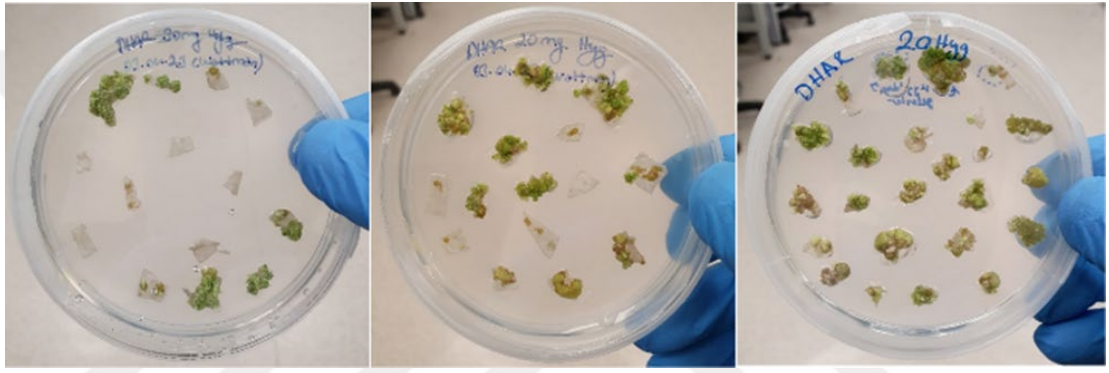
Şekil 4.20. Düzenlenmiş sekans verilerinin BLAST sonucu. Elde edilen dizi verisi PHAVU_001G230400g (*PvDHAR1*) ile %99,46 oranında benzerlik göstermiştir (eşleşmenin tam olarak kapsanmama nedeni 35S primerinden gelen junk DNA parçasıdır).

4.1.12. pGFPGUS*Plus::PvDHAR1* aşırı ifade vektörünün *N. benthamiana* bitkilerine *Agrobacterium*-aracılı transformasyonu, T₀ bitkilerinden tohum eldesi ve T₁ bitkilerinin yetiştirilmesi

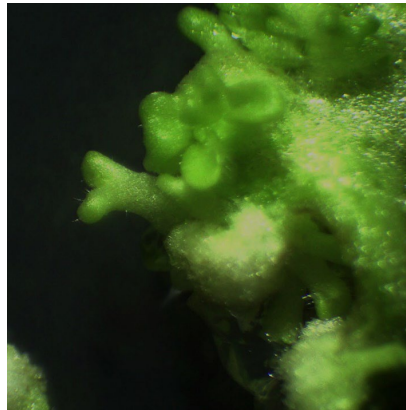
Tütün bitkilerine transformasyon işlemi modifiye bir metot ile gerçekleştirilmiştir (Ordon et al. 2019). Steril tohumlar hormon içermeyen MS ortamlarına ekilmiş ve bitkiler 3-5 yapraklı döneme gelene kadar steril koşullarda büyütülmüştür. Uygun büyüklüğe gelen bitkiler yapraklarından yaklaşık 1 cm² olacak şekilde steril doku makası yardımıyla parçalar alınmıştır. pGFPGUS*Plus::PvDHAR1* aşırı ifade vektörünü taşıyan AGL-1 suşları, içerisinde 10 µg/mL asetosiringon bulunan indüksiyon besiyerinde OD₆₀₀=0,8 olana kadar büyütülmüştür. Büyüyen bakteriler ile bitkiden kesilen yaprak doku parçaları steril bir petri içerisinde 1 saat birlikte inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonrasında yaprak diskler ko-kültivasyon ortamlarına alınmıştır. Ko-kültivasyon ortamı, AGL-1'in yaprak disk parçalarındaki yaralı kısımlardan, içerdiği Ti-Plazmidin *vir* genleri kontrolü altında kalan T-DNA bölgesini bitki genomuna aktarması için gerekli olan enfeksiyon ortamı olarak tanımlanmaktadır. 2 günlük inkübasyonun ardından ko-kültivasyon ortamlarından alınan yaprak diskler, 600 mg/L sefotaksim çözeltisi ile yıkanmış ve yaprak diskler *Agrobacterium*'lardan arındırılmıştır. *Agrobacterium* açısından steril edilen bu yaprak diskler MSII ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 4.21). MSII ortamı içerdiği higromisin-B antibiyotiğinden dolayı transforme bitki seleksiyon ortamıdır. pGFPGUS*Plus* plazmidinin barındırdığı ve bitkiye geçen *HygR* geni sayesinde higromisin-B antibiyotiğine karşı direnç sağlamaktadır. Geni taşıyan transforme bitkiler bu ortamda büyüyebilirken geni almamış bitkiler ölmüştür (Şekil 4.22). MSII ortamı ayrıca bitki rejenerasyon ortamıdır ve *HygR* geni taşıyan bitkilerin rejenerasyonu stimüle edilmiştir. Bu durumda yaprak disklerin kallus oluşumuna ve takibinde bitki rejenerasyonuna doğru ilerlemesi beklenmiştir. MSII ortamlarında kültüre alınan yaprak doku parçalarında yaklaşık 3 hafta sonra kallus oluşmuş ve bitki rejenerasyonuna başlanmıştır (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).



Şekil 4.21. MSII ortamlarına alınan yaprak diskler. a) ilk günkü görüntüler, b) aynı kültürlerin 3 gün sonraki görüntüsü (renklerinde sararma ve beyazlama olan doku parçalarında higromisin-B direnci yoktur ve bu dokular ölmüştür).



Şekil 4.22. MSII kültür ortamlarının 20 gün sonraki görüntüsü (ölen ve kallus geliştiren bitki dokuları açıkça görülmektedir).

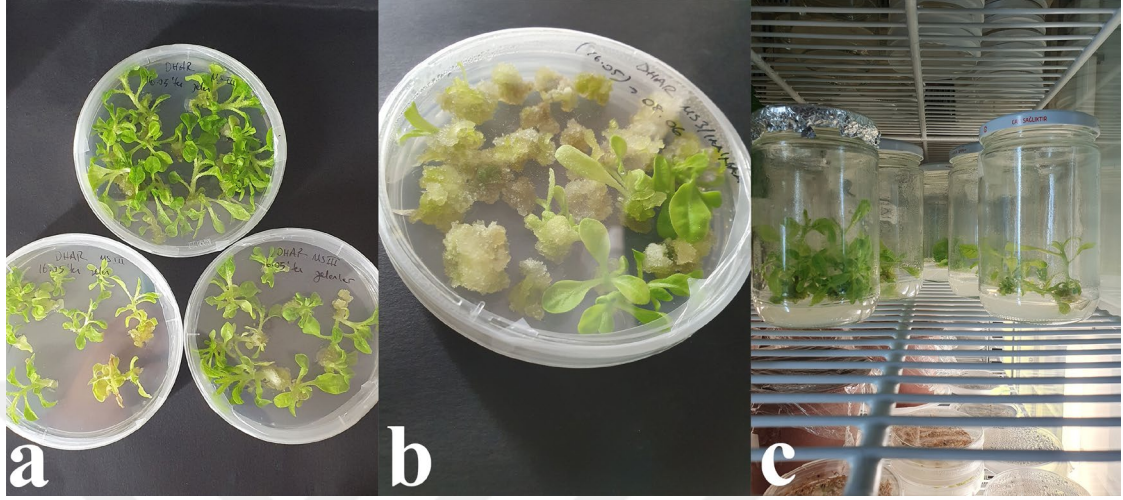


Şekil 4.23. MSII ortamlarında bulunan dokularda gelişen kalluslardaki bitki rejenerasyonu.

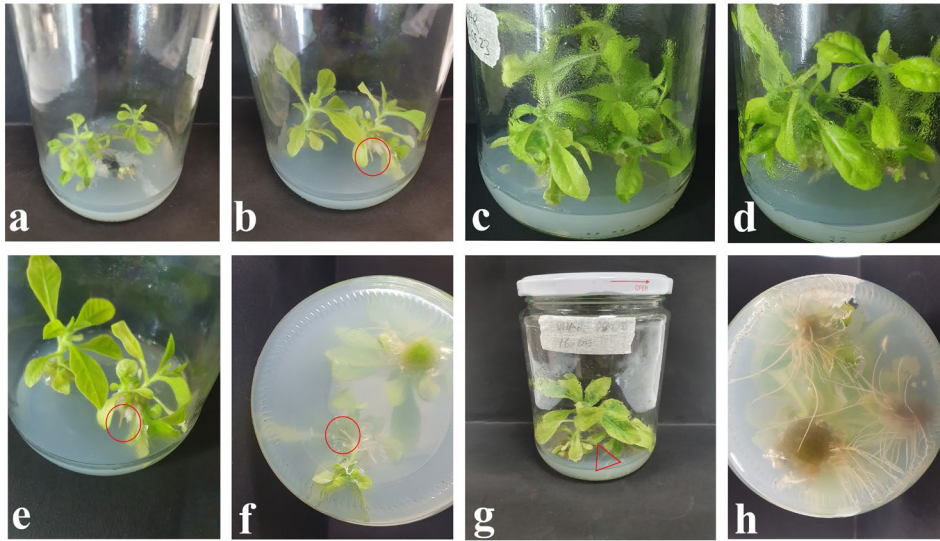
MSII ortamlarında yeterli büyüklüğe ulaşan sürgünler, kök gelişimini teşvik etmek için oksin oranı fazla olan MSIII ortamlarına aktarılmıştır. MSII ortamında olduğu gibi MSIII ortamı da bitkinin kallus oluşturmaya sebebiyet vermektedir (Şekil 4.25). Bu sebeple MSIII ortamında oluşan kalluslar dikkatli bir biçimde steril olarak bitkilerden

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

uzaklaştırılıp MSII ortamlarına geri ekilmiştir. MSIII ortamlarında bitkilerde 2-4 hafta içerisinde köklenme başladığı tespit edilmiştir. Rejenere bitkilerde yaklaşık 5-6 hafta içerisinde gerçek kökler gözlenmiştir (Şekil 4.26).

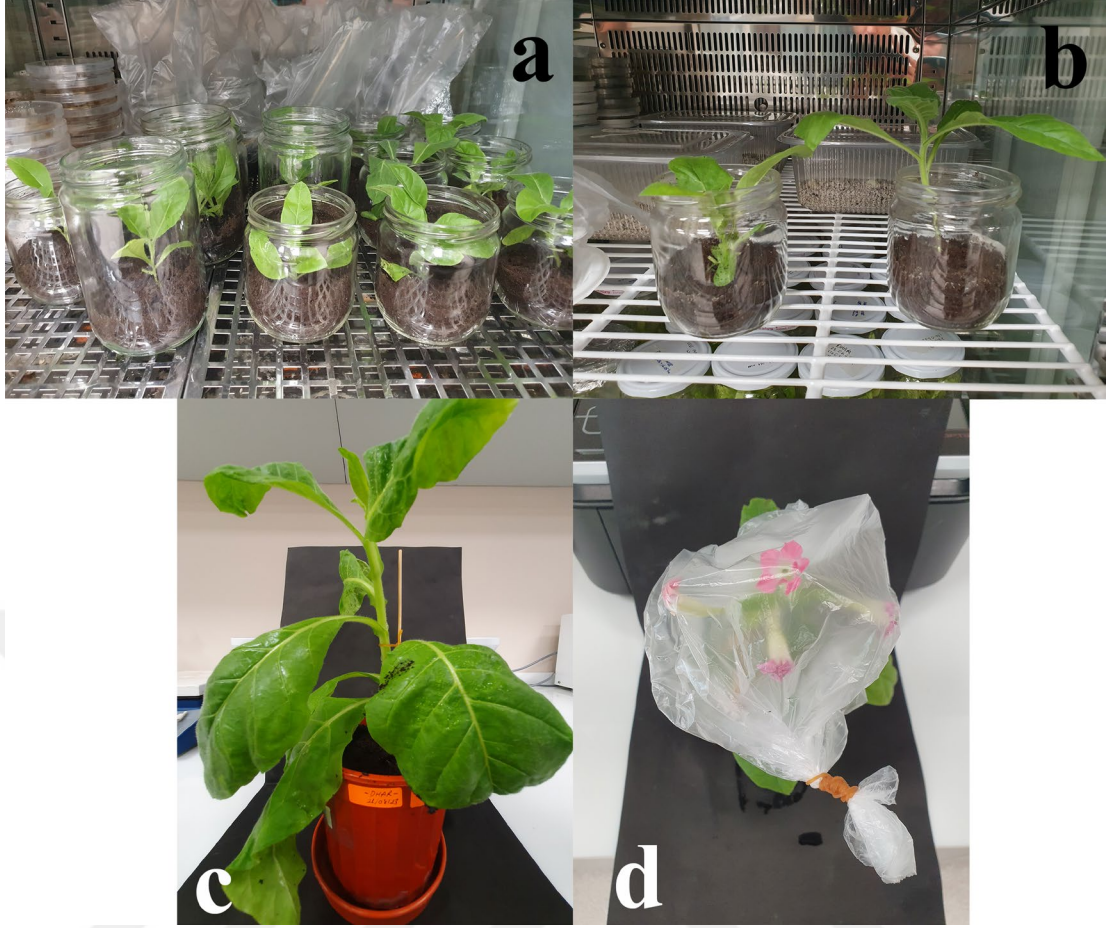


Şekil 4.24. a) MSIII ortamında gelişen sürgünler, b) MSIII ortamında gelişen kalluslar, c) MSIII ortamlarında büyüyen bitkiler.



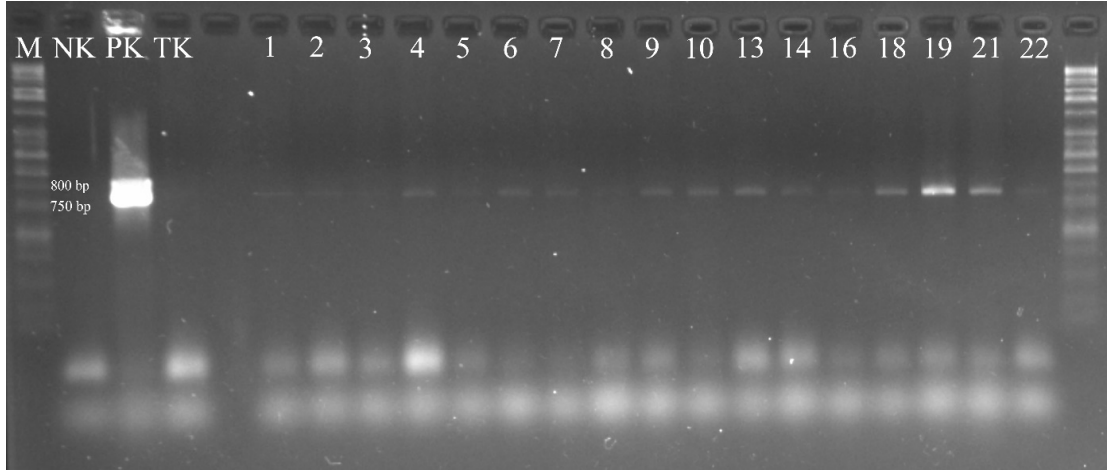
Şekil 4.25. IAA içeren MSIII ortamlarında bulunan bitkilerde oluşan ilk kökler (b, e ve f) ve gelişen gerçek kökler (h görselinde açıkça görülmektedir).

Kökleri gelişen potansiyel T₀ bitkileri steril kavanozlarda bulunan steril ve elenmiş topraklara ekilmiş ve üzeri poşet yardımıyla kapatılmıştır (Şekil 4.26). Poşetlere birkaç delik açılarak hava girişi sağlanmıştır. Yaklaşık 10 gün sonra poşetler çıkarılmış ve bitkiler dış ortama alıştırılmıştır. Topraklarının nem durumuna göre yaklaşık 3 günde bir sulama yapılarak tohum eldesine kadar bitkiler büyütülmüştür.



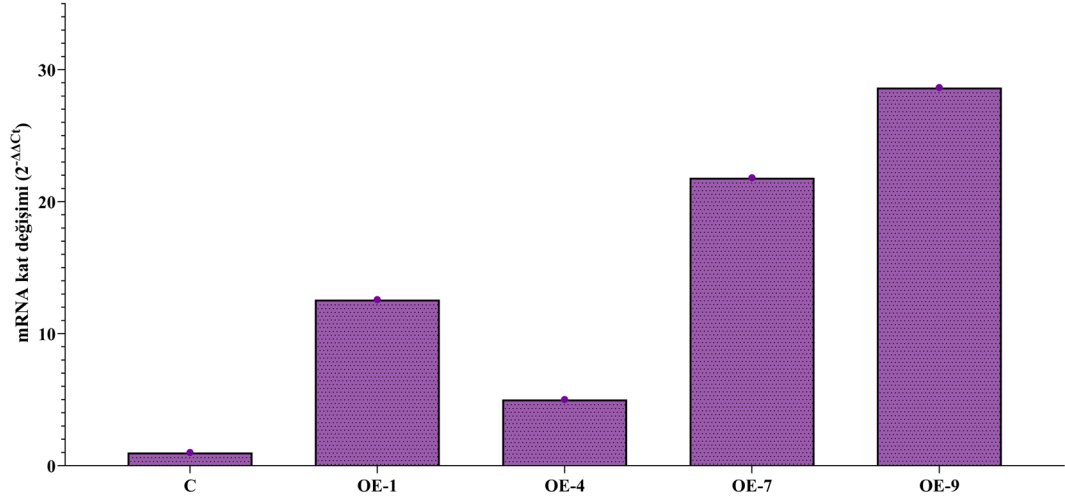
Şekil 4.26. Gelişen bitkilerin toprağa aktarılmasını gösteren görseller. a) üzerinde poşetler olan alıştırma kavanozları ve önlerinde poşetleri çıkarılmış toprağa alışmış bitkiler, b) toprağa alışmış bitkilerin büyümesi, c) büyüyen bitkilerin saksıya alınması ve gelişmesi, d) çiçek açan bitkilerin çiçeklerinin kapatılması ve tohum eldesine gidilmesi.

T_0 bitkilerinden elde edilen tohumlar T_1 tohumları olarak adlandırılmış ve higromisin-B içeren MS ortamlarında çimlendirilmiştir. 3-5 yapraklı dönemlere kadar büyütülen bitkiler steril topraklara alınmış ve büyütülmesine devam edilmiştir. Toplamda 24 adet bitki büyümesi gözlemlenmiştir. Bu 24 bitkiden 17 tanesi toprağa aktarıldıktan sonra yaşamaya devam etmiştir. T_1 bitkilerinden alınan yaprak örneklerinden ve yabancı tip bitkinin yaprak örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar 50 ng/ μ L'ye ayarlanmış ve Pvul-DHAR primerleri kullanarak yaklaşık 800 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü aranmıştır (Şekil 4.27).



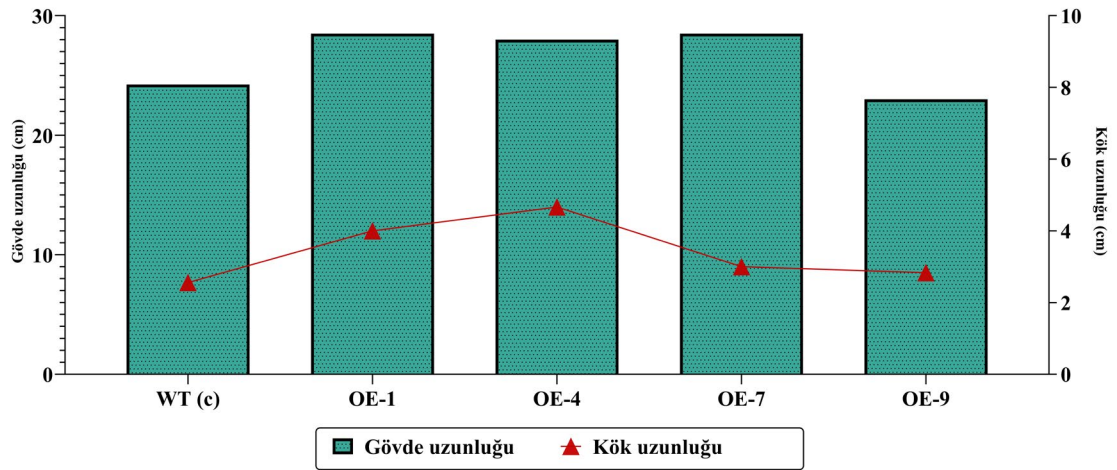
Şekil 4.27. 17 potansiyel T₁ ve yabancı tip bitkiden alınan örneklerin PCR görüntüsü (M: marker, NK: negatif/su kontrol, PK: pozitif kontrol (S4 plazmidi), TK: yabancı tip tütün kontrol).

Elde edilen bu T₁ bitkilerinin yapraklarından RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu cDNA'lar ile T₁ bitkilerinde *PvDHAR1* geninin kopya sayısına ulaşılmıştır. Sadece pGFPGUS*Plus::PvDHAR1* vektöründe bulunan *PvDHAR1* genine bağlanan Pvul-DHAR1-2 primeri bu amaç doğrultusunda kullanılmıştır. Tüm T₁ bitkilerine qRT-PCR denemesi yapılmış ve OE-1, OE-4, OE-7 ve OE-9 bitkilerinden alınan örneklerde *PvDHAR1* geninin artan ifadesine rastlanılmıştır (Şekil 4.28). Diğer bitkilerde ise ya ifade seviyesinde azalma ya da ifade seviyesinin hiç ölçülmemesi durumuyla karşılaşmıştır. Aktarılan kasetin içerisinde bulunan 35S CamV promotörü kontrolünde olan *PvDHAR1* geninin her durumda ifadesinde ve kopya sayısında artış beklenmektedir. Bu durumda ifade seviyesinde azalma görülen ya da ifade seviyesi ölçülemeyen bitkilerin aşırı ifade transgenik bitkiler olmadığı belirlenmiştir. Gen kontrolü olarak *PvDHAR1* geninin izole edildiği fasulye cDNA kütüphanesi kullanılmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında bu dört bitkinin ifade seviyelerindeki artışlar sırasıyla 13, 4, 22 ve 29 kat kadar olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.28. T₁ aşırı ifade (OE: Over Expressed) bitkilerinde *PvDHAR1* geninin ifade seviyelerini gösteren grafik.

Kuraklık stres uygulamasına başlanmadan hemen öncesinde bitkilerin kök ve gövde uzunlukları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. OE-1, OE-4 ve OE-7 bitkilerinin gövdelerinin kontrole göre daha uzun olduğu OE-1 ve OE-4 bitkilerinin köklerinin ise kontrole göre yaklaşık 2 kat daha uzun olduğu belirlenmiştir. OE-7 ve OE-9 bitkilerinin kök uzunluğunun kontrole göre çok değişmediği fakat OE-9 bitkisinin gövde uzunluğunun kontrolden daha az olduğu tespit edilmiştir.

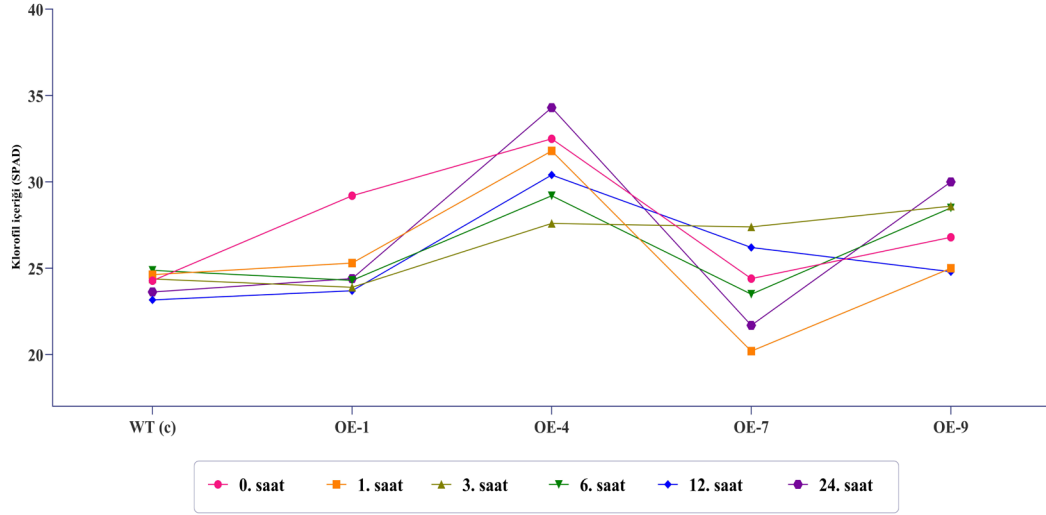


Şekil 4.29. Yabanıl tip (kontrol) tütün ve aşırı ifade hatların 8 yapraklı dönemlerindeki gövde ve kök uzunlukları.

4.1.13. Yabanıl tip ve aşırı ifade hatlara kuraklık stresi uygulaması ve stres toleranslarının belirlenmesi

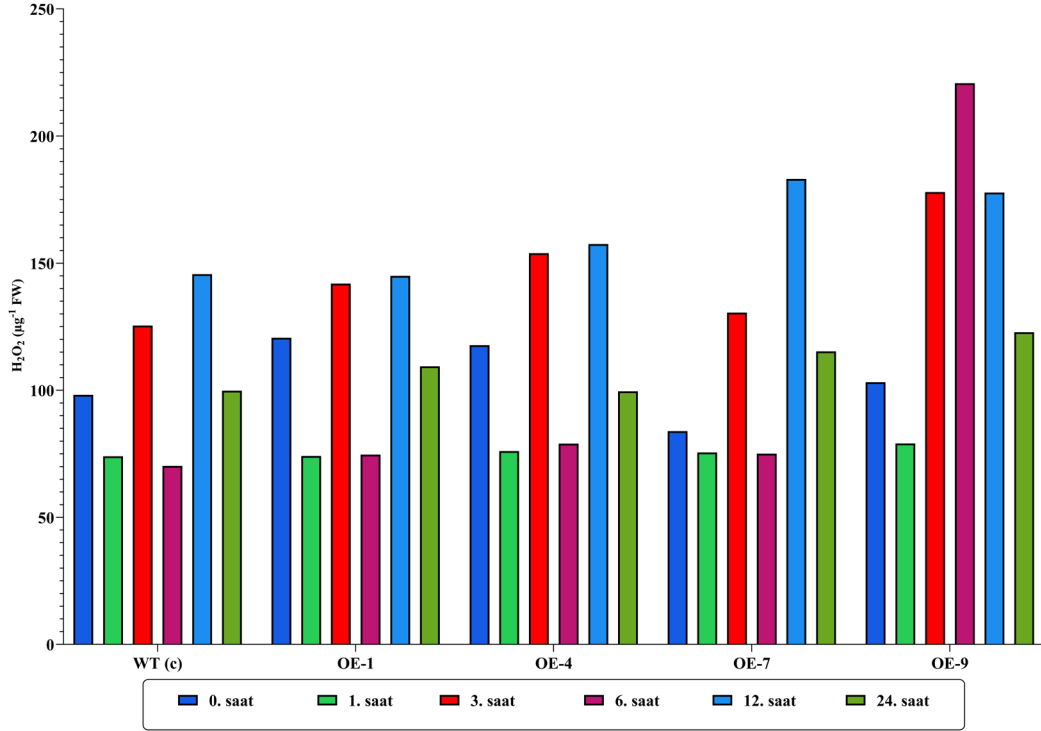
Aynı büyüklüklere ulaşan ve 8 yapraklı dönemde bulunan aşırı ifade hatları ve yabanıl tip tütün bitkileri 1/10 Hoagland çözeltisi içeren hidrofonik ortamlara alınmıştır. Bu ortama alınan bitkilere %10 PEG6000 uygulaması yapılarak kuraklık stresi simüle edilmiştir (Eltayeb et al. 2006). Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki farklı zamanlardaki etkilerini araştırmak adına 0., 1., 3., 6., 12., ve 24. saatlerde bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Bu yaprak örnekleri ile bitkideki nispi klorofil miktarı, klorofil floresans değerleri, MDA ve H₂O₂ içerik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ilave olarak kuraklık stresi uygulamasından hemen önce ve sonunda (0. ve 24. saatlerde) membran hasarını belirlemek için bağıl elektrik iletkenliği ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Bitkilerin klorofil içeriği SPAD cihazı ile ölçülmüş ve elde edilen veriler kaydedilmiştir. SPAD bitki yapraklarını kullanarak 650 ve 940 nm dalga boylarında ölçümler yapmaktadır. Kontrol bitkisinde stres uygulaması boyunca klorofil içeriği çok yakın değerler vermiştir. *PvDHAR1* geninin aşırı ifade edildiği OE-4 ve OE-9 bitkilerinde klorofil miktarının da arttığı görülmüştür. OE-7 bitkisinde de ilk saatin sonunda klorofil miktarında azalma görülürken sonraki ölçümlerde klorofil miktarının arttığı gözlemlenmiştir. *PvDHAR1* geninin aşırı ifadesinin bitkilerin içerdiği klorofil miktarını değiştirdiği tespit edilmiştir. OE-1 bitkisinde ise stres uygulaması yapılmadan önce klorofil miktarında artış belirlenmiş, fakat bu artışın stres uygulaması ile azalarak yabanıl tip bitkinin klorofil miktarına yakın noktalara kadar düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.39).



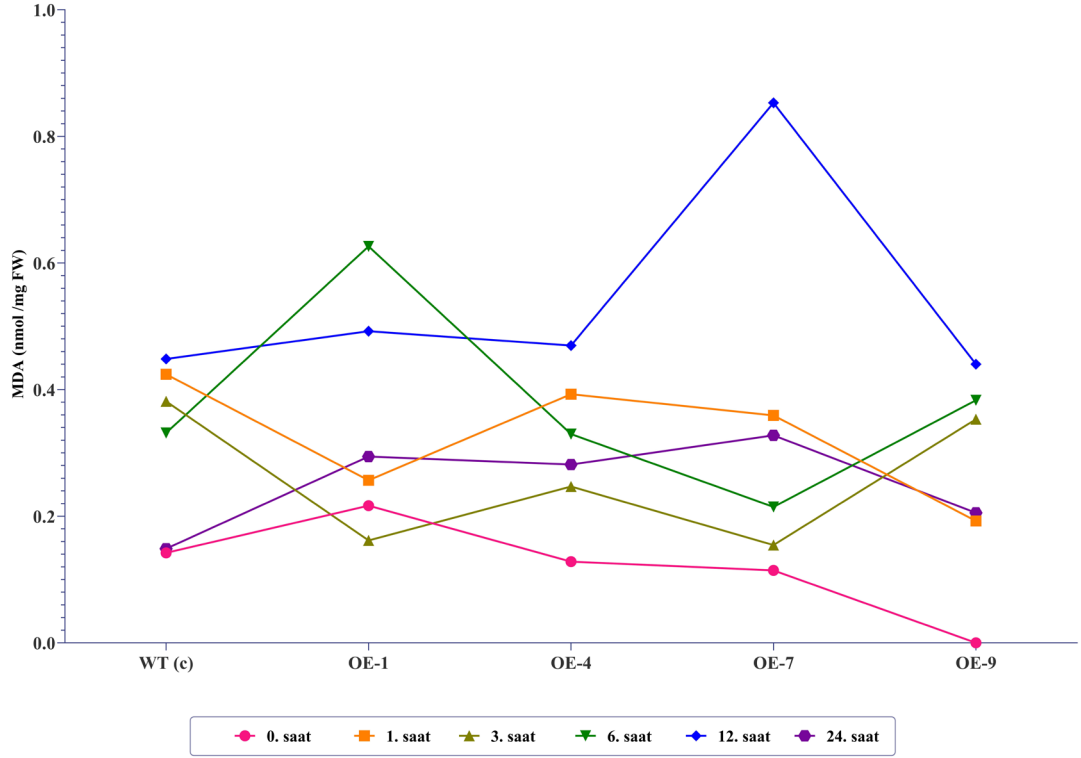
Şekil 4.30. Kuraklık stresi altında bitkilerin yapraklarında ölçülen klorofil miktarlarını gösteren grafik.

Tüm bitkilerin yapraklarında H_2O_2 miktarı ölçümü gerçekleştirilmiş ve sonuçlar grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.31). Stres uygulamasının 0. saatinde yalnızca OE-1 ve OE-4 bitkilerinde kontrole göre daha yüksek oranda H_2O_2 miktarı tespit edilmiştir. OE-9 bitkisinde 1. saat hariç diğer tüm saatlerde H_2O_2 miktarının kontrole göre yaklaşık 1,5 ile 2,5 kat arası daha fazla olduğu belirlenmiştir. OE-9 haricinde diğer tüm bitkilerde 12. saat ölçümünde pik değerler elde edilmiştir. Uygulamanın ilk saatinde tüm bitkilerde H_2O_2 miktarında azalma saptanmıştır. Stres uygulamasının 6. saatinde OE-9 hariç diğer bitkilerin H_2O_2 miktarlarında bir önceki saat ölçümüne göre ortalama %45, 0. saate göre ise ortalama %27 oranında azalma tespit edilmiştir. Özellikle gen ifade seviyelerinin de diğer bitkilere nazaran fazla olduğu OE-7 ve OE-9 aşırı ifade hatlarının strese karşı yanıtı daha iyi yönettiği belirlenmiştir.



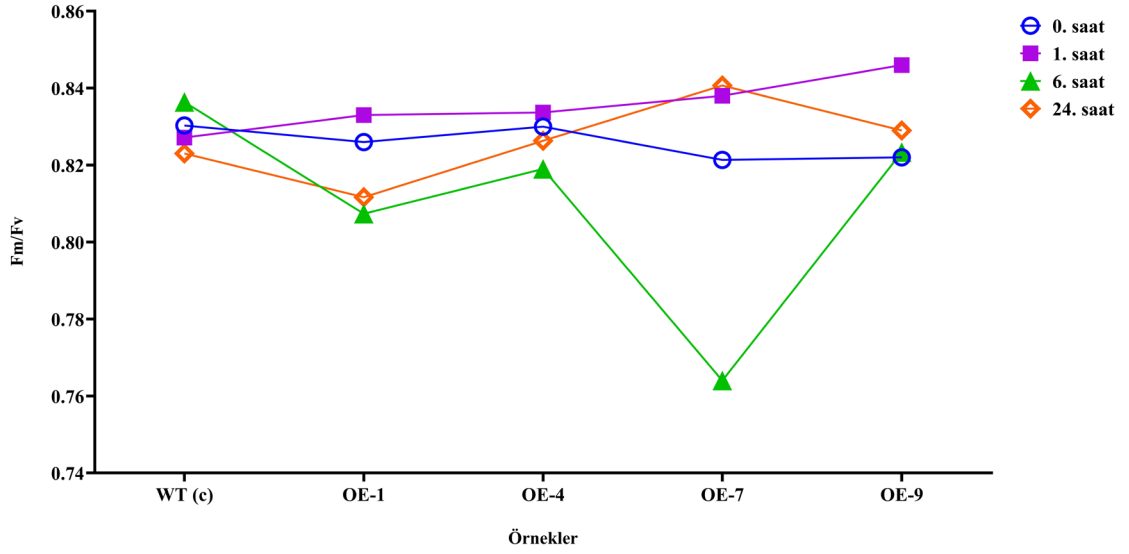
Şekil 4.31. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerin 6 farklı zaman noktasındaki H_2O_2 miktarlarını gösteren grafik.

Kuraklık stresi uygulamasının başlangıcında (0. saat) ve sonuna kadar 6 farklı zaman noktasında MDA ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.32). Stres uygulamasının 0. saatinde OE-1 haricinde diğer bitkilerin MDA içeriğinin kontrole göre daha az olduğu belirlenmiştir. Uygulamanın 1. saatinde tüm bitkilerin MDA oranının kontrole göre az olduğu tespit edilmiştir. Uygulamanın 12. saatinde OE-7'nin MDA içeriğinin tüm değerlerden fazla, tepe noktada olduğu belirlenmiş ve diğer bitkilerin aynı saatteki MDA içeriklerinin ise kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. MDA analizleri sonucunda özellikle OE-7 aşırı ifade hattının strese yanıtta diğer bitkilerden daha başarılı olduğu belirlenmiştir. *PvDHAR1* geninin aşırı ifadesinin kuraklık stresinde MDA sentezi üzerine etkilerinin olduğu görülmüştür.



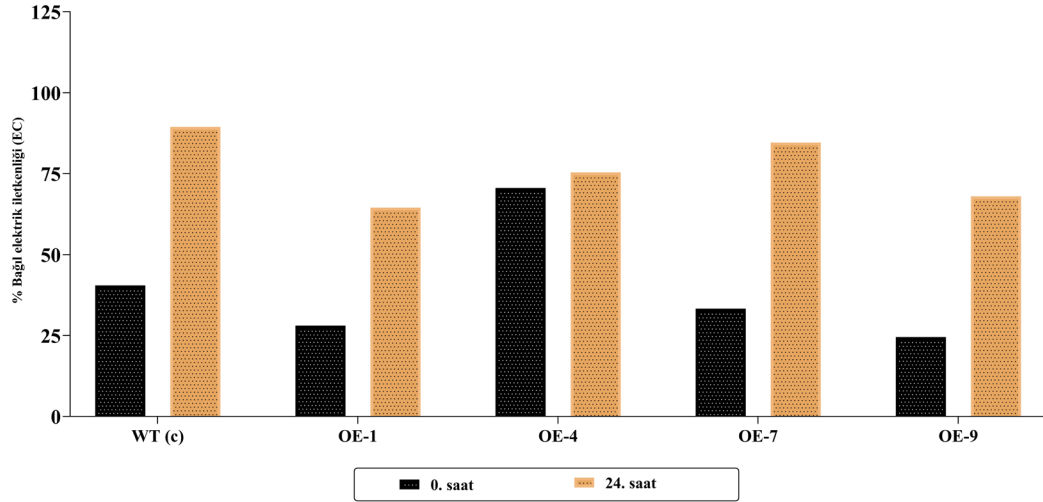
Şekil 4.32. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerin farklı zamanlarda ölçülen MDA içerikleri

Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde fotosistem II'nin (PSII) maksimum fotokimyasal etkinliği (F_v/F_m) ölçülmüştür. Karanlığa uyum sağlayan yaprak bölgelerindeki PSII'nin minimum floresans verimi (F_0), PSII reaksiyon merkezlerinin kapalı olduğu durumdaki klorofillerin maksimum floresans verimi (F_m) ve değişken floresans (F_v) ölçümleri yapılmıştır. Maksimum fotokimyasal verimlilik $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.33). Aşırı ifade hatlarda fotosistem etkinliğinin 0. saatte kontrol bitkisine çok yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir. Uygulamanın 1. saatinde kontrol grubundaki PSII verimliliği azalırken diğer bitkilerde artmıştır. Uygulamanın 6. saatinde kontrol grubunda PSII verimliliği artış gösterirken diğer bitkilerde azalma görülmüştür. Artan stres süresi dikkate alındığında PSII verimliliği kontrol grubunda genel olarak azalış gösterirken diğer tüm bitkilerde genel olarak artmıştır. Bu esnada OE-7 bitkisinde 6. saatte dramatik bir düşüş kaydedilmiştir. *PvDHAR1* geninin aşırı ifadesi ile PSII'nin fotokimyasal veriminin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.33. Kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin fotokimyasal verimliliğini gösteren grafik.

Kuraklık stresinden dolayı meydana gelen membran hasarını belirlemek adına yaprak dokularından alınan parçalarla % bağıl elektriksel iletkenlik (EC) ölçümü yapılmıştır (Şekil 4.34). Bağıl elektriksel iletkenlik hücre zarı sızıntısının göreceli yüzdesini göstermektedir. OE-4 haricinde diğer tüm bitkilerin stres öncesi %EC değerlerinin kontrol grubundan daha az olduğu tespit edilmiştir. OE-4 bitkisinin stres öncesi %EC değeri diğer aşırı ifade hatlarının değerlerinin 2 katından fazla olduğu belirlenmiştir. OE-4 haricinde diğer tüm bitkilerin stres uygulaması sonrası %EC değerlerinde 2 kattan fazla artış gözlenirken, OE-4 bitkisinde bu değer yaklaşık %5 olmuştur. Aşırı ifade hatların stres sonu %EC değerlerinin kontrol grubundan daha az olduğu belirlenmiştir. Stres uygulaması öncesinde yalnızca OE-4 bitkisinin %EC değerinin kontrolden fazla olduğu tespit edilmiştir. *PvDHARI* geninin aşırı ifadesinin kuraklık stresi kaynaklı membran hasarının azaltılmasında rol oynadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.34. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerdeki membran sızıntısının göreceli yüzdesini belirlemek için yapılan bağlı elektrik iletkenliği (%EC) ölçümlerinin sonuçları.

4.2. Tartışma

Her geçen gün gelişen biyoinformatik araçlar sayesinde birçok organizmada farklı genlerin tanımlanması ve karakterizasyonu yapılmaktadır. Biyoinformatik genlerin işlevlerinin anlaşılması, genlerin yapıları ve bu genlerin homologları ile evrimsel ilişkilerinin aydınlatılmasında oldukça önemli bir role sahiptir. Bu tez çalışması kapsamında *GST* genlerinin *P. vulgaris* bitkisindeki rollerini ve işlevlerini anlayabilmek ve ileri çalışmalar için zemin oluşturabilmek adına analizler gerçekleştirilmiştir. Tüm organizmalarda bulunan *GST* proteinleri oldukça büyük bir öneme sahiptir. *GST*'ler sitozolik, mitokondriyal (kappa) ve mikrozomal olarak üç ana sınıfa ayrılır. Çözünabilir *GST*'ler sitozol ve mitokondride bulunurken, membran bağlantılı eikosanoid ve glutatyon (MAPEG) enerji salan mekanizmalarında rol alan enzimler ise genellikle mikrozomal *GST*'lerle ilişkilidir (Hayes et al. 2005; Pearson 2005; Ahmad et al. 2020). Zeta (Z), tau (U), Lambda (L), phi (F), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), teta (T), tetraklorohidrokinon dehalojenaz (TCHQD), mikrozomal prostaglandin E-sentaz tip 2 (mPGES-2), γ -alt ökaryotik uzama faktörü 1B (EF1B γ) ve glutatyonil-hidrokinon redüktaz (GHR) gibi *GST* sınıfları; dizilerin benzerliği, kinetik özellikler ve görevleri, immünolojik çapraz reaktivite ve tüm genom organizasyonu gibi faktörler ile farklılaşmıştır (Lallement et al. 2014). Phi, tau, zeta ve TCHQD gibi dimerik *GST*'ler aktif bölgelerinde serin rezidüsü barındırırken, dimerik olmayan DHAR ve Lambda ise aktif bölgelerinde sistein rezidüsü ihtiva ederler (McGonigle et al. 2000). Bununla beraber, phi, tau, teta ve zeta *GST*'ler son derece özel olarak üretilirken phi ve tau hücrede daha yüksek oranda bulunur. *GST* yapısı iki katlanmalı şekilde olup, bunlardan ilki glutatyon bağlanma bölgesi ve tiyoredoksin katlanmaları içeren N-terminal domain ve ikincisi ise substrat spesifikliğini doğrulayan dörtlü sarmal yapıda olan C-terminal domaindir (Frova 2003). *GST*'ler strese adaptasyon yollarında iyi bilinen proteinlerdir (Sheehan et al. 2001; Pearson 2005; Ahmad et al. 2020). Bununla birlikte, çeşitli prooksidanlara maruziyet altında *GST*'lerin bakterilerde, bitkilerde, balık ve memelilerde ifadesinin arttığı rapor edilmiştir (Hayes et al. 2005). *GST*'lerin genom çaplı analizleri birçok bitkide yapılmış ve sonuçlar gösterilmiştir. Çeltikte 79 (Jain et al. 2010), *Arabidopsis*'te 55 (Sappl et al. 2009), mısırdaki 42 (McGonigle et al. 2000), şeker portakalda 23 (Licciardello et al. 2014), Japon kara çamında 27 (Yang et al. 2014), *Capsella rubella*'da 49 (He et al. 2016), patatesti 90 (Islam et al. 2018), *Gossypium*

raimondii'de 59 ve *Gossypium arboreum*'da 49 (Dong et al. 2016) ve *G. max*'ta 74 (McGonigle et al. 2000; Ahmad et al. 2020) olmak üzere çeşitli mahsullerde GST'ler rapor edilmiştir.

GST'lerin filogenetik ağaç analizinde 10 farklı dala ayrıldığı görülmüştür. GST proteinlerinin kökenlerine göre on gruba ayrılması, Pv-GST dağılımlarında farklı kümelerin ve alt ailelerin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Tau ve Phi sırasıyla en çok üyeye sahip sınıflardır. *A. thaliana* ve *G. max*'ın evrimsel olarak diğer GST'lerden farklı olan MGST sınıfı proteinlerin hiçbir üyesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca *G. max*'ın GHR sınıfının hiçbir üyesine ve *A. thaliana*'nın EF1B sınıfının hiçbir üyesine sahip olmadığı bulunmuştur. Aktif bölgelerinde bir serin kalıntısı içeren alt sınıfların (sırasıyla Tau, Phi, Theta ve Zeta) en fazla GST üyesini içerdiği bulunmuştur.

Genlerin evrimsel süreçlerinin daha iyi anlaşılabilmesi adına gen duplikasyon taramaları gerçekleştirilmiştir. Gen duplikasyonları genlerin yeni işlev kazanması, işlev kaybetmesi ya da farklılaşmalarını sağlamakta oldukça önemli bir olaydır (Cannon et al. 2004). Pozitif seleksiyon evrimsel süreçte hızlanmayı, negatif seleksiyon ise işlevsel sınırlanmayı tanımlamaktadır (İlhan 2018; Kasapoğlu et al. 2020; Muslu et al. 2024). Fasulye genomunda bulunan segmental duplike GST genlerin tamamının arındırıcı seleksiyon baskısına maruz kaldığı belirlenmiştir. *Pv-GSTU-1/Pv-GSTU-4* ve *Pv-GSTU-6/Pv-GSTU-26* çiftleri olmak üzere 4 tane Tau ailesinden, *Pv-GSTL-1/Pv-GSTL-3* çifti olmak üzere 2 tane Lambda ailesinden ve *Pv-TCHQD-1/Pv-TCHQD-2* çifti olmak üzere TCHQD ailesinin 2 üyesinin de segmental duplike genler olduğu belirlenmiştir. İki farklı *Gossypium* türünde yapılan çalışmada toplamda 26 duplike gen çiftinden 5 çiftin pozitif seleksiyon baskısı, kalan 21 gen çiftinin ise güçlü bir arındırıcı seleksiyon baskısı altında kaldığı rapor edilmiştir. Bu durum GST genlerinin evrimsel süreç boyunca hem arındırıcı hem de pozitif seleksiyon baskısına maruz kaldığını göstermektedir (Dong et al. 2016). Ayrıca *C. rubella*'da yapılan çalışmada segmental duplikasyon olayına rastlanılmamış, elde edilen tüm duplike genlerin tandem duplike olduğu rapor edilmiştir (He et al. 2016).

Pv-GST proteinlerinin evrimsel olarak korunmuş motif analizi, yüksek oranda korunmuş 10 motifin varlığını ortaya çıkarmıştır. En uzun motif olan 10 numaralı motif sadece Pv-GSTL proteinlerinde bulunmakta ve bu motif glutatyon S-transferaz N

terminal alanını içermektedir. Ayrıca “motif 1” ve “motif 3” de N terminal alanı içermektedir. Altı Pv-GST’nin “motif 1” ve on bir Pv-GST’nin “motif 3” içermediği bulunmuştur. Pv-GSTU-24 hariç tüm Pv-GSTU proteinlerinin ve Pv-GSTL-4 hariç tüm Pv-GSTL proteinlerinin glutatyon S-transferaz C terminal alanını içeren “motif 2”yi içerdiği tespit edilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, “motif 4”ün herhangi bir alan içermediği, ancak tüm Pv-GST’lerin bu motifi içerdiği ve hatta Pv-GHR-1’in sadece bu motifi içerdiği bulunmuştur. Bu durum, “motif 4”ün GST süper ailesiyle oldukça ilişkili olabileceğini göstermiştir.

GST genlerinin 2000 bp yukarı akış bölgesinde bulunan promotör bölgelerindeki kuraklık ve tuzluluk stresleri ile ilişkili *cis*-etkili elementlerin varlığı bu genlerin streslere karşı yanıt mekanizmalarında rol oynayabileceğini göstermektedir. Promotör bölgelerde bulunan *cis*-etkili elementler stres durumlarına yanıt olarak genin transkripsiyonunu azaltarak ya da artırarak gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Transkripsiyon faktörü, hedef genlerin ifadesini kontrol eden önemli bir düzenleyicidir ve bitki gelişimi, metabolizma ve stres tepkisinde önemli roller oynar (Li et al. 2022). Kuraklık cevap elementi (Drought Response Element), birçok stres koşulu ile bağlantılı olduğu bilinen MYB/MYC elementleri, absisik asite yanıt elementi (ABRE) gibi birçok *cis* elementin *PvGST* genlerinin promotör bölgelerinde bulunduğu belirlenmiştir. Önceki çalışmalar ve bu tez çalışması göz önünde alındığında *PvGST* genlerinin bitki büyümesinde ve ayrıca streslere karşı yanıtta rol alabileceği belirlenmiştir.

Proteinlerin 3-boyutlu yapısı onların işlevini belirler. Proteinlerin aktif bölgelerinin önemi olduğu kadar yan bölgelerin de görevi ve yapısı önemlidir. Aynı alt ailede bulunan GST ailesinin üyeleri yapısal olarak benzerlik sergilemektedir. Hem bulundukları alt aileler hem de yapılarındaki benzerlikler dikkate alındığında, aynı alt aileye ait proteinlerin hücredeki işlevlerinin de aynı ya da birbirine çok yakın olduğu söylenebilir. Proteinlerin diğer proteinlerle etkileşimleri biyolojik süreçlerin yönetilmesinde oldukça elzemdir ve bu analizin gerçekleştirilmesi de taraması yapılan proteinlerin işlevlerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynar (Frova 2003, Islam et al. 2018). *PvGST* proteinlerinin birbiri arasındaki etkileşimleri belirlenmiş ve bu etkileşimi gösteren bir ağ görseli oluşturulmuştur. DHAR alt ailesine ait iki üye olan *Pv-DHAR-1* ve *Pv-DHAR-2* ve bunlara ek olarak EF1BG (γ) alt ailesinin iki üyesi olan *Pv-EF1BG-1*

ve Pv-EF1BG-2 proteinlerinin diğer proteinlerle en çok etkileşimde olan proteinler olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak MGST alt ailesine ait iki üye olan Pv-MGST-1 ve Pv-MGST-2 proteinlerinin de sadece kendi aralarında etkileşimde olduğu saptanmıştır.

Pv-GST genleri tuz ve kuraklık stresleri altında farklı ifade profilleri sergilemiştir. *Pv-DHAR-1* geninin ifade seviyesi stres uygulaması ile artış gösterirken *Pv-DHAR-2* geninin ifadesi stres uygulaması ile azalmıştır. *Pv-GSTU-23* ve *Pv-GSTL-2* gibi bazı genlerin de ifade seviyelerinin stresin etmenine göre artış gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde *Pv-GSTF-10* ve *Pv-GSTU-22* gibi bazı genlerin de ifade seviyelerinde stres etmenine bağlı olarak azalma görülmüştür. Bazı genlerin ise ifade seviyelerinde değişim gözlemlenmemiştir. Buna ek olarak, *Pv-EF1BG* genlerinin ifade düzeyleri her iki stres koşulunda da çok küçük değişikliklerle azalmış olsa da bu genlerin ifade düzeyleri in silico sürekli olarak yüksek bulunmuştur. Bu gen, ökaryotik translasyon uzama faktörü 1B'nin gama alt birimini kodlayan *GST* süper ailesinin bir üyesidir (Sheehan et al. 2001). *Pv-EF1BG*'nin translasyon mekanizmalarıyla ilişkili bir ürünü kodlayan bir gen olması nedeniyle, bu genin tüm koşullar altında sabit bir yüksek ifade seviyesine sahip olması muhtemeldir. Bu çalışmada gerçekleştirilen işlemler sonrasında iki farklı fasulye çeşidinde farklı *GST* genlerinin ifadelerinde çeşitlilik görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında *GST* genlerinin birkaç istisna dışında her iki stres koşulu altında da melatonin varlığında kontrol grubuna göre daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. İfade seviyeleri incelenen genlerin tuz ve kuraklık gibi iki farklı stres durumunda da iyileştirici etkisi olan melatonin varlığında daha fazla etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

GST'lerin bitkilerde birçok stres etmenine karşı savunmada görev aldığı bilinmektedir (Marrs 1996; Chen et al. 2012). Mısırdaki yapılan bir çalışmada, Edwards ve Owen (1986) tarafından *GST*'lerin bir herbisit olan atrazine karşı bitkiyi koruduğu bulunmuştur. Chen vd. (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada *Arabidopsis*'te *atgstul7* geninin nakavt mutantları su eksikliği stresinde aynı genin aşırı ifade edildiği transgenik *Arabidopsis*'e göre daha fazla hayatta kalmıştır. Bu çalışma ile *atgstul7* geninin etkinliği bildirilmiştir. Farklı bir çalışmada ise *Glycine soja*'ya ait *GsGST*'nin tütüne aktararak tütünde gelişmiş tuz ve kuraklık stresine tolerans bildirilmiştir (Ji et al. 2010). Srivastava ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise çeltiğe ait tau sınıfı bir *GST* geninin (*OsGSTU30*) *Arabidopsis*'te aşırı ifadesi, artan ağır metal

stresi ve kuraklık stresine karşı tolerans geliştirmiştir. Yine benzer şekilde 2019 yılında yapılmış bir diğer çalışmada *Populus trichocarpa*, *Populus yalongensis* ve *Populus euphratica* bitkilerinden alınan 3 ortolog *GST*'nin *Arabidopsis*'te tuz ve kuraklık stresine karşı yanıtı arttırıcı bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Yang et al. 2019).

Elde edilen veriler doğrultusunda bitkilerde *GST*'lerin en önemli üyesinin glutathione dehydrogenase/transferase (*DHAR*) olduğu söylenebilir. *DHAR* (dehidroaskorbat redüktaz) indirgenmiş glutatyon (*GSH*) kullanarak dehidroaskorbat'ın (*DHA*) askorbat'a (*AsA*) indirgenmesini katalize eden bir enzimdir. *DHAR* enzimi daha önceki çalışmalarda ıspanak yapraklarından (Hossain and Asada 1984), patates yumrularından (Dipierro and Borraccino 1991) ve çeltikten (Kato et al. 1997) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Eltayeb et al. 2006). Glutatyon redüktaz (*GR*), askorbat peroksidaz (*APX*) ve dehidroaskorbat redüktaz (*DHAR*) glutatyon metabolizmasındaki en önemli üç enzim olarak değerlendirilmektedir. Redoks reaksiyonları ve redoks katalizleri sayesinde askorbat-glutatyon (*AsA-GSH*) havuzunun korunmasında rol oynayan bu enzimler özellikle bitki antioksidan savunma mekanizmalarında büyük öneme sahiptir (Eltayeb et al. 2006, 2011).

Kuraklık, tuz stresi ve herbisit kullanımı gibi bitkilere olumsuz çevre koşulları oluşturan etmenler, bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (*ROT*) oluşumunu teşvik eder. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalar *ROT*'ların zararlı etkilerinin giderilmesini sağlar (Asada and Takashi, 1987; Mittler, 2002; Hung et al. 2005; Eltayeb et al. 2011). Bitkilerde antioksidatif enzimler arasında bulunan *DHAR*'ın aşırı ifadesi ozon, tuz, PEG, kuraklık, ağır metal stresleri gibi çoklu çevresel streslere karşı gelişmiş tolerans kazandırmıştır (Eltayeb et al. 2006; Yin et al. 2010; Eltayeb et al. 2011). *DHAR*'ın aşırı ifadesinin askorbat-glutatyon yolağı üzerine ciddi etkileri bildirilmiştir. Askorbik asit serbest radikallerin direkt olarak temizlenmesinde oldukça önemli bir moleküldür. *DHAR* ve *MDAR* (monodehidroaskorbat redüktaz) enzimleri ise askorbat yenilenmesi ve *GSH* (indirgenmiş glutatyon) havuzunun korunması için çok önemli enzimlerdir (Eltayeb et al. 2011). *DHAR* geninin aşırı ifadesinin *DHAR* aktivitesinde 4 kata kadar ve indirgenmiş askorbat miktarında ise 2 kata kadar artış sağladığı rapor edilmiştir. *DHAR* geninin aşırı ifadesinin domatestte tuz ve donma streslerine (Qin et al. 2015), patatestte herbisit, kuraklık ve tuz streslerine (Eltayeb et al.

2011), *Arabidopsis*'te fotooksidatif strese (Noshi et al. 2016) karşı toleransı artırdığı rapor edilmiştir. Tüm bunlara ilaveten *DHAR*'ın aşırı ifade edilmesinin çeltikte ürün verimini artırdığı da rapor edilmiştir (Kim et al. 2013, 2022). Bu tez çalışmasında fasulye *DHAR1* geninin tütün bitkisinde aşırı ifadesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen transgenik bitkiler ile yabancı tip tütün bitkileri kuraklık stresine maruz bırakılmış ve stresin oluşturduğu etkiler incelenmiştir.

Kuraklık stresi reaktif oksijen türlerinin artışına neden olan abiyotik stres etmenidir. Genel olarak stres etmenleri fotosentetik aktivitelerde azalmaya neden olur ve hücre zarı, protein, lipid ve DNA hasarlarına yol açabilir. H_2O_2 hücre içerisinde oksidatif fosforilasyon, bazı diğer metabolik olaylar sonucu veya streslere karşı yanıt olarak üretilen bir reaktif oksijen molekülüdür. H_2O_2 'nin asıl zararı, bu molekülün hücre zarından kolayca geçebilmesinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Toksik seviyelere çıkan H_2O_2 miktarı, üretildiği yerlerden uzak hücre konumlarına ulaşabilir ve hücrelerin kontrollü geçişini aşarak hücre içi hasara neden olabilir (Hossain et al. 1984). Bu nedenle H_2O_2 'yi indirgeyerek detoksifiye etmek canlılığın devamı için oldukça büyük öneme sahiptir. *PvDHAR1* geninin aşırı ifadesinin 12. saate kadar üretilen H_2O_2 seviyesini 24. saate kadar oldukça başarılı tolere ettiği saptanmıştır. Patateste yapılan çalışmada, *AtDHAR1* geninin aşırı ifade edilmesinin patates bitkisinin herbisit, kuraklık ve tuz stresinde H_2O_2 eliminasyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Eltayeb et al. 2011).

Kuraklık stresi altında meydana gelen hücre ve organel zarlarındaki çoklu yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondealdehit (MDA) oluşur. Lipid peroksidasyonunun derecesi dokulardaki malondialdehit miktarı ile tahmin edilebilir (Davey et al. 2005). *PvDHAR1* geninin aşırı ifadesi kontrole kıyasla kuraklık stresi altında MDA seviyelerinin genel olarak azalmasına yardımcı olmuştur. Artan MDA seviyeleri lipid peroksidasyonunda artış olduğu anlamına gelmektedir. Özellikle OE-7 aşırı ifade hattının 3 kata kadar artmış tolere edebildiği saptanmıştır. Benzer şekilde OE-1 ve OE-4 bitkilerinin de yaklaşık 2 kata kadar artmış MDA birikiminin azaltılmasında başarılı olduğutespit edilmiştir. DHAR enziminin rol aldığı AsA-GSH havuzu yolağı dikkate alındığında lipid peroksidasyonuna yol açabilecek ROT olan H_2O_2 'nin birikimi de iyi tolere edildiğinden MDA içeriklerinin de iyi tolere edilmesi beklenmiştir. Benzer bir şekilde tütün ve patates bitkisinde kuraklık ve ozon stresi altında (Eltayeb et al. 2006,

2011), *Arabidopsis*'te fotooksidatif stres altında (Noshi et al. 2017) *DHAR* geninin aşırı ifadesi sonrasında artan AsA seviyeleri bildirilmiştir. Bunlara ek olarak önemli ölçüde artan APX ekspresyonu ve aktivitesi yaprak biti ile enfekte olmuş mısır bitkisinde (Sytykiewicz 2016) rapor edilmiştir.

Fotosentetik organizmaların strese maruz kalmaları sonrasında fotosistem II (PSII) aktivitesinin engellenmesi durumu ortaya çıkar. Bu olay fotosistemin inhibisyonu (fotoinhibisyon) olarak adlandırılır. Bununla birlikte fotosentetik organizmalar PSII'nin hızlı onarımı yoluyla fotoinhibisyonu aşmaya çalışmaktadırlar. Bu nedenle fotoinhibisyonun derecesi, PSII'nin aldığı hasar ile bu hasarın onarımı arasındaki denge ile ölçülmektedir (Murata et al. 2007). Oksidatif stresin PSII'nin tamir mekanizmaları üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir (Warner et al. 1999). Ayrıca yine oksidatif stresin H_2O_2 üretimine neden olduğu da bilinmektedir. *PvDHAR1* geninin aşırı ifadesi direkt olarak PSII üzerine etkisi olmasa da H_2O_2 birikiminin azalmasına neden olacağından fotosistem etkinliğinin stresten daha az etkilenmesini sağlayabilir. Bu çalışmada tütün bitkisine aktarılan *PvDHAR1* geninin aşırı ifade edilmesi ile PSII'nin fotokimyasal verimliliğinin arttığı belirlenmiştir. Benzer bir sonuç olarak *Arabidopsis*'te *dhar1-1* ve *dhar1-2* genlerinin nakavtı sonrasında fotoinhibisyonun arttığı ve PSII fotokimyasal veriminin düştüğü rapor edilmiştir (Noshi et al. 2017).

Kuraklık stresi kloroplast yapısında bozulmaya neden olur ve membranlarda PSII'nin elektron transferi bu şekilde engellenmiş olur (Prasch and Sonnewald 2013). Elektron transferi engellendiğinde PSII için yeterli miktarda klorofil üretimi yapılamaz ve yavaşlayan bitki metabolizmasıyla birlikte klorofil miktarında azalma görülür (Li et al. 2024). *PvDHAR1* geninin tütün bitkisinde aşırı ifade edilmesi sonucunda OE-4 bitkisinin klorofil miktarında artış tespit edilmiştir. OE-1 bitkisinde ise uygulamanın öncesinde klorofil miktarında artış olduğu saptanmıştır. OE-1 ve OE-4 bitkilerinde *PvDHAR1*'in aşırı ifadesinin ortamda stres koşulu olmadığında bitkide klorofil miktarını artırdığı tespit edilmiştir. Literatürde *DHAR* geninin aşırı ifadesi ile artan bitki büyüklükleri ve ürün veriminde artış gibi fotosentez ile yakından ilişkili bulgular yer almaktadır (Chen et al. 2003; Eltayeb et al. 2006, 2011; Kim et al. 2013, 2022; Qin et al. 2015).

PvDHAR1 geninin aşırı ifadesi tütün bitkisinde kuraklık stresi ile mücadele etmeye yardımcı olmuştur. İfade seviyeleri en yüksek iki transgenik bitki olan OE-7 ve OE-9 bitkilerinin diğer analizleri dikkate alındığında bu bitkilerin H₂O₂ birikimini iyi bir şekilde tolere ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde OE-7 bitkisinin artan lipit peroksidasyonu ile başarılı bir şekilde mücadele ettiği tespit edilmiştir. Ciddi oranda artan ifade seviyelerine göre nispeten beklentilerin altında sonuç alınan diğer analizlerin nedeninin strese yanıt olarak DHAR'dan başka yanıt mekanizmalarının da görev yapmasıdır. Bitkilerin strese yanıt olarak su alımını artırdığı, su kaybını önlediği, stomaları kapatarak fotosentezi azalttığı ve bunlarla beraber bir takım morfolojik değişimlerin gerçekleştiği bilinmektedir. Yüksek organizmalarda bu tip değişimler birden fazla genin ifade edilmesinden, ifade seviyesinin artmasından ve/veya azalmasından/baskılanmasından kaynaklanabilir (Zhu et al. 2022).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında fasulye genomundaki *GST* genlerinin karakterizasyonu çeşitli biyoinformatik araçlar ve bilgisayar programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fasulye genomunda 55 *GST* geni keşfedilmiştir. Bu genlerin fasulyenin tüm kromozomlarına dağıldığı belirlenmiştir. Fasulye bitkilerine kuraklık ve tuz stresi uygulanmasının ardından yaprak dokularında *PvGST* genlerinin ifade değişimleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar görselleştirilmiştir. Bitkilerde ciddi bir öneme sahip olan glutasyon yolağının üyesi olan *GST*'lerin tuz ve kuraklık stresi koşullarında ifade düzeylerinin değiştiği ortaya konmuştur. Çeşitler aynı türün farklı bireyleridir, bu da onların çevresel uyaranlara vereceği tepkilerin değişebileceği anlamına gelmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *GST* ailesinin strese karşı önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Bunlara ek olarak *PvDHAR1* geninin transgenik yaklaşımla kuraklık stresi altında fonksiyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Fasulye *PvDHAR1* geninin bütün bitkisine aktararak aşırı ifadesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler ve analizler sonrasında *PvDHAR1* geninin kuraklık stresine karşı toleransı artırabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin *PvDHAR1* geninin kuraklık stresine karşı yanıtındaki literatür boşluğunu dolduracağı beklenmektedir.

Tohumlardan elde edilecek bitkilerin (T_2 ve sonraki jenerasyonlarda) kuraklık stresine verilen yanıtı sürdürülebilirliğinin araştırılması önerilmektedir. Ayrıca *PvDHAR1* geninin susturulması ile ortaya çıkması muhtemel eksikliklerin derinlemesine araştırılarak bu genin fonksiyonel çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, M. Z., Nasir, J. A., Ahmed, S., Ahmad, B., Sana, A., Salman, S., Shah, Z. and Yang, C. 2020. Genome-wide analysis of glutathione S-transferase gene family in *G. max*. *Biologia*, 75(10), 1691-1705.
- Anonymous, 2017. Web Sitesi: www.biorender.com, Erişim Tarihi: 31.05.2022
- Anonymous, 2023. Web Sitesi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>, Erişim Tarihi: 04.11.2024.
- Anonymous, 2024a. Web Sitesi: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>, Erişim tarihi: 01.10.2024.
- Anonymous, 2024b. Web Sitesi: <https://ourworldindata.org/explorers/global-food>, Erişim tarihi: 22.10.2024.
- Anonymous, 2024c. Web Sitesi: <https://goldbio.com/articles/article/a-quick-overview-of-agrobacterium-for-plant-transformation>, Erişim Tarihi: 01.11.2024.
- Arnao, M.B. and Hernández-Ruiz, J. 2009. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. *Journal of pineal research*, 46(1), 58-63.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208-218.
- Asada, K. and M. Takahashi. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, In: *Photoinhibition*. Kyle, D.J., Osmond, B., Arntzen C.A. (eds), Elsevier, 227–287, Amsterdam.
- Aygören, A. S., Güneş, E., Muslu, S., Kasapoğlu, A. G., Yiğider, E., Aydın, M., Büyük, İ. and İlhan, E. 2023. Genome-Wide Analysis and Characterization of SABATH Gene Family in *Phaseolus vulgaris* Genotypes Subject to Melatonin under Drought and Salinity Stresses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 41(2), 242-259.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., Li, W.W. 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34, W369-W373.
- Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Breton, M. F., Discala, F., Bacri, L., Foster, D., Pelta, J. and Oukhaled, A. 2013. Exploration of Neutral Versus Polyelectrolyte Behavior of Poly(ethylene glycol)s in Alkali Ion Solutions using Single-Nanopore Recording. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(13), 2202-2208.

- Broggini, G.A.L., Durel, C.E., Vergne, E., Chevreau, E., Fahrenttrapp, J., Vanblaere, T., Peil, A., Flachowsky, H., Hanke, M.V., Krens, F.A., Schouten, H.J. and Gessler, C. 2013. Cisgenic approach for improved disease resistance in apple. *Acta Horticulture*, 974, 117-121. DOI: 10.17660/ActaHortic.2013.974.13
- Büyük, İ., Inal, B., İlhan, E., Tanriseven, M., Aras, S. and Erayman, M. 2016. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean. *Mol. Biol. Rep.* 43, 1251-1266.
- Cannon, S.B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N.D. and May, G. 2004. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 4, 10.
- Castaneda, R., Doan, D., Newhouse, D. L., Nguyen, M., Uematsu, H. and Azevedo, J. P. 2016. Who are the poor in the developing world?. *World Bank Policy Research Working Paper*, 7844.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H.R., Frank, M.H., He, Y. and Xia, R. 2020. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Molecular plant*, 13(8), 1194–1202.
- Chen, J.H., Jiang, H.W., Hsieh, E.J., Chen, H.Y., Chien, C.T., Hsieh, H.L. and Lin, T.P. 2012. Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiology*, 158(1), 340-351.
- Chen, Z., Young, T. E., Ling, J., Chang, S.-C. and Gallie, D. R. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3525-3530.
- Cooley, M. B., D'Souza, M. R. and Kado, C. I. 1991. The virC and virD operons of the *Agrobacterium* Ti plasmid are regulated by the ros chromosomal gene: Analysis of the cloned ros gene. *Journal of Bacteriology*, 173(8), 2608-2616.
- Dai, X., Zhuang, Z., Zhao, P.X. 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*, 46(W1), W49–W54.
- Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. and Swennen, R. L. 2005. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 201-207.
- Davidova, I., Ruban, O. and Herbina, N. 2022. Pharmacological activity of amino acids and prospects for the creation of drugs based on them. *Annals of Mechnikov's Institute*, (4), 11-31.
- Deutsch, J. C. 2000. Dehydroascorbic acid. *Journal of chromatography A*, 881(1-2), 299-307.
- Dipierro, S. and Borraccino, G. 1991. Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry*, 30(2), 427-429.

- Dong, Y., Li, C., Zhang, Y., He, Q., Daud, M. K., Chen, J. and Zhu, S. 2016. Glutathione S-Transferase Gene Family in *Gossypium raimondii* and *G. arboreum*: Comparative Genomic Study and their Expression under Salt Stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 139.
- Edwards, R. and Owen, W. J. 1986. Comparison of glutathione S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells. *Planta*, 169(2), 208-215.
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Shibahara, T., Inanaga, S. and Tanaka, K. 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiologia Plantarum*, 127(1), 57-65.
- Eltayeb, A. E., Yamamoto, S., Habora, M. E. E., Yin, L., Tsujimoto, H. and Tanaka, K. 2011. Transgenic potato overexpressing Arabidopsis cytosolic AtDHAR1 showed higher tolerance to herbicide, drought and salt stresses. *Breeding Science*, 61(1), 3-10.
- Frova, C. 2003. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol Plant*, 119, 469-479.
- Gelvin, S. B. 2017. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, 51, 195-217.
- Gentry, H.S. 1969. Origin of the Common Bean, *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany*, 23(1), 55-69.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. and Rokhsar, D.S. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* Jan;40 (Database issue), D1178-1186. doi: 10.1093/nar/gkr944.
- Greef, W. D., Delon, R., Block, M. D., Leemans, J. and Botterman, J. 1989. Evaluation of Herbicide Resistance in Transgenic Crops Under Field Conditions. *Bio/Technology*, 7(1), 61-64.
- Gregorio Jorge, J., Villalobos-López, M.A., Chavarría-Alvarado, K.L., Ríos-Meléndez, S., López-Meyer, M. and Arroyo-Becerra, A. 2020. Genome-wide transcriptional changes triggered by water deficit on a drought-tolerant common bean cultivar. *BMC plant biology*, 20(1), 1-20.
- Griffith, F. 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene*, 27(2), 113-159.
- Guidi, L., Lo Piccolo, E. and Landi, M. 2019. Chlorophyll Fluorescence, Photoinhibition and Abiotic Stress: Does it Make Any Difference the Fact to Be a C3 or C4 Species? *Frontiers in Plant Science*, 10(Article: 174).

- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Chen, X. and Luo, J. C. 2007. GSDS: a gene structure display server. *Hereditas*, 29(8), 1023–1026.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R. 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 51–88.
- He, G., Guan, C.N., Chen, Q.X., Gou, X.J., Liu, W., Zeng, Q.Y. and Lan, T. 2016. Genome-wide analysis of the glutathione S-transferase gene family in *Capsella rubella*: identification, expression, and biochemical functions. *Front Plant Sci*, 7(Article: 1325).
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I. E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K. and Lacomme, C. 2005. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant physiology*, 138(4), 2155–2164.
- Hiz, M.C., Canher, B., Niron, H. and Turet, M. 2014. Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. *PloS one*, 9(3), e92598.
- Horemans, N., Foyer, C. H., Potters, G., Asard, H. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant physiology and biochemistry*, 38(7-8), 531-540.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J. and Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587.
- Hossain, M. A. and Asada, K. 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology*, 25(1), 85-92.
- Hossain, M. A. and Fujita, M. 2010. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(1), 19-29.
- Hossain, M. A., Nakano, Y. and & Asada, K. 1984. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant and Cell Physiology*, 25(3), 385-395.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J., Gao, G. 2015. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296–1297.
- Hung, S. H., Yu, C. W. and Lin, C.H. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 1–10.
- Islam, M.D., Choudhury, M., Majlish, A.K., Tahimna, I. and Ghosh, A. 2018. Comprehensive genome-wide analysis of glutathione S-transferase gene family in

- potato (*Solanum tuberosum* L.) and their expression profiling in various anatomical tissues and perturbation conditions. *Gene*, 639, 149–162.
- Islam, S., Rahman, I. A., Islam, T. and Ghosh, A. 2017. Genome-wide identification and expression analysis of glutathione S-transferase gene family in tomato: Gaining an insight to their physiological and stress-specific roles. *PLOS ONE*, 12(11), e0187504.
- İlhan, E. 2018. *Eucalyptus grandis* YABBY Transkripsiyon Faktörlerinin Genom Bazında Analizi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 5(2), Article 2.
- Jain, M., Ghanashyam, C. and Bhattacharjee, A. 2010. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics*, 11,73.
- Ji, W., Zhu, Y., Li, Y., Yang, L., Zhao, X., Cai, H. and Bai, X. 2010. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Biotechnology letters*, 32(8), 1173-1179.
- Jiang, C. J., Shimono, M., Maeda, S., Inoue, H., Mori, M., Hasegawa, M., Sugano, S. and Takatsuji, H. 2009. Suppression of the rice fatty-acid desaturase gene OsSSI2 enhances resistance to blast and leaf blight diseases in rice. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(7), 820–829.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. and Claverys, J.-P. 2014. Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(3), 181-196.
- Kang, G., Li, G., Ma, H., Wang, C. and Guo, T. 2013. Proteomic analysis on the leaves of TaBTF3 gene virus-induced silenced wheat plants may reveal its regulatory mechanism. *Journal of proteomics*, 83, 130-143.
- Kasapoğlu, A. G. 2024. Fasulyede GPAT gen ailesinin karakterizasyonu ve kuraklık stresi altında PvGPAT1 geninin transgenik yaklaşımla fonksiyonunun belirlenmesi. Doktora Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, 118, Erzurum.
- Kavas, M., Gökdemir, G., Seçgin, Z. and Bakhsh, A. 2020. Ectopic expression of common bean ERF transcription factor PvERF35 promotes salt stress tolerance in tobacco. *Plant Biology*, 22(6), 1102-1112.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6),845-858.
- Kerk, N. M., Feldman, N. J. 1995. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development*, 121(9), 2825-2833.

- Kidwai, M., Dhar, Y. V., Gautam, N., Tiwari, M., Ahmad, I. Z., Asif, M. H. and Chakrabarty, D. 2019. *Oryza sativa* class III peroxidase (OsPRX38) overexpression in *Arabidopsis thaliana* reduces arsenic accumulation due to apoplastic lignification. *Journal of hazardous materials*, 362, 383-393.
- Kim, Y. S., Kim, I. S., Shin, S. Y., Park, T. H., Park, H. M., Kim, Y. H., Lee, G. S., Kang, H. G., Lee, S. H. and Yoon, H. S. 2014. Overexpression of Dehydroascorbate Reductase Confers Enhanced Tolerance to Salt Stress in Rice Plants (*Oryza sativa* L. japonica). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(6), 444-456.
- Kim, Y.-S., Kim, I.-S., Bae, M.-J., Choe, Y.-H., Kim, Y.-H., Park, H.-M., Kang, H.-G. and Yoon, H.-S. 2013. Homologous expression of cytosolic dehydroascorbate reductase increases grain yield and biomass under paddy field conditions in transgenic rice (*Oryza sativa* L. japonica). *Planta*, 237(6), 1613-1625.
- Kim, Y.-S., Park, S.-I., Kim, J.-J., Shin, S.-Y., Kwak, S.-S., Lee, C.-H., Park, H.-M., Kim, Y.-H., Kim, I.-S. and Yoon, H.-S. 2022. Over-Expression of Dehydroascorbate Reductase Improves Salt Tolerance, Environmental Adaptability and Productivity in *Oryza sativa*. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(6), 1077.
- Kondou, Y., Higuchi, M., Matsui, M. 2010. High-throughput characterization of plant gene functions by using gain-of-function technology. *Annual review of plant biology*, 61, 373-393.
- Korgaonkar, S., Bhandari, R. 2023. Drought Stress in Plants: Effects and Tolerance. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 19(1), 5-17.
- Krügel, T., Lim, M., Gase, K., Halitschke, R., Baldwin, I. T. 2002. Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana attenuata*, a model ecological expression system. *Chemoecology*, 12, 177-183.
- Kumar, M., Choi, J., An, G., Kim, S. R. 2017. Ectopic expression of OsSta2 enhances salt stress tolerance in rice. *Frontiers in plant science*, 8, 316.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Kwon, S.-Y., Choi, S.-M., Ahn, Y.-O., Lee, H.-S., Lee, H.-B., Park, Y.-M. and Kwak, S.-S. 2003. Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *Journal of Plant Physiology*, 160(4), 347-353.
- Lallement, P.A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A. and Rouhier, N. 2014. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Front Pharmacol*, 5(192).
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. and Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory

elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325–327.

- Leterrier, M., Corpas, F. J., Barroso, J. B., Sandalio, L. M. and del Río, L. A. 2005. Peroxisomal Monodehydroascorbate Reductase. Genomic Clone Characterization and Functional Analysis under Environmental Stress Conditions. *Plant Physiology*, 138(4), 2111-2123.
- Letunic, I. and Bork, P. 2011. Interactive tree of life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, 39, W475- W478.
- Li, J., Bai, X., Ran, F., Zhang, C., Yan, Y., Li, P. and Chen, H. 2024. Effects of combined extreme cold and drought stress on growth, photosynthesis, and physiological characteristics of cool-season grasses. *Scientific Reports*, 14(1), 116.
- Li, X., Guo, C., Li, Z., Wang, G., Yang, J., Chen, L., Hu, Z., Sun, J., Gao, J., Yang, A., Pu, W. and Wen, L. 2022. Deciphering the roles of tobacco MYB transcription factors in environmental stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- Licciardello, C., D'Agostino, N., Traini, A., Recupero, G.R., Frusciante, L., Chiusano, M.L. 2014. Characterization of the glutathione S-transferase gene family through ESTs and expression analyses within common and pigmented cultivars of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *BMC Plant Biol*, 14, 39.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Maltseva, E., Iskakova, G., Ismagul, A., Chirkin, A., Naizabayeva, D., Ismagulova, G., Malakhova, N., Aitkhozhina, N., Eliby, S. and Skiba, Y. 2021. A cisgenic approach in the transformation of bread Wheat cv. Saratovskaya 29 with class I chitinase gene. *The Open Biotechnology Journal*, 15(1).
- Marrs, K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 127-158.
- Mazari, A. M. A., Zhang, L., Ye, Z.-W., Zhang, J., Tew, K. D., and Townsend, D. M. 2023. The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. *Biomolecules*, 13(4), Article 4.
- McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S.-M. C., Koeppe, M. K. and O'Keefe, D. P. 2000. A Genomics Approach to the Comprehensive Analysis of the Glutathione S-Transferase Gene Family in Soybean and Maize. *Plant Physiology*, 124(3), 1105.
- Mishra, A. K. and Singh, V. P. 2011. Drought modeling—A review. *Journal of Hydrology*, 403(1-2), 157-175.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.

- Mohsenzadeh, S., Esmaili, M., Moosavi, F., Shahrtash, M., Saffari, B. and Mohabatkar, H. 2011. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *Afr J Biotechnol*, 10, 8160–8165.
- Mukeshimana, G., Ma, Y., Walworth, A. E., Song, G. Q. and Kelly, J. D. 2013. Factors influencing regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biotechnology Reports*, 7, 59-70.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev, S. I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(6), 414-421.
- Muslu, S., Kasapoğlu, A. G., Güneş, E., Aygören, A. S., Yiğider, E., İlhan, E. and Aydın, M. (2024). Genome-wide analysis of glutathione S-transferase gene family in *P. vulgaris* under drought and salinity stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 42(1), 57-76.
- Muslu, S., Turan, M. ve İlhan, E. 2024. Biyoinformatiğe Giriş, In: Temel Moleküler Biyoloji. Adem Kara (ed), Akademisyen Kitabevi, 341-364, Ankara.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M. and Fujita, M. 2015. Glutathione-induced drought stress tolerance in mung bean: coordinated roles of the antioxidant defence and methylglyoxal detoxification systems. *AoB Plants*, 7.
- Nester, E. W. 2015. *Agrobacterium*: Nature’s genetic engineer. *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. and Foyer, C. H. 2000. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1465-1475.
- Noshi, M., Yamada, H., Hatanaka, R., Tanabe, N., Tamoi, M. and Shigeoka, S. 2017. Arabidopsis dehydroascorbate reductase 1 and 2 modulate redox states of ascorbate-glutathione cycle in the cytosol in response to photooxidative stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(3), 523-533.
- Okla, M. K., Saleem, M. H., Saleh, I. A., Zomot, N., Perveen, S., Parveen, A., Abasi, F., Ali, H., Ali, B., Alwasel, Y. A., Abdel-Maksoud, M. A., Oral, M. A., Javed, S., Ercisli, S., Sarfraz, M. H. and Hamed, M. H. 2023. Foliar application of iron-lysine to boost growth attributes, photosynthetic pigments and biochemical defense system in canola (*Brassica napus* L.) under cadmium stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 648.
- Pearson, W. R. 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol* 401, 186–204.

- Pignocchi, C. and Foyer, C. H. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 379-389.
- Prasch, C. M. and Sonnewald, U. 2013. Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiology*, 162(4), 1849-1866.
- Prelich, G. 1999. Suppression mechanisms: themes from variations. *Trends in Genetics*, 15(7), 261-266.
- Prelich, G. 2012. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854.
- Qin, A., Huang, X., Zhang, H., Wu, J., Yang, J. and Zhang, S. 2015. Overexpression of PbDHAR2 from *Pyrus sinkiangensis* in transgenic tomato confers enhanced tolerance to salt and chilling stresses. *HortScience*, 50(6), 789-796.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. and Lopez, R. 2005. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_2): W116-W120.
- Rodríguez-Trelles, F., Tarrío, R. and Ayala, F. J. 2005. Is ectopic expression caused by deregulatory mutations or due to gene-regulation leaks with evolutionary potential?. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(6), 592–601.
- Rong, W., Qi, L., Wang, A., Ye, X., Du, L., Liang, H., Xin, Z. and Zhang, Z. 2014. The ERF transcription factor TaERF3 promotes tolerance to salt and drought stresses in wheat. *Plant biotechnology journal*, 12(4), 468–479.
- Rosales-Serna, R., Kohashi-Shibata, J., Acosta-Gallegos, J. A., Trejo-López, C., Ortiz-Cereceres, J., Kelly, J. D. 2004. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. *Field crops research*, 85(2-3), 203-211.
- Rosegrant, M. W., Koo, J., Cenacchi, N., Ringler, C., Robertson, R. D., Fisher, M., Cox, C., Garrett, K., Perez, N.D. and Sabbagh, P. 2014. Food security in a world of natural resource scarcity: The role of agricultural technologies. International Food Policy Research Institute, 154, Washington, DC.
- Saidi, Y., Schaefer, D. G., Goloubinoff, P., Zrýd, J.-P. and Finka, A. 2009. The CaMV 35S promoter has a weak expression activity in dark grown tissues of moss *Physcomitrella patens*. *Plant Signaling & Behavior*, 4(5), 457.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., Singh, K.B. 2009. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex

stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J*, 58(1):53–68.

- Schell, J. and Van Montagu, M. 1977. The Ti-Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, A Natural Vector for the Introduction of NIF Genes in Plants? In: Genetic Engineering for Nitrogen Fixation. Hollaender, A., Burris, R. H., Day, P. R., Hardy, R. W. F., Helinski, D. R., Lamborg, M. R., Owens, L. and Valentine, R. C. (eds), Springer, 159-179, US.
- Schneider, K.A., Rosales-Serna, R., Ibarra-Perez, F., Cazares-Enriquez, B., Acosta-Gallegos, J.A., Ramirez-Vallejo, P., Wassimi, N. and Kelly, J.D. 1997. Improving common bean performance under drought stress. *Crop Science*, 37(1), 43-50.
- Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current opinion in biotechnology*, 14(2), 194-199.
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H. and Battaglia, M. L. 2021. Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. *Plants*, 10(2), 259.
- Shah, S. H., Ali, S., Hussain, Z., Jan, S. A. and Ali, G. M. 2016. Genetic Improvement of Tomato (*Solanum lycopersicum*) with AtDREB1A Gene for Cold Stress Tolerance using Optimized *Agrobacterium*-mediated Transformation System. *International Journal of Agriculture & Biology*, 18(3).
- Shams, M. K. (2019). Tuz stresinin biberde bitki gelişimi, fizyolojik ve biokimyasal özellikler, dna metilasyonu ile tohum çimlenmesi üzerine etkisi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, 156, Erzurum.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant growth regulation*, 46(3), 209-221.
- Shastry, B. S. 1995. Overexpression of genes in health and sickness. A bird's eye view. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1), 1-13.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: Implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal*, 360(Pt 1), 1-16.
- Smirnoff, N. and Wheeler, G. L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in plant sciences*, 19(4), 267-290.
- Srivastava, D., Verma, G., Chauhan, A.S., Pande, V. and Chakrabarty, D. 2019. Rice (*Oryza sativa* L.) tau class glutathione S-transferase (OsGSTU30) overexpression

- in *Arabidopsis thaliana* modulates a regulatory network leading to heavy metal and drought stress tolerance. *Metallomics*, 11(2), 375-389.
- Suyama, M., Torrents, D. and Bork, P. 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Research*, 34, W609-W612.
- Sytykiewicz, H. 2016. Expression Patterns of Genes Involved in Ascorbate-Glutathione Cycle in Aphid-Infested Maize (*Zea mays* L.) Seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 268.
- Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P. and Mi, H. 2022. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*, 31(1), 8-22.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876-4882.
- Ushimaru, T., Nakagawa, T., Fujioka, Y., Daicho, K., Naito, M., Yamauchi, Y., Nonaka, H., Amako, K., Yamawaki, K. and Murata, N. 2006. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 163(11), 1179-1184.
- Várallyay, É., Giczey, G., Burgyán, J. 2012. Virus-induced gene silencing of Mlo genes induces powdery mildew resistance in *Triticum aestivum*. *Archives of virology*, 157, 1345-1350.
- Verma, S., Kumar, A. and Modgil, M. 2023. Impact of cefotaxime and kanamycin on in vitro regeneration via *Agrobacterium* mediated transformation in apple cv. Red Chief. *Plant Physiology Reports*, 28, 34-42.
- Vickers, C. E., Schenk, P. M., Li, D., Mullineaux, P. M. and Gresshoff, P. M. 2007. pGFPGUSPlus, a new binary vector for gene expression studies and optimising transformation systems in plants. *Biotechnology Letters*, 29(11), 1793-1796.
- Wang, C.-T., Ru, J.-N., Liu, Y.-W., Li, M., Zhao, D., Yang, J.-F., Fu, J.-D. and Xu, Z.-S. 2018. Maize WRKY Transcription Factor ZmWRKY106 Confers Drought and Heat Tolerance in Transgenic Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3046.
- Wang, Y., He, X., Ma, W., Zhao, X., Li, B. and Tong, Y. 2014. Wheat PROTON GRADIENT REGULATION 5 is Involved in Tolerance to Photoinhibition. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(6), 1206-1215.
- Ward, J. E., Akiyoshi, D. E., Regier, D., Datta, A., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1988. Characterization of the *virB* operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(12), 5804-5814.

- Warner, M. E., Fitt, W. K. and Schmidt, G. W. 1999. Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8007-8012.
- Weinstein, J.N., Myers, T.G., O'Connor, P.M., Friend, S.H., Fornace, A.J., Kohn, K.W., Fojo, T., Bates, S.E., Rubinstein, L.V., Anderson, N.L., Buolamwini, J.K., van Osdol, W.W., Monks, A.P., Scudiero, D.A., Sausville, E.A., Zaharevitz, D.W., Bunow, B., Viswanadhan, V.N., Johnson, G.S., Wittes, R.E. and Paull, K.D. 1997. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science*, 275(5298), 343–349.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. and Hochstrasser, D.F. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.* 112, 531-552.
- Würdig, J., Flachowsky, H., Saß, A., Peil, A. and Hanke, M. V. 2015. Improving resistance of different apple cultivars using the Rvi6 scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/FRT recombinase system. *Molecular Breeding*, 35(3), 95.
- Yang, Q., Liu, Y.J. and Zeng, Q.Y. 2014. Biochemical functions of the glutathione transferase supergene family of *Larix kaempferi*. *Plant Physiol Biochem*, 77, 99–107.
- Yang, Q., Liu, Y.J. and Zeng, Q.Y. 2019. Overexpression of three orthologous glutathione S-transferases from *Populus* increased salt and drought resistance in *Arabidopsis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 83, 57-61.
- Yang, Z.H. 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1586-1591.
- Yao, P., Sun, L., Dekomah, S., Bi, Z., Sun, C., Mao, J., Zhang, C., Qin, T., Wang, Y., Liu, Y., Liu, Z., Ali, K. and Bai, J. 2023. Evolutionary Analysis of StSnRK2 Family Genes and Their Overexpression in Transgenic Tobacco Improve Drought Tolerance. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1000.
- Yin, L., Wang, S., Eltayeb, A. E., Uddin, M. I., Yamamoto, Y., Tsuji, W., Takeuchi, Y. and Tanaka, K. 2010. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta*, 231(3), 609–621.
- Yoshida, S., Tamaoki, M., Shikano, T., Nakajima, N., Ogawa, D., Ioki, M., Aono, M., Kubo, A., Kamada, H., Inoue, Y. and Saji, H. 2006. Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 47(2), 304-308.
- Zeng, X., Zeng, Z., Liu, C., Yuan, W., Hou, N., Bian, H., Zhu, M. and Han, N. 2017. A barley homolog of yeast ATG6 is involved in multiple abiotic stress responses and stress resistance regulation. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 115, 97–106.

- Zhao, Y.W., Wang, C.K., Huang, X.Y. and Hu, D.G. 2021. Genome-wide analysis of the glutathione S-transferase (GST) genes and functional identification of MdGSTU12 reveals the involvement in the regulation of anthocyanin accumulation in apple. *Genes*, 12(11), 1733.
- Zhu, Y., Liu, Y., Zhou, K., Tian, C., Aslam, M., Zhang, B., Liu, W. and Zou, H. 2022. Overexpression of ZmEREBP60 enhances drought tolerance in maize. *Journal of Plant Physiology*, 275, 153763.



EKLER

EK-1

Gen ürünlerinin (proteinlerin) sekans bilgileri:

>Pv-DHAR-1

MSTARVQVSACALSTAVNHLRLRPNAVVSFTNHFRKSLRVVSMSSVPPSQPF EIAVKASLTTPN
RLGDCPFCQRVLLTLEEKHLPYEPKLVDFTNPEWFRTVNPDGKVPVIKFDEKWVPDSDVITQTL
EEKYSPPLVTPPEKATVGSKIFSTFIGFLKSKDPNDGTEQALLSELSSFNDYIKENGP FINGNEISA
ADLSLGPPLYHLEIALGHYKKWTVPDSLTSLSYTKAIFLRESFIKTS AQPQDVIEGWRPKVEG

>Pv-DHAR-2

MAVEVAVKAAVGAPTVLGDCPFSQRVLLTLEEKIPYKLHLIDLSNKPEWFLGVNPEGKVPVAL
FDGKWVSDSDVIVGILEEKYPEISLITPPEFATVGSKIFGSFVTLKSKDPNDGTEQALLAELSALD
EHLKANGPYVAGEKVTAVDLSLAPKLYHLVVVLGHFKKWSVPESLAHVHNYTKLLFSRESFEK
TKPPKEEYVIAGWAPKVNG

>Pv-EF1BG-1

MAPLILHGGKTNKNSYKTLIAAQYAGVQVELAPNFEMGVSNKTPQFLQMNPIGKVPVLETPDGP
VFESNSIARYVARLSGDNTLYGSSFFEYAQIEQWIDFSSLEIDANIHKWYAPRFGRGPYLPAAEAAA
ISALKRALDALNTHLASNTYLVGHSVTLADIILTCNLYLGFANILVKSFTSEFPHVERYFWTLVNQ
PNFRKILGQVKQTEAVPPVQS AKKPSQPKETKAKAKDEPKKEAKKEPEKPKEEAEAEAPKPKPK
NPLDLLPPSPMILDEWKRLYSNTKSNFREVAIKGFWD MYDPEGYSLWFCNYKYNDENTVSFVT
MNKVGGLQRM DLARKYAFGKMLVIGSNPPFKVKGLWLF RGQEIPKFVIDECYDMELYEWTKV
DISDEAQKERV SQMIEDYEPFEGEALLDAKCFK

>Pv-EF1BG-2

MALILHATRRNKNVYKSLIAAEYSGVELELAPNFEMFVTTKTPEFLKMNPIGKVPVLETPDGPIFE
SNAIARYVARLNGDNALYLSTPIDNARIDQWIDFSSLEIDANILKVYIPRLGYTPYFPPVEEAANSA
LKRALGALNTHLASNTYLVGHSVTLADIIMICNLYLGFQILVKSFTSEFPHVERYFWTLVNQPNF
RKILGQVKQTD AVPPVASFKKPSQPKESKPEPKDEPKKVAKPEPEKPKVEAEAEAPKPKPKNPLD
LLPPSKMILDEWKRLYSNTKTNFREVAIKGFWD MYDPEGYSLWFCDYKYNDENTVSFVTLNKV
GGFLQRM DLARKYAFGKMLVIGSQAPFKVKGLWLF RGQEIPKFVMDECYDMELYEWTKVDISD
EAQKERV SQMIEDYEPFEGESLLDAKCFK

>Pv-GHR-1

MVGIIHLVGMARSSMDEISNSGAFVRSASTFRNWISRD PNSSQFPPESGRYHLYVSYACPWASRCL
AYLNIKGLNKAISFS AVKPIFERTKESDEYKGWVFPDSETEVPGAEPDRLNGAKSIRELYEIASAN
YTGKYTVPV LWDKKLKTIVN NESSEIIRMLNTEFN NIAENPSFDLYPADLKALIDETNEWVYDSIN
NGVYKCGFAKKQEPHNEAARQLFGALDKCENILSKQRYICGNTL TEADIRLFVTLIRFDEVYAVH
FKCNKLLHEYPNLFNYTKDIFQIPGISSTVNMEHIK LHYYGSHPSINPFGIVPVGPNIDFSAPHDR
ERFSA

>Pv-GSTF-1

MAAPPVKVYGPPMSTAVSRVLACLEKDVQFQLIPVNMAKGEHRSPEFRKLHPFGQVPAFQDG
DNISLFESRAICRYVCEKYGDRGNKELYGRNPLAKASIDQWLEAEAQNFNPPSSTLVFQLAFAPR
MKIKQDEGAIKQSKEKLAKVLDVYDKRLAESRFLAGDDFSLADLSHLPNAHYLVAAADAAPLF
TSPNVARWWDEISSRDSWKKVVDLQRGP

>Pv-GSTF-2

MVVKVYGP TYASPKRVLVCLIEKEIEFETVDVDL FKG EHK EPEFLKLQPF GSVPVIQDGDYTL YE
SRAIRYLA EKYKEQGTELLGKTIEEKGLVEQWLEVEAHNFHPPLYNLVINILFAPLMGAPSDQK
VIEESDKKLEKVL DVYEERLSNSKYL AGDFFSLADLSHLPFGHYLVNQTGRGNLVRERK HVNA
WWDDISNRPSWKKVLQQYKYPV

>Pv-GSTF-3

MVVKVYGP TYASPKRVLVCLIEKEIEFETVDVDL FKG EHK EPEFLKLQPF GSVPVIQDGDYTL YE
SRAIRYFA EKYKEQGTELLGKTIEEKGLVEQWLEVEAHNFHPPLYNLVINILFAPLKGVPSDQKV
IEESDKKLEKVL DVYEERLSNSKYL AGDFFSLADLSHLPFGHYLVNQTGRGNLVRERK HVNAW
WDDISNRPSWKKVLQQYKYPV

>Pv-GSTF-4

MVVKVYGP DYGSTKGVLCLIEKEIEFETVHVDGFKGEHKQPEY LKMQPFG LFPVVDGDYVL
YESRAIRYFA EKYKNQGTDLGKTVEDRGLVEQWLDVEAHNFTPPIYSLVKIYFASVLEGVPA
DPKAIKENEEKIEKYLDIYEKRLSQT KYLAGDFFSLADLNHLPFTSYLMNEMEKGMVRERKHV
SAWWDDISSRPSWKKVLQDYKNPYDVLKEMNLVN

>Pv-GSTF-5

MVVKVFGPT YGCPKR VVCLIEKEIEFETVDVDL FKG EHK EPEFLKLQPF GSVPVIQDGDYTL YE
SRAIRYFA EKYKEQGTELLGKTIEEKGLVEQWLEVEAHNFHPPLYNLVINILFAPLKGVPSDQKV
IEESDKKLEKVL DVYEERLSNSKYL AGDFFSLADLSHLPFGHYLVNQTGRGNLVRERK HVNAW
WDDISNRPSWKKVLQLYKYAV

>Pv-GSTF-6

MMVVKVYGEARAACPQRVMVCLLEKGV EQLVHIDLQGGQQKTPQFLLQPF GQVPVVEDGD
FRLFESRAIRY YATKYADRGTELLGKTLEERALVEQWLEVEAHNFNNLCFSIMLQLVILPKMGK
VGDLALAKKGEEDIGKVL DVYESRLSESTYLAGDHFSLADLSHLPGLGHLIEEAKLGHLVTQRK
NVNAWWEKISSRPAWKKLKNMVH

>Pv-GSTF-7

MATIKLHGNPFSAATMRATASLYE KQLEFEFIMIDMKNGEHKKEPFLLLNPF GQVPVAFEDGDLKL
FESRAISQYIVHEYADKGTQLISSDSKKMATIRMWMEIESQRYDQAASKLVWELAVKPMYGLPM
DPAAVEQAEGMLNTTLD FYEKTLSNSKYL AGDCFTLADLHHLPTIHYLMNTSSKKLFESRPHVT
AWVADITARPAWSKVLAMQTNLSDK

>Pv-GSTF-8

MALKLYGLPMSTNTTRVMICLHEKEVDFELVPVNVFSAE HKQPPFLSKNPFGLIPVLEDGELTLF
ESRAITAYVA EKFKETGPD LIRHKDAKEGAVVKVWTEVEAHYYEP AVSPIIYEHFVAPFQGKEPD
KSVIDSNVEKLLKVL DVYEAKLSSTKYLAGEFYSLADLSHVSETHYLMQTPCASMITERPHVKA
WWEDISSRPAFNKVEGGMTFGKNQE

>Pv-GSTF-9

MVVKVYGP HSASAKRVLVCLLEKEIEFEVVPVDLLKG EHKGP EFLKLQPF GAVPVIQDGDYTL
YESRAIMRY YADKYRSQGIELVGRTP EERG VVEQWLEVEAHNFNPPANDLAVHVL FAPFFGITP
DPK LIEESEAKLLKVL DVYEERLSKSKYLGGDFFSLADISHLPTYFIVNKMNKEYLIRERKHVSG
WWDDISSRPSWKKVIELYLPI

>Pv-GSTF-10

MVVKVYGP HCASTKRVLVCLLEKDVEFEVVPVDLTKGEHKDPEFLKLQPF GVVPVIQDGDYTL
YESRAIMRY YADKYRSQGV ELLGRTPEERG VVEQWLEVEAHNFHPPAYDLAVHLLFAPLFGMT
PDPK LIEESEAKLLKVL DVYEERLSKSKYLGGDFFSLADISHLPTYFIVNQMNKG YLIKERKHVS
GWDDISSRPSWKKVIQLYPPPV

>Pv-GSTF-11

MVVKVYGPHCASTKRVLVCLLEKEVEFEVVPVDLTKGEHKAPEFLKLQPFQVVPVIQDGDYTL
YESRAIMRFYADKYRSQGVELVGRTAERGVEQWLEVEAHNFHPPAYDLAVHLLFAPIFGMTP
DPKVEESEAKLLKVLVDVYEERLSKSKYLGGDFSLADISHLPTTYFIVNQMNKGYLKERKHVSG
WWDDISSRPSWKKVIELYPPP

>Pv-GSTF-12

MVVKVYGPDIYANPKKVIVCLIEKQVEFETVHVDGINGEHKQPEYLKLQPFGLLPVVKDGDYILY
ESRAILRYEYSEKYKNQGSALLGNTIEERGLVEQWLEVEAHNYPPYINLVMNILILPIVKGEASDP
KVSEENEEKLCKVLDIYEERLSKTKYLAGDFFSLADLSHLPTTHYLMTSMKKEYMVRERKHVSA
WWDDISNRPSWKKVLQLYKYPF

>Pv-GSTL-1

MATSSLS DVRPPALTSISEPLPFDGTTTRYICYLCPYAQRAWITRNCKGLQDKIELVPIDLRNRPS
WYKEKVYPLNKVPSLEHNGKVLGESLDLIRYIDANFEGASLFPSPAKKEFGQMISHVDTFTSGI
YSSYKGDPEQTSAAFDYLENALGKFDDGPFFLGQFSLVDIAYVSFLERIQLVFSEIFKHDITAGR
PKLATWIEQANKIDGYKQTKVDKEEYLEVFKIKFLA

>Pv-GSTL-2

MATAGVQEARIPPLTSTSEIPPLFDGTTTRYISYLCPYAQRVWITRNYKGLQDKIELVPIDLQNRPA
WYKEKVYPENKVPSLEHNGKVLGESLDLVKYIDDNFEGQSLVPSDPAKKEFGQELISYVDTFTK
ELYSALKGDPIQQASPAFDYLENSLGKFDDGPFFLGQFSLVDIAYVPFVERFQLVFFEVFKHDITE
GRPKLAAWIEEVNKINAYTQTRGDPKDIVDLFKKRFLAQQ

>Pv-GSTL-3

MATFGAQVVRPPPLTSTSDPPPLFDGTTTRYINYDCPYAQRVWIARNYKGLQNKINLIPINLQDRP
AWYKEKVYSENKVPSLEHNGKVLGESLDLIK YVDVNFEGTPLFPTDPAKKEFGQELISHVDTFTR
DLFISLKGDAVQQASSAFDYLENALGKFDDGPFFLGQFSLVDIAYIPFVERFHIVFAEAFKHDVTE
GRPKFATWLKELNKIDAYTETKVDPDIIIDLFKKRFLPQL

>Pv-GSTL-4

MATLGVQAFRPPPLTSTSDPPSLFDGTTTRYISYSCPYAQRVWITRNYKRLQAKIQLVPIDLQDRP
AWYKEKVYPENKVPSLEHNGKVLGESLDLIK YVDANFEGTPLFPGDPAKKEFGQELISHVDTFN
KDTSSSLKGDAEHQDSFAFEYLENALGKFDDGPFFLGQFSLVDIAYIPFVERFQPVFLDFFKHDT
EGRPKLSTWIEEVNKIDAYTETKMDPQEI VDRFKKRYLSQQ

>Pv-GSTT-1

MMMEKLVYADRMSQPSRAVLIFCRLNGIGFVEIKVDISKGHLSSEFTEVNPLQKVPAIVHGSF
NLSESHAILVYLNSAFPGIADHWYPSDIFRAKINSVMDWHHSNLNRNGAVSYVINTVLGPATGRT
LNPKTAAEAKEKVLFFSSLSNLEDIWL YGDRFLLGGSQPSIADLSMVCELMQLEVLDEKDRSRILS
PYKKVLQWIDDTRASTNPHFEEVHNILYRAKKKFEQQCSRIAETQTKPSDKIGGHSKM

>Pv-GSTT-2

MKLVYADRMSQPSRAILIFCKVNGIDFEEIKVELSKRQHLSPEFRAINPLGQVPAIVDGRFKLFES
HAILIYLASAFPGVADHWYPADLSRRARIHSVLDWHHQNLRGAAGFVLNTVLAPLLGLPLNQ
AAAEAEKILISSLT KLENIWLKGNKYLLGGLRPSIADLSLVCEIMQLELLNGKDRDRILGPHKKV
LQWIESTRNATRPHFDEVHKILYMLKTKLSEQQSNQADSVMESRIRTPLTSMK

>Pv-GSTU-1

MAKNELKLLGGWSSPFALRVQIALNLKGVDYEAVEETFNPKSDLLLKSNPVHKKIPVLLHADKPI
CESAIIVEYIDEVWTNLP SILPQNVYDRANARFWVAYIDDKWLTALKSILRAEEKNEEKKAQFEE
AEEVFERMEEVLHKGSEGKAFFGGDTIGFIDIGFGSFLSWIRVVEKMNGRKLLEDTKHPRLLQWA
QNFAAHPAVNGLIPQTDKLI EVVKGFNQTS GALAAAK

>Pv-GSTU-2

MAKNNVKLLGGWFSPFALRVQIALNLKGV DYEIEETLNP KSELLLSNPVQKKIPVLLHA EKVI
CESAIIVEYIDEVW TNAPPILPQNAYDRANARFWNAYIDEK WFTSLRSVVVAEDDEEK RPHFEQA
EEVLERLEEVLNKGGE GKAFFGGDTIGFIDISFGSFLSWIRVTEQINGRKL LDETKHPSLVQWAET
FAAHPAVNGFLPETDKLIEFAKFLKLKFAAK

>Pv-GSTU-3

MGSEEVKVVSFWVSPFGIRVEWALKLKGIEY EYIEEDIFNKS NLLLQLNPVHKKVPVLLHA HKPI
AESFIILQYIDEIWKHYPLLPQHPYQRALVHF WANFGDQKLLDPSWIAMCSSGDDQENALKVAR
ESMEKIEEEIKGKKFFGGDNIGYLDIALGWISY WLPVWEEVGSMQIMDPLKFPATNAWITNFLSH
PVIKDNLPPRDKMLVYFHSRRKALSSSLQGWFKV

>Pv-GSTU-4

MSMKSEVKLLGAWSPYVLRVRIALNMKSVEY EFHEEKLSSKSQ LLLQSNPIYKKIPVLIHKDKP
LCESLIIVQYVDDVWSSASPILPSHPYDCAIARFWAVYIDQTL YPTMKSIRGASEEDEKKRLIEEVR
KGLALLEDVFKDRSKGKGFYGGDRIGLLDIALGSILGWLRV VETLNGVKLLEQSNTPELLKWAE
RFSAAHA VKDVM PETERLLEFSKTLVKG

>Pv-GSTU-5

MGDEVVLLDFNL SMFCVRVKIALTEKGV EFENKVEDLVNTKS ALLQMN PVHKKVPVLIHNGK
PIESLIIVEYIDEIWRDRAPLLPTDPYQRAQARFWANFVDNK VHEVAKRIWTGKIGEHEAEKKEL
VENLKQLEEALGDMPYFGGDTFGFVDIALIPFYKWFSSY EKIGNFKLDCPKLTAWANRCLVKES
VSKFV SDEKDVYEFILSHRKRIGVD

>Pv-GSTU-6

MSMADEVVLLDFWSPFGMRVRVALAEKGIK YERKEENLRNKS FLLLQMN PVHKKIPVLIHKG
KPICESLIVVQYIEEVWNGTNPLLPSPDPYQRAQAIFWADYVDVK IFNLEKISKSGEEREVAKKE
LIEGLKLEELGDKTYFGGENLGFVDIALVPVYPWWKS FETFVTLNIDGECPKLTDWAKRCIQK
ESVANNLPGPQKVTELTRKIFAIE

>Pv-GSTU-7

MGDEVILLNFWLSPYGIRVRIALEEKGIK YENREEDLRNKS PLLQMN PVHKKIPVLIHNGKPICE
SLIAVEYIDEVWKDQSPLLPSNPYQRAQARFWANYVDTELYK HALRFWTTGEERE GARKEFLE
CLKLFEEQLGDEPYFGGNNFGIVDVALVPLFCYFYTFSLYDN FISEAQYPKIISWAKRCTQKESVS
KSFPSEELVKEYLSQKRQHKG

>Pv-GSTU-8

MEEAKVVLLSSGFSMFGMRAKIALAEKGIK YEYMEEDLTNKS PLLQEMNPIHKKIPVLIHGG RPI
CESLIIVEYIDMVWHNKSPLLFPDPYLKAQAKFWADFDQKVYHSSRRVWISKGDEQEVAKKDF
LESCLKHLEELGDKPYFGGETFGFVDVALIPFYCWFYTYETFGNFKVEPVCPKLISWAKRCMQKE
SVFETLADEKEVYEGVLDYKTKNLLN

>Pv-GSTU-9

MADEVVLLDTWAS MFGMRVRIALAEKSVKYELKEENLRDKS PLLQMN PVHKKIPVLIHNGKPI
CESAIIVQYIDEVWNHNPLMPSPDPYERAQARFWVDYIDKKVYDTWRKMWLSSGEEHETWKKE
LISIFKQLEETLGDKPFYGGGETFGFADVGLIPFYSWFYTFETYGNFKMEAECPKLMVWAKRCME
RETVSKTLPDEKKVYAYIVEIKKALESK

>Pv-GSTU-10

MSMADEVVLLDFWSPFGMRVRIALAEKGINYEYKEEDLKNKS PLLQMN PVHKKIPVLIHKGK
PIESLIVVQYIDEVWHDRTPLLPSPDPYQRAQARFWADFDKKMYDLGRKILWTSKGEENEVAK
KEFIETLKVLEEQLGDRTYFGGDNLGFMDVALVPFYTWFEAYETFGGLNLESECPKFI AWAKRC
LQKESVAKSLPDQHKIHEIVVEMRKKSGIE

>Pv-GSTU-11

MSMADEVVLLDFWSPFGRVRIALAEKGINYEYKEEDLKNKSPLLLQMNPPVHKKIPVLIHKGK
PISESLIVVQYIDEVWHDRTPLLPSPDPYQRAQARFWADYVDKKIYDNGRKIVWTSKGEEKEVAK
KEFIEGLKVLEEQLGDKTYFGGDNLGFVDVALVPFYTWFEAYETFGVFNLESECPKFIWAKRC
LQKESVAKSLPDQHKIHEIVVEMRKKSGIQ

>Pv-GSTU-12

MSMADEVVLLDFWSPFGRVRIALAEKGINYEYKEEDLKNKSPLLLHMNPVHKKIPVLIHKGK
PISESLIAVQYIDEVWHDRTPLLPSPDPYQRAQARFWVDYVDKKMYDLGRKIVWTSKGEEKEVA
KKEFIEVLKVLEEQLGDKTYFGGDNLGFVDVALVPFYTWFEAYETFGGLNLESECPKFIWAKR
CLQKESVAKSLPDQHKIHEIIVEMRKKSGLQ

>Pv-GSTU-13

MADTNVVLLDFWPSSYGMRVKIALPEKGISYECKQEDFEAKSSLLLEMNPVHKMIPVLIHNAKPI
CESLNIVQYIDEAWKHKPSLLPSDPYKRSQARFWGDYIDKNVYNGVKRVWTGKGKEQECKKE
LMECLKTLEVELGEKPYFGGEEFGYVDVALVPFTSWFYTVETCGELSIEEECPKLVAWTKRCMQ
KESVATSLPHPQQIYAFALQYKHRHGL

>Pv-GSTU-14

MGDVKVLGFWSSPFVHRVIWALKLKAISYEYIEVDRHNKSDLLQSNPVYKKVPVLIHGGKAIA
ESMVLQYIEDTWPHNPLPKDNHQKALARFWIKFGEDSIGSIDLFLRPYKDEEERAGAWKRAQ
ETVTVIEEQGLGDKKFFGGDNIGMVDIAYGCLSHWLEGLEEIVGMKLIENKFPQLHAWTQNFK
QVPVIKENLPDYGKLLIHLQWRRQQ

>Pv-GSTU-15

MGEVKLHGFWYSPFTLRVVWTLKLDIAYENIEEDRYNKSVKLLEYNPVYKKTPVLVHNGKPL
CESMLIVEYIDQIWPNSLLPADPYHRALARFWVNYTDDLVS AVVPFFRSNTDEEREKSVENVR
KHLAVVENQCDDQKKIFGGDILNIVDIAFGSIFKFEVVEDIIQVKVLEDEKFPHLCSWYNNFKN
VPIIKDNLPDHDKMAAFVKAIREKILASS

>Pv-GSTU-16

YEKIEEDRLKKTPELLEYNPVYKRILVLVHSGKSISELGKLPVFSNTESMIILEYMDQVWPHNPLF
PPHPYHKALARFWLNYCDHHLSGGVRAFRSNEVEGRKKVIENTIWEHLRVVEDQCFSKENKFFG
GDSVNVLDLAFSGSIKYLTVLEDIFGVQILEEHKFPPLYSWFNIFKTQPIIAQNLPHQDQMVAFVES
LREQILSSSS

>Pv-GSTU-17

MEGTVKLIATPQSFPFCARVEWALRIKGVYEYELQENLANKSPLLLQSNPVHKKVPVFLHNHNPL
PESLVILEYIDETWKDNPLPLDPYQRAQARFWARFIDEKVLYGVWGATVAEGEEKGKAVDAA
LESALFLEKEIEGKKYFGGDKIGYLDIAAGWLSHWLSVLEELGEMELLNAERFPSLHQWSHNFQ
TSPVKDCIPSRESVAEYFSFGINYTRSLASNKS

>Pv-GSTU-18

MASSQEEVTLLGATASPFVCRVKIALKLGIEYKYVEENLGNKSEQLLKYNPVHKKVPVVFVHGD
KPLAESLVIVEYIDETWNNNPILPSDPYQRALARFWSKFIDDKIVGATWKS VFTADEKEREKNVA
EASESLQFLENEIGDKKFFGGGEEGLVDIAAVYVAFWIPLVQEIGGLELLTSEKFPNLYKWSQEFV
SHPIVKESLPPRDPVFGFFKGRYESLFASK

>Pv-GSTU-19

MAANQGEVKLLGVLGSPFVCRARIALKFKGIEYEFVEENLANKSEQLLKYNPVHKKVPVVFVHNE
KPIAESMIIVEYIDETWNNNPISPSDPHQKALARFWSKFIDDKVVGAAWKSFTVDEKEREKNLQ
EALEGLQFLEDEIEKKKFFGGGEEIGLVDIAGVFIAFWMPIVQEIAGLQLLSSEKFPNLYKWSQELIN
HSVVKVLELPPREPLFAFFKGRYESL TASK

>Pv-GSTU-20

MSKGDQVEILDFWASPFCARVKIALEEKGVKHVDSEEDLFGAKSELLLSNPIHQRPVLLHNG
KPIAESAIIVSYIDEVWPSKSLPTCAYDRAQARFWVDYIDKKVFETGRSVWASNGEEREVATRD
FIEVLKHLEEALGEKEYFGGDGFGYVDIIAISHSAWFFAYEKFQDFKIEDHSPKFSAWIKRCLQRE
SVAKVLPDPEKVYQFVLHFRKMSGLD

>Pv-GSTU-21

MAEESVTLLGFWGCPFTLRVKNKNAMLLQYNPVNRKAPVLVHDGKSPAESLVTIEYINETWKQ
NPLLPHYETAKHDSGHLFSKGGEEQKAAQEARENKLTLEGQKIGFADILIGWLGCWEPIVE
EIVVINRIDKEFMDKLDSEWDFDLSFLLSKNACRLVMNSLTTRPSHRA

>Pv-GSTU-22

MAEQEKVILHGMWASPYAKRVELALNFKGIPYEEYVEEDLRNKSELLLKYNPVHKKVPVLVHNG
KAIAESMVILEYIEETWKDAPNLLPTDSYRRAQARFWSSFIQDQLIEVSFLVLKTDGEAQKKAVD
QVYEKLVLEDGMKTYLAERNARGESNFGILEIVFCALFGSYKAHEEVLGMKFIVPEKFPVLFS
WLMAIAEVEVVKATPPHEKTVEILHLFRQSALKSSAA

>Pv-GSTU-23

MANHYGDVELFGVRGSPYAVRVQIALELKGIQYTYFEEDLRNKSDLLLKYNPIHKKVPVLVHNG
RPLAESLVILEYIDETWGNHPIFPQPYHRALARFWSRFIDDKCLPAILKAAFTANEEERQKGTEE
SLDALQILEDELKQKFFGGESIGLVDIAAGFIAPWLPAIEEAVGLKLLISQKFPKLSKWSEEYTNHP
VVKESLPQRERVVGFFKARYASIIASK

>Pv-GSTU-24

PYSLRKEHKHKIIYYCIPAIKAAFTANEEEREKGTEESLDALQILEDELKQKFFGGESIGLVDIAAG
FIAPWLPAIEEAVGLKLLVSQKFPKLSKWSEEYTNHPVVKESLPQRERVVGFFKARYASIIASK

>Pv-GSTU-25

MASEESSEVRVLGKWASPFNSNRVDLALKLKGVSYKYCEEDLANKSQDLLKYNPVHKKVPVLIH
NGNPLAESLVIVEYIDETWKNNPLLQDPYERALAHFWAKTLDDKILPAIWNACWSDEKGREKA
EEEALEALEILQEALKGKRFFGGESIGLVDIAANFIGYWVAILQEIAGLKLLTLEKFPKLYKWSQE
FLNHPVIKEGLPRDELFAFFKASAKK

>Pv-GSTU-26

MAEELILLDDWLSMFGMRARIALAEKEIEYREEDLNNKSQLLLQMNPNVHKKIPVLIHNGKPIS
ESIIIVEYIDEVWKNKASFLPSEPYQRAQARFWADFNKKIGDVGGRIWAGKREEIEAAKKELVE
GLKELEKNLGEKPYFGGDTFGFVDIALIPFSTWFYSYEALGNFKVEAECPKIIAWAKRCNERESVS
KSVADEKKVYEFVVDFRKSHQLD

>Pv-GTSZ-1

MASASVAKEEKNKLTLYSYWRSSCSFRVRIALNLKGLKYDYKPVNLLKGEQSSPEFLQLNPVGC
VPVLVDGHAVLYDSLAILYLEDKYPHNPLPHDIPKRTINFQAASVVSSTIQPLHNLSLLNYIGEK
VGPDEKLRWAQSTIRRGFTALEKLLKDHTGRYATGDEVYLADIFLAPQLHAAFKRFNIQMONEF
PILSRLHETYNEIPAFQEALPENQPDVH

>Pv-GTSZ-2

MDLDKPKSGHCSNASFSSNLQLYSYCHGSCSWRIRFALCLKGIPYKEYEVDLAKGEQYSPEFERL
NPLHYVPVLVDNNVVVSDDSYAIFLHLEEKYTQKPLLPVDPQLRALNLQVASIVHSSIQPLNMLAV
LKDMEKMFGAESKPWAQFTIDKGFSALEKLLKNFAGTYATGECIYMADVFLAPQIEQAVQRFDI
DMSKFPALSRLYETYKALPEFQASSPQRQHEAFIHKP

>Pv-MGST-1

MRRVPSILFRTLAATRATRATSYVVHNRLHLSAATAAAHSHSRFSYLLAPFAAASIGVAGAL
VSQEVLAKEPPPPEALPRDVVLYQFEACPFCKVKAFLDYHDIPYKVVEVNPLSKKEIKWSEYQ

KVPILVVDGEQLNDSSAIIDQLGLKILSKKIADSTSEDEETKWRRWVDNHLVHVLSPNIYRNTSEA
LESFEYITSNGNFSYIEKISVKFAGAAAMYFVSKKLKKKYNITDERAALYAAAETWVEALNGREF
LGGSKPNLADLAVFGVLKPIRYLRSGKDMVEHTRIGEWYARMESAVGEPSKIK

>Pv-MGST-2

MRGLNRGILLSRALRSNFTAVSGATATLHPVAPHGTTTLRSSNSSVTGFRYVSFSASASATCLAQ
EAQIKAFEPKELLLFQYQACPCFNKVA AFLDYYPFKVVEVNPINKKEIKWSDYKKVPILSVDG
EQMVDSSDIIDKLIKRIHPDYDLNAAAAKKWREWVDNHLVHVLSPNIYRNVPEALESFDYITTQG
NFSFSERLVAKYGGAAAMYFVSKKLKKKHNTDERAALYGAAEQWVDALNGRKFLGGLDPNL
ADLAVFGVLRPIRDLKSGRDMVEHTRIGKWFSEMDRAVGQSSRVWERS

>Pv-TCHQD-1

MQLYHHPLDLDLSQRVRISLEEEGVDTSHHVNPIITGKNLDSSFFKMNRGRVPVFQNGSHIYNT
IDIIQYIERIAVVSSGAESISTSNREVMQKIQEWDPKFFTLAHIPEKYRIYVSKFIRQVVIARMS
ESPELAGDYHRKLREAYETEEKLKEADVLRRSKEHLFRLLEVERQLCETPFLAGQDFTMADVM
LIPVLARIKLLDLENEYITGRPNIAEYWLLVQQRPSYKRVIGKYFSGWRKHKTFLKTWFLVRIRSL
LKRY

>Pv-TCHQD-2

MQLYHHAFDLDLSQKVRLALEEKSIDYTSHHVNPIITGKNLDSSFFKMNPGGRLPVFQNGSHILYK
TIDIIQYIERIAVFSSGSENITSSNKEVIEWMQKVQEWNPKYFSLSHVPEKYRIYVSKFLRRVAIAR
MSEPELAGAYHRKLKEAYQTEEKLKESDVLIRSKEHLIRLLDEAERQLSETPYLAGQEFTMADV
MLIPVLSRLVLLDLENEYITGRPNIAEYWVLVQQRPSYRKVIGRYFDGWKKHKTLLKTWCFVRL
RSLLKRF

EK-2

Bazı GST genleri ve miRNA'lara ilişkin bilgiler:

miRNA	Hedef Gen	miRNA Fragmenti	Eşleşme	Hedef Fragment	İnhibisyon
miR159a.1	Pv-GSTU-18	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	.. ::::::::::::::	UUUGGAUCCCUUUGGUUCAAG	Kesilme
miR159a.1	Pv-GTSZ-1	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	::: :::: :: ::::	AUGAGAUCCCUUGCAUCCAGG	Translasyon
miR159a.1	Pv-GTSZ-2	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA	:::::::::::::::	CUGGGUUUCCUUCAGUUCAAU	Kesilme
miR2119	Pv-GSTF-8	UCAAAGGGAGUUGUAGGGGAA	: :::: : :::::	UCUCUCUAAGAAUCCCUUUGG	Translasyon
miR319c	Pv-GSTF-3	UUGGACUGAAGGGAGCUCCUU	::::: ::::: :::	AAGGGUGUCCUUCAGACCAA	Kesilme
miR319c	Pv-GSTF-5	UUGGACUGAAGGGAGCUCCUU	::::: ::::: :::	AAGGGUGUCCUUCAGACCAA	Kesilme
miR319c	Pv-GSTU-18	UUGGACUGAAGGGAGCUCCUU	: ::::::::::::::	UUUUGGAUCCCUUUGGUUCA	Kesilme
miR319c	Pv-GTSZ-2	UUGGACUGAAGGGAGCUCCUU	:::::::::::::::	ACUGGGUUUCCUUCAGUUCAA	Kesilme