



**FASULYEDE *GPAT* GEN AİLESİNİN
KARAKTERİZASYONU ve KURAKLIK STRESİ
ALTINDA *PvGPAT1* GENİNİN TRANSGENİK
YAKLAŞIMLA FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİ**

Ayşe Gül KASAPOĞLU

**Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN**

**2024
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**FASULYEDE *GPAT* GEN AİLESİNİN KARAKTERİZASYONU ve KURAKLIK
STRESİ ALTINDA *PvGPAT1* GENİNİN TRANSGENİK YAKLAŞIMLA
FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİ**

Ayşe Gül KASAPOĞLU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emre İLHAN

Ana Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2024

Her hakkı saklıdır

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.

29 / 02 / 2024

Ayşe Gül KASAPOĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

FASULYEDE *GPAT* GEN AİLESİNİN KARAKTERİZASYONU ve KURAKLIK STRESİ ALTINDA *PvGPAT1* GENİNİN TRANSGENİK YAKLAŞIMLA FONKSİYONUNUN BELİRLENMESİ

Ayşe Gül KASAPOĞLU

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emre İLHAN

GPAT (sn-Gliserol-3-fosfat-1-O-asiltransferaz), membran lipidlerinin biyosentezinde anahtar bir enzimdir. Gliserolipidlerin üretiminde iki tür *GPAT* yer alır. sn-1-*GPAT*'lar lizofosfatidik asit oluşturmaktan sorumluyken, sn-2-*GPAT*'lar monoaçilgliserolü üretir. Yapılan literatür taramalarına göre *Phaseolus vulgaris*'in *GPAT* genlerinin karakterizasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma, kuraklık ve tuz stresine maruz bırakılan fasulye yapraklarında *GPAT* genlerinin ekspresyon profillerini değerlendirmeyi ve biyoinformatik araçlar yardımıyla *GPAT* gen ailesi üyelerinin genom çapında analizinin yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca kloroplastik *PvGPAT1* geninin klonlanarak elde edilmesi ve bu klonun tütün bitkisinde aşırı ifade ettirilerek kuraklık stresi altında fonksiyonunun belirlenmesi de amaçlanmıştır. Bu çalışmada fasulye genomunda moleküler ağırlıkları 50,2 kDa ile 60,4 kDa, amino asit sayıları 376 ile 539, teorik izoelektrik noktası 8,41 ile 9,46 ve instabilite indeksi 31,84 ile 51,38 arasında değişen 13 *PvGPAT* geni saptanmıştır. *P. vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vitis vinifera*, *Lens culinaris* ve *Cicer arietinum* türlerinin *GPAT* proteinleri arasında filogenetik analiz yapılmıştır. *A. thaliana* ve *G. max* *GPAT* proteinlerinin evrimsel süreçte *PvGPAT* genleri ile daha yakın ilişki gösterdiği belirlenmiştir. Seçilen altı *PvGPAT* geni ile yapılan qRT-PCR analizlerinde bu genlerin tuz, kuraklık ve melatonin uygulamalarındaki ifade düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca kuraklık stresi altında tütün bitkisinde *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesinin sonuçları kuraklık stresine karşı yanıtta bu genin düzenleyici bir fonksiyona sahip olduğunu doğrular niteliktedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında *PvGPAT1* geninin kuraklık stresine yanıtındaki rolü hakkında literatürde bulunan boşluğu dolduracağı beklenilmektedir.

2024, 118 sayfa

Anahtar Kelimeler: Fosfatidilgliserol, Lipid, Sinteni, Filogenetik analiz, Transgenik

ABSTRACT

Ph.D Thesis

CHARACTERIZATION OF THE *GPAT* GENE FAMILY IN BEAN AND DETERMINATION OF THE FUNCTION OF THE *PvGPAT1* GENE UNDER DROUGHT STRESS WITH A TRANSGENIC APPROACH

Ayşe Gül KASAPOĞLU

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emre İLHAN

GPAT (sn-Glycerol-3-phosphate-1-O-acyltransferase) is a key enzyme in the biosynthesis of membrane lipids. Two types of *GPATs* are involved in glycerolipid production. sn-1-*GPATs* are responsible for creating lysophosphatidic acid, whereas sn-2-*GPATs* produce monoacylglycerol. According to the literature, no study has characterized *GPAT* genes in *Phaseolus vulgaris*. This research was conducted to examine the expression patterns of *GPAT* genes in bean leaves subjected to melatonin, drought, and salt stress, and to carry out a comprehensive genomic analysis of *GPAT* gene family members using bioinformatics techniques. We also aimed to obtain the chloroplastic *PvGPAT1* gene by cloning and determine its function under drought stress by overexpressing this clone in tobacco plants. In this study, 13 *PvGPAT* genes were detected in the bean genome, with molecular weights ranging from 50,2 kDa to 60,4 kDa, amino acid numbers between 376 and 539, theoretical isoelectric points between 8,41 and 9,46, and instability indexes between 31,84 and 51,38. A phylogenetic analysis was conducted using *GPAT* proteins from *P. vulgaris*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, and *Cicer arietinum* species. It has been determined that *A. thaliana* and *G. max* *GPAT* proteins are closely related to the *PvGPAT* genes during the evolutionary process. In qRT-PCR analyses performed with six selected *PvGPAT* genes, the expression levels of these genes in salt, drought, and melatonin treatments were examined. Moreover, overexpression of *PvGPAT1* in tobacco plants under drought stress confirmed that this gene has a regulatory function in the response to drought stress. In light of the data obtained from this study, it is expected to fill the gap in the literature about the role of the *PvGPAT1* gene in response to drought stress.

2024, 118 page

Keywords: Phosphatidylglycerol, Lipid, Synteny, Phylogenetic Analysis, Transgenic

TEŞEKKÜR

Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1002-A kapsamında 1230868 nolu proje ile desteklenmiştir. Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK BİDEB 2211-A kapsamındaki finansal desteğinden ötürü TÜBİTAK’a teşekkür ederim. Ayrıca 2019-2021 yılları arasında YÖK 100/2000 programı kapsamında sağladığı finansal destek için Yükseköğretim Kurulu’na teşekkür ederim.

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın büyük bir bölümü Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM)’da diğer bölümü ise Atatürk Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğü’nde yapılmıştır. Doktora çalışmam için bana uygun ortam ve şartları sağlayan YÜTAM ve Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarları Koordinatörlüğü’ne teşekkür ederim.

Doktora dönemim boyunca benden bilgi birikimi veengin tecrübelerini esirgemeyen, her konuda desteğini hissettiren, akademik hayatta bana yol gösteren ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Emre İLHAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez sürecimde bana her türlü desteğini sunan, akademik bilgi birikimini ve tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Murat AYDIN’a, Doç. Dr. Behcet İNAL’a ve Doç. Dr. Murtaza HACIZADE’ye emeklerinden ötürü teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında bana destek ve yardımcı olan değerli çalışma arkadaşlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Esmâ YİĞİDER’e, Uzman Selman MUSLU’ya, Uzman Ahmed Sıdar AYGÖREN’e, Ziraat Yüksek Mühendisi Sümeyra UÇAR’a, Ziraat Yüksek Mühendisi Esra YAPRAK’a ve Uzman Burak Muhammed Öner’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez sürecim boyunca benden desteklerini esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Gül KASAPOĞLU
Şubat 2024

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Bitki materyalleri, bakteri suşları ve plazmitler	22
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	22
3.1.3. Kullanılan cihazlar	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Araştırmada kullanılan solüsyonların hazırlanışı	24
3.2.2. <i>GPAT</i> genlerinin araştırılması ve tanımlanması	30
3.2.3. <i>GPAT</i> genlerinin yapısı, korunmuş motifleri, cis-etkili elementleri, kromozomal konumu ve gen duplikasyon durumunun analizleri	30
3.2.4. PvGPAT proteinlerinin fizyolojik parametreleri ve hücre altı lokalizasyonu	31
3.2.5. Filogenetik ağaç ve dizi hizalama analizleri ve fasulye, soya fasulyesi ve <i>Arabidopsis</i> arasında karşılaştırmalı haritalama	31
3.2.6. Gen Ontolojisi analizi, homoloji modellemesi ve PvGPAT proteinlerinin protein-protein etkileşimleri	32
3.2.7. PvGPAT genlerinin transkriptomik gen ifade düzeyleri	32
3.2.8. Bitkilerin büyütülmesi, melatonin tuz ve kuraklık uygulamaları	33
3.2.9. <i>GPAT</i> genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi	34
3.2.9.1. Total RNA izolasyonu	34
3.2.9.2. RNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi ve agaroz jel elektroforezi	35
3.2.9.3. cDNA sentezi	35

3.2.9.4. qRT-PCR analizleri.....	36
3.2.9.5. Verilerin değerlendirilmesi	37
3.2.10. Rekombinant vektörlerin elde edilmesi	38
3.2.10.1. Fasulye <i>GPAT1</i> geninin klonlanması.....	38
3.2.10.2. <i>PvGPAT1</i> geninin jelden ekstraksiyonu	39
3.2.10.3. <i>PvGPAT1</i> geninin pJET klonlama vektörüne aktarımı	40
3.2.10.4. <i>E. coli</i> JM101 suşu kompetent hücrelerinin hazırlanması	40
3.2.10.5. Rekombinant vektörün kompetent JM101 hücrelerine transformasyonu.....	41
3.2.10.6. Koloni PCR ile pozitif kolonilerin tespit edilmesi.....	41
3.2.10.7. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu.....	42
3.2.10.8. Rekombinant vektörün doğrulanması	42
3.2.10.9. <i>PvGPAT1</i> genin aşırı ifade vektörüne klonlanması.....	43
3.2.10.10. <i>A. tumefaciens</i> AGL1 suşunun kompetent hücrelerinin hazırlanması	45
3.2.10.11. <i>pGFPGUSPlus::PvGPAT1</i> vektörünün AGL1 suşuna transformasyonu.....	46
3.2.11. Tütün bitkisine <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyon metodu ile gen aktarımı.....	46
3.2.11.1. Tütün bitkilerinin yetiştirilmesi ve transformasyon için tütün yaprak disklerinin hazırlanması	47
3.2.11.2. <i>Agrobacterium</i> süspansiyonunun hazırlanması.....	48
3.2.11.3. Tütün bitkilerine <i>Agrobacterium</i> aracılı gen transformasyonu.....	48
3.2.11.4. Seleksiyon ve bitki indüksiyonu	49
3.2.11.5. Kök indüksiyonu ve toprağa transferi	49
3.2.11.6. Transgenik bitkilerin (T ₁) tespit edilmesi ve doğrulanması.....	50
3.2.12. T ₁ ve yabani tip bitkilere kuraklık stres uygulaması ve stres toleransının belirlenmesi.....	50
3.2.12.1. MDA ve H ₂ O ₂ ölçümü	51
3.2.12.2. Klorofil içeriğinin belirlenmesi.....	52
3.2.12.3. Klorofil floresans analizi.....	52
3.2.12.4. Doku elektrik iletkenliği analizi.....	52
3.2.12.5. İstatistiksel analiz	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	54
4.1. Araştırma Bulguları.....	54
4.1.1. GPAT genlerinin genom çaplı karakterizasyonu	54
4.1.1.1. <i>P. vulgaris</i> GPAT genlerinin tanımlanması ve karakterize edilmesi	54
4.1.1.2. GPAT genlerinin filogenetik ve gen yapısı analizleri	57

4.1.1.3. PvGPAT proteinlerinin üç boyutlu yapısal modellemesi, ppi ve GO Analizi ...	59
4.1.1.4. <i>PvGPAT</i> genlerinin promotör bölgesindeki cis-etkili elementlerin tanımlanması	63
4.1.1.5. <i>P. vulgaris</i> ve diğer bitkilere ait <i>GPAT</i> genleri ile oluşturulan sinteni analizi ..	64
4.1.1.6. <i>PvGPAT</i> genlerinin farklı fasulye dokularında ve farklı stres koşulları altında in silico gen ekspresyon analizi	65
4.1.1.7. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizler.....	67
4.1.2. Kuraklık stresi altında <i>PvGPAT1</i> geninin transgenik yaklaşımla fonksiyonunun belirlenmesi.....	70
4.1.2.1. <i>PvGPAT1</i> geninin izole edilmesi ve pJET1.2/blunt vektörüne klonlanması	70
4.1.2.2. <i>PvGPAT1</i> geninin pGFPGUSPlus aşırı ifade vektörüne klonlanması ve AGL1 suşuna transformasyonu.....	72
4.1.2.3. pGFPGUSPlus:: <i>PvGPAT1</i> aşırı ifade vektörünün tütün bitkilerine <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonu.....	77
4.1.2.4. T ₁ ve yabancı tip bitkilere kuraklık stres uygulaması ve stres toleransının belirlenmesi.....	83
4.2. Tartışma.....	88
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	98
EKLER.....	116
EK1	116
EK2	118

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°	Derece
μ	Mikro
μE	Elektroforetik hareketlilik
μFD	Mikrofarad
dk	Dakika
g	Gram
g	Gravite
kV	Kilovolt
m	Metre
m ³	Metre küp
mha	Milyon hektar
mt	Milyon ton
M	Molarite
n	Nano
rpm	1 dakika içerisinde gerçekleştirilen devir sayısı
s	Saniye

Kısaltmalar

cDNA	complementer DNA
CT	Cycle Threshold
EC	Elektrik iletkenliği
FAO	Food and Agriculture Organization
G3P	Gliserol 3 fosfat
GFP	Yeşil floresan protein
GUS	β-glukuronidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
LB	Luria Bertani
M.Ö.	Milattan Önce

MDA	Malondialdehit
MMA	Sıvı MS ortamı
MS	Murashige ve Skoog
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PG	Fostatidilgliserol
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
SYGM	Su Yönetimi Genel Müdürlüğü
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
WCRP	World Climate Research Programme
YT	Yabani Tütün

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fasulye üretimi	3
Şekil 1.2. 2017-2021 yılları arasında fasulye ekim alanı, üretimi ve verimi	4
Şekil 1.3. <i>Arabidopsis</i> plastidlerinde fosfatidilgliserol biyosentezi.....	11
Şekil 2.1. <i>Agrobacterium</i> aracılı transformasyonun moleküler mekanizması.....	18
Şekil 2.2. p35SGFPUS <i>Plus</i> vektörünün haritası.....	19
Şekil 3.1. Phytozome v13 veritabanından alınan <i>PvGPAT1</i> geninin CDS dizisi	38
Şekil 3.2. Tütün bitkisine aktarılan gen kaseti.....	45
Şekil 3.3. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisine <i>Agrobacterium</i> aracılı gen aktarım şeması.....	47
Şekil 4.1. <i>PvGPAT</i> genlerinin fasulye kromozomları üzerindeki konumu.....	55
Şekil 4.2. <i>GPAT</i> genlerinin filogenetik ağacı	57
Şekil 4.3. <i>PvGPAT</i> proteinleri arasındaki filogenetik ilişki, <i>PvGPAT</i> proteinlerinin korunmuş motif diyagramı, <i>PvGPAT</i> proteinlerinde bulunan ilave domainler ve <i>PvGPAT</i> genlerinin gen yapısı.....	58
Şekil 4.4. <i>PvGPAT</i> proteinlerinin birbirleriyle ve diğer proteinlerle protein-protein etkileşimleri.....	61
Şekil 4.5. <i>PvGPAT</i> proteinlerinin metabolik yol diyagramı ve en çok etkileşime girdikleri 5 protein.....	62
Şekil 4.6. <i>PvGPAT</i> genlerinin biyolojik süreçlere, hücrel bileşenlere ve moleküler işlevlere katılım oranlarını gösteren pasta grafiği.	63
Şekil 4.7. <i>PvGPAT</i> genlerinin promotör bölgelerindeki cis-etkili elementler	64
Şekil 4.8. <i>PvGPAT</i> genleri ile <i>AtGPAT</i> ve <i>GmGPAT</i> genleri arasındaki ortolog ilişkileri gösteren sinteni analizi.	65
Şekil 4.9. Tuz stresi altındaki fasulyelerde tuz ve kuraklık stresi altındaki fasulyelerde <i>GPAT</i> genlerinin transkriptomik ifade düzeyleri.....	66
Şekil 4.10. Sekiz farklı fasulye dokusunda <i>GPAT</i> genlerinin in silico ifade seviyeleri .	67
Şekil 4.11. Tuz stresi ve melatonin uygulaması altında iki çeşitte <i>PvGPAT</i> genlerinin ekspresyon seviyesi grafikleri.	68
Şekil 4.12. Kuraklık stresi ve melatonin uygulaması altında iki çeşitte <i>PvGPAT</i> genlerinin ekspresyon seviyesi grafikleri.....	69
Şekil 4.13. <i>Bgl</i> III ve <i>Bst</i> EII enzim kesim bölgelerini içeren primerler ile elde edilen <i>PvGPAT1</i> 'e ait cDNA'nın jel görüntüsü ve pJET::GPAT1 rekombinant	

vektörünün PvGPAT1 ve pJET primerleriyle yapılan PCR doğrulamasının jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.14. Elde edilen gen bölgesi ve Phytozome v13 veri tabanındaki <i>Phvul.002G136600.1</i> geni arasındaki BLAST sonucunun görüntüsü.	72
Şekil 4.15. pJET1.2/blunt vektörünün <i>Bgl</i> II ve <i>Bst</i> EII enzimleriyle kesiminin jel görüntüsü ve pGFPGUS <i>Plus</i> aşırı ifade vektörünün <i>Bgl</i> II ve <i>Bst</i> EII enzimleriyle kesiminin jel görüntüsü	73
Şekil 4.16. Ligasyon ürünü kontrol PCR jel görüntüsü ve Koloni PCR sonucu	74
Şekil 4.17. Elde edilen gen bölgesi ve NCBI veri tabanında bulunan <i>PHAVU_002G136600g</i> geni arasındaki BLAST sonucunun görüntüsü	76
Şekil 4.18. RE enzimleri ile pGFPGUS <i>Plus</i> :: <i>PvGPAT1</i> vektörünün kesim görüntüsü .	77
Şekil 4.19. MSII ortamına ekilen yaprak disklerin 20 gün sonraki görüntüsü	78
Şekil 4.20. MSII ortamında gelişen kalluslarda bitki rejenerasyonu.	78
Şekil 4.21. MSII ortamında gelişen sürgünlerin MSIII ortamına alındığı görüntü, MSIII ortamına alınan sürgünlerde ilk kök oluşum görüntüsü ve Rejenere olan bitkilerde gelişen gerçek köklerin görüntüsü.	79
Şekil 4.22. T ₀ bitkilerini toprağa alıştırma düzeneği ve T ₀ bitkilerinin dış ortama alıştırılması ve T ₀ bitkilerinin çiçek oluşumu ve tohum eldesi.	79
Şekil 4.23. Transgenik T ₁ bitkilerinin HptII primerleri ile yapılan PCR sonucu	80
Şekil 4.24. Transgenik T ₁ bitkilerinin PvGPAT primerleri ile yapılan PCR sonucu	81
Şekil 4.25. T ₁ bitkilerinde <i>PvGPAT1</i> geninin ifade seviyesi grafiği.	82
Şekil 4.26. Yabani tütün ve T ₁ bitkilerinin sekiz yapraklı dönemdeki bitki ve kök uzunluğu.	82
Şekil 4.27. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T ₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki klorofil içeriği.	83
Şekil 4.28. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T ₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki H ₂ O ₂ miktarı.	84
Şekil 4.29. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T ₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki MDA miktarı.....	85
Şekil 4.30. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T ₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki PSII verimliliği.	86
Şekil 4.31. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T ₁ bitkilerinin 0. ve 24. saatlerindeki membran hasarı.	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları	22
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	23
Çizelge 3.3. Fasulye çeşitlerine uygulanan tuz, kuraklık ve MEL konsantrasyonları	33
Çizelge 3.4. cDNA sentez karışımı	35
Çizelge 3.5. PCR bileşenleri ve miktarları	36
Çizelge 3.6. PCR şartları	36
Çizelge 3.7. qRT-PCR için tasarlanan primerler	37
Çizelge 3.8. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri	37
Çizelge 3.9. qRT-PCR reaksiyon şartları	37
Çizelge 3.10. <i>PvGPAT1-1</i> primerlerinin enzim kesim bölgeleri	38
Çizelge 3.11. <i>PvGPAT1</i> geninin izole edilmesi, klonlanmasında kullanılan primerler..	38
Çizelge 3.12. Küt uçlama reaksiyonu bileşenleri	40
Çizelge 3.13. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri	40
Çizelge 3.14. Reaksiyon koşulları	43
Çizelge 3.15. Plazmitlerin doğrulanmasında kullanılan primerler	44
Çizelge 3.16. <i>A. tumefaciens</i> suşlarının antibiyotik dirençlilik tablosu	48
Çizelge 4.1. <i>PvGPAT</i> proteinleri hakkında bilgi	55
Çizelge 4.2. Fasulye genomundaki duplike <i>GPAT</i> gen çiftleri	56
Çizelge 4.3. <i>PvGPAT</i> genlerinin hücre altı lokalizasyonu	56
Çizelge 4.4. <i>PvGPAT</i> genlerindeki motif dizilerine ait muhtemel en iyi eşleşme	59
Çizelge 4.5. <i>PvGPAT</i> proteinlerinin üç boyutlu yapısı	60
Çizelge 4.6. <i>PvGPAT</i> proteinleri ile en güçlü etkileşime giren proteinler	61

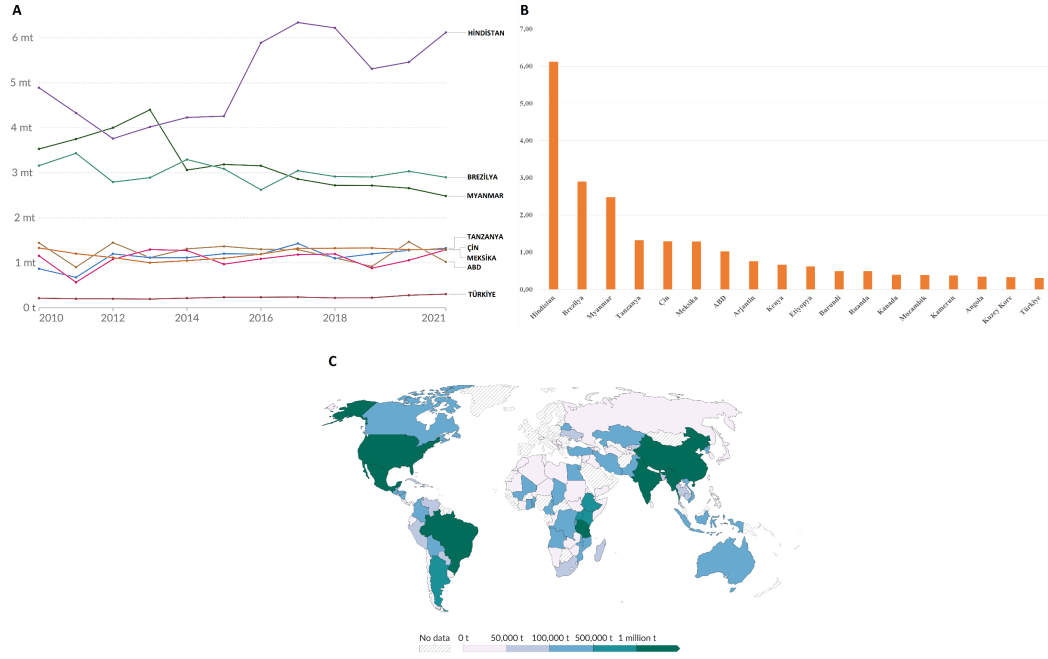
1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan yemeklik tane baklagillerin tarihi MÖ 5000 yıllarına kadar uzanmaktadır. Bitkisel ürünlere kıyasla daha fazla oranda protein, mineral, vitamin ve lif kaynağına sahip olan baklagiller arasında özellikle kuru fasulye, nohut, bezelye, börülce ve mercimek ön plana çıkmaktadır. İnsanda sentezlenemeyen bazı amino asitlerin gıda alımıyla insan vücuduna girişi sağlanır. İnsan sağlığı açısından oldukça önemli olan lösin, izolösin, lizin, metiyonin, treonin, triptofan ve valin amino asitleri günlük olarak alınmalıdır (Şehirli 1988; Davidova et al. 2022). Bu amino asitler baklagillerin birçoğunda mevcuttur. Dünyada insan ve hayvan beslenmesindeki proteinlerin %60'ı ve karbonhidratların ise %12'si baklagiller tarafından karşılanmaktadır (Adak et al. 2010). Ayrıca baklagillerin insan tüketiminin dışında kalan bitki kısımları hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır.

Dünyadaki ekim alanlarında tahıllardan sonra en fazla ekimi yapılan ürün baklagillerdir. Baklagiller arasında en fazla ekim alanına sahip ürünlerden biri de fasulyedir (*Phaseolus vulgaris* L.). Fasulye, Leguminosae familyasına ve Faboideae alt familyasına ait *Phaseolus* cinsi bir baklagildir (Hayat et al. 2014). Fasulye nispeten küçük bir genoma (633 Mbp (0.66 pg)/IC) ve $2n = 22$ kromozoma sahip diploid bir baklagildir (Arumuganathan and Earle 1991). Fasulye, Orta ve Güney Amerika orijinli olup burada kültüre alınmış ılıman ve yarı tropik bölgelerde yaygın olarak yetiştirilen tek yıllık bir bitkidir (Papa et al. 2005; Ganesan and Xu 2017). *P. vulgaris* renk, boyut, büyüme modeli ve tohum morfolojisi çeşitliliği sergiler (Nyau 2014). Fasulyede baskın çeşitler arasında kırmızı barbunya fasulyesi, lacivert fasulye, kırmızı fasulye, siyah fasulye, barbunya fasulyesi, Meksika fasulyesi, Great Northern fasulyesi ve kızılıcık fasulyesi bulunur (Choung et al. 2003; Hosfield et al. 2004). Yenilebilir kuru tohumları, protein açısından zengin ve ete göre daha düşük fiyatlı olması nedeniyle, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki düşük gelirli insanlar tarafından dünya çapında tüketilmektedir (Shimelis and Rakshit 2005; Bai et al. 2023). Fasulye, kişi başına tüketimin 40 kg'a ulaşabildiği Meksika, Güney ve Orta Amerika ve Afrika gibi ülkelerde temel gıda olarak tüketilmektedir (Luthria and Pastor-Corrales 2006). Fasulye genellikle kuru tohum olarak tüketilir; yeşil yaprakları ve olgunlaşmamış kabukları ise sebze olarak değerlendirilebilir (Lin et al. 2008).

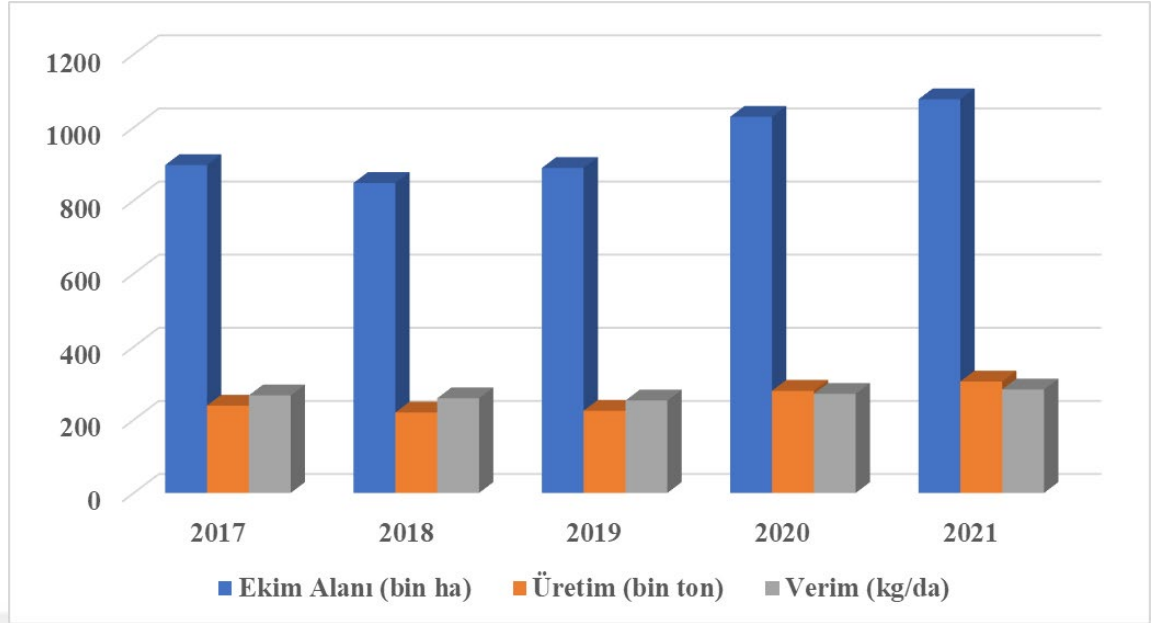
2002 yılında, baklagiller toplam baklagil tüketiminin %87'sini oluşturmuştur (Leterme and Muñoz 2002). 2010 istatistiklerinde küresel kuru fasulye üretiminin yıllık 25,42 milyon ton (mt) olduğu ve 32 milyon hektarlık alanda hasat edildiği kaydedilmiştir (Ganesan and Xu 2017). Hindistan toplam üretimin yaklaşık %19,23'üne katkıda bulunurken, onu Myanmar (%13,88), Brezilya (%12,42), Amerika Birleşik Devletleri (ABD) (%5,66), Çin (%5,26), Meksika (%4,52), ve Tanzanya (%4,28) gibi diğer ülkeler takip etmektedir. Türkiye ise 2010 yılında kuru fasulye üretiminde %1,05'lik bir paya sahipti. 2014 yılında dünya kuru fasulye üretimi toplam 27,59 milyon ton, ekim alanı ise tahminlere göre 31,22 milyon hektar olarak gerçekleşmiştir. Myanmar, toplam üretimin yaklaşık %16,85'ini oluştururken, bunu Hindistan (%14,89), Brezilya (%11,92), Amerika Birleşik Devletleri (%4,74), Meksika (%4,60), Tanzanya (%4,023) ve Çin (%3,84) takip etmektedir. Türkiye'de ise 2014 yılında 2010 yılına kıyasla fasulye üretiminde artış olmasına rağmen Türkiye'nin dünya fasulye üretimindeki yüzdesi (%0,77) azalmıştır. 2020 yılında ise toplam küresel kuru fasulye üretimi 27,5 mt'a ulaşmış ve 34,8 milyon hektar alanda hasadı yapılmıştır. Türkiye ise 2020 yılında 0,28 mt ile toplam fasulye üretiminin %1,02'sini oluşturmuştur. 2021 yılında ise küresel kuru fasulye üretimi 27,72 mt'a ulaşmıştır. 2021 yılında sırasıyla en fazla üretim yapan ülkeler Hindistan (6,12 mt), Brezilya (2,90 mt), Myanmar (2,48 mt), Tanzanya (1,33 mt), Çin (1,29 mt), Meksika (1,29 mt), ABD (1,02 mt), Arjantin (0,76 mt), Kenya (0,67 mt), Etiyopya (0,62 mt), Burundi (0,49 mt), Ruanda (0,49 mt), Kanada (0,39 mt), Mozambik (0,39 mt), Kamerun (0,37 mt), Angola (0,34 mt), Kuzey Kore (0,33 mt) ve Türkiye (0,305 mt)'dir (FAO 2023) (Şekil 1.1). Türkiye fasulye üretiminde dünyada 2021 yılında 18. sıradadır. Türkiye'deki fasulye üretimi her geçen yıla göre artmış olsa da diğer ülkelerin oldukça gerisinde kalmaktadır.

1. GİRİŞ



Şekil 1.1. Fasulye üretimi (a) 2010-2021 yılları arasında dünyadaki bazı ülkelerin yıllık fasulye üretimi (b) 2021 yılında Dünya’da kuru fasulye üretiminde en fazla paya sahip ülkeler (c) 2021 yılında Dünya’daki kuru fasulye üretiminin Dünya haritası üzerinde gösterimi (Anonymous 2023a).

2017 ve 2021 yılları arasında Türkiye’deki fasulye ekim alanları, üretim miktarı ve verim oranları Şekil 1.2’de gösterilmiştir. Türkiye kuru fasulye ekim alanı 2017 yılında 89 bin ha alandan 2021 yılında 107 bin ha alana yükselmiştir. Kuru fasulye üretim miktarı ise 2017 yılında 239 bin tondan 2021 yılında 305 bin tona yükselmiştir. Buna göre verim oranı 267’den 283’e yükselmiştir (TÜİK 2022). Artan ekim alanlarına paralel olarak fasulye üretimi ve bu alanlardan alınan verim de artmıştır. Ülkemizdeki bu artış ümit vadeci olsa da dünyada fasulye üretiminde ilk sıralarda yer almak için yeterli değildir.



Şekil 1.2. 2017-2021 yılları arasında fasulye ekim alanı, üretimini ve veriminin sütun grafiği (TUIK 2022).

2050 yılına kadar, dünya nüfusunun 9,1 milyarı aşacağı ve %70'ten fazlasının gıda ihtiyacının yalnızca tarıma dayanacağı varsayılmaktadır (Castañeda et al. 2016). Sonuç olarak, gıda arzı ve aynı zamanda ülkelerin mali sistemleri tarım biliminden etkilenecektir. Öte yandan, agronomik uygulamalarla, yetersiz sulama sistemleri, iyi özellikli tohumların kıtlığı, toprağa uygun olmayan kimyasal böcek ilaçları ve aşırı gübre uygulanması ve toprak erozyonları gibi engellerle mücadele edilmektedir (Dev 2012). Yukarıdaki kısıtlamaların yanı sıra hem doğal hem de tarımsal alandaki bitkiler, büyümelerini ve gelişmelerini etkileyecek, dolayısıyla ürün verimini engelleyecek ve aşırı durumlarda bitkinin ölümüne yol açacak çok çeşitli biyotik (böcekler, bakteriler, virüsler, mantarlar) ve abiyotik (sıcaklık, su, tuzluluk, soğutma, donma) streslere maruz kalmaktadır (Seki et al. 2003). Bitkilerin yaşadığı alanda metabolik ve fizyolojik dengesini farklılaştıran veya bozan her türlü değişiklik stres olarak tanımlanır (Shulaeva et al. 2008). Kuraklık ve tuzluluk stresi bitkinin büyüme ve gelişmesini en fazla etkileyen abiyotik streslerdendir. Değişen iklim koşulları nedeniyle su kıtlığı hızla artan nüfus için gıda güvencesine yönelik en ciddi tehditlerden biridir (Farooq et al. 2009).

Su, yaşamın katalizörüdür ve fotosentezden hidrofobik bir bağ yoluyla moleküller arası etkileşimlere kadar uzanan bitki fizyolojik süreçlerinde önemli rollere sahip bir moleküldür (Korgaonkar and Bhandari 2023). Dünya üzerindeki 35 milyon km³ tatlı

suyun sadece %0,3'ü ekosistem ve insani tüketime uygun tatlı su kaynaklarından oluşmaktadır. Türkiye'de ise toplam 94 milyar m³ yüzey suyunun 44 milyar m³'ü sulamada 13 milyar m³'ü ise içme suyu ve sanayide kullanılmaktadır. Türkiye, sanılanın aksine su kıtlığı sınırında bir ülkedir. Türkiye'nin gereksinim duyacağı su miktarının, önümüzdeki 25 yılda günümüz su tüketiminin 3 katı olacağı öngörülmektedir. Türkiye'de kişi başına kullanılabilir su miktarı yıllık olarak; 2000 yılında 1652 m³, 2009 yılında 1544 m³ ve 2020 yılında ise 1346 m³ (günde yaklaşık 216 litre)'tür. Gün geçtikçe kişi başına düşen su miktarı azalmaktadır (SYGM 2023). İklim şartlarının değişmemesinin mümkün olduğu durumda bile, yalnızca nüfus artışı sebebiyle 2050 yılında Türkiye'de kişi başına düşen su miktarının yılda 1.200 m³ civarında olacağı öngörülmektedir. Bir başka ifade ile ikliminin değiştiği ve nüfusunun hızla arttığı dikkate alındığında Türkiye'nin 2050 yılında su fakiri bir ülke olacağı öngörülmektedir (Kadioğlu et al. 2017; Turan 2018).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre, tarımda “kuraklık” terimi, toprakta belirli bir zamanda bitki taleplerini karşılamak için yetersiz su miktarı anlamına gelmektedir (FAO 2023). Küresel iklim değişikliği, sıcaklığın ve atmosferdeki CO₂ seviyesinin artmasının ana nedenidir; bu durum topraktaki suyun buharlaşma oranını arttırır ve dolayısıyla yağış düzeni bozulur. Bunun sonucunda dünya çapında kuraklık stresi tetiklenir ve iklim değişikliği bitkileri kuraklık stresine maruz bırakır (Dai 2011; Mishra and Singh 2011). Stresin şiddeti; stresin yoğunluğuna, süresine, başlangıç zamanına, toprağın fizikokimyasal koşullarına ve bitkinin hassasiyet derecesine bağlıdır. Su emilimi ve su kaybı oranındaki dengesizlik, toprağın su potansiyelinin köklerden daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun başlıca nedeni, atmosferik koşulların terleme veya buharlaşma yoluyla sürekli su açığına neden olmasıdır (Mafakheri et al. 2010). Meteorolojik kuraklık tarımsal kuraklığa neden olur (Dai 2011). Çevre koşullarından kaynaklanan değişiklikler nedeniyle, bitkiler sürekli olarak optimum su mevcudiyeti eksikliğine maruz kalır, bu da büyümenin bozulmasına ve su taşınımında ve alımında bozulmaya yol açar (Farooq et al. 2009). Kuraklık, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere çeşitli bitki süreçlerini tetikleyen önemli bir çevresel faktördür. Örneğin; kuraklık stresi, fotosentez için önemli elemanlar olan klorofiller üzerinde olumsuz etkilere neden olmakta ve elektron taşıma mekanizmalarını bozarak bitkilerin fotosentez veriminin düşmesine neden olmaktadır (Korgaonkar and Bhandari 2023).

Çeşitli abiyotik stresler arasında tuzluluk, bitki gelişimi üzerinde çeşitli zararlı etkileriyle birlikte ürün verimliliğini ve büyümesini önemli ölçüde etkileyen önemli bir faktör olarak ortaya çıkmaktadır (Balasubramaniam et al. 2023). Tuzluluk stresi ekonomisi tarıma dayalı ülkeler için ciddi bir tehdit olarak görülmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün bir tahminine göre, dünya topraklarının %8,7'si (833 mha) tuzluluk ve alkalilikten, yani diğer tuzlara göre yüksek oranda sodyum tuzunun varlığından etkilenmektedir (Chaudhary et al. 2024). Bu yönde yapılan diğer tahminler ise, 2050 yılına kadar tarımsal olarak kullanılan arazilerin yaklaşık %50'sinin muhtemelen tuzluluktan etkileneceğini göstermektedir (Mangal et al. 2023). Tarım arazilerinin bozulmasına başlıca katkıda bulunan tuzluluk, bu arazileri mahsul ekimi ve üretimi için uygunsuz hale getirmektedir (Parihar et al. 2015; Kappachery et al. 2024). Tuzlu topraklarda bitki kökleri topraktan su emdikçe, bazı çözünenlerin birikmesi, beslenme anormallikleri, iyonik homeostazın bozulması, fotosentez, solunum, gaz alışverişi, terleme, bitkinin anatomisi, morfolojisi ve büyüme paterni gibi fizyolojik bozulmalar da dahil olmak üzere çeşitli zorluklara neden olur ve sonuçta doku ölümüne yol açar (Singh and Sengar 2014; Ismail and Horie 2017; El Sabagh et al. 2019).

Bitki büyümesi üç nedenden dolayı tuz stresi nedeniyle engellenir: 1) Ozmotik stres, kök bölgesindeki su potansiyelinin azalmasına neden olur ve bitkiler ihtiyaç duydukları suyu alamazlar (Sevik and Cetin 2015), 2) hem klor hem de sodyum iyonlarının aşırı miktarda mevcut olduğu ve bitki tarafından emildiği spesifik iyonik toksisite (Shabala 2000) ve 3) bitkilerin potasyum, kalsiyum ve nitratlar gibi önemli besin maddelerini absorbe edemediği besin eksikliği (Read et al. 2006). Bu engellere rağmen bitkiler, biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri ve birden fazla genin aktivasyonunu içeren karmaşık bir özellik olan tuzluluk stresine karşı koymak için çeşitli mekanizmalar kullanmaktadır (Dhiman et al. 2021). Her bitkinin aşırı tuz stresine karşı tolerans düzeyi farklı olup bazı bitkiler tuz stresinden diğer bitkilerden daha fazla etkilenmektedir (Blum 2018). Fasulye tuz stresinden etkilenen ve verim kayıpları yaşanan bitkilerden biridir (Yılmaz et al. 2011). Bitkiler toprağa bağımlı organizmalar olduğu için bulunduğu ortamdaki çevresel şartlardan kaçamazlar. Bu nedenle olumsuz çevre koşullarına daha dayanıklı bitkilere ihtiyaç duyulmaktadır (Korgaonkar and Bhandari 2023).

Yaşam döngüleri boyunca bitkiler zorlu koşullarla başa çıkmak için çeşitli teknikler geliştirmiştir (Arnao and Hernández-Ruiz 2020). Bunlardan biri bitkinin bünyesinde var olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), çevreye zarar vermeyen bir biyomolekül olup, küçük boyutu ve hem lipitlerde hem de suda yüksek derecede çözünebilme özelliğiyle hücre bölmelerine kolaylıkla girebilmektedir. Bu yönüyle bitkilerin hem biyotik hem de abiyotik strese toleransını artıran modülatör bir ajan (biyo-uyarıcı ve bitki büyüme düzenleyicisi) olarak bitkilerde önemli bir role sahiptir (Arnao et al. 2022; Sharma et al. 2024). Stres koşullarında bitkide mevcut olan melatonin yetersiz kalabilir. Bu nedenle bitkilere eksojen melatonin uygulanmaktadır. Bu uygulanma, abiyotik streslere karşı bitki toleransını arttırmak için alternatif ve düşük maliyetli bir teknik olarak kabul edilmektedir (Moustafa-Farag et al. 2020). Bu nedenle melatoninin kuraklık, su basması, şiddetli sıcaklıklar, tuz, alkalilik, topraktaki kimyasal kirleticiler (ağır metaller, pestisitler ve diğerleri gibi), UV radyasyonu ve bunların kombinasyonları gibi spesifik abiyotik stres faktörlerine karşı önemli bir koruyucu olarak rol aldığı kabul edilmektedir (Arnao and Hernández-Ruiz 2021). Ayrıca melatonin savunmada rol alan önemli enzim ve transkripsiyon faktörlerinin ifade seviyelerini de düzenlenmektedir (Weeda et al. 2014).

Biyoinformatik, biyolojik problemleri çözmek için bilgisayarların, matematiksel algoritmaların ve istatistiğin gücünü yaşam bilimlerindeki kavramlarla birleştiren yeni ve gelişmekte olan bir bilimdir. Biyolojik veri toplama ve depolama, veri madenciliği, veri tabanı aramaları, analizler ve yorumlama, modelleme ve ürün tasarımı ele alarak biyolojik bilgiyi işlemek için bilgi teknolojisi çözümlerinin sistematik bir şekilde geliştirilmesini ve uygulanmasını kapsayan, yeni ortaya çıkan disiplinlerarası bir bilim ve teknoloji alanıdır (Xiong 2009; Jayaram and Dhingra 2010). Bu nedenle biyoinformatik, biyolojik verileri bilgi teknolojisi ve bilgisayar bilimi kullanarak yorumlayan disiplinler arası bir bilimdir (Alemu 2015). Biyoinformatik araçlar, tarım topluluğu için yararlı olan genomlardaki gen ve gen ailelerini araştırmak ve işlevlerini açıklamak için kullanılabilir. Bu özel genetik bilgi daha sonra daha güçlü, kuraklığa, hastalıklara ve böceklere karşı dayanıklı mahsuller üretmek ve besi hayvanlarının kalitesini artırarak onları daha sağlıklı, hastalıklara daha dayanıklı ve daha üretken hale getirmek için kullanılabilir (Singh et al. 2011). Bitki genomlarının karşılaştırmalı analizi sonucunda, bazı gen bölgelerinin ve bu genlerin organizasyonunun evrimsel süreç boyunca yüksek derecede korunduğunu

göstermiştir (Kushwaha et al. 2017). Bu bulgular, model bitkilerden (*Arabidopsis thaliana* (su teresi), *Oryza sativa* (çeltik), *Triticum aestivum* (buğday) ve *Zea mays* (mısır)) elde edilen genomik bilgilerin, diğer bitkilerde iyileştirmeler önermek için kullanılabileceğini göstermektedir (Proost et al. 2009; Kushwaha et al. 2017).

Ayrıca tarım bitkilerinde verim, kalite ve biyotik ve abiyotik streslere karşı direnç ile ilişkili agronomik özellikleri geliştirmek için, genetik seleksiyon, mutasyon ıslahı, somaklonal varyasyonlar, tüm genom dizisine dayalı yaklaşımlar, fiziksel haritalar ve fonksiyonel genomik araçlar dahil olmak üzere çeşitli geleneksel ve moleküler yaklaşımlar kullanılmaktadır. Dayanıklı hatlar geliştirmek amacıyla kullanılan klasik ıslah yöntemleri, çok sayıda melezleme, seleksiyon ve test aşamaları gibi birçok adımdan oluşmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında, yeni bir hat ya da çeşit geliştirmek bir veya yirmi yıl alabilir. Bu tür zaman alıcı, zahmetli ve hedefsiz ıslah programları, artan küresel gıda talebini karşılayamaz. Bu zorluğun üstesinden gelmek ve elit hatların seçim etkinliğini artırmak için markör destekli seleksiyon ve transgenik yaklaşımlar benimsenmektedir (Ahmar et al. 2020). Transgenik yaklaşımlar ile arzu edilen özellik, bitkilere aktararak geleneksel ıslaha kıyasla daha kısa sürede dayanıklı hatlar elde edilebilmektedir. Kuraklığa dayanıklılık genleri manipüle edilerek kuraklığa dayanıklı hatların geliştirilmesi, bu zorlukların üstesinden gelmek için potansiyel ve çekici bir önlemdir (Rouphael et al. 2012; Bukhari et al. 2019). Bu bağlamda transgenik yaklaşımlar, bitki kuraklık direncinin düzenlenmesinde önemli roller oynayan anahtar genlerin madenciliğinin yapılması, strese karşı yanıt mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, kuraklık stresine adaptasyon ve kuraklık stresinin ürün verimi üzerindeki etkilerini hafifletmek için büyük önem taşımaktadır (Oladosu et al. 2019; Lin et al. 2021; Coşkun 2023).

Genetik transformasyon, bir hücrenin dış ortamdan yabancı DNA aldığı ve kalıtsal olarak değiştirilmiş bir genotipin elde edildiği bir süreçtir (Smith et al. 1981). Gram-negatif bir bakteri olan *Agrobacterium tumefaciens*, yabancı DNA'yı bitki hücrelerine transfer etme ve bu T-DNA'yı kararlı bir şekilde konak organizmanın çekirdek genomuna entegre etme yeteneğine sahiptir (Gelvin 2017). Böylece daha kesin ve doğru bir genetik transformasyon sağlanmış olur (Tzfira et al. 2017). Bu doğal mühendislikten yararlanarak, *Agrobacterium* aracılı transformasyon hem dikot hem de monokot

bitkilerde en yaygın kullanılan genetik transformasyon yaklaşımı haline gelmiştir (Liu et al. 2023). *Agrobacterium* aracılı gen aktarım yöntemi diğer gen aktarım yöntemleriyle karşılaştırıldığında, düşük kopya sayısı, transformasyon kolaylığı, kararlı transgen ifadesi ve seleksiyon kolaylığı gibi özellikler sayesinde genetik transformasyon için daha avantajlıdır (Travella et al. 2005). *Agrobacterium* aracılı yöntemler, dokuya özgü ifadeye izin veren ve diğerlerine kıyasla daha düşük maliyetli prosedürlerdir (Ribeiro et al. 2019).

Tütün (*Nicotiana tabacum*) ve *Nicotiana* cinsindeki diğer türler, *Agrobacterium* aracılı dönüşüme oldukça yatkındır ve sonuç olarak hem gen işlevini incelemek hem de biyoteknoloji için model bitkiler olarak yaygın şekilde kullanılır hale gelmiştir (Lein et al. 2008; Bally et al. 2018; Molina Hidalgo et al. 2021; Kallam et al. 2023). *Nicotiana* türlerinin, yani *Nicotiana tobaccum* ve *Nicotiana benthamiana*'nın hedef eksplant olarak yaprak diskleri kullanılarak *Agrobacterium* aracılı transformasyonu, bitkiler alanında yüksek bitkilerde transgenlerin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi açısından değerli bir araç olarak kullanılmaktadır. Eksplanta uygulama kolaylığı, yüksek verimlilik ve nispeten hızlı geri dönüş süresi bu yöntemin tercih edilme sebeplerindendir. Yaprak disklerinin in vitro rejenerasyon şeması üretkendir ve dolaylı bir organojenik farklılaşmayı takip eder. *N. tobaccum* ve *N. benthamiana*, *A. tumefaciens* suşlarına karşı oldukça hassastır ve transformasyon sistemi, birçok farklı seleksiyon ajanına uygundur (Clemente 2006). Bu çalışmada da daha etkili bir transformasyon için *N. benthamiana* bitkisi seçilmiştir. *N. benthamiana*, biber, domates, patates ve tütünü içeren, tarımsal açıdan önemli Solanaceae familyasından yerli bir Avustralya türüdür. 19 kromozomdan oluşan bir genoma sahip bir allotetraploiddir (Kelly et al. 2013). 1998 yılında *N. benthamiana*'ya GFP geni aktararak *N. benthamiana*'nın model organizma olarak kullanılmasının önü açılmıştır (Ruiz et al. 1998; Bally et al. 2018). O zamandan günümüze kadar yapılan birçok çalışmada da *N. benthamiana* model organizma olarak sıkça tercih edilmiştir.

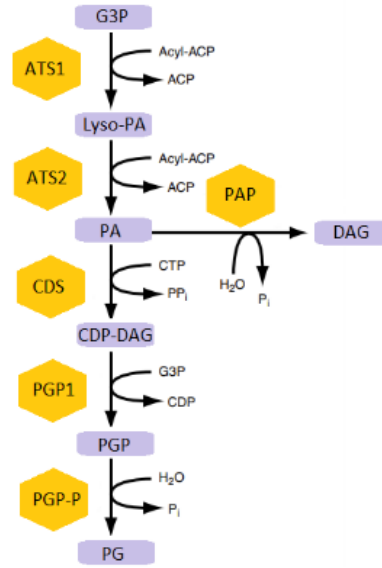
Kapsamlı biyoinformatik araçlar sayesinde bitkilerdeki farklı gen ailelerinin tanımlanması ve karakterizasyonu yapılabilmektedir. Bu çalışmada gliserolipit biyosentezinde önemli bir enzim olan sn-Gliserol-3-fosfat 1-O-açıltransferazı (GPAT; [EC] 2.3.1.15) kodlayan *GPAT* gen ailesinin genom çaplı karakterizasyonu fasulye bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Bitki lipitleri, steroller, gliserolipitler ve lipit poliesteri

gibi çeşitli yağ asitlerinden ve bunların türevlerinden oluşmaktadır. Hücre dışı koruyucu katmanların ve sinyal moleküllerin ana bileşeni olan lipidler, hücre zarının yapısına katılır ve de hücrenin metabolizması için gerekli enerjiyi sağlar. Bununla birlikte, bitki büyümesi ve gelişmesi gibi birçok fizyolojik ve metabolik reaksiyonlarda ve streslere karşı dirençte önemli bir rol oynamaktadır (Gidda et al. 2009; Okazaki and Saito 2014; Nakamura 2017). Lipitlerin sentezlenmesinde birçok gen rol almaktadır (Guschina et al. 2014) ve bu genlerden biri olan *GPAT*, gliserolipit biyosentezinde önemli bir bileşen olmasının yanı sıra farklı metabolik yollarda ve fizyolojik işlevlerde de görev alır. *GPAT*, hemen hemen bütün fosfolipitlerin biyosentezinde ilk adımı katalizlemektedir. Bazı *GPAT*'lar ya açıl-CoA'dan ya da açıl-ACP'den (açıl-açıl taşıyıcı proteinden) aldığı bir açıl grubunu gliserol-3-fosfatın (G3P) sn-1 pozisyonuna transfer eder ve lizofosfatidik asit (LPA) oluşur. LPA, membran lipidleri ve hücre dışı lipid poliestерlerinin oluşumu ve depolanması için önemli bir ara üründür. Bu *GPAT*'ler sn-1 tipi *GPAT*'lardır. Diğer *GPAT*'lar ana ürün olarak sn-2 monoaçilgliserol (2-MAG) oluşturmak için ilave bir fosfataz aktivitesine sahiptir. Bu *GPAT*'lar sn-2 tipindedir ve çoğunlukla karasal bitkilerde kütin ve suberin biyosentezine katılır (Li et al. 2007; Beisson et al. 2012; Yang et al. 2012).

GPAT'lar ilk olarak 60 yıldan uzun bir süre önce hayvan ve bitki dokularında biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Weiss et al. 1939; Kornberg and Pricer 1987). *Arabidopsis*, *Brassica napus* (Chen et al. 2011, 2014), *Z. mays* (Zhang et al. 2018), *O. sativa* (Men et al. 2017), *Heliantus annuus* (Paya-Milans et al. 2016) ve *Solanum lycopersicum* (Petit et al. 2016; Fawke et al. 2019) gibi birçok bitkide *GPAT* gen ailesi çalışılmıştır. Yapılan literatür taramasında fasulye *GPAT* (*PvGPAT*) genlerinin karakterizasyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bitkilerde, kloroplast, endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri olmak üzere üç farklı organelde aktif olan farklı *GPAT* genleri karakterize edilmiştir (Gidda et al. 2009). Mitokondri ve ER'de aktivite gösteren *GPAT*'lar açıl vericisi olarak açıl-CoA ve açıl-ACP'yi tercih etmekte olup membrana bağlıdırlar. Kloroplastlardaki *GPAT*'lar ise açıl donörü olarak açıl-ACP'yi tercih etmekte ve çözünür bir formdadır (Zheng et al. 2003). Evrimsel olarak incelendiğinde farklı organizmalardaki *GPAT* amino asit sekanslarının hizalanmasıyla, bu enzimlerin hem açıltransferaz aktivitesi hem de gliserol-3-fosfat substrat bağlanması için esansiyel olan yüksek oranda korunmuş en az dört amino asit sekansı motifine sahip olduğu ortaya

1. GİRİŞ

konulmuştur (Lewin et al. 1999). *A. thaliana* genomunda iki tanesi sn-1 tipinde (*AtGPAT9* ve *ATS1*) olmak üzere 10 tane *GPAT* geni tespit edilmiştir. *AtGPAT9* polen tanelerin gelişmesinde lipit damlacık üretiminde rol almakta ve bitki zarı lipit ve yağının biyosentezinden sorumludur (Shockey et al. 2016). sn-2 tipindeki diğer sekiz üye (*AtGPAT1-8*) kara bitkilere özgü *GPAT*'lardır ve kütin ve suberin biyosentezinde görev almaktadırlar. Ek olarak, bazı *GPAT*'ların polen ve anter gelişiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Örneğin *AtGPAT5* ve *AtGPAT7*, büyük ölçüde açıl-CoA spesifitesine sahiptir ve suberin sentezinde gerekli olan açıltransferazlardır (Yang et al. 2012). *AtGPAT1*, tapetum farklılaşması ve besin salgısı için elzemdir (Zheng et al. 2003). *AtGPAT6* polen dış kabuğu ve tapetum oluşumunda ve stamen uzamasının gelişiminde çeşitli görevler üstlenmektedir (Zheng et al. 2003; Li et al. 2012). Ayrıca çeltik, mısır ve domateste erkek fertilité için gerekli olan birkaç *GPAT* geni vardır. Domatesin *gpat6* mutantında bozulmuş polen oluşumu belirlenmiştir (Petit et al. 2016). Çeltikte *OsGPAT3*'ün, anter kütikülü ve polen dış kabuğu gelişimine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Men et al. 2017).



Şekil 1.3. *Arabidopsis* plastidlerinde fosfatidilgliserol biyosentezi (*ATS1*: gliserol-3-P açıl-ACP açıltransferaz, *ATS*; lizofosfatidik asit açıltransferaz, *PAP*; fosfatidik asit fosfataz, *CDS*; CDP-diaçilgliserol sentaz, *PGP1*; fosfatidilgliserolfosfat sentaz, *PGP-P*; fosfatidilgliserol fosfataz. Yol bileşikleri: ACP; açıl taşıyıcı protein, Açıl-ACP; açıl-açıl taşıyıcı protein, CDP-DAG; CDP-diaçilgliserol, G3P; gliserol-3-fosfat, Lyso-PA; lizofosfatidik asit, PA; fosfatidik asit, PG; fosfatidilgliserol, PGP; fosfatidilgliserolfosfat) (Xu et al. 2006).

ATSI, *Arabidopsis* kloroplastlarındaki açıl-ACP substratlarını kullanarak fosfatidilgliserol (PG) biyosentezinde görevlidir (Nishida et al. 1993; Xu et al. 2006). Şekil 1.3'te *Arabidopsis* plastidlerindeki PG biyosentezi şematize edilmiştir. PG, fotosistem II (PSII)'de oksijenli elektron taşıma bölgesindedir ve aynı zamanda tilakoid membranların tek fosfolipididir (Wada and Murata 1998). Bu nedenle, PG yağ asidi türlerinin değişiklikleri, PSII'nin fotosentetik mekanizmasının işlevini ve kloroplastik antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkileyebilir (Sui et al. 2007; Sun et al. 2010). *GPAT*'ların substrat seçiciliği ise PG'deki cis-doymamış yağ asitlerinin içeriğini belirleyen ana faktördür (Roughan and Slack 1982). Ayrıca düşük klorofil içeriği ve PSII verimliliği nedeniyle ısı stresi altında fotosentezde, elektron taşınmasının bozulmasında ve Rubisco'nun etkisizleştirilmesinde önemli düşüşler bildirilmiştir (Ergo et al. 2018). Şiddetli kuraklık koşullarında, stoma ile ilgili olan ve olmayan kısıtlamalar, fotosentetik hızdaki düşüşün büyük bölümünü oluşturur (Fahad et al. 2017; Zandalinas et al. 2018). Azalan yeşil yaprak alanı, yer üstü biyokütlesi ve bitki boyu ile gösterildiği gibi, bitkiler stres koşullarına maruz kaldığında azalan fotosentez, bitki gelişimini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Abdelhakim et al. 2021). Fotosentezde yaşanan aksaklıklar bitkiler için hayati önem taşımaktadır. Tuz ve kuraklık gibi abiyotik stresler sonucunda tilakoit membranlarda doymamış yağ asidi oranı özellikle PG miktarı azalmaktadır. PG oranındaki azalmalar PSI ve PSII'nin fotoinhibisyonuna neden olur (Sui et al. 2010). Bu nedenle PG sentezinin ilk adımını katalizleyen enzimi kodlayan *ATSI* geninin ifade seviyesinin artırılması kuraklık stresi sonucunda azalan PG miktarını dengeleyeceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının temel amacı *PvGPAT* genlerinin genom çaplı karakterizasyonunu gerçekleştirmek, tuz, kuraklık ve melatonin uygulamalarının *PvGPAT* genlerinin ifade seviyelerinde meydana getirdiği değişimi tespit ederek *PvGPAT* genlerinin stres yanıtındaki rolünü tahmin etmek ve *PvGPAT1* (kloroplastik *GPAT*) geninin tütün bitkisinde aşırı ifade edilmesi ile PG içeriğini artırarak kuraklık stresine karşı tütün bitkisine dayanıklılık kazandırmaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

20. yüzyılda gözlemlenen değişiklikler arasında küresel hava ve okyanus sıcaklığındaki artışlar, küresel deniz seviyelerinin yükselmesi, kar ve buz örtüsünün geniş çapta azalması ve mevsimsel yağışları etkileyen bölgesel hava düzensizlikleri yer almaktadır. Bu farklılıklara atmosfere salınan sera gazlarının da eklenmesiyle küresel sıcaklık artışı meydana gelir ve bunun sonucunda iklim değişikliği oluşur. İklim değişikliği, ortalama hava koşullarının birkaç on yıl veya daha uzun bir süre boyunca daha sıcak, yağışlı veya kuru hale gelmesi gibi önemli değişikliklerdir (WCRP 2021). İklim değişikliği sonucunda ortaya çıkan hava kirliliği, su kalitesinin bozulması ve gıda yetersizliği gibi sorunlar sosyal ve çevresel yönlerden insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (WHO 2021).

Gıda üretimi, son 70 yılda küresel nüfusun katlanarak artması nedeniyle günümüzün önemli konularından biri haline gelmiştir. 1950’de 2,5 milyar olan nüfus, 2022’de 8 milyara çıktı ve önümüzdeki 30 yılda yaklaşık 2 milyar daha artması beklenmektedir. Günümüzde olduğu gibi ilerleyen yıllarda da buğday, çeltik ve baklagiller gibi ürünler küresel gıda güvencesinin sağlanmasında hayati bir rol oynamaya devam edecektir. Aynı zamanda gıda güvencesi toprağın bozulması, yabani ot ve haşere istilası ve şiddetli kuraklıklar nedeniyle tehdit altındadır. Bunlar kısmen sürdürülemez tarımdan ve çoğunlukla da iklim değişikliğinin neden olduğu aşırı hava koşullarından kaynaklanmaktadır. Halihazırda ekili alanların yaklaşık %60’ının kuraklıktan etkilendiği tahmin edilmekte olup, küresel ısınmanın başlamasıyla bu sayının daha da artması beklenilmektedir (Vedere et al. 2023).

Toksik olmayan ve nüfuz edemeyen bir ozmotik madde olan moleküler ağırlığı ≥ 6000 olan polietilen glikol (PEG) molekülleri (PEG6000), kuraklık stresini tetiklemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Önceki araştırmalarda, PEG ile simule edilen kuraklık stresinin, farklı bitkilerin morfolojik, fizyo-biyokimyasal ve moleküler tepkileri üzerindeki etkisini incelenmiştir. Ayrıca PEG6000’e maruz kalmanın, kuraklığı etkili bir şekilde taklit edebileceğini ve tüm deney dönemi boyunca tekdüze bir su potansiyelini koruyabileceğini doğrulanmıştır. (Jatoi et al. 2014; Rohamare et al. 2014; Mendhulkar and Nisha 2015).

Kuraklık stresi bitkilerin temel hayati fonksiyonlarını etkiler, bireysel organlarına zarar verebilir ve aşırı durumlarda ölümüne yol açabilir (Larcher 1995). Kuraklık stresi, gelişimin her aşamasında bitkiyi morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeyde etkiler. Kuraklık stresi sonucunda bitkilerin özellikle hücre membranlarında hasar ve sızıntı meydana gelmektedir. Hücre membranlarının ana bileşeni olan lipidler birçok metabolik aktivitede yer alan önemli biyomoleküllerdir (Liang et al. 2023). Bitkilerdeki lipidler, steroller, gliserollipitler ve lipid poliestерleri gibi çeşitli yağ asitlerinden ve bunların türevlerinden meydana gelmektedir. Bitki metabolizmasında önemli bir yere sahip olan gliserollipitler Gliserol-3-fosfat açıltransferazı kodlayan *GPAT* gen ailesi tarafından sentezlenir. Bitkilerde sırasıyla plastidlerde, mitokondride ve sitoplazmada lokalize olan üç tip *GPAT* içerir (Xu et al. 2006; Li et al. 2012). Plastide lokalize olmuş çözünebilir *GPAT* genlerinden biri olan *ATSI* açıl-ACP substratlarını kullanır ve bölgeye özgü olarak sn-1 açıl transferi sergiler (Nishida et al. 1993). Çözünebilir *GPAT* genlerinin diğeri *GPAT9*'dur ve diğeri *GPAT* genleri ile ilişkili değildir ancak yağ dokularında triaçilgliserollerin sentezinde doğrudan rol oynamaktadır (Cao et al. 2006). *GPAT9* proteini ER lokalizedir ve kloroplastların dışındaki gliserolipit sentezinde rol oynamaktadır (Gidda et al. 2009). Geri kalan sekiz *GPAT* geni, membran ve depo lipidleri biyosentezinin dışında kalan lipidlerin sentezinde görev almaktadır (Chi et al. 2015). Kütin sentezinde rol alan *GPAT4*, *GPAT6* ve *GPAT8*, 2-monoasilgliserol (MAG) ürünleri üretebilen iki işlevli sn-2 açıltransferaz/fosfataz enzimleri olarak davranmaktadır. Bu genler C16:0 ve C18:1 ω-oksitlenmiş açıl-CoA'ları substrat olarak tercih ederler (Yang et al. 2012). Suberin sentezinde rol alan *GPAT5* ve *GPAT7* ise sn-2 açıltransferaz aktivitesine sahipken fosfataz aktivitesine sahip değildir. *GPAT1-GPAT3* enzimleri, *Arabidopsis*'in *GPAT* ailesindeki *GPAT4/6/8* ve *GPAT5/7* gruplarından farklı bir bölümü temsil eder. Fosfataz aktivitesi olmayan *GPAT1*, dikarboksilik açıl-CoA substratlarını kullanabilir. *GPAT2* ve *GPAT3*, fosfataz domainlerindeki anahtar amino asitlerini kaybetmiş olsalar da HXXXXD ve CPEGT korunmuş açıl transferaz motiflerini korurlar ve dolayısıyla aktif açıltransferazlar olarak işlev görebilir (Yang et al. 2012; Chi et al. 2015).

Biyoinformatik araçlar kullanılarak ilgili gen ailelerinin genom çaplı karakterizasyonu gerçekleştirilmektedir. Yer fıstığında (*Arachis hypogaea* L.) *GPAT* genlerinin genom çaplı karakterizasyonu ve ekspresyon analizini gerçekleştirmişlerdir.

Bu çalışmada *AhATSI*, *AhGPAT1*, *AhGPAT2*, *AhGPAT6*, *AhGPAT8* ve *AhGAPT9* genlerinin bitkinin farklı dokularında ve soğuk, tuz, kuraklık ve ABA stresi altında ifade profilleri incelenmiştir. Tohum gelişimi sırasında *AhGPAT9*'un ifade seviyesi artarken diğer beş genin ifade seviyelerinin azaldığı ve *AhGPAT1*, *AhGPAT6*, *AhGPAT8* ve *AhATSI* genlerinin ise tuza, kuraklığa ve ABA stresine maruz kalan köklerde önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir. *GPAT* genlerinin yer fıstığında bazı abiyotik stres türlerinin düzenlenmesinde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (Chi et al. 2015).

Waschburger et al. (2018) yaptığı çalışmada alglere, tek ve çift çenekli bitkilere ait *GPAT* genlerinin genom çapında ve evrimsel analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları filogenetik analiz sonucunda, bu genlerin üç ana dalda gruplandığı rapor edilmiştir. Sınıf I (*GPAT9*) ve II (*ATS*)'de yer alan genlerin, alglere ve bazı bitkilere ait olduğu, sınıf III (*GPAT1-8*)'te yer alan genlerin ise kutin veya suberin biyosentezinin gerçekleştiği bitkilere özgü olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler ışığında bitkilerdeki *GPAT* genlerinin gen organizasyonu ve ekspresyon paternlerinin filogenide sınıf oluşumunu yönlendirdiği dolayısıyla evrimsel paternlerin genlerin işlevselliğine yansıdığı sonucuna varılmıştır (Waschburger et al. 2018).

Dört farklı pamuk türünde yapılan *GPAT* genlerinin karakterizasyon çalışmasında *Gossypium raimondii*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium hirsutum* ve *Gossypium barbadense*'de sırasıyla 14, 16, 28 ve 27 *GPAT* geni tanımlanmıştır. Pamuk, *Arabidopsis* ve kakao ile oluşturulan filogenetik ağaç üç gruba ayrılmıştır. Ayrıca, gen yapısı analizleri karşılaştırıldığında aynı grupta bulunan *GPAT* genlerinin *Arabidopsis* ve pamuk arasında yüksek oranda korunduğu rapor edilmiştir. Segmental duplikasyonun dört pamuk türünde *GPAT* gen ailesinin genişlemesinin ana itici gücü olduğu sonucuna varılmıştır. *GhGPAT* genlerinin ekspresyon modelleri farklı dokularda çeşitlilik göstermiştir. *GhGPAT* genlerinin çoğu, Upland pamuğunda tuz veya soğuk stresinden sonra baskılanmıştır. Bu da bazı *GhGPAT* genlerinin tuza ve soğuğa karşı yanıtta rol oynamasının muhtemel olduğunu göstermektedir (Cui et al. 2019).

Xu et al. (2019) mısır genomunda on beş *GPAT* gen ailesi üyesi tanımlamış ve bu üyeleri *ZmGPAT1-14* ve *ZMS1* olarak adlandırmıştır. *ZmGPAT* proteinleri 371 ila 557 amino asit uzunluğunda ve 42,7 ila 61,2 kDa arasında bir moleküler ağırlığındadır.

Filogenetik analiz, *ZmGPAT*'ların dört gruba ayrıldığını ortaya çıkarmıştır. *ZmGPAT* proteinlerinin tümü, korunmuş PlsC/LPLAT (Fosfat açıltransferazlar/Lisofosfolipid açıltransferazlar) domainine ve birden fazla açıltransferaz motifine sahiptir. *ZmGPAT* genlerinin ifade profilleri, mısırın çeşitli dokularında farklılık göstermiştir. Çevresel streslere yanıt olarak, *ZmGPAT* genlerinin diferansiyel ifade modeli sergilediği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda özellikle soğuk stresi altında bazı *ZmGPAT* genlerinin ifadesinin indüklendiği rapor edilmiştir (Xu et al. 2019).

Biftekte otunda (*Perilla frutescens*) *GPAT* genlerinin fonksiyonel karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada biftekte otu genomunda toplam 14 *PfGPAT* geni tanımlanmış ve bu genler filogenetik olarak üç farklı gruba (Grup I, II ve III) ayrılmıştır. ER-lokalize *PfGPAT9*, perillanın tohum gelişimi sırasında toplam yağ ve α -linolenik asit (ALA) birikimlerinin dinamikleri ile tutarlı ifade profili sergilemiştir. *PfGPAT9*'un heterojen ekspresyonu, transgenik tütün bitkilerinin hem tohumlarında hem de yapraklarında toplam yağ ve doymamış yağ asidi (çoğunlukla C18:1 ve C18:3) seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır. Ayrıca, bu durum transgenik tütün bitkilerinin, bitki büyümesi ve tohum çimlenme hızının yanı sıra diğer morfolojik ve gelişimsel özellikler de dahil olmak üzere diğer tarımsal özellikler üzerinde önemli bir olumsuz etki göstermediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgularla, *PfGPAT9*'un, yağlı tohumlu mahsullerde yağ verimini ve kalitesini iyileştirmeye yönelik yeni bir genetik mühendisliği hedefi olduğu sonucuna varılmıştır (Zhou et al. 2023).

Soğuğa karşı hassas bir bitki olan *Paeonia lactiflora*'da yapılan bir çalışmada araştırmacılar bu bitkiye *GPAT* genini klonlayıp, *GPAT* geninin soğuk strese dayanıklılıktaki rolünü ifade seviyesine göre test etmişlerdir. Filogenetik analiz sonucunda, *PIGPAT* geninin, çift çenekli bitkilerdeki *GPAT* genleriyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada yapılan qPCR analizleri sonucunda *PIGPAT* ifadesinin düşük sıcaklık stresi ile ilişkili olduğunu ve *PIGPAT* geninin *P. lactiflora*'da soğuk stresine karşı direncin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Li et al. 2018).

Wang et al. (2020) Brassica'larda *GPAT* genlerinin karakterizasyonunu ve *Brassica napus*'taki iki kütin grubu *GPAT* geninin fonksiyonel karakterizasyonunu

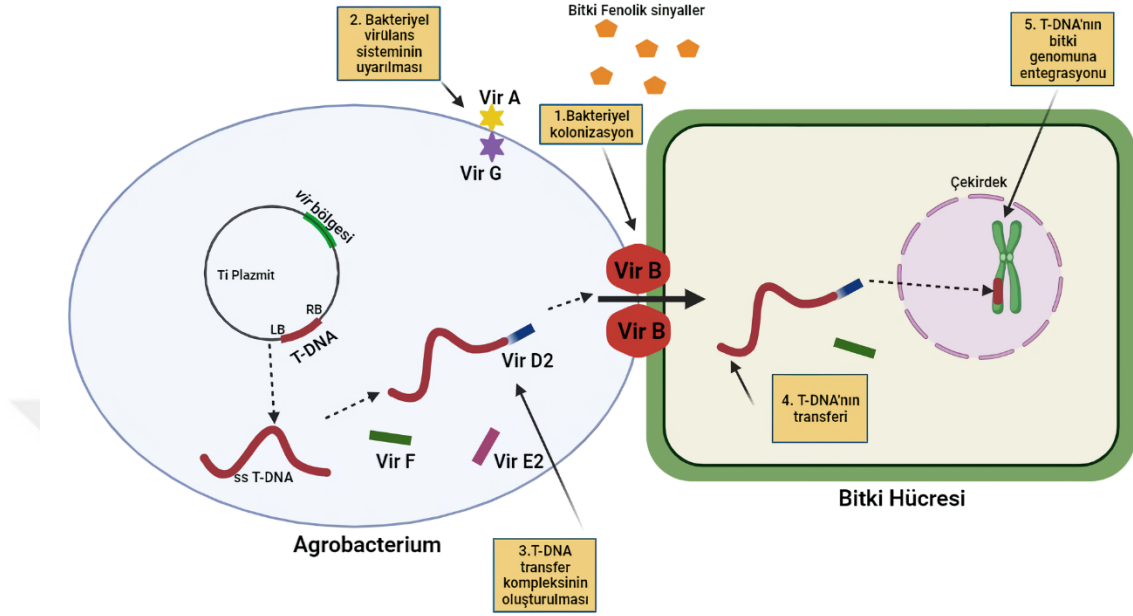
gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada *B. napus* ve onun diploid progenitörleri *B. rapa* ve *B. oleracea*'da sırasıyla 32, 18 ve 17 muhtemel *GPAT* geni tanımlanmıştır. Bu genler üç farklı gruba ayrılmıştır. Farklı gelişim aşamalarındaki farklı doku ve tohumların transkriptom analizinde, *BnGPAT*'lar mekansal ve zamansal olarak farklı ifade profili sergilemiştir (Wang et al. 2020).

Genetik transformasyon, alıcıya belirli hedef gen veya genlerin kalıtsal fonksiyonel özelliklerini veren bir hücrenin veya tüm organizmanın genetik değişimidir (Rustgi and Luo 2020). 1983 yılında, bitki genetik mühendisliği döneminin başlangıcını temsil eden, herbisite dirençli transgenik tütün olan ilk transgenik bitki üretilmiştir (Greef et al. 1989). Yaklaşık kırk yıllık gelişimden sonra, çok sayıda bitki için genetik transformasyon sistemleri başarıyla kurulmuştur (Hao et al. 2024). *Agrobacterium*, biyolistik parçacık bombardımanı, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, lazer mikro ışınlar, polietilen glikol ve lipozom aracılı transformasyonu içeren doğrudan veya dolaylı gen transfer teknikleri, genetik transformasyon için başarıyla uygulanmıştır. Bunlar arasında *Agrobacterium* aracılı genetik transformasyon, yüksek transformasyon verimliliği, istikrarlı düşük kopya transferi, basit ve kullanışlı uygulama ve nispeten düşük maliyet avantajları nedeniyle en popüler olanı olarak kabul edilir (Kong et al. 2020).

Agrobacterium aracılı bitki transformasyonu hem bakterinin hem de konakçı bitki hücresinin genetik belirleyicilerini içeren oldukça karmaşık ve gelişmiş bir süreçtir. *Agrobacterium tumefaciens* tarafından taşınan ve bitki transformasyonu için gerekli olan genetik bileşenler arasında bitki hücresine aktarılan T-DNA, transformasyon için gerekli olan Ti plazmid virülans (vir) bölgesi ve vir bölgesinin aksine ekspresyonu konstitütif olan *chvA*, *chvB* ve *pscA* olmak üzere transfer işlemi için gerekli olan üç kromozomal virülans lokusu bulunmaktadır (Mehrotra and Goyal 2012). İlgili gen, *Agrobacterium* tarafından aktarılan T-DNA'nın sol ve sağ sınır tekrarları arasına yerleştirilmektedir (Gelvin 2003). *A. tumefaciens*, T-DNA'yı, bitkinin genomuna aktarma yeteneğine sahiptir (Sheng and Citovsky 1996). Vir bölgesi, T-DNA'nın işlenmesini ve transferini düzenlemek için proteinleri kodlayan *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* ve *virH* olmak üzere sekiz operon içerir. *Agrobacterium*'dan bitki hücrelerine gen transferi, Şekil 2.1'de gösterilen beş temel adımı içerir. Bunlar (1) bakteriyel kolonizasyon, (2) bakteriyel virülans sisteminin uyarılması, (3) T-DNA transfer kompleksinin oluşturulması, (4) T-

2. KAYNAK ÖZETLERİ

DNA'nın transferi ve (5) T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonudur (Mehrotra and Goyal 2012).

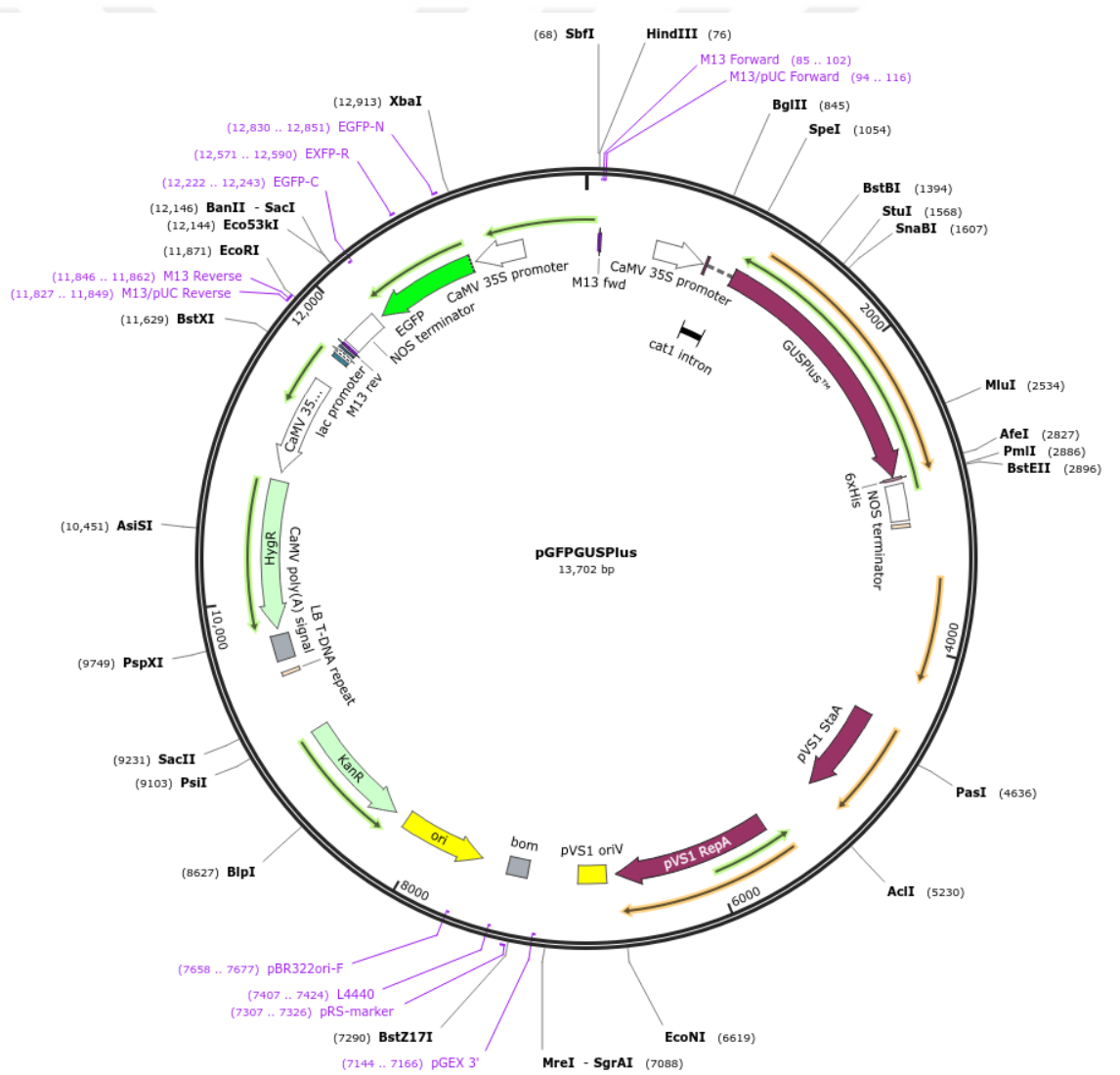


Şekil 2.1. Bitkilerde *Agrobacterium* aracılı transformasyonun moleküler mekanizması (Anonymous 2023b).

Kuraklığa dayanıklılık genleri manipüle ederek kuraklığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, stresin üstesinden gelmek için potansiyel ve çekici bir önlemdir (Chen et al. 2021). Bu bağlamda, bitkilerin kuraklığa direncinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan anahtar genlerin derinlemesine araştırılması ve bunların kuraklık stresine tepki ve adaptasyonlarının moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, kuraklık stresinin ürün verimi üzerindeki etkilerini hafifletmek için büyük önem taşımaktadır (Yao et al. 2023). Bir genin fonksiyonunu incelemek için çeşitli reverse genetik araçları geliştirilmiştir; en yaygın kullanılanlardan ikisi nakavt ve aşırı ekspresyondur (Zhang 2003). pGFPGUS*Plus* (Plasmid #64401) (Şekil 2.2) vektörü bir aşırı ifade vektörüdür. Vickers et al. (2007) transformasyon sistemlerinin geliştirilmesini ve optimizasyonunu kolaylaştırmak amacıyla, hem yeşil floresan protein (GFP) (Chalfie et al. 1994) hem de geliştirilmiş bir b-glukuronidaz (GUS*Plus*) (Broothaerts et al. 2005) ekspresyon kasetleri taşıyan pGFPGUS*Plus* adlı bir transformasyon vektörü oluşturduğunu rapor etmiştir. 35S promotör:GFP ifade kaseti oluşturmak için, pUBIGFP'den sentetik sGFP(S65T) genini içeren EcoRI ile kesilmiş ve küt uçlu bir parça, p35SsGFP oluşturmak için GUS geninin yerini alan pBI221 plazmidine eklenmiştir. pGFP::GUS*Plus*, p35SsGFP'den

2. KAYNAK ÖZETLERİ

35S:GFP:NOS ekspresyon kasetinin pCAMBIA1305.1'e yukarı yönde ve 35S:GUSPlus:NOS kasetine ters yönde, çoklu klonlama bölgelerindeki HindIII ve EcoRI bölgelerinden ligasyon yoluyla klonlanmasıyla yapılmıştır. Bu şekilde, her iki raportör genin ifadesi, iki 35S promotöründe bulunan arttırıcı elementlerden yararlanır. Her raportör gen, dikot türlerinde ve birçok monokot türünde aktif olan karnabahar mozaik virüsü (CaMV) 35S promotörü tarafından kontrol edilmektedir. Raportör gen kasetleri ve bir higromisin direnç gen kaseti, T-DNA sınırları arasında yer alır ve *Agrobacterium* aracılı transformasyona izin verir. Her üç ekspresyon kaseti de kolayca çıkarılabilir ve ilgilenilen bir gen veya farklı bir seçilebilir direnç geni ile değiştirilebilir (Vickers et al. 2007).



Şekil 2.2. p35SGFPGUSPlus vektörünün haritası (Anonymous 2023c)

Xue et al. (2017) yaptığı çalışmada, dirençli bir fasulye genotipinden bir peroksidaz geni olan *PvPOXI*'i izole edip p35SGFPGUS*Plus* vektörüne aktarmıştır. Ardından *Agrobacterium rhizogenes* aracılı saçak kök transformasyonu yoluyla hassas bir fasulye genotipi olan BRB130'a transferi ile *PvPOXI*'in dirençteki rolünü doğrudan kanıtlamıştır. *PvPOXI* geninin aşırı ekspresyonunun hem köklerde hem de transgenik bitkilerin geri kalanında *Fusarium* solgunluğuna karşı direnci artırdığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, *PvPOXI* geninin reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu aşırı duyarlı yanıtın ortaya çıkması yoluyla *Fusarium* solgunluk direncinde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. Böylece *PvPOXI* ifadesinin, ROS ile aktive edilen bir direnç mekanizmasıyla *Fusarium* solgunluğuna karşı konakçı savunma tepkisini güçlendirebilecek değerli bir gen olduğu kanıtlanmıştır (Xue et al. 2017).

Vickers et al. (2009) yaptığı çalışmada *Populus alba*'dan izole ettikleri izopren sentaz geni modifiye ettikleri p35SGFPGUS*Plus* vektörüne klonlamıştır. Rekombinant vektör *Agrobacterium* aracılı transformasyon metodu ile *Nicotiana tobacum*'a aktararak transgenik tütün bitkileri elde etmiştir. İzopren sentazın aşırı ifadesi sonucu artan izoprenin üç abiyotik strese (ısı, kombine ısı/ışık ve ozon kaynaklı oksidatif stres) karşı koruyucu bir rol oynadığını tespit etmişlerdir (Vickers et al. 2009).

Kloroplastik *GPAT*, tilakoid membranlarda fosfatidilgliserolün (PG) doymamışlığını belirleyen ilk anahtar enzimdir ve bitkilerin soğuk, kuraklık ve yüksek tuzluluk streslerine toleransında rol oynar (Xue et al. 2019). PG, yüksek bitkilerdeki kloroplastların tilakoid membranlarındaki tek fosfolipittir ve sentezi, kloroplast stromada lokalize olan gliserol-3-fosfat açıltransferaz tarafından başlatılır. Enzim, lisofosfatidik asit (LPA) oluşturmak için bir açıl zincirini G3P'nin sn-1 pozisyonuna aktarır. Daha sonra palmitoil (16:0) açıl zinciri, fosfatidik asit (PA) üretmek için yalnızca LPA'nın sn-2 konumunda esterleşmektedir. Bu PA, PG'nin sentezi için kullanılır (Wada and Murata 2007; Xue et al. 2019).

Daha önce yapılan çalışmalarda doymamış yağ asidi içeriğini artırarak, bitkinin soğuk, kuraklık, sıcaklık ve tuz gibi farklı koşullara karşı toleransını değiştirebileceği bildirilmiştir (Sui et al. 2017). Bu çalışmalardan biri olan *AtAST1*'in tütünde aşırı ekspresyonunu, hem fosfatidilgliseroldeki yağ asitlerinin doymamışlık derecesini hem de

tütünün soğuk stresine karşı direncini arttırdığını gösterdi (Murata et al. 1992). Çeltikte yapılan in vivo deneyde ise *Arabidopsis* kloroplast *GPAT* geni (*AtATSI*) aktarılmış çeltik bitkilerinde gerçekleşen PG'deki artış, fotosentetik oranları ve düşük sıcaklıklarda büyümeyi iyileştirmiştir (Ariizumi et al. 2002). Sui et al. (2007), *LeATSI*'in aşırı ekspresyonunun, domatesin tilakoid membranlarındaki PG cis-doymamış yağ asitlerinin seviyelerini artırdığını ve bunun sonucunda PSI'de soğuk stresin neden olduğu fotoinhibisyonunun iyileşmesini desteklediğini bildirmiştir (Sui et al. 2007). Yan et al. (2008) tatlı biberden elde edilen *ATSI*'in tütün bitkisine transferi sonucunda transgenik tütünde tilakoid membran lipidlerindeki artışın fotosentetik ürünlerin termotoleransını artırdığını rapor etmiştir (Yan et al. 2008).

Ammopiptanthus mongolicus'ta yapılan çalışmada *AmGPAT* geninin fonksiyonunu karakterize etmek için *Arabidopsis*'e transformasyonu gerçekleştirilmiştir. *AmGPAT* geninin *Arabidopsis*'te yapısal ifadesi, cis-doymamış yağ asitlerinin, özellikle PG içeriğini, linolenik asit (18:3) seviyesini ve transgenik soylardaki diğer kloroplast lipid içeriğini artırmıştır. Daha da önemlisi, transgen, transgenik bitkilerin sadece soğuk stresine değil aynı zamanda hem hücresel hem de tüm bitki kısımlarındaki oksidatif strese karşı toleransı önemli ölçüde artırmıştır (Xue et al. 2019).

Sui et al. (2017) *Suaeda salsa*'dan izole edilen 1167 bp nükleotitik *SsGPAT* geninin *Arabidopsis*'te aşırı ifadesini gerçekleştirmiştir. Transgenik *Arabidopsis* bitkilerini tuz stresine maruz bırakarak *SsGPAT* genini tuz stresindeki rolünü ortaya çıkarmıştır. Tuz stresi altındaki kontrol bitkisine göre aşırı eksprese edilmiş transgenik bitkilerde, klorofil içeriği, PSII'nin fotokimyasal verimliliği, PSI oksidoredüktif aktivitesi ve PG'nin doymamış yağ asidi içeriğinin artmıştır. Bu sonuçlar, *Arabidopsis*'te *SsGPAT*'ın aşırı ekspresyonu PG'deki cis-doymamış yağ asidi seviyelerini artırmıştır. PG cis-doymamış yağ asitlerinin artışı, PSI ve PSII'nin fotoinhibisyonunu hafifleterek fotosentez elemanlarını korumuş ve tuz toleransını artırmıştır (Sui et al. 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyalleri, bakteri suşları ve plazmitler

Araştırmada kullanılan *Phaseolus vulgaris* cv “Serra” ve “Elkoca-05” ve gen aktarım çalışmalarında kullanılan *Nicotiana benthamiana* bitkileri Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nden temin edilmiştir. Araştırmada fasulyeden izole edilen DNA parçasının çoğaltılmasında CloneJET (Thermo Scientific, #K1231) klonlama vektörü kullanılmıştır. Aşırı ifade vektörü olarak pGFPGUSPlus (Addgene plasmid #64401) plazmiti kullanılmıştır. Plazmitlerin çoğaltılmasında *Escherichia coli* JM101 ve gen aktarım çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 bakteri suşları kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları

Kimyasalın Adı	Kullanım Amacı
Agar	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Agaroz	İki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.
Ampisilin	Bakteri seleksiyon ortamında kullanılmıştır.
Asetosiringon	Gen aktarım çalışmalarında kullanılmıştır.
β -merkaptotanol	DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Borik asit	İki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.
Bromophenol blue	İki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	İki boyutlu jel elektroforezi ve DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Etidyum Bromür (EtBr)	İki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında kullanılmıştır.
Etil alkol (EtOH)	Genel sterilizasyonda ve DNA-RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Fenol-Kloroform	DNA-RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Gliserol	Bakterilerin stoklanmasında kullanılmıştır.
Hidroklorik asit (HCl)	Tampon çözelti hazırlamada kullanılmıştır.
İzopropanol	DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
İndol-3-Asetik Asit (IAA)	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Kanamisin	Bakteri seleksiyon ortamında kullanılmıştır.
LB broth	Bakteri büyütme ortamında kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.1. (Devam)

MES hidrat	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
MS Vitamin Solution 1000 X	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
MS temel besi ortamı	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Sükroz	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Sefotaksim	İn vitro ortamda agro eliminasyonunda kullanılmıştır.
Trizol reagent	RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Taq 2X Master Mix	PCR çalışmalarında kullanılmıştır.
Tris	İki boyutlu jel elektroforezi ve DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
PVP40	DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
CTAB	DNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.
Sodyum hipoklorit	Sterilizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.
α -naftalin asetik asit (NAA)	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
6-benzil amino pürin (BAP)	Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.
Higromisin	Bitki seleksiyon ortamında kullanılmıştır.
PEG6000	Kuraklık stresi uygulama çalışmalarında kullanılmıştır.
NaCl	Tuz stresi uygulama çalışmalarında kullanılmıştır.
Melatonin	Stres iyileştirici ajan olarak kullanılmıştır.
Sybr Green Mix	qPCR çalışmalarında kullanılmıştır.
Streptomisin	Bakteri seleksiyon ortamında kullanılmıştır.
Rifamisin	Bakteri seleksiyon ortamında kullanılmıştır.
YEB ortamı	Bakteri büyüme ortamında kullanılmıştır.
Hoagland solüsyonu	Hidrofonik ortamda bitkilerin büyütülmesinde kullanılmıştır.
cDNA sentez kiti	cDNA sentezi çalışmalarında kullanılmıştır.
Thiyobarbitürik asit	MDA analizi çalışmalarında kullanılmıştır.
Trikloroasetik asit	MDA analizi çalışmalarında kullanılmıştır.
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit analizi çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/model
Bitki Büyütme Kabini	Wisd/SWGC-450
Santrifüj	Hettich/1406
Manyetik Karıştırıcı	Wisd/MSH-20D
Hassas Terazî	Shimadzu/ATX224
4°C Soğutucu	Simens/KD56NAW35N
-20°C Soğutucu	Beko
Emniyet Kabini	Biobase/BSC-700IIA2
Su Banyosu	Wisd/WB-11
Spektrofotometre	ThermoFisher/Multiskan Go
Real Time PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q
Jel Görüntüleme Cihazı	Bio-rad/Universal Hood III
Elektroforez Sistemi	Bio-rad/PowerPac Basic
PCR	SenzoQuest/LabCycler Gradient
Etüv	Wisd/WIR-150
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng/ZHWY-2102C

Çizelge 3.2. (Devam)

Otoklav	Hirayama/HV-50L
-80°C Soğutucu	ThermoFisher/FDE40086FV
Sınıf II Emniyet Kabini	Esco/NC2-4L8
İnkübatör	Memmert/IN110
Mikropipet Takımı	Eppendorf
Klorofil Ölçer Spektrometre	Konica Minolta/SPAD 502
Klorofil Florometrekare	Hansatech/Handy PEA
EC Metre	Mettler Toledo/SevenGo Duo
pH Metre	Mettler Toledo/SevenCompact
Mikrodalga	Altus
Doku Parçalayıcı	Qiagen/TissueLyser LT

3.2. Yöntem

3.2.1. Araştırmada kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70'lik EtOH hazırlanışı

%99,8 saflıkta olan etil alkolden 700 ml alınarak son hacim 1000 ml olacak şekilde saf su ile hazırlanmıştır.

%1'lik NaOCI solüsyonunun hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen Güldal marka %5'lik NaOCI'den 100 ml alarak son hacim 500 ml olacak şekilde saf su ile hazırlanmıştır.

%20'lik PEG6000 solüsyonunun hazırlanışı

200 g PEG6000 tartılmıştır ve bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

150 mM NaCl solüsyonunun hazırlanışı

8,766 g NaCl tartılmıştır ve bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

20 mM CaCl₂ solüsyonunun hazırlanışı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

294,02 g tartılıp $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%10'luk Gliserol solüsyonunun hazırlanışı

Saf gliserolden 1 ml alınarak son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

100 mg/ml Kanamisin stok solüsyonunun hazırlanışı

1 g Kanamisin sülfat (Gibco, 11815-024) alınarak 10 ml distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 μm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

25 mg/ml Rifamisin stok solüsyonunun hazırlanışı

250 mg Rifamisin (Duchefa, R0146) alınarak 10 ml DMSO'da çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 μm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

100 mg/ml Ampsilin stok solüsyonunun hazırlanışı

1 g Ampsilin (Sigma, A9393) alınarak 10 ml distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 μm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

50 mg/ml Streptomisin stok solüsyonunun hazırlanışı

500 mg Streptomisin (Duchefa, S0148) alınarak 10 ml suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 μm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

25 mg/ml Higromisin stok solüsyonunun hazırlanışı

250 mg Higromisin (Gold Bio, H-270-1) alınarak 10 ml suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 μm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

200 mg/ml Sefotaksim stok solüsyonunun hazırlanışı

2 g Sefotaksim (Gold Bio, C-104-1) alınarak 10 ml suda çözündürülmüştür. Hazırlanan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

100 mM Asetosiringon stok solüsyonunun hazırlanışı

19,62 mg Asetosiringon (ACROC, 115540050) alınarak 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 edilmiştir.

1 mg/ml Benzilaminopurin (BAP) stok solüsyonunun hazırlanışı

100 mg Benzilaminopurin (Sigma, B3408) alınarak bir miktar saf su eklenmiştir. 3 ml 1 N NaOH e ilavesi ile tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözündükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1 mg/ml Naftalin asetik asit (NAA) stok solüsyonunun hazırlanışı

100 mg naftalin asetik asit (Sigma, N0640) alınarak bir miktar saf su eklenmiştir. 3 ml 1 M NaOH ilavesi ile tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözündükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1 mg/ml İndol asetik asit (IAA) stok solüsyonunun hazırlanışı

100 mg indol asetik asit (Sigma, I3750) alınarak 5 ml EtOH içerisinde çözündükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

0,5 M Tris solüsyonunun hazırlanışı

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.

0,5 M EDTA solüsyonunun hazırlanışı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

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 edilmiştir.

10X TBE Buffer stok solüsyonunun hazırlanışı

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 edilmiştir.

1X TBE Buffer'ın hazırlanışı

10X TBE Buffer'dan 50 ml alınıp 450 ml saf suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır.

%5 Trikloasetikasit (TCA) solüsyonunun hazırlanışı

5 g TCA 50 ml saf suda çözündürülmüş ve son hacim 100 ml' ye saf su ile tamamlanmıştır.

MDA reaksiyon solüsyonunun hazırlanışı

20 g TCA ve 0,5 g Tiyobarbütirik asit (TBA) 50 ml saf suda çözündürülmüş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaksiyon solüsyonunun hazırlanışı

0,0272 g KH_2PO_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_2O_2 ölçümünde blank olarak kullanılmak üzere 290, 580, 870 μM H_2O_2 çözeltileri (100 ml'de sırasıyla 2,5, 5 ve 7,5 μl) hazırlanmış ve kullanılmıştır.

5 M NaCl solüsyonunun hazırlanışı

292,4 g NaCl alınarak bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklav ile sterilize edilmiştir.

%2'lik CTAB stok solüsyonunun hazırlanışı

3. MATERYAL ve YÖNTEM

10 g CTAB ve 4,1 g NaCl alınarak 50 ml saf suda ısı yardımıyla çözdürülmüştür. Son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmış ve otoklav ile sterilize edilmiştir.

%5,4'lük PVP40 stok solüsyonunun hazırlanışı

5,4 g PVP40 alınarak 70 ml saf suda çözdürülüp son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

DNA izolasyon solüsyonunun hazırlanışı

%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.

Kloroform: İzooamil alkol (24:1) solüsyonunun hazırlanışı

48 ml kloroform ve 2 ml izooamil alkol alınarak hazırlanmıştır.

Luria-Bertani (LB) broth besi ortamının hazırlanışı

10 g Triptofan, 10 g NaCl ve 5 g maya ekstraktı içeren ticari olarak temin edilmiş LB broth ortamından 25 g alınarak 1 l saf suya eklenmiştir ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanmıştır.

LB agar besi ortamının hazırlanışı

1 litre besi ortamı elde etmek için LB broth'tan 25 g ve agardan 12 g alınarak 1 l saf suya eklenmiştir ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanmıştır.

YEB besi ortamının hazırlanışı

5 g sığır ekstraktı, 1 g maya ekstraktı, 5 g pepton, 5 g süktroz ve 0,5 g MgCl₂ alınarak 1 litre saf su ile hazırlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C'de otoklavlanmıştır.

İndüksiyon ortamının hazırlanışı

YEB ortamı içeriği ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 ml saf suda çözdürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8'e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca

3. MATERYAL ve YÖNTEM

121°C’de otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra, 100 mM asetosiringon, 100 mg/ml kanamisin, 25 mg/ml rifampisin, 100 mg/ml ampsilin ve 50 mg/ml streptomisin olacak şekilde antibiyotikler eklenerek son hacim saf su ile 10 ml’ye tamamlanan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamına eklenmiştir.

MMA ortamının hazırlanışı

4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 ml saf suda çözdürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8’e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C’de otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra ortama 1ml MS vitamin (1000x) (Sigma M3900) ve 9 ml saf sudan oluşan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek eklenmiştir.

MS besi ortamının hazırlanışı

4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz, 8 g agar ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 ml saf suda çözdürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8’e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C’de otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra ortama 1ml MS vitamin (1000x) ve 9 ml saf sudan oluşan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek eklenmiştir.

MSII besi ortamının hazırlanışı

4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz, 8 g agar ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 ml saf suda çözdürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8’e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C’de otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra, 1 mg/ml BAP, 0,1 mg/ml NAA, 25 mg/ml higromisin ve 200 mg/ml sefotaksim olacak şekilde bileşenler ve 1ml MS vitamini (1000x) eklenerek son hacim 10 ml’ye tamamlanan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamına eklenmiştir.

MSIII besi ortamının hazırlanışı

4,3 g MS tuzu, 20 g süktroz, 8 g agar ve 0,5 g MES hidrat alınarak 990 ml saf suda çözdürülmüş ve 1N KOH çözeltisi kullanılarak ortamın pH=5,8’e ayarlanmıştır ve 15 dk boyunca 121°C’de otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra, 25 mg/ml higromisin, 200 mg/ml

sefotaksim ve 1 mg/ml IAA olacak şekilde bileşenler ve 1ml MS vitamini (1000x) eklenerek son hacim 10 ml'ye tamamlanan solüsyon 0,22 µm gözenekli selüloz asetat filtreden geçirilerek besi ortamına eklenmiştir.

3.2.2. *GPAT* genlerinin araştırılması ve tanımlanması

GPAT gen ailesi üyelerinin fasulye (Schmutz et al. 2014), soya fasulyesi (Valliyodan et al. 2019), *Arabidopsis* (Lamesch et al. 2011), *Vitis vinifera*, *Cicer arietinum* ve *Lens culinaris* genomlarındaki protein dizilerini elde etmek için gereken Pfam Erişim Numarasını (PF01553) elde etmek için Pfam veri tabanından (Mistry et al. 2021) yararlanılmıştır. Bu erişim numarasına sahip tüm olası *GPAT* protein dizilerini bulmak için Phytozome v13 (Goodstein et al. 2012) veritabanı ile Blastp ve Hidden Markov Model (HMM) taraması yapılmıştır. Ayrıca, *PvGPAT* genlerinin CDS (kodlama dizisi), genomik, transkript ve promotör dizileri Phytozome v13 veri tabanından elde edilmiştir.

3.2.3. *GPAT* genlerinin yapısı, korunmuş motifleri, cis-düzenleyici elementleri, kromozomal konumu ve gen duplikasyon durumunun analizleri

P. vulgaris GPAT (PvGPAT) genlerinin ekzon ve intron organizasyonu, veri tabanlarında depolanan genomik DNA dizileri kullanılarak ve gen organizasyonu ve yapısının protein evrimi ve türler arasındaki işlevsel farklılıklar üzerindeki ilkeleri ve potansiyel etkileri anlaşılabilir belirlenmiştir (Wang et al. 2013). *PvGPAT* genlerinin ekzon-intron bölgelerinin başlangıç ve bitiş noktaları hakkında bilgi içeren annotation-gene-transcript (gff3) dosyası Phytozome v13 veri tabanından elde edilmiştir. *PvGPAT* amino asit dizilerinin ek korunmuş motifleri “Multiple EM for Motif Elimination (MEME)” programı kullanılarak elde edilmiştir (Bailey et al. 2006). Maksimum motif sayısı 10 olarak belirlenirken, motif genişliği aralığı 2 ila 50 olarak belirlenmiştir. Tema bölgeleri 6 ila 300 arasında değişmektedir. Domain dağılımını oluşturmak için herhangi bir sayıda tekrar kullanılmıştır. Tanınan motifleri aramak için InterPro veritabanının varsayılan ayarları kullanılmıştır (Quevillon et al. 2005). *PvGPAT* genleri için korunmuş motif bilgileri “NCBI Conserved Domain Search” tarayıcısından elde edilmiştir. Elde edilen veriler TBtools programı ile görselleştirilmiştir (Chen et al. 2020). Ek olarak,

fasulyelerde korunmuş bölge dizi analizi için, PvGPAT proteinlerinin BLOCK I-II-III ve -IV domainlerinin dizi logo analizleri WEBLOGO çevrimiçi web aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Crooks et al. 2004). Fasulye kromozomu üzerindeki *PvGPAT* genlerinin boyutları ve yerleşimleri Phytozome v13 veri tabanı kullanılarak belirlenmiştir. *PvGPAT* genlerinin konumları tüm fasulye kromozomları üzerinde not edilmiş ve TBtools programı kullanılarak çizilmiştir. *PvGPAT* genlerinin ikili gen çiftleri arasındaki eş anlamlı olmayan (K_a), eş anlamlı (K_s) değerleri ve evrimsel zorlamalar (K_a/K_s) PAML arayüzü (Yang 2007) ve PAL2NAL tarayıcısı kullanılarak tanımlanmıştır. PlantCARE (Lescot et al. 2002) kullanılarak *PvGPAT* gen ailesinin tüm üyeleri için yaklaşık 2 kb DNA içeren 5 yukarı akış bölgesine cis-element analizi uygulanmıştır. Elde edilen veriler TBtools aracı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.4. PvGPAT proteinlerinin fizyolojik parametreleri ve hücre altı lokalizasyonu

Fasulyedeki GPAT proteinlerinin amino asit sayısı, teorik izoelektrik noktası (pI), moleküler ağırlığı, kararsızlık indeksi ve stabilizasyon durumu ProtParam kullanılarak belirlenmiştir. Fasulye GPAT protein dizilerinin hücre altı lokalizasyonları WoLF PSORT kullanılarak belirlenmiştir (Horton et al. 2007).

3.2.5. Filogenetik ağaç ve dizi hizalama analizleri ve fasulye, soya fasulyesi ve *Arabidopsis* arasında karşılaştırmalı haritalama

Filogenetik analiz için 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile maksimum olabilirlik (ML) modeli kullanılmıştır. *G. max*, *A. thaliana*, *P. vulgaris*, *V. vinifera*, *L. culinaris* ve *C. arietinum*'un GPAT protein dizileri ClustalW (Thompson et al. 1997) kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan veriler, MEGA v11 programı (Kumar et al. 2016) kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Evrimsel ağaç İnteraktif Yaşam Ağacı (iTOL) tarayıcısı kullanılarak oluşturulmuştur (Letunic and Bork 2011).

A. thaliana, *G. max* ve *P. vulgaris* GPAT genlerinin ortologlarını belirlemek için “Çoklu Doğrusallık Tarama Araç Seti (MCScanX)” kullanılmıştır (Wang et al. 2012). Ortolog genlerin protein dizileri Phytozome v13 kullanılarak keşfedilmiştir. *Arabidopsis*,

fasulye ve soya fasulyesindeki *GPAT* genlerinin sinteni haritası TBTools kullanılarak oluşturulmuştur

3.2.6. Gen Ontolojisi (GO) analizi, homoloji modellemesi ve PvGPAT proteinlerinin protein-protein etkileşimleri

Proteinleri modellemek için daha önce bulunan GPAT protein dizileri kullanılmıştır. Proteinlerin 3D yapılarının simülasyonları Phyre² (Kelley et al. 2015) kullanılarak elde edilmiştir. Güven aralığı>%90 olan simülasyonlar tercih edilmiştir. Protein-protein etkileşimlerinin fiziksel ve işlevsel bağlantılarını belirlemek için “Etkileşen Genlerin/Proteinlerin Elde Edilmesi için Arama Aracı (STRING)” veritabanı (Szklarczyk et al. 2021) kullanılmıştır. Toplanan veriler sınıflandırılmış ve her protein-protein etkileşimi için bir güven puanı (0,7) ile ilişkilendirilmiştir. Etkileşen proteinlerin maksimum sayısı 5 olarak belirlenmiştir. PvGPAT proteinlerinin GO verilerine (moleküler işlevler, hücresel bileşenler ve biyolojik süreçler) Blast2GO, Omics Box (Götz et al. 2008), STRING veritabanı ve DAVID: Functional Annotation Tool çevrimiçi tarayıcıları (Huang et al. 2007) ile erişilmiştir

3.2.7. PvGPAT genlerinin transkriptomik gen ifade düzeyleri

PvGPAT genlerinin ifade modellerini incelemek için Illumina RNA-seq verileri NCBI veri tabanının Dizi Okuma Arşivi (SRA) veri bankasından toplanmıştır. İlgili RNA-seq verilerini bulmak için tuz ve kuraklık stresi erişim numaraları elde edilmiştir. Kuraklık stresi analizi için SRR8284480 (kontrol) ve SRR8284481 (14 günlük kuraklık) erişim numaraları kullanılmıştır (Gregorio et al. 2020). Tuz stresi analizi için SRR13434024 (kontrol), SRR13434021 (3 saat tuz), SRR13434019 (6 saat tuz), SRR13434026 (12 saat tuz) ve SRR14120315 (24 saat tuz) erişim numaraları kullanılmıştır (Anonymous 2023d). Gen ifadesi verilerini standardize etmek için bir milyon eşlenmiş okumanın ekzon modelinin kilobaz başına okuma (RPKM) tekniği kullanılmıştır. Ayrıca, fasulye bitkilerinin farklı gelişim aşamalarına (olgun yeşil bakla, genç bakla, gövde, kök, nodül, yaprak, çiçek ve çiçek tomurcuğu) karşılık gelen ifade verileri Phytozome v13 veri tabanından FPKM şeklinde elde edilmiştir. Heatmap analizleri, RPKM ve FPKM verileri kullanılarak TbTools programında oluşturulmuştur.

3.2.8. Bitkilerin büyütülmesi, melatonin tuz ve kuraklık uygulamaları

Fasulye tohumları ilk olarak %70'lik EtOH'de 5 dk inkübe edildikten sonra 3 defa ddH₂O yıkanarak alkolden uzaklaştırılmıştır. Ardından %1'lik NaOCl çözeltisinde 15 dk süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra ddH₂O ile iyice durulanmıştır. Steril tohumlar 1/10 Hoagland çözeltisi ile nemlendirilmiş perlit dolu saksılara ekilmiştir. Fidler, 24°C'de ve %60 bağıl nemde 250 mmol m⁻²s⁻¹ fotosentetik foton akısına sahip kontrollü bir ortam büyüme odasında üç yapraklı olana kadar saksılarda büyütülmüştür. Aynı büyüklükteki bitkiler daha sonra 0,5 l hazırlanmış 1/10 Hoagland çözeltisi ile desteklenmiş bir hidrofonic ortama aktarılmıştır (Hoagland and Arnon 1950). Eşit boyuttaki fidelere, kuraklık ve tuz stresi uygulamadan önce spreyleme yöntemi ile yapraklara 0 ve 200 µM konsantrasyonlarında melatonin (MEL) uygulanmıştır. Aynı büyüme koşulları altındaki fasulye bitkilerine dokuz gün boyunca, 150 mM NaCl ile desteklenmiş Hoagland çözeltisi kullanılarak orta derecede tuzluluk stresi uygulanmıştır. Bununla birlikte, aynı koşullar altındaki diğer fasulye bitkileri 24 saat boyunca %20 PEG6000 ile desteklenmiş Hoagland çözeltisiyle kuraklık stresine maruz bırakılmıştır (Aygören et al. 2023). İki farklı fasulye çeşidinde gerçekleştirilen deneme modeli Çizelge 3.3'te verilmiştir. Uygulamalardan sonra fasulye bitkilerinin yaprak dokuları sıvı azot içine alınmış ve çalışma yapılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan fasulye bitkileri her uygulama başına üç biyolojik tekrar olacak şekilde yetiştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Fasulye çeşitlerine uygulanan tuz, kuraklık ve MEL konsantrasyonları

Uygulama	Fasulye Çeşidi	MEL (µM)	NaCl (mM)	PEG6000 (%)
Kontrol	Elkoca-05	0	0	0
Kontrol	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

3.2.9. *GPAT* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi

3.2.9.1. Total RNA izolasyonu

Uygulamaların gerçekleştirildiği fasulye bitkilerinin yaprak dokularından TRIzol® reagent (Invitrogen Life Technologies) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

- Alınan yaprak örnekleri sıvı azot yardımıyla havanda toz haline getirilmiştir. Toz halindeki örneklerden 100 mg olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
- Örneklerin üzerine 1 ml TRIzol reaktifi eklenmiştir. Örnekler iyice parçalanarak homojenize edildikten sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Örneklerle 0,2 ml kloroform eklendikten sonra hızlı bir şekilde 15 s elle çalkalanmıştır. Ardından örnekler 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 14000 rmp'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. En üstteki faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- RNA'yı çöktürmek için 0,5 ml izopropanol eklendikten 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 14000 rmp'de 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp RNA peletine 1 ml %75'lik EtOH eklenerek yıkanmıştır.
- 10000 rmp'de 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. EtOH uzaklaştırılıp 10 dk hava kurutması yapılmıştır.
- RNA peleti 50 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürülmüştür. Ardından ısıtıcı blokta 55°C'de 10 dk bekletilmiştir.
- RNA örneklerinin A_{260/280} O.D. değeri ölçülmüştür.

3.2.9.2. RNA konsantrasyonlarının tespit edilmesi ve agaroz jel elektroforezi

Örneklerin total RNA konsantrasyonları Nanodrop cihazında ölçümleri yapılmış ve $A_{260/280}$ O.D. değerindeki veriler kaydedilmiştir. RNA örneklerinin konsantrasyonu 1000 ng ayarlanıp örnekler 3 μ l 2X loading dye eklenip %1,2'lik agaroz jelde 90 voltta, 40 dk boyunca yürütülmüştür. Jel, Bio-Rad ChemiDoc MP UV-Transillüminatör cihazında görüntülenmiştir.

3.2.9.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi, 1000 ng'a eşitlenen RNA örneklerinden Thermo RevertAid First Strand cDNA sentez kitinin (#K1622) talimatları doğrultusunda yapılmıştır. cDNA sentez karışımı Çizelge 3.4'e göre hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım vortekslenmiştir. Ardından örnekler PCR cihazında 42°C'de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Sentez işlemini sonlandırmak için 70°C'de 5 dk bekletilmiştir. Örnekler çalışma yapılıncaya kadar 20°C'de bekletilmiştir.

Çizelge 3.4. cDNA sentez karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktarı
Toplam RNA (1000 ng)	---
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase	1 μ l
RiboLock RNase Inhibitor	1 μ l
5X Reaction Buffer	4 μ l
10mM dNTP Mix	2 μ l
Oligo(dT) ₁₈ Primer	1 μ l
Nükleaz içermeyen su	----
Toplam	20 μ l

Elde edilen cDNA'lar fasulye β actin ileri primeri (5'-TGAGCAAGGAGATTACAGCATTGG-3') ve geri primeriyle (5'-CATACTCTGCCTTCGCAATCCAC-3') doğrulanmıştır. Aşağıdaki talimatlara uygun bir şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR Karışımı Çizelge 3.5'e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. 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

PCR şartları ise Çizelge 3.6’da verildiği şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.6. PCR şartları

Ön Denatürasyon	94°C	5 dk	35 Döngü
Denatürasyon	94°C	45 s	
Bağlanma	50°C	30 s	
Uzama	72°C	45 s	
Son Uzama	72°C	10 dk	
Bekletme	4°C	∞	

3.2.9.4. qRT-PCR analizleri

PvGPAT gen ailesi üyelerine ait spesifik primerler IDT OligoAnalyzer aracı (Anonymous 2023e) ve Phytozome v13 veri tabanından elde edilen fasulye GPAT genlerinin cDNA dizileri kullanılarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.7). Ardından NCBI blastn ile doğrulanmıştır. qRT-PCR analizleri aşağıdaki protokoldeki talimatlara uygun bir şekilde yapılmıştır (Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9). Her primer için farklı bağlanma sıcaklığı ayarlanmıştır. qRT-PCR’da transkriptin seviyesini karşılaştırmak için fasulye β-actin genine ait primerler kullanılmıştır. qRT-PCR analizleri RotorGene Real-Time PCR System cihazı ve ABT firmasının 2X qPCR SYBR-Green MasterMix’i kullanarak yapılmıştır. qRT-PCR analizleri üreticinin yönlendirmelerine göre yapılmıştır. qRT-PCR analizinde kalıp olarak kullanılan cDNA’lar 1:10 oranında seyreltilmiştir. qRT-PCR analizi 3 teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.8 ve reaksiyon şartları Çizelge 3.9’da verilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.7. qRT-PCR için tasarlanan primerler

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer
<i>PvGPAT2</i>	TGTCCAGGGAGCTAACAATAAC	CCAAGTTCAAATGCACCCTTC
<i>PvGPAT5</i>	TCTCCCTCTCACTCCCATTTA	GTTCTGTGGTTACAGACGTAGAG
<i>PvGPAT7</i>	GACACCTGGAGAGTGTTTAACT	TTCAGTCCCAAGCACCTTATC
<i>PvGPAT9</i>	CAGAGCGACGATGGAGAAAT	CTCAGCAAACAAAGGACTGAAC
<i>PvGPAT11</i>	CTCCACCACCCTCAAAGAAA	CCCTAGTGCAACAGCAGTAA
<i>PvGPAT12</i>	TTCCCCGGATATTGGACTCG	CAGACGCTCCTGTGGTACTG

Çizelge 3.8. qRT-PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
Master Mix	10 µl
Forward primer (10 µM)	0,4 µl
Reverse primer (10 µM)	0,4 µl
Ultra pure water	7,2 µl
cDNA [1:10]	2 µl
Son Hacim	20 µl

Çizelge 3.9. qRT-PCR reaksiyon şartları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	40 döngü
Başlangıç denatürasyon	95°C	5 dk	
Denatürasyon	95°C	15 s	
Bağlanma	57°C-62°C	30 s	
Melt	65°C'den 95°C'ye	5 s/her bir sıcaklık	

3.2.9.5. Verilerin değerlendirilmesi

Kuraklık ve tuz stresi ve melatonin uygulanmış bitkilerde ve kontrol bitkilerindeki *GPAT* genlerine ait ifade profilleri fasulye β -actin geninin ifade profili ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001) metoduna göre ve One Way ANOVA (Dunnett) ile gerçekleştirilmiştir (Dunnett 1955). Housekeeping olarak kullanılan β actin gen ifade verileri ile CT değerlerinin normalizasyon işlemi yapılmıştır. Bu verilere ait istatistiksel analizler ve ifade grafikleri Graphpad Prizm 9 ile hesaplanarak çizilmiştir.

3.2.10. Rekombinant vektörlerin elde edilmesi

3.2.10.1. Fasulye *GPAT1* geninin klonlanması

PvGPAT1 (Phvul.002G136600.1) geninin CDS (coding sequence) (Şekil 3.1) dizisi Phytozome v13 veritabanı kullanılarak elde edilmiştir. Bu bölgeyi çoğaltması için pGFPUS*Plus* vektörüne özgü kesim yapması için *Bst*EII ve *Bgl*II enzim kesim bölgelerini (Çizelge 3.10) içeren primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.11). Kuraklık stresine maruz bırakılmış Elkoca-05 çeşidine ait cDNA'dan bu primerler kullanılarak *Bst*EII ve *Bgl*II enzim kesim bölgelerini içeren *PvGPAT1* geni Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'daki talimatlara göre PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünü agaroz jelde yürütülerek bant boyutu kontrol edilmiştir. Jel elektroforezi sonrası uygun bant büyüklüğüne sahip ampikon jelden aşağıdaki talimatlara uygun bir şekilde izole edilmiştir. Jelden elde edilen bölge TA klonlama yöntemiyle pJET klonlama vektörüne klonlanmıştır.



Şekil 3.1. Phytozome v13 veritabanından alınan *PvGPAT1* (Phvul.002G136600.1) geninin CDS dizisi.

Çizelge 3.10. *PvGPAT1-1* primerlerinin enzim kesim bölgeleri

<i>Bgl</i> II kesim bölgesi	5'-A ^v GATCT-3' 3'-TCTAG _A -5'
<i>Bst</i> EII kesim bölgesi	5'-G ^v GTNACC-3' 3'-CCANTG _A G-5'

Çizelge 3.11. *PvGPAT1* geninin izole edilmesi ve klonlanmasında kullanılan primerler

Primer Adı	Geri Primer	İleri Primer
<i>PvGPAT1-1</i>	GGTNACC CTACTTCCATGGCTGTGACAAAGT	AGATCT ATGAGCATGACCGGTTCTTCAGCT
<i>pJET</i>	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC

3.2.10.2. *PvGPAT1* geninin jelden ekstraksiyonu

PvGPAT1'in jelden ekstraksiyonu GeneJET Jel Ekstraksiyon Kitinin (Thermo Scientific #K0692) talimatları doğrultusunda yapılmıştır. Jelden ilgili genin ekstraksiyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- 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.
- 1:1 (hacim:ağırlık) oranı olacak şekilde (100 mg jel için 100 µl) Binding Buffer eklenmiştir.
- Jel ve Binding Buffer karışımı 50-60°C arası 10 dk inkübasyon yapılarak jelin tampon çözelti içerisinde erimesi/çözünmesi sağlanmıştır. Ardından hafifçe vortex ya da dip-tap işlemi yapılarak karışım iyice homojen hale getirilmiştir.
- Karışımın üzerine 1 hacim olacak şekilde distile su eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- En çok 800µl karışım olacak şekilde, DNA fragmentini içeren karışım GeneJET saflaştırma kolonuna aktararak 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı dökülerek kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
- GeneJET saflaştırma kolonuna 100 µl Binding Buffer eklendi ve yeniden 12000 g'de 1 dk santrifüj edilmiş toplama tüpüne akan sıvı dökülerek kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
- Kolona, önceden etanol ile seyreltilmiş Wash Buffer'den 700 µl eklendi, 1 dk oda sıcaklığında bekletilmiş 1 dk 12000 g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan sıvı döküldü ve kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir.
- GeneJET saflaştırma kolonu ve toplama tüpü boş olarak son bir kez daha 1 dk 12000 g'de santrifüj edilmiştir.
- GeneJET saflaştırma kolonu boş ve steril 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır. Kolonun tam merkezine olacak şekilde 100 µl Elution Buffer eklenmiştir.
- GeneJET saflaştırma kolonu atıldı ve toplama tüpü içerisindeki saflaştırılmış DNA kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Jelden izolasyon sonrasında elde edilen DNA'nın bir kısmı tekrar agaroz jelde yürütülmüş ve varlığı kontrol edilmiştir.

3.2.10.3. *PvGPAT1* geninin pJET klonlama vektörüne aktarımı

Jelden elde edilen bölge pJET klonlama vektörüne üreticinin talimatları doğrultusunda aşağıdaki yapışkan uçlu klonlama protokolü ile aktarılmıştır.

- Küt uçlama reaksiyonu Çizelge 3.12'deki belirtildiği gibi buz üzerinde hazırlandı.

Çizelge 3.12. Küt uçlama reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
2X Reaksiyon Tamponu	10 µl
PCR ürünü (50 ng)	1 µl
DNA Blunting Enzim	1 µl
ddH ₂ O	6 µl
Toplam hacim	18 µl

- Karışım 5 s düşük ayarda vortekslenmiştir.
- Karışım 70°C'de 5 dk inkübe edilmiş ve ardından buza alınmıştır.
- Buz üzerinde ligasyon reaksiyonu Çizelge 3.13'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.13. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Miktar
pJET1.2/blunt klonlama vektörü	1 µl
T4 DNA Ligaz	1 µl
Toplam hacim	20 µl

- Karışım 5 s düşük ayarda vorteklenmiştir.
- Ligasyon karışımı oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilip bir gece 4°C'de bekletildikten sonra kullanılacak zamana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.10.4. *E. coli* JM101 suşu kompetent hücrelerinin hazırlanması

Tek bakteri kolonisinden elde edilen bakteriler LB broth besi yerinde bir gece boyunca çoğaltılmıştır. Bu süspansiyon kültüründen 1 ml alınıp üzerine 40 ml LB broth besi yerine ilave edildikten sonra 37°C'de 250 rpm'de $A_{600}=0,500$ olana kadar

bekletilmiştir. Hücreler 10 dk boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Hücreler 10 dk 4000 rpm'de 4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine soğuk 20 mM CaCl₂ çözeltisinden 5ml eklenip ve hafifçe pipetaj yapılmıştır. 4°C'de 2500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak peletin üzerine soğuk 20 mM CaCl₂ çözeltisinden 2 ml eklenip 4°C'de 2500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Hücrelerin üzerine soğuk 20 mM CaCl₂ çözeltisinden 1 ml eklendi ve hücreler iyice çözdürülmüştür.

3.2.10.5. Rekombinant vektörün kompetent *E. coli* JM101 hücrelerine transformasyonu

Rekombinant vektörden 5 µl ve kompetent hücrelerden 60 µl alınarak hafifçe pipetaj yapılmıştır. 30 dk boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Buz üzerinden alınan örnekler 42°C'de 1 dk ünkübe edilmiştir. Örneklerin üzerine 200 µl LB broth besi yeri eklenmiştir. 37°C'de 45 dk inkübe edilmiştir. Hücreler 100 mg/ml ampsilin içeren katı LB broth besi yeri bulunan petrilere ekilerek petrilere 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir.

3.2.10.6. Koloni PCR ile pozitif kolonilerin tespit edilmesi

Antibiyotikli besi yeri üzerinde büyüyen bakterilerden genelde yalnız başına koloni oluşturmuş olanlardan yaklaşık 7-10 adet seçilmiştir. Daha sonra PCR tüpleri üzerine 5 µl ultra steril saf su eklenmiştir. Seçilen koloniler pipet ucu ile dikkatlice alınıp tüp içerisine daldırılarak pipetaj yapılmıştır. Diğer taraftan mikrosantrifüj tüplerine 200 µl LB Broth eklenmiştir. PCR tüpü içerisindeki karışımdan 3 µl alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktararak 37°C'de 200 rpm de 1 gece boyunca inkübasyona alınmıştır. Geri kalan PCR tüpü içerisine Çizelge 3.5'te belirtilen PCR bileşenleri eklenmiştir. Primer olarak PvGPAT1 ileri primer/pJET geri primer ve pJET ileri primer/PvGPAT1 geri primerleri kullanılmıştır. Bu işlemlerin ardından örnekler mini santrifüj yapılarak PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR şartları Çizelge 3.6'da belirtildiği gibi ayarlanmıştır. İşlem sonucunda her bandın ürün boyutu 100 bp marker kullanılarak %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde 110 voltta yaklaşık 1 saat yürütülerek doğrulanmıştır. Pozitif çıkan koloniler 100 mg/ml ampsilin içeren LB broth besi yerinde 37°C'de 200 rpm'de büyümeye alınmıştır.

3.2.10.7. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu

Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu EURX plazmit izolasyon (Cat. no. E3545) kitinin talimatlarına uygun bir şekilde yapılmıştır. Kolonun aktifleşmesi için kolona 30 µl Buffer Uni solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. Bir gece büyütülmüş bakteri kültüründen 2 ml alınarak 9000 rpm’de 2 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak kâğıt havlu üzerinde ters çevrilmiştir. Hücre peleti üzerine 250 µl Cell R çözültisi eklenmiş ve iyice çözdürülmüştür. Bu karışımın üzerine 250 µl Lysis Blue çözültisi eklenerek birkaç kez nazıkçe pipetaj yapılmıştır. Ardından 350 µl Neutral B. eklenmiş ve birkaç kez nazıkçe pipetaj yapılmıştır. Örnekler santrifüj cihazına yerleştirilip 9000 rpm’de 7 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant kısmından 600 µl alınarak daha önceden aktiveleştirilmiş kolona yüklenmiştir. Ardından 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Plazmit bu aşamada kolana bağlanmıştır. Toplama kabında biriken sıvı atılmıştır. Kolon üzerine 500 µl Wash UX1 solüsyonu eklenmiş ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama kabında biriken sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolon üzerine 600 µl Wash UX2 solüsyonu eklenmiş ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama kabında biriken sıvı atılmıştır. Kolon tekrar 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Örnekler yeni bir mikrosantrifüj tüpü alınarak kolon içine yerleştirilmiştir. Kolonun üzerine 70 µl Elution Buffer solüsyonu eklenerek 3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolon uzaklaştırılarak örnekler kullanılacak zamana kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.2.10.8. Rekombinant vektörün doğrulanması

Pozitif kolonilerden izole edilen pJET::PvGPAT1 rekombinant vektörünün doğrulanması için Çizelge 3.11’deki PvGPAT1-1 ve pJET primerlerin farklı kombinasyonları (PvGPAT1-1 ileri primer/ pJET geri primer, PvGPAT1-1 geri primer/ pJET ileri primer ve PvGPAT1-1 ileri primer/PvGPAT1-1 geri primer) kullanılarak Çizelge 3.5 ve 3.6’daki talimatlara uygun bir şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası ürünler %1,2’lik agaroz jelde 100 voltta 60 dk yürütülerek istenilen bant büyüklüğünde sahip fragmentler belirlenmiştir.

pJET klonlama vektörüne aktarılan *PvGPAT1-1* ileri primer/ PJET geri primer ve pJET ileri primer/*PvGPAT1-1* geri primerleriyle çift yönlü okuma yapılmıştır. Sekans okuma verileri düzenlendi. Phytozome v13 veri tabanında bulunan Phvul.002G136600.1 (*PvGPAT1*) geni ile izole edilen gen bölgesine ait dizi verileri NCBI-blastn aracı kullanılarak uyumluluğu tespit edilmiştir.

3.2.10.9. *PvGPAT1* genin aşırı ifade vektörüne klonlanması

Doğrulan *pJET::PvGPAT1* rekombinant vektöründen *PvGPAT1* geni aşağıdaki talimatlara uygun bir şekilde *Bgl*III ve *Bst*EII enzimleriyle kesimi yapılarak vektörden çıkartılmıştır. Ayrıca pGFPGUS*Plus* vektöründe bulunan GUS bölgesi aynı enzimlerle kesilerek çıkartılmıştır.

Çizelge 3.14'te verilen miktarlara uygun bir şekilde buz üzerinde reaksiyon kurulmuştur. İlk önce reaksiyona *Bst*EII enzimi eklenerek reaksiyon karışımı birkaç kez pipetaj yapılmıştır. PCR cihazında 60°C'de 10 dk inkübasyon yapılmıştır. Ardından reaksiyon tüpüne *Bgl*III enzimi eklenip birkaç kez pipetaj yapılmıştır. PCR cihazında 37°C'de 20 dk inkübasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.14. Reaksiyon koşulları

Bileşenler	Miktar
Vektör	1 µg
10X NEB Buffer	5 µl
Restriksiyon Enzimi	1 µl
ddH ₂ O	-
Toplam	50 µl

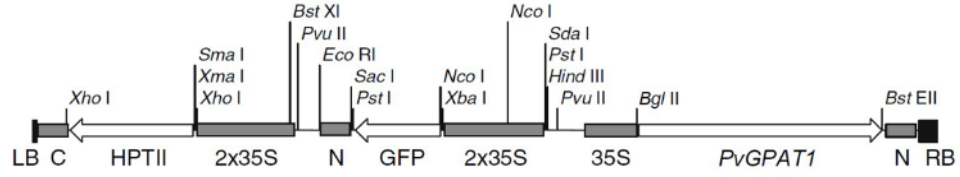
*Bgl*III ve *Bst*EII enzimleriyle kesimi yapılan pGFPGUS*Plus* ve *pJET::PvGPAT1* rekombinant vektörü %1.2'lik agaroz jelde 100 voltta 60 dk yürütüldü. pGFPGUS*Plus* jelinde GUS bölgesi ve kesilmiş pGFPGUS*Plus* vektörü bulunmaktadır. Kesilmiş pGFPGUS*Plus* vektörü Bölüm 3.2.10.2'de belirtilen talimatlara uygun bir şekilde jelden izole edilmiştir. *pJET::PvGPAT1* jelinde ise kesili pJET vektörü ve *PvGPAT1* geni olmak üzere iki bant bulunmaktadır. *PvGPAT1* geni Bölüm 3.2.10.2'de belirtilen talimatlara uygun bir şekilde jelden izole edilmiştir. İzole edilen ürünlerin bir kısmı %1,2'lik agaroz

jelde 100 voltta 60 dk yürütülmüştür. Bu ürünlerin varlığı ve bant büyüklükleri tekrar kontrol elde edilmiştir.

Çizelge 3.15. Plazmitlerin doğrulanmasında kullanılan primerler

Primer Adı	Geri Primer	İleri Primer
35S	TCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATC	CATCCCTTACGTCAGTGGAGATATC
HPTII	ACAGCGTCTCCGACCTGATG	TTCTTTGCCCTCGGACGAGTG
PvGPAT1	CTACTTCCATGGCTGTGACAAAGT	ATGAGCATGACCGGTTCTTCAGCT

GUS bölgesi çıkarılan pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektöründe ve *pJET* vektöründen çıkarılan *PvGPAT1* geninde kesim sonrası yapışkan uçlar oluşturulmuştur. T4 DNA ligaz (EL0011) enzimi kullanılarak pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektörü ile *PvGPAT1* geni birleştirilerek *PvGPAT1* genini içeren aşırı ifade vektörü oluşturulmuştur. Elde edilen ligasyon ürünü 35S ileri primer ile *PvGPAT1* geri primeri ve *PvGPAT1* ileri primeri ile *PvGPAT1* geri primeri (Çizelge 3.15) kullanılarak ligasyon ürünü Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da belirtildiği şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası ürünler %1,2’lik agaroz jelde 100 voltta 60 dk yürütülmüştür ve istenilen bant büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. pGFPGUS*Plus*::*PvGPAT1* kasetini içeren görsel Şekil 3.2’de verilmiştir. Ardından kompotent *E. coli* JM101 suşuna ligasyon ürününün (pGFPGUS*Plus*::*PvGPAT1*) transformasyonu Bölüm 3.2.10.5’te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. pGFPGUS*Plus* vektörü kanamisin direnç gen bölgesini içermektedir. Bu nedenle transformasyon sonrası bakteriler 100 mg/ml kanamisin içeren katı LB broth besi yeri bulunan petrilere ekilmiştir. Petriler 37°C’de bir gece inkübe edilerek pozitif koloniler Bölüm 3.2.10.6’da belirtildiği şekilde *PvGPAT1* primerleri ve HPTII primerleri kullanılarak doğrulanmıştır. Pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu Bölüm 3.2.10.7’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Daha sonra, ilgili gen bölgesini içeren fragmentin 35S ileri/*PvGPAT1* geri primerleri ve 35S geri/*PvGPAT1* ileri primerleri kullanılarak tekrar çift yönlü okuması yapılmıştır. Sekans okuma verileri hizalama yapılarak düzenlenmiştir. Phytozome v13 veri tabanında bulunan Phvul.002G136600.1 (*PvGPAT1*) geni ile elde edilen fragmentin uyumu NCBI-blastn programı ile tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Tütün bitkisine aktarılan gen kaseti

Ayrıca *SacI*, *BglII* ve *BstEII* enzimleriyle pGFPGUSPlus::PvGPAT1 vektörü kesilerek doğruluğu kontrol edilmiştir. *SacI* enzimi hem PvGPAT1 gen bölgesinden hem de pGFPGUSPlus vektöründe tek bir bölgeden kesim yapmaktadır. Bu nedenle yaklaşık 3313 bp ve 10389 bp boyutlarında iki bant elde edilmelidir. *BglII* ve *BstEII* enzimleri ise PvGPAT1 gen bölgesini iki ayrı uçtan kesmektedir. Bu nedenle yaklaşık 1386 bp ve 12316 bp boyutlarında iki bant elde edilmelidir. *BglII* ve *BstEII* enzimleri ile Bölüm 3.2.10.9’da belirtildiği şekilde kesim yapılmıştır. *SacI* enzimi ile yapılan kesim işleminde ise Çizelge 3.14’te belirtilen bileşenler kullanılmıştır. Tüm bileşenler eklendikten sonra PCR cihazında aktivasyon için 37°C’de 10 dk ve inaktivasyon için 65°C’de 20 dk inkübasyon yapılmıştır. Kesim sonucunda elde edilen ürünler %1,2’lik agaroz jelde 100 volta 60 dk yürütülmüştür. Doğru boyutta bantlar elde edilmiştir.

3.2.10.10. *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 suşunun kompetent hücrelerinin hazırlanması

Tek bakteri kolonisinden elde edilen bakteriler gece boyunca çoğaltılarak bu süspansiyon kültüründen 1 ml alınıp üzerine 40 ml LB low salt besi yeri ilave edildikten sonra 28°C’de 200 rpm’de 4 saat boyunca bekletilmiştir. Bakteri kültürünün, daha önceden steril edilmiş ve soğutulmuş falkon tüplere dağıtılmasının hemen ardından 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet, 40 ml soğuk suda çözündürülmüştür. Daha sonra 4°C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Son aşama 2 kere tekrarlandıktan sonra pelet, 4 ml soğuk steril %10’luk gliserolda çözündürülmüştür. Ardından 4°C’de 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra bakteri peletinin üzerine 500 µl %10’luk gliserol ilave edilerek peletin çözünmesi sağlanmıştır.

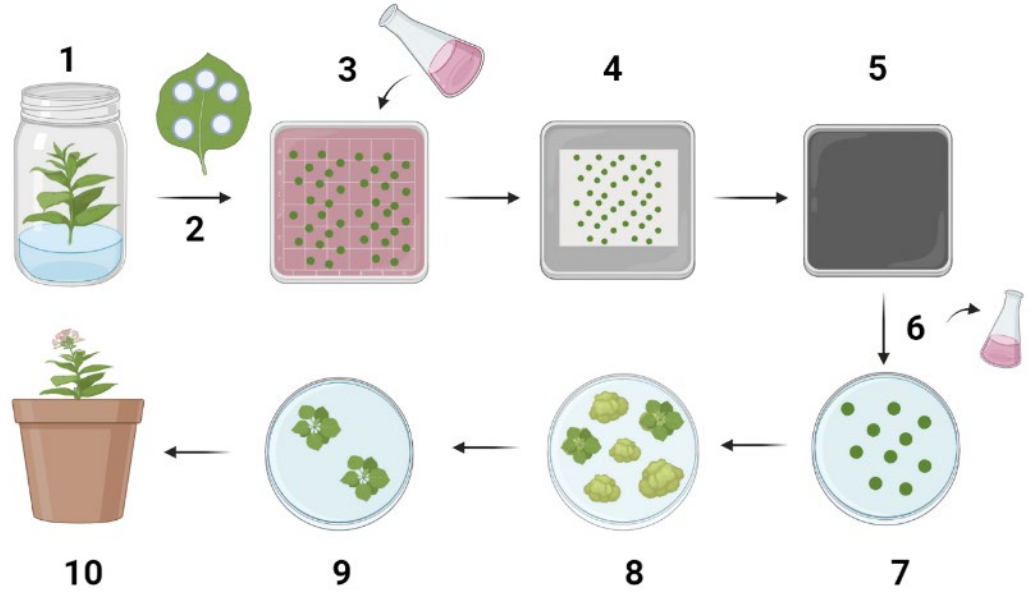
3.2.10.11. pGFPGUSPlus::*PvGPAT1* vektörünün AGL1 suşuna transformasyonu

2 µg plazmit üzerine 10 µl steril saf su eklenerek 200 ng/µl'ye ayarlanmıştır. Daha sonra plazmitten 2,5 µl alınır ve üzerine 47,5 µl RNaz içermeyen su eklenerek 10 ng/µl'ye seyreltilmiştir. -20°C den alınan 80 µl AGL1 kompetent bakteri içeren tüp içerisine seyreltilmiş plazmitten 5 µl eklenerek yavaşça pipetaj yapılmıştır ve önceden buzda bekletilerek soğutulmuş elektroporasyon küveti içerisine tüp içerisindeki tüm materyaller (80 µl AGL1 kompetent hücre + 5 µl plazmit) aktarılmıştır. Daha sonra elektroporasyon cihazına (BioRad GenePulser Xcell) küvet yerleştirilmiştir ve 2,50 kV, 25 µFD, 400 ayarları ve 8,0 ile 9,5 ms arasında zaman sabiti ile transformasyon sağlanmıştır. Küvet buz üzerine alınarak ve steril kabin içerisinde 200 µl LB Broth Low Salt eklenmiştir. Yarım saat boyunca çalkalama olmaksızın 28°C'de bekletilmiştir. Daha sonra 1,5 ml'lik mikrosantifüj tüp içerisine küvetin tamamı alınarak ve 28°C'de 3 saat 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Ardından 50 mg/ml kanamisin içeren LB agar üzerine 150 µl olacak şekilde farklı noktalara damlatılıp daha sonra drigalski öze ile yayılmıştır. 28°C'de 2 gün boyunca inkübe edilir. 36 saat sonra ilk koloniler görülmeye başlanmıştır.

Ardından pGFPGUSPlus::*PvGPAT1* vektörünü içeren pozitif kolonileri tespit etmek için yukarıda belirtildiği şekilde HPTII primerleri ile koloni PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen pozitif koloniler bütün bitkilerine transformasyon işleminde kullanılmak üzere 28°C'de LB Low salt besiyerinde büyütülmüştür.

3.2.11. Tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkisine *Agrobacterium* aracılı transformasyon metodu ile gen aktarımı

Ordon et al. (2019) tarafından belirtilen protokol küçük modifikasyonlarla kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Nicotiana benthamiana* bitkisine *Agrobacterium* aracılı gen aktarım şeması: 1) MS ortamına ekilen steril tohumlardan elde edilen tütün bitkisi 2) Tütün bitkisinden yaprak disklerin eldesi 3) Hazırlanan *Agrobacterium* süspansiyonu ile yaprak disklerin inkübasyonu 4) Steril su ile ıslatılmış Whatman kağıdına yaprak disklerin alınması 5) 48 saat karanlık ortamda inkübasyon (ko-kültivasyon) 6) *Agrobacterium*'dan yaprak disklerin arındırılması 7) *Agrobacterium*'dan arındırılan yaprak disklerin MSII ortamına alınması (seleksiyon ve sürgün indüksiyon ortamı) 8) MS-II ortamında kallus ve rejenere sürgünlerin gelişmeye başlaması 9) Rejenere bitkilerin MSIII ortamına alınması (Kök indüksiyonu) 10) İyi gelişmiş ve köklenen rejenere bitkilerin (T_0) toprağa transferi (Aklimasyon).

3.2.11.1. Tütün bitkilerinin yetiştirilmesi ve transformasyon için tütün yaprak disklerinin hazırlanması

Tütün tohumları %70'lik EtOH 4 dk boyunca inkübe edilmiştir. Tohumlar steril su ile üç kez yıkanarak etil alkolden arındırılmıştır. Ardından tohumlar 8 dk boyunca %1'lik NaOCl (+%0,01 Tween) içinde inkübe edilmiştir. NaOCl kalıntısından kurtulmak için tohumlar steril suda üç kez yıkanmıştır. Steril tohumlar MS besiyerine ekilerek 16 saatlik fotoperiyotta, 24/20°C'de (gündüz/gece), %60 bağıl nemde ve $130-150 \mu E m^{-2}s^{-1}$ ışık yoğunluğundaki bitki büyütme kabininde çimlendirilip fideler 3-5 yapraklı olana kadar büyütülmüştür. Transformasyonun tüm adımları steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bitki büyütme kabininde yetiştirilen 3-5 yapraklı döneme gelen tütün bitkilerinin en genç yaprakları alınarak ana damarları içermeyecek halde yapraklar disk şeklinde (yaklaşık 1 cm x 1 cm) parçalara ayrılmıştır.

3.2.11.2. *Agrobacterium* süspansiyonunun hazırlanması

pGFPGUSPlus::*PvGPAT1* aşırı ifade vektörünü taşıyan *A. tumefaciens* AGL1 suşu, kanamisin (100 µg/ml), rifamisin (25 µg/ml), ampsilin (100 µg/ml) ve streptomisin (50 µg/ml) içeren katı YEB besi yerine yayma plak yöntemiyle ekimi yapılmıştır. Kanamisin sadece vektörü bünyesine alan bakterilerin büyümesine izin verirken rifamisin, ampsilin ve streptomisin ise AGL1 suşunun büyümesine izin vermektedir. Dört antibiyotiğin kullanılma nedeni ise sadece içerisine pGFPGUSPlus::*PvGPAT1* aşırı ifade vektörünü almış AGL1 bakterilerinin büyümesini sağlamaktır (Çizelge 3.16). Transformasyondan iki gün önce: ilgili antibiyotikleri içeren 5 ml sıvı YEB besi yerine rekombinant vektörü içeren AGL1 bakterileri inoküle edilmiştir; çalkalamalı inkübatörde 28°C’de 24 saat büyütülmüştür (ön kültür). Transformasyondan bir gün önce: 100 ml antibiyotikli indüksiyon ortamı 1 ml ön kültür ile inoküle edilmiştir, bir gece boyunca 28°C’de çalkalanmıştır. Transformasyon günü: indüksiyon ortamındaki bakteriler bir falkonda 40 ml olacak şekilde 2500 rpm’de 20 dk santrifüjlenmiştir. Bakteri peleti MMA ortamında (antibiyotiksiz) OD₆₀₀=0,8 olacak şekilde yeniden süspanse edilmiştir.

Çizelge 3.16. *A. tumefaciens* suşlarının antibiyotik dirençlilik tablosu

	Ampsi lin 100mg /ml	Karbes ilin 100mg /ml	Kloramfe nikol 30mg/ml	Gentam isin 30mg/ ml	Kanam isin 50mg/ ml	Rifam isin 25mg/ ml	Spektro misin 50mg/ml	Strepto misin 50mg/m l	Tetrasi klin 50mg/ ml
GV3 101	-	D	D	D	H	D	H	D	H
EHA 105	D	D/H	D	D/H	H	D	H	D	H
LBA 4404	H	H	H	H	H	D	H	D	H
AGL- 1	D	D	D	D/H	H	D	H	D	H
C58C 1	D	D	D	D/H	H	D	H	D	H

D: Dirençli, H: Hassas

3.2.11.3. Tütün bitkilerine *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonu

Sterilize yaprak diskler daha küçük parçalara ayrılmıştır. Yaprak diskler AGL1 inokülasyon süspansiyonunda (MMA ortamında süspanse edilen) inkübe edilmiştir. Bunun için AGL1 süspansiyonunu petri kabına dökülüp ve yaprak diskler tamamen

süspansiyon ile kaplanacak şekilde yerleştirildikten sonra en az 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübe edilen eksplantlar ko-kültivasyon için steril petri kabında steril suyla ıslatılmış Whatman kâğıdı üzerine yerleştirilmiştir. Bu petriler parafilm ile sarıldıktan sonra ışık almayacak bir kaba koyulmuştur. Bu kap bitki büyütme kabinine alınarak 24°C’de 48 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.11.4. Seleksiyon ve bitki indüksiyonu

Ko-kültivasyon ortamından elde edilen tütün eksplantları 25 mg/ml higromisin ve 200 mg/ml sefotaksim içeren 50 ml suda yıkanarak *Agrobacterium*’ların eksplantlardan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Antibiyotikli sudaki eksplantlar hafifçe sallanarak 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra steril bir Whatman kağıdında eksplantlar kurutulmuştur. Kurutulmuş eksplantlar sürgün indüksiyon ortamına (MS-II) yerleştirilmiştir. Her petri kabına 8-10 eksplant yerleştirilmiştir. Petri kapları parafilm ile kaplandıktan sonra sürgünler oluşana kadar büyütme kabininde 23°C’de, 16 saatlik fotoperiyotta, ışık yoğunluğu: $105 - 125 \mu E m^{-2}s^{-1}$ altında, 5-6 hafta boyunca inkübe edilmiştir. Sürgün oluşana kadar eksplantlar/gelişmekte olan kalluslar 2 haftada bir taze MS-II besi ortamlarına alt kültüre alınmıştır.

3.2.11.5. Kök indüksiyonu ve toprağa transferi

MS-II besi yerlerinde kallustan sürgünler gelişmeye başladıktan sonra köklenmeyi başlatmak için oluşan sürgünler (rejenere bitkiler) yapısında 1 mg/ml IAA bulunan MS-III besi yerlerine aktarılmıştır. Kalluslar homojen gelişmediği için oluşacak sürgünler farklı dönemlerde MSIII besiyerine aktarılmıştır. Sürgünler MS-III ortamına yerleştirilerek sürgünün ve köklenmenin daha da gelişmesi için öncekiyle aynı koşullar altında inkübe edilmiştir. Sürgünler gelişmeye devam edeceği için önceki kalluslar MS-II ortamında yedek olarak tutulmuştur. Sürgünler MS-III ortamında daha da gelişerek 2-3 haftanın sonunda kök oluşturmaya başlamıştır. İyi gelişmiş ve köklenen rejenere bitkilerin (T_0) toprağa transferi için 0,5 l cam kavanozlar kullanılmıştır ve her kavanozda maksimum 3 sürgün olacak şekilde yerleştirilmiştir. T_0 bitkiler önceden elenmiş ve otoklavlanmış steril toprak içeren kavanozlara aktarılmıştır. Kontaminasyonu önlemek için MS ortam kalıntıları sürgün veya köklerden uzaklaştırılmıştır. T_0 bitkileri doku

kültürü ortamından çıktığı için oldukça hassas durumdadır. Bu nedenle T₀ bitkilerin dış ortama alışması için yeterli büyüklüğe gelene kadar steril koşullar korunmuştur. Ardından rejenere bitkiler yavaş yavaş aklimizasyon ile dış ortama alıştırılmıştır. Tohum elde edilinceye kadar T₀ bitkileri büyütülmüştür. T₀ bitkilerinden yaprak örnekleri alınmıştır ve pGFPGUS*Plus* vektöründeki GFP raportör geninin ürünü UV altında ışıma verdiği için UV altında görüntülemesi yapılmıştır.

3.2.11.6. Transgenik bitkilerin (T₁) tespit edilmesi ve doğrulanması

T₀ bitkilerinden elde edilen tohumlar (T₁) ve yabani tip tohumlar MS ortamında çimlendirilmek üzere Bölüm 3.2.11.1’de belirtildiği gibi yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Steril tohumlar MS besiyerine ekimi yapılmış ve RNA örneği almak için 3 hafta 24°C’de, 16/8 saatlik fotoperiyotta büyütülmüştür. Oluşan fidelerin yapraklarından Bölüm 3.2.9.1’de belirtildiği şekilde RNA izolasyonu ve Bölüm 3.2.9.3’te belirtildiği şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri HPTII ve *PvGPAT1* primerleriyle Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da belirtildiği şekilde PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1,2’lik agaroz jelde 100 voltta 60 dk yürütülerek bant veren örnekler tespit edilmiştir. Şekil 3.2’de gösterilen pGFPGUS*Plus*::*PvGPAT1* gen kasetini içeren bitkiler transgenik bitkiler olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca T₁ bitkilerinde *PvGPAT1* geninin kopya sayısının değişimi qRT-PCR analiziyle tespit edilmiştir. qRT-PCR reaksiyonları Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9’da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. T₁ ve yabani tip bitkilere ait ifade profilleri Nbβ-actin (ileri primer: 5'-TGGACTCTGGTGATGGTGTC-3' ve geri primer: 5'-CCTCCAATCCAAACACTGTA-3') ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler Bölüm 3.2.9.5’te belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

3.2.12. T₁ ve yabani tip bitkilere kuraklık stres uygulaması ve stres toleransının belirlenmesi

T₁ ve yabani tip tohumlar bitki büyütme kabinde uygun koşullar altında 8 yapraklı döneme kadar büyütülmüştür. T₁ ve yabani tip bitkilerin kuraklık toleransını araştırmak ve karşılaştırmak için benzer büyüme gösteren T₁ ve yabani tip bitkiler seçilmiştir ve 1/10 Hoagland çözeltisi içeren hidrofonik ortama aktarılmıştır. Hidrofonik

ortama alınan bitkilere ortamın konsantrasyonu %10 olacak (Qi et al. 2023) şekilde PEG6000 eklenmiştir. Bitkiler 28°C’de 16/8 saatlik bir fotoperiyot altında 24 saat boyunca kuraklık stresine maruz bırakılarak 0., 1., 3., 6., 12. ve 24. saatlerde bitkilerin yapraklarındaki nispi klorofil miktarı ve klorofil floresans parametreleri alınmıştır. MDA ve H₂O₂ ölçümü için her zaman noktasında yaprak örnekleri alınmıştır. Ayrıca kuraklık öncesi ve sonrası membran hasarını belirlemek için 0. ve 24. saatlerde tüm bitkilerin yapraklarından disk şeklinde örnekler alınmıştır. Ayrıca stres öncesinde T₁ ve yabancı tip bitkilerin kök ve gövde uzunluğu not edilmiştir.

3.2.12.1. MDA ve H₂O₂ ölçümü

Lipid peroksidasyonu malondialdehit ile ölçülmektedir. Doymamış yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit konsantrasyonu Shams (2019)’a göre değerlendirilmiştir. Yabancı tip ve T₁ bitkilerinin stres öncesi, stres sırasında ve stres sonrasında olacak şekilde 6 farklı zamanda alınan yaprak örneklerinde ölçüm yapılmıştır. Sıvı azot ile toz haline getirilen yaprak örneklerinden 0,2 g alınmıştır. Örnekler 5 ml %5’lik TCA çözeltisi ile doku parçalama cihazında 7 dk boyunca homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4°C’de 15 dk 5000 g’de santrifüj edilmiştir ve süpernatanttan 2 ml alınarak 2 ml MDA reaksiyon çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım 95°C’de 45 dk boyunca su banyosunda inkübe edilmiştir. Ardından örnekler buz üzerinde soğumaya bırakılmıştır. 10 dk sonra örneklerin 450, 532 ve 600 nm dalga boylarında absorbans seviyeleri ölçülmüştür (Shams 2019). Yapılan tüm ölçümler üç tekerrürlüdür. Lipid peroksidasyonu $6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$ formülü kullanılarak nmol/g olarak hesaplandı (Okla et al. 2023).

H₂O₂ içeriği Shams (2019) tarafından verilen metot kullanılarak belirlenmiştir. Sıvı azot ile toz haline getirilen yaprak örneklerinden 0,2 g alınmıştır. Örneklerin üzerine 5 ml %5’lik TCA kullanılarak eklenmiştir. Örnekler doku parçalama cihazında 7 dk boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 4°C’de 15 dk süreyle 12000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Örneklerin üst fazı yeni mikrosantrifüj tüplerine alındıktan sonra 4°C’de 60 dk bekletilmiştir. Daha sonra plate kuyularına 50 µl süpernatant ve 150 µl H₂O₂ reaksiyon çözeltisi eklenmiştir. Blank olarak 290, 580 ve 870 µM konsantrasyonlarındaki H₂O₂ reaksiyon çözeltilerinden 3 tekrar olacak şekilde 200 µl

kuyulara yüklenmiştir. Örneklerin 390 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür (Shams 2019).

3.2.12.2. Klorofil içeriğinin belirlenmesi

Kuraklık stresine yanıtta *PvGPAT1*'in aşırı ifadesinin klorofil miktarı üzerindeki etkisini anlamak için yabani tip ve T₁ bitkilerinin stres öncesi, stres sırasında ve stres sonrasında olacak şekilde 6 farklı zamanda yaprak örneklerinde ölçüm yapılmıştır. Klorofilmetre (Konica Minolta SPAD-502Plus), yaprağın iki dalga boyu arasındaki absorbansını ölçerek mevcut nispi klorofil miktarını ölçmeye dayalı yöntemdir. Bu bitkilerin aynı gelişim aşamasında olan yapraklarındaki klorofil miktarı klorofilmetre yardımıyla ölçülmüştür. Yapılan tüm ölçümler üç tekerrürlüdür.

3.2.12.3. Klorofil floresans analizi

Klorofil floresans analizi, streslerin fotosentetik süreç üzerindeki etkisini incelemek için en güçlü ve yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. İlk kullanımdan itibaren F_v/F_m oranı, bitki fotosentetik performansının hassas bir göstergesi olarak büyük ölçüde kullanılmaktadır. Bu indeksteki düşüşler, fotoinhibisyonun yani PSII'nin etkinliğinin azaldığının göstergesidir (Guidi et al. 2019). İlk floresans (F_o), maksimum floresans (F_m), değişken floresans (F_v) ve PSII'nin maksimum kuantum etkinliği (F_v/F_m) dahil olmak üzere klorofil floresans parametreleri, taşınabilir bir klorofil floresans sistemi (Handy Pea, Hansatech Instruments, King's Lynn, BK) ile ölçülmüştür. T₁ ve yabani stres sırasında ve stres sonrasında olacak şekilde 6 farklı zamanda yaprak örneklerinde ölçüm yapılmıştır. Yapraklara karanlık ortam sağlayan yaprak klipsleri takılmıştır ve 30 dk bekletildikten sonra ölçüm yapılmıştır. Yapılan tüm ölçümler üç tekerrürlüdür.

3.2.12.4. Doku elektrik iletkenliği analizi

Strese maruz kalan bitkilerin özellikle yaprak dokusu ve hücre membranları hasar görmektedir. Meydana gelen bu hasarın tespit yöntemlerinden biri de yaş yaprak dokularının elektrik iletkenlik ölçümüdür. Bu amaçla her bir bitkinin gerçek yapraklarından alınan diskler 15 ml saf su içeren falkon tüplere konulduktan sonra 24 saat

bekletilmiştir. Ardından falkonlardaki suyun elektriksel iletkenliği (EC1) EC metre (Mettler Toledo/SevenGo Duo) ölçülmüştür. Hücre ve dokuların tamamen parçalanması için aynı örnekler otoklavda 121°C’de 15 dk bekletilmiştir. Ardından ikinci ölçüm (EC2) yapılmıştır. T₁ ve yabani tip tütünlerin hem 0. saatinde hem de 24. saatinde EC1 ve EC2 ölçümleri alınmıştır. Kuraklık stresinin hücre membran ve doku hasarını tespit etmek için EC1/EC2 oranı kullanılarak göreceli elektriksel iletkenlik değerleri hesaplanmıştır.

3.2.12.5. İstatistiksel analiz

Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm deneylerden elde edilen veriler GraphPad Prism 9.0 kullanılarak analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. GPAT genlerinin genom çaplı karakterizasyonu

4.1.1.1. *Phaseolus vulgaris* genomundaki *GPAT* genlerinin tanımlanması ve karakterize edilmesi

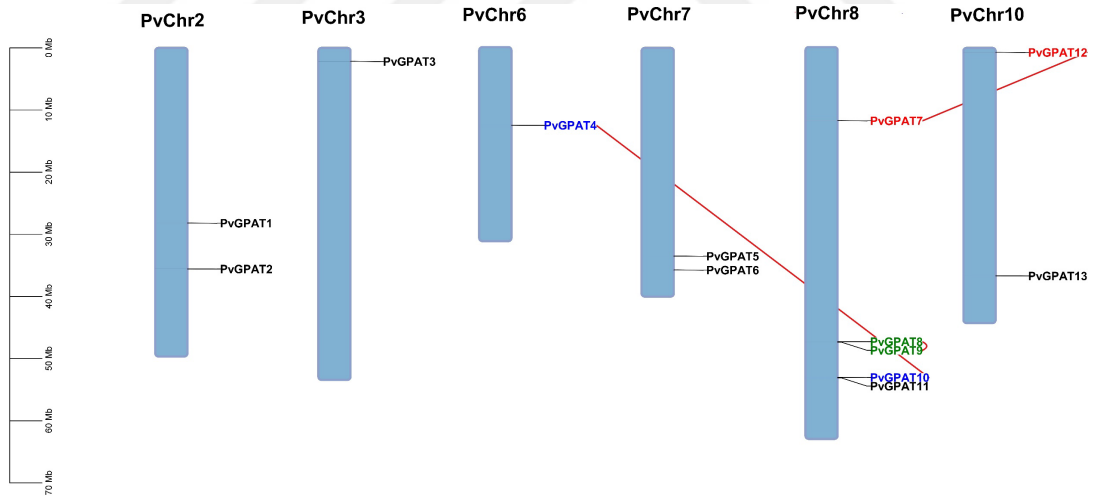
P. vulgaris *GPAT* genleri, Phytozome v13 tarayıcısı ve Pfam veritabanından alınan Pfam numarası (PF01553) kullanılarak anahtar kelime taraması ile bulunmuştur. Bu tarama sonucunda aynı genin farklı alternatif versiyonları silinmiş ve PlsC (fosfat açıltransferaz) ve gliserol-3-fosfat açıltransferaz domainlerini içeren *GPAT* genleri seçilmiştir. Fasulye genomunda bu şartları taşıyan 13 farklı *GPAT* geni saptanmıştır (EK1). PlsC domainine ek olarak, bazı *GPAT* genleri bir N-terminal haloasit dehalojenaz (HAD) benzeri hidrolaz domaini, bir LPLAT süper aile üyesi ve bir N-terminal gliserol-3-fosfat açıltransferaz domaini (GPAT_N) içermektedir (Şekil 4.3). Örneğin, *PvGPAT1* geni GPAT_N domainini ve LPLAT süper ailesini içermektedir. Ek olarak, *PvGPAT4*, 6, 7, 8, 9, 11 ve 12 genleri HAD domainine sahiptir. *PvGPAT2* ve *PvGPAT3* genleri ek domain içermemektedir. Çizelge 4.1, fasulye genomunda tanımlanan 13 *PvGPAT* genini ve tanımlama bilgilerini göstermektedir. *GPAT* genleri fasulye kromozomlarından PvChr2, PvChr3, PvChr6, PvChr7, PvChr8 ve PvChr10 üzerinde lokalize olmuştur (Şekil 4.1). Genlerin çoğu (*PvGPAT7*, *PvGPAT8*, *PvGPAT9*, *PvGPAT10* ve *PvGPAT11*) PvChr8 kromozomu üzerindedir. Çizelge 4.1 ayrıca *PvGPAT*'ların amino asit sayılarını, izoelektrik noktalarını, moleküler ağırlıklarını (kDa), kararlılık durumlarını ve gen kararsızlık indekslerini de içermektedir. *PvGPAT10* en fazla amino asit sayısına (539) sahipken, *PvGPAT2* ve *PvGPAT3* en düşük amino asit sayısına (376) sahiptir. Teorik izoelektrik noktaları 8,41 ila 9,46 arasında değişmektedir. *PvGPAT9* en düşük değere sahipken, *PvGPAT12* en yüksek değere sahiptir. Yedi *PvGPAT* proteini kararsızken, diğer altısı kararlıdır. Kararsızlık indeksi 31,84 ile 51,38 arasında değişmektedir. Bunlar sırasıyla *PvGPAT4* ve *PvGPAT1*'e ait değerlerdir. Molekül ağırlıkları karşılaştırıldığında, *PvGPAT10* (60,40 kDa) en yüksek, *PvGPAT2* ise en düşüktür (43,26 kDa).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1. PvGPAT proteinleri hakkında bilgi

Gen adı	Phytozome ID	Kromo- zom no	Kromozomal bölge (bp)	aa uzun luğu	Molekü- ler ağırlık (kDa)	pI	Kararlı- lık durumu	Kararsız- lık indeksi
PvGPAT1	Phvul.002G136600	PvChr2	28182584- 28192135 (-)	461	50,67	8,5 6	Kararlı değil	51,38
PvGPAT2	Phvul.002G191600	PvChr2	35555730- 35562770 (-)	376	43,26	9,0 1	Kararlı değil	45,72
PvGPAT3	Phvul.003G022900	PvChr3	2173526- 2180810 (-)	376	43,27	9,0 1	Kararlı değil	48,77
PvGPAT4	Phvul.006G033100	PvChr6	12557623- 12560228 (-)	532	60,35	8,9 5	Kararlı	31,84
PvGPAT5	Phvul.007G212600	PvChr7	33508147- 33510579 (-)	445	50,22	8,8 2	Kararlı	32,97
PvGPAT6	Phvul.007G233600	PvChr7	35729556- 35732133 (-)	487	53,33	9,2 5	Kararlı değil	40,19
PvGPAT7	Phvul.008G106700	PvChr8	11833930- 1837425 (+)	496	55,14	9,3 4	Kararlı değil	43,02
PvGPAT8	Phvul.008G169400	PvChr8	47372024- 47374065 (-)	505	56,93	9,0 4	Kararlı	36,75
PvGPAT9	Phvul.008G169500	PvChr8	47477960- 47480037 (+)	501	56,66	8,4 1	Kararlı değil	40,60
PvGPAT10	Phvul.008G191600	PvChr8	53130068- 53132262 (+)	539	60,40	8,9 6	Kararlı	37,87
PvGPAT11	Phvul.008G192000	PvChr8	53217781- 53220332 (-)	472	52,74	8,9 5	Kararlı	39,13
PvGPAT12	Phvul.010G004650	PvChr10	719323- 722383 (+)	493	54,84	9,4 6	Kararlı	39,42
PvGPAT13	Phvul.010G099700	PvChr10	36675257- 36679613 (+)	501	55,62	9,2 6	Kararlı değil	41,54

*(+): pozitif zincir, (-): negatif zincir



Şekil 4.1. PvGPAT genlerinin fasulye kromozomları üzerindeki konumu (Mavi ve kırmızı renkli gen çiftleri segmental duplike genlerdir. Yeşil renkli gen çiftleri tandem duplike genlerdir).

Gen duplikasyon analizlerine göre, *PvGPAT4/PvGPAT10* ve *PvGPAT7/PvGPAT12* segmental duplike genler iken, *PvGPAT8/PvGPAT9* tandem duplike genlerdir. Çizelge 4.2, bu duplike genlerin Ka ve Ks değerlerini, Ka/Ks oranlarını ve duplikasyon tiplerini göstermektedir. Ka/Ks verilerine göre, bu genler evrimsel süreç

boyunca fonksiyonel sınırlama ve negatif seçim (arındırıcı) baskısına maruz kalmıştır. *GPAT* genlerinin ıraksama süreci (MYÖ), $T=Ks/2\lambda$ ($\lambda=6,56E-9$) olarak yılda eşanlamlı bölge başına bir ikame eşanlamlı mutasyon oranı kullanılarak hesaplanmıştır (Büyük et al. 2016). *PvGPAT4/PvGPAT10* genleri 11,04 milyon yıl önce (MYÖ), *PvGPAT7/PvGPAT12* genleri 67,96 MYÖ ve *PvGPAT8/PvGPAT9* genleri 45,7 MYÖ birbirinden ayrılmıştır.

Çizelge 4.2. Fasulye genomundaki duplike *GPAT* gen çiftleri

Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ	Seleksiyon baskısı	Duplikasyon Tipi
<i>PvGPAT4</i>	<i>PvGPAT10</i>	0,1595	0,7446	0,2124	11,04	Arındırıcı	Segmental
<i>PvGPAT7</i>	<i>PvGPAT12</i>	0,1312	0,9060	0,1445	67,96	Arındırıcı	Segmental
<i>PvGPAT8</i>	<i>PvGPAT9</i>	0,1725	0,6550	0,2632	45,70	Arındırıcı	Tandem

PvGPAT genlerinin hücre altı lokalizasyonu Çizelge 4.3'te verilmiştir. WoLF PSORT veri tabanı kullanılarak, *PvGPAT* genlerinin hücre içi lokalizasyonlarının çekirdek, kloroplast ve mitokondri gibi on iki farklı bölgede lokalize olduğu belirlenmiştir. *PvGPAT3* sekiz farklı hücre altı bölgede bulunmasına rağmen, *PvGPAT1* ve *PvGPAT12* sadece iki farklı hücre altı bölgede bulunmaktadır. Kloroplast organelinde sadece *PvGPAT1*, *PvGPAT3* ve *PvGPAT4* genleri bulunmaktadır.

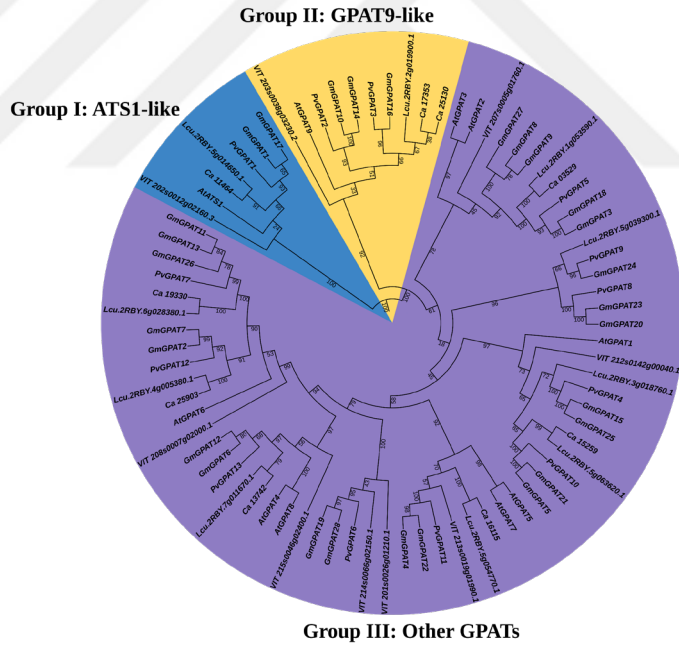
Çizelge 4.3. *PvGPAT* genlerinin hücre altı lokalizasyonu

Gen adı	Hücre altı lokalizasyon
<i>PvGPAT1</i>	*chlo: 12, mito: 2
<i>PvGPAT2</i>	plas: 7, E.R.: 4, nucl: 1, cyto: 1, vacu: 1
<i>PvGPAT3</i>	nucl: 3.5, chlo: 3, cyto: 3, cysk: 2.5, plas: 2, mito: 1, vacu: 1
<i>PvGPAT4</i>	plas: 4.5, golg: 3.5, chlo: 3, vacu: 2, golg: 1.5, nucl: 1, cyto: 1, E.R.: 1
<i>PvGPAT5</i>	plas: 5.5, golg: 5.5, golg: 4.5, vacu: 2, E.R.: 2
<i>PvGPAT6</i>	plas: 7, E.R.: 4, golg: 2, vacu: 1
<i>PvGPAT7</i>	plas: 8.5, cyto: 5, E.R.: 3, mito: 1, vacu: 1
<i>PvGPAT8</i>	plas: 7, E.R.: 5, mito: 1, vacu: 1
<i>PvGPAT9</i>	plas: 7, nucl: 2, vacu: 2, cyto: 1, E.R.: 1, golg: 1
<i>PvGPAT10</i>	plas: 4, E.R.: 4, cyto: 2, nucl: 1, mito: 1, extr: 1, vacu: 1
<i>PvGPAT11</i>	plas: 6, E.R.: 5, extr: 1, vacu: 1, golg: 1
<i>PvGPAT12</i>	plas: 7, E.R.: 3, mito: 2, cyto: 1, vacu: 1
<i>PvGPAT13</i>	plas: 8, E.R.: 5, vacu: 1

*chlo: kloroplast, mito: mitokondri, E.R.: Endoplazmik retikulum, vacu: vakuol, nucl: çekirdek, cyto: sitozol, golg: golgi, cysk: hücre iskeleti, plas: plazma zarı, extr: hücre dışı

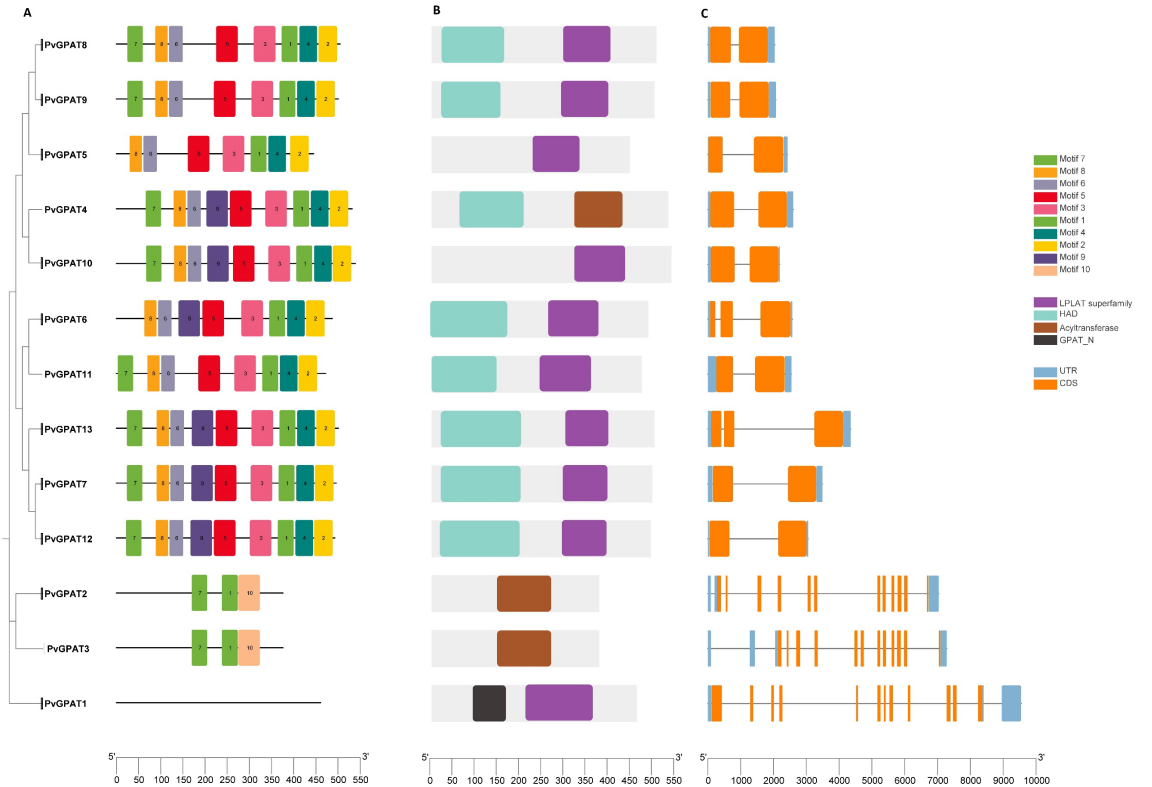
4.1.1.2. *GPAT* genlerinin filogenetik ve gen yapısı analizleri

GPAT proteinleri arasındaki akrabalık ilişkileri belirlemek için *Arabidopsis*, fasulye, üzüm, nohut, mercimek ve soya fasulyesi bitkilerinin *GPAT* genlerinin protein dizileri kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir. *GPAT* proteinlerinin filogenetik ağacı, 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile ML yöntemi kullanılarak çizilmiştir ve iTOL programında şekillendirilmiştir (Şekil 4.2). Filogenetik ağaç incelendiğinde *GPAT* proteinleri 3 gruba ayrılmıştır: Grup I: *ATSI* benzeri, Grup II: *GPAT9* benzeri ve Grup III: Diğer *GPAT*'lar. Grup I, farklı bitkilere ait kloroplastik *GPAT* genlerini içermektedir. Bu genler *Arabidopsis ATSI* geninin ortologlarıdır. Grup II'deki *GPAT* genleri *Arabidopsis GPAT9* geninin ortologlarıdır. Grup III bu genlerin dışındaki genleri içermektedir.



Şekil 4.2. *GPAT* genlerinin filogenetik ağacı (MEGA v11 programı kullanılarak soya fasulyesi, *Arabidopsis*, üzüm, nohut, mercimek ve fasulye *GPAT* genlerinin amino asit dizileri ile bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Ağaç, Grup I: *ATSI* benzeri, Grup II: *GPAT9* benzeri ve Grup III: Diğer *GPAT*'ları içeren toplam 79 protein ile 3 gruba ayrılmıştır. Rakamlar 1000 tekrarlı bootstrap değerleridir).

PvGPAT proteinleri ile oluşturulan filogenetik ağaç, domain ve korunmuş motif analizi sonuçları Şekil 4.3A’da sunulmuştur. İlave korunmuş motif analizinde, amino asit sayıları 32 ila 50 arasında değişen on korunmuş motif bulunmuştur. PvGPAT4 ve PvGPAT10 en fazla motif sayısına (9) sahiptir. PvGPAT1 herhangi bir motif içermediği belirlenmiştir. PvGPAT2 ve PvGPAT3 en düşük motif sayısına sahip olup sadece 3 motif içerdiği tespit edilmiştir. Motif 1, PvGPAT1 hariç tüm GPAT proteinlerinde bulunur. Çizelge 4.4, motifler için en iyi olası eşleşme dizilerinin bir listesini içermektedir. Ayrıca, Şekil 4.3C’de, *PvGPAT* genlerinin gen yapısı analizinin görsel bir temsili sunulmuştur. *PvGPAT* genlerinin birden fazla ekzon bölgesi içerdiği belirlenmiştir. Bazı *PvGPAT* genlerinin hemen hemen aynı ekzon-intron modeline sahip olduğu belirlenmiştir. Gen yapısı analizi sonucunda ekzon sayıları iki, üç ve on iki olarak, intron sayıları ise bir, iki ve on bir olarak belirlenmiştir. *PvGPAT1*, *PvGPAT2* ve *PvGPAT3* genlerinin en yüksek ekzona sahip olduğu belirlenmiştir. Neredeyse tüm *PvGPAT* genleri LPLAT süper ailesini ve HAD domainini içerdiği tespit edilmiştir. Diğerlerinden farklı olarak, *PvGPAT2*, *PvGPAT3* ve *PvGPAT4* ilave açıltransferaz domainini ve *PvGPAT1* ise GPAT_N domainini içerdiği bulunmuştur (Şekil 4.3b).



Şekil 4.3. (a) PvGPAT proteinleri arasındaki filogenetik ilişki ve PvGPAT proteinlerinin korunmuş motif diyagramı (b) PvGPAT proteinlerinde bulunan ilave

domainler (c) *PvGPAT* genlerinin gen yapısı. Her bir renkli kutunun açıklaması şekilde gösterilmiştir.

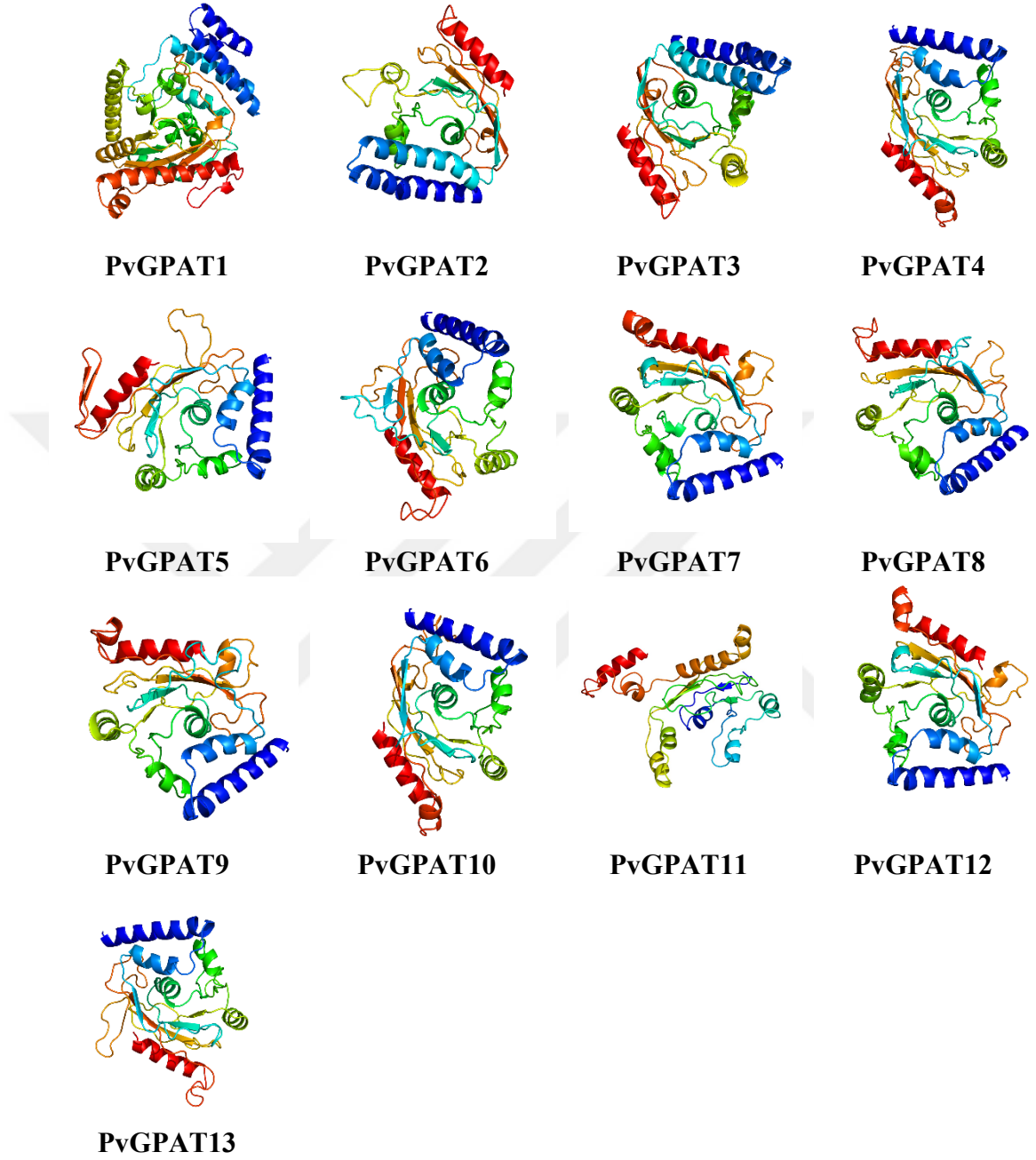
Çizelge 4.4. *PvGPAT* genlerindeki motif dizilerine ait muhtemel en iyi eşleşme

Motif no	Genişlik	Muhtemel en iyi eşleşme	Domain
Motif-1	41	LLSEGDVVCPGEGTTCREPYLLRFS ALFAELTDEIVPVAID	GPAT/DHAPAT, açıltransferaz domain
Motif-2	43	GGKSSIEVANYIQKVJADALGFEC TNLTRKDKYLMLAGNEGVV	GPAT/DHAPAT, açıltransferaz domain
Motif-3	50	VLYVCNHRITLLDPIYISVALGRPJS AVTYSLSKLSEHSPIKTVRLTRDR	GPAT/DHAPAT, açıltransferaz domain
Motif-4	41	SMFYGTASGLKCLDPFFFFMNPR PTYEITFLEKLPKELTC	GPAT/DHAPAT, açıltransferaz domain
Motif-5	50	PREKYPKPLIFHDGRLAFRPTPLAA LLTFLWLPFGFISILRIYLGIPLP	GPAT/DHAPAT, açıltransferaz domain
Motif-6	35	YGKRVVVTALPRVMVEPFLKEYL GADAVLGTELKT	N/A
Motif-7	41	DGTLLRSTSAFPYFMLVAFEAGSIL RALJLLSVPLVWLLN	GPAT, N-terminal domain süperailisi
Motif-8	24	VARAVLPKFYLEDVHPESFEVFA	N/A
Motif-9	47	IEPSLVEAAGAFFDDSWTGVFKYN PPEPWNWPKYLFPLWHTGMIDRY	N/A
Motif-10	21	LGDRITDHDHFMSCKEGYMVP	N/A

4.1.1.3. *PvGPAT* proteinlerinin üç boyutlu yapısal modellemesi, protein-protein etkileşimleri ve Gen Ontoloji Analizi

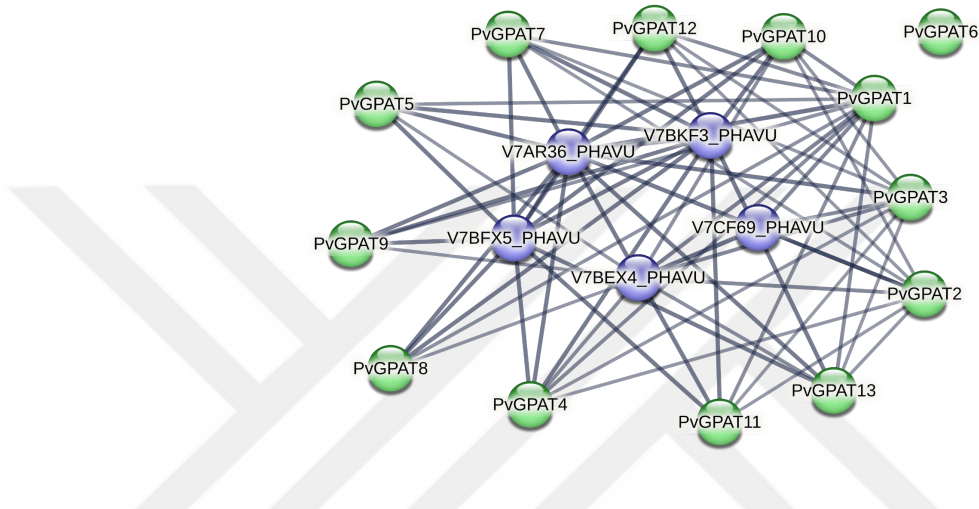
Protein Veri Bankası'ndaki (PDB) *PvGPAT* proteinleri BLASTP ile taranmış ve GPAT proteinlerinin yapısını ve işlevini tahmin etmek için kullanılan bir veri tabanı olan Phyre2 kullanılarak bu proteinlerin üç boyutlu homoloji modellemesi elde edilmiştir. Bu analizde tanımlanan proteinlerin üç boyutlu homoloji modelleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. *PvGPAT* proteinlerinin üç boyutlu yapı analizinde, modelleme güven düzeyi %90'ın üzerinde olan simülasyonlar tercih edilmiştir. *PvGPAT* proteinlerinin üç boyutlu yapısı incelendiğinde, çok sayıda alfa-sarmal yapıya sahip oldukları ancak daha az sayıda beta-tabaka yapıya sahip oldukları görülmüştür. *PvGPAT1* hariç, diğer GPAT proteinlerinin üç boyutlu yapılarının birbirine benzediği belirlenmiştir. *PvGPAT* proteinlerinin üç boyutlu homoloji modelleme tahminlerine göre, bu proteinler farklı etkileşim alanlarına sahip olmuştur. Bununla birlikte, bağlanma bölgelerinin konumu ve türü bakımından farklılık göstermişlerdir. Ancak bu proteinlerin yapılarının daha iyi anlaşılması için fonksiyonel çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çizelge 4.5. PvGPAT proteinlerinin üç boyutlu yapısı



PvGPAT’ların protein-protein etkileşimleri, PvGPAT protein dizileri kullanılarak “Etkileşen Genlerin/Proteinlerin Elde Edilmesi için Arama Aracı (STRING)” ara yüzü aracılığıyla tespit edilmiştir. PvGPAT1 proteini diğer GPAT proteinleri ile en çok etkileşime giren protein olmuştur. PvGPAT6 diğer GPAT proteinleri ile etkileşime girmediği tespit edilmiştir. PvGPAT5, PvGPAT8 ve PvGPAT9 proteinleri yalnızca PvGPAT1 proteini ile etkileşime girmiştir. V7AR36_PHAVU, V7BKF3_PHAVU,

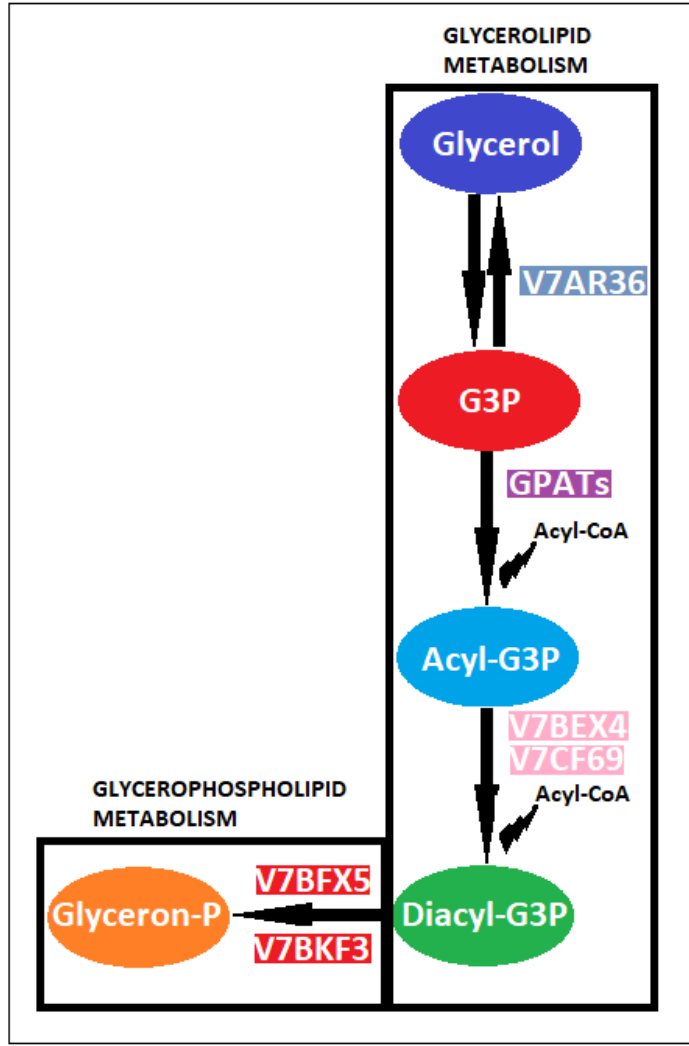
V7BFX5_PHAVU, V7BEX4_PHAVU ve V7CF69_PHAVU proteinleri PvGPAT proteinleriyle en çok etkileşime giren 5 protein olmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Bu beş proteinin NCBI ID'leri ve rol oynadıkları moleküler işlevler Çizelge 4.6'da verilmiştir. Buna göre, PvGPAT proteinleri çoğunlukla gliserol degradasyonu, diaçilgliserol/triaçilgliserol biyosentezi ve fosfatidilkolin açıl düzenleme yollarında yer alan proteinlerle etkileşime girdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4. PvGPAT proteinlerinin birbirleriyle ve diğer proteinlerle protein-protein etkileşimleri.

Çizelge 4.6. PvGPAT proteinleri ile en güçlü etkileşime giren proteinler hakkında bilgi

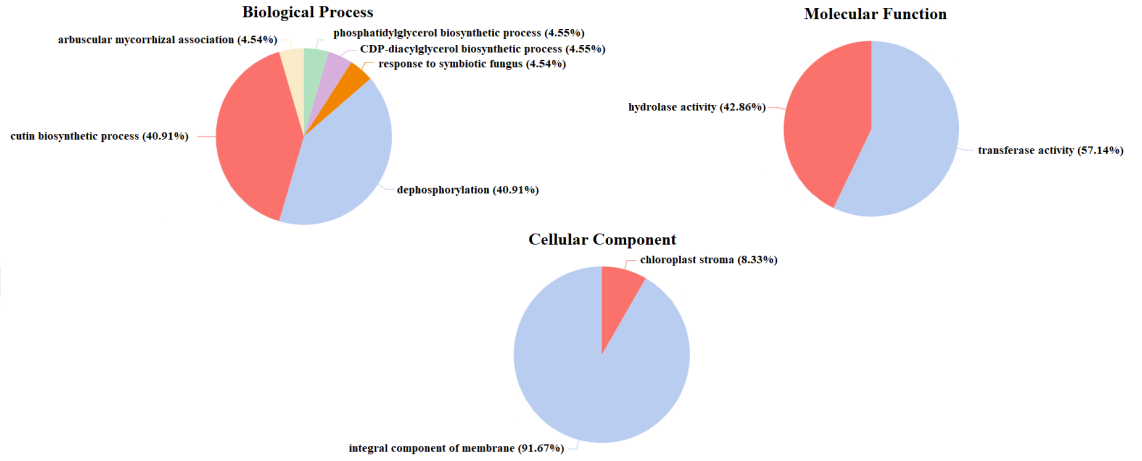
String ID	Phytozome ID	Fonksiyonu	Metabolik Yolağı
V7AR36_PHAVU	Phvul.010G157400	gliserol kinaz	gliserol degradasyonu
V7BKF3_PHAVU	Phvul.007G245200	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz	gliserol degradasyonu
V7BFX5_PHAVU	Phvul.007G099001	Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz	gliserol degradasyonu
V7BEX4_PHAVU	Phvul.007G037000	1-açıl-sn-gliserol-3-fosfat açıltransferaz	diaçilgliserol/triaçilgliserol biyosentezi
V7CF69_PHAVU	Phvul.003G212400	Lizofosfolipit açıltransferaz	fosfatidilkolin açıl düzenleme



Şekil 4.5. PvGPAT proteinlerinin metabolik yol diyagramı ve en çok etkileşime girdikleri 5 protein.

PvGPAT genlerinin Gen Ontoloji analizleri varsayılan parametrelerle (seviye 1) Blast2GO® ve Omics Box araçları ile gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, GO analizleri STRING veri tabanı ve DAVID: Functional Annotation Tool çevrimiçi tarayıcısı ile desteklenmiştir. Bu genlerin moleküler fonksiyon, hücresel bileşenler ve biyolojik süreç analizlerine katılım yüzdeleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, GPAT genleri iki farklı moleküler fonksiyonda işlev görmektedir; hidrolaz aktivitesi (%42,86) ve transferaz aktivitesi (%57,14). GPAT proteinleri iki farklı hücresel kompartmanda bulunmaktadır: kloroplast stroması (%8,33) ve membranın integral bir bileşeni (%91,67). Ayrıca arbusküler mikorizal ilişki (%4,54), kütin biyosentetik süreci (%40,91), fosfatidilgliserol biyosentetik süreci (%4,55), CDP-diasilgliserol biyosentetik süreci (%4,55), simbiyotik mantara yanıt (%4,54) ve defosforilasyonunu (%40,91) içeren altı ayrı biyolojik süreçte yer almıştır (Şekil 4.6). GPAT genlerinin daha önce farklı bitkilerde

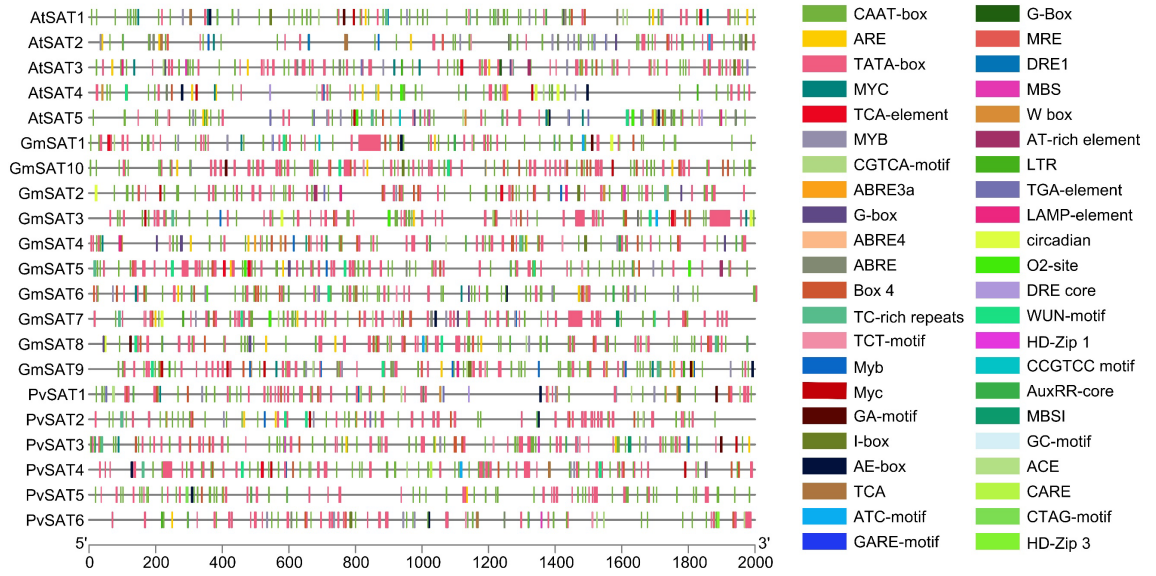
yapılan GO analizlerine paralel olarak, bu çalışmadan elde edilen GO sonuçları da fasulyedeki *GPAT* genlerinin gliserol-3-fosfat açıltransferaz aktivitesinde işlevsel olarak yer aldığını göstermiştir. Ayrıca bu bulgular, GPAT geninin biyolojik süreçlerde çeşitli lipid ürünlerinin ve bunların membrana bağlı hücresel bileşenlerinin sentezinde görev aldığını da göstermektedir (Safder et al. 2021).



Şekil 4.6. *PvGPAT* genlerinin biyolojik süreçlere, hücresel bileşenlere ve moleküler işlevlere katılım oranlarını gösteren pasta grafiği.

4.1.1.4. *PvGPAT* genlerinin promotör bölgesindeki cis-etkili elementlerin tanımlanması

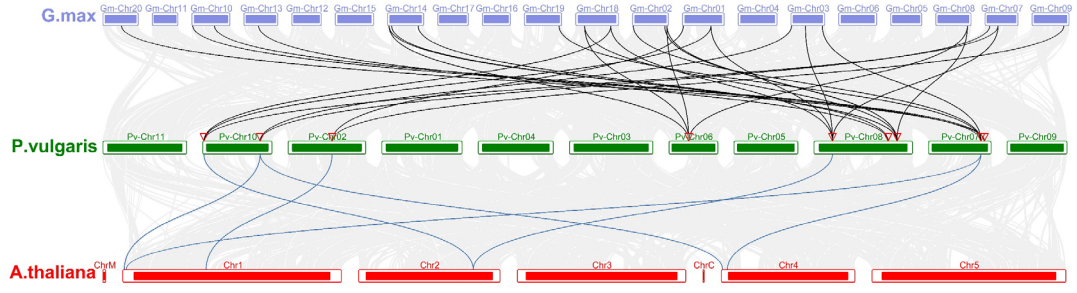
PvGPAT genlerinin transkripsiyonel düzenlemesini belirlemek için *PvGPAT* genlerinin 2000 bp yukarı akış promotör bölgesi alınarak PlantCARE veritabanında analiz edilmiştir. *PvGPAT* genlerinin promotörlerinde stres ile ilişkili otuz sekiz farklı cis-etkili element tanımlanmış ve bu veriler TBtools ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.7). Bu analize göre, kuraklık stres tepkisi ile ilişkili MBS elementi *PvGPAT1*, 2, 8, 12 ve 13 genlerinde bulunmuştur. Kuraklık ve tuzluluk stresıyla mücadelede de etkili olan ABRE, *PvGPAT1*, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12 ve 13 genleri arasında tespit edilmiştir. DRE-core elementi ise sadece *PvGPAT3* ve *PvGPAT5* genlerinde bulunmuştur.



Şekil 4.7. *PvGPAT* genlerinin promotör bölgelerindeki cis-etkili elementler

4.1.1.5. *P. vulgaris* ve diğer bitkilere ait *GPAT* genleri ile oluşturulan sinteni analizi

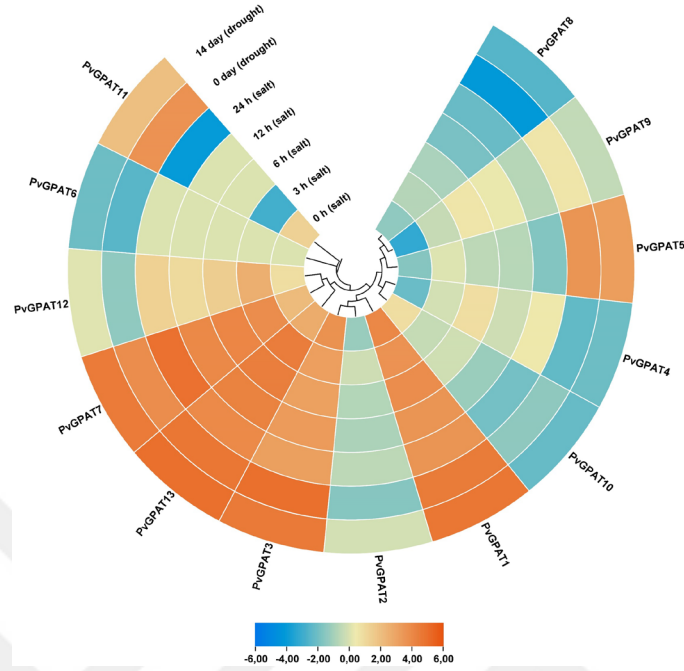
TBtools aracı ile fasulye, soya fasulyesi ve *Arabidopsis* bitkilerinin *GPAT* genlerinin sinteni haritası oluşturulmuştur (Şekil 4.8). *A. thaliana* ve *P. vulgaris*'in sinteni çalışmasında yedi sintenik bağlantı, *P. vulgaris* ve *G. max*'ın sinteni analizinde ise 28 sintenik ilişki keşfedilmiştir. *P. vulgaris* ve *A. thaliana* arasında uygulanan analiz sonucunda *AtATSI* geninin *PvGPAT1* geni ile, *AtGPAT2* ve *AtGPAT3* genlerinin *PvGPAT5* geni ile, *AtGPAT6* geninin *PvGPAT7* ve *PvGPAT12* genleri ile ve *PvGPAT13* geninin *AtGPAT4* ve *AtGPAT8* genleri ile ortolog genler olduğu tespit edilmiştir. *P. vulgaris* ve *G. max* arasında uygulanan analiz sonucunda *GmGPAT1* ve *GmGPAT17* genlerinin *PvGPAT1* geni ile, *GmGPAT16* geninin *PvGPAT3* geni ile, *GmGPAT5*, 15, 21 ve 25 genlerinin *PvGPAT4* ve *PvGPAT10* geni ile, *GmGPAT3*, 8, 18 ve 27 genlerinin *PvGPAT5* geni ile, *GmGPAT19* ve *GmGPAT28* genlerinin *PvGPAT6* geni ile, *GmGPAT2*, 7, 13 ve 26 genlerinin *PvGPAT7* geni ile, *GmGPAT20* ve *GmGPAT23* genlerinin *PvGPAT8* geni ile, *GmGPAT2*, 13 ve 26 genlerinin *PvGPAT12* geni ile ve *GmGPAT6* ve *GmGPAT12* genlerinin *PvGPAT13* geni ile ortolog genler olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. *PvGPAT* genleri ile *AtGPAT* ve *GmGPAT* genleri arasındaki ortolog ilişkileri gösteren sinteni analizi.

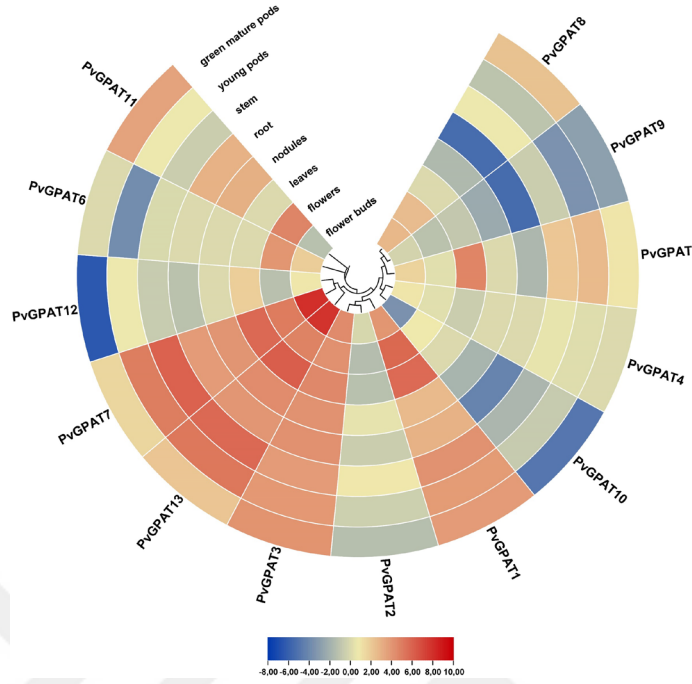
4.1.1.6. *PvGPAT* genlerinin farklı fasulye dokularında ve farklı stres koşulları altında *in silico* gen ekspresyon analizi

0, 3, 6, 12 ve 24 saatlik tuz stresi RNAseq verileri kullanılarak bir ısı haritası çizilmiştir (Şekil 4.9). Bu haritaya göre, *PvGPAT* genlerinden *PvGPAT4*, 9 ve 12'nin ifade seviyesinde artış gözlenirken, *PvGPAT11* geninin ifade seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Tuz stresi verilerine göre, artan tuz stresi seviyesinden bağımsız olarak yüksek ifade seviyeleri sergileyen genler *PvGPAT1*, 3, 7 ve 13 olmuştur. *PvGPAT5* ve *PvGPAT10* genlerinin ifadesi tuz stresinin 3. saatinde artmış ve sonraki saatlerde azalmıştır. Diğer taraftan, 0 ve 14 günlük kuraklık stresi RNAseq verileri kullanılmıştır. Buna göre, kuraklık stresi *PvGPAT9*, 10 ve 11 genlerinin ifadesinde azalmaya ve *PvGPAT2*, 7, 8 ve 12 genlerinin ifadesinde artışa neden olmuştur. Tuz stresi altında olduğu gibi, kuraklık stresinde de *PvGPAT1*, 3 ve 13'ün ifade seviyelerinin hem stres öncesi hem de stres sonrası yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Tuz stresi altındaki fasulyelerde tuz (0-3-6-12-24 saat) ve kuraklık (0-14 gün) stresi altındaki fasulyelerde *GPAT* genlerinin transkriptomik ifade düzeyleri.

Phytozome v13 veritabanı kullanılarak fasulyenin 8 farklı dokusundan elde edilen RNA-seq verileri ile ısı haritası çizilmiştir (Şekil 4.10). Haritaya göre, *PvGPAT* genlerinin ifade düzeyleri dokulara göre farklılık göstermektedir. En yüksek ifade seviyesi çiçek tomurcuğu dokusunda *PvGPAT7* ve *PvGPAT13*'te tespit edilmiştir. En düşük ifade seviyesi yeşil olgun bakla dokusunda *PvGPAT710* ve *PvGPAT12*'de ve kök dokusunda ise *PvGPAT8* ve *PvGPAT9* genlerinde tespit edilmiştir. *PvGPAT1*, 3, 7 ve 13 tüm dokularda yüksek ifade seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Sekiz farklı fasulye dokusunda *GPAT* genlerinin in silico ifade seviyeleri

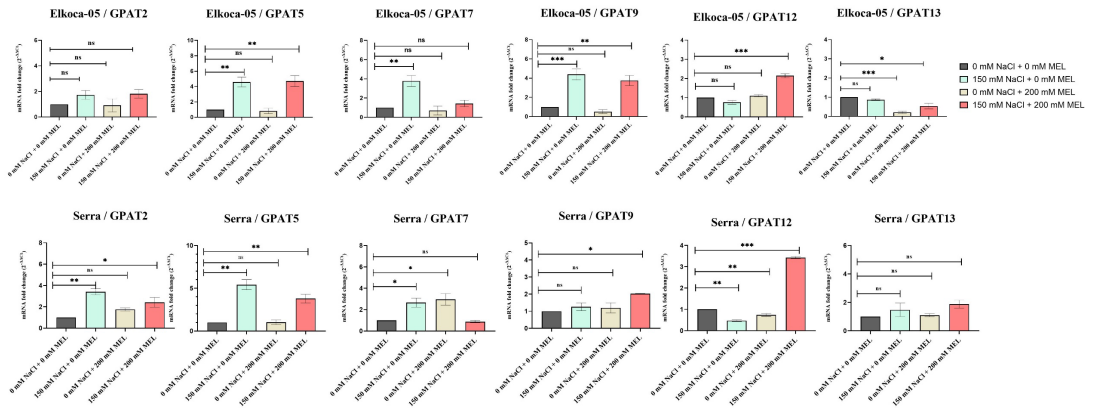
4.1.1.7. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizler

Araştırmada, tuz stresi (150 NaCl) ve kuraklık (%20 PEG6000) stresi ve bu stres şartlarında melatonin uygulaması altında iki fasulye çeşidinde (Elkoca-05 ve Serra) *PvGPAT* genlerinin ifade düzeylerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Bunun için, *PvGPAT2*, *PvGPAT5*, *PvGPAT7*, *PvGPAT9*, *PvGPAT12* ve *PvGPAT13* genlerine uygun primerler tasarlanmış ve qRT-PCR yapılmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada, Elkoca-05 çeşidinin Serra çeşidine göre nispeten daha dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Aygören et al. 2023). Bu çalışmada, stres koşullarına verilen yanıtın çeşitler arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için iki farklı uygulama rejimi kullanılarak altı *PvGPAT* geninin ifade düzeyleri incelenmiştir (Şekil 4.11).

Araştırmada, Elkoca-05 çeşidinde tuz stresi uygulaması sonucunda, *PvGPAT5*, *PvGPAT7* ve *PvGPAT9* genlerinin ifade seviyelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, *PvGPAT13* geninde anlamlı bir azalış olmuştur diğer genlerin ifade seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. 150 mM tuz + 200 mM MEL uygulaması, *PvGPAT5*, 9 ve 12 genlerinin ifade düzeylerinde kontrole kıyasla anlamlı bir

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

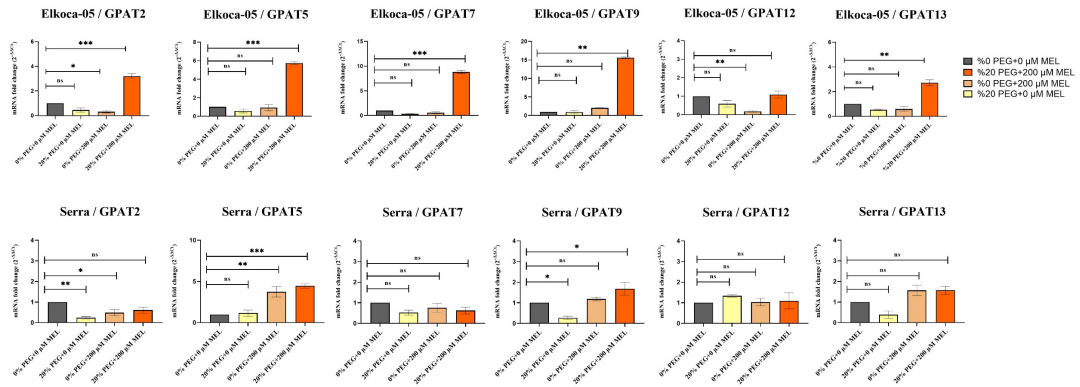
artışa neden olmuş, ancak diğer *GPAT* genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Serra çeşidine tuz stresi uygulaması, *PvGPAT2*, 5, ve 7 genlerinin ifade seviyelerinde anlamlı bir artışa neden olurken, *PvGPAT12* geninde anlamlı bir azalış olmuştur ve diğer genlerin ifade seviyeleri açısından anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir. Melatonin uygulaması, *PvGPAT7* ve *PvGPAT12* genlerinin ifade seviyelerinde kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı bir artışa neden olurken, diğer *GPAT* genlerinin ifade seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. 150 mM tuz + 200 mM MEL uygulaması sonucunda, *PvGPAT2*, 5, 9 ve 12 genlerinin ifade seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, diğer *GPAT* genlerinin ifade seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.11). qRT-PCR sonuçlarına göre, her iki çeşitte *PvGPAT5* ve *PvGPAT7* genleri tuz stresi uygulamasında benzer şekilde yanıt verirken, *PvGPAT5*, *PvGPAT9* ve *PvGPAT12* genleri tuz + melatonin uygulamasında benzer şekilde yanıt vermiştir. Ancak, Serra çeşidinde *PvGPAT7* ve *PvGPAT12* genlerinin Elkoca-05 çeşidinde ise *PvGPAT13* geninin melatonin uygulamasına tepkisi farklılık göstermiştir.



Şekil 4.11. Tuz stresi ve melatonin uygulaması altında iki çeşitte (Elkoca-05 ve Serra) *PvGPAT* genlerinin ekspresyon seviyesi grafikleri.

Elkoca-05 çeşidinde kuraklık stresinin bir sonucu olarak, *PvGPAT* genlerinin ifade seviyelerinde kontroldekilere kıyasla anlamlı bir fark bulunmamıştır. Melatonin uygulama grubunda *PvGPAT2* ve *PvGPAT12* genlerinin ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiş, ancak diğer *GPAT* genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. %20 PEG+200 mM MEL uygulamasından sonra, *PvGPAT2*, 5, 7, 9 ve 13 genlerinin ifade seviyelerinde kontrol

grubundakilere kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, diğer *GPAT* genlerinin ifade seviyesi açısından anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.12). Diğer taraftan Serra çeşidinde kuraklık stresinde, *PvGPAT2* ve *PvGPAT9* genlerinin ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalış gözlenirken, diğer genlerin ifade düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Melatonin uygulandığında, *PvGPAT2* ve *PvGPAT5* genlerinin ifade düzeylerinde kontroldekilere kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenirken, diğer *GPAT* genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. %20 PEG+200 mM MEL uygulaması sonucunda *PvGPAT5* ve *PvGPAT9* genlerinin ifade düzeylerinde kontroldekilere kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken, diğer *GPAT* genlerinin ifade düzeyleri açısından anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. qRT-PCR sonuçlarına göre, her iki çeşitte *PvGPAT2* geni melatonine benzer şekilde yanıt vermiştir. Ayrıca, her iki çeşitte *PvGPAT5* ve *PvGPAT9* genleri tuz + melatonine benzer şekilde yanıt vermiştir. Bununla birlikte, kuraklık uygulamasına tepkisi olarak sadece Serra çeşidinde *PvGPAT2* ve *PvGPAT9* genlerinde anlamlı değişiklik sergilenmiştir. *PvGPAT12* geni hariç diğer genlerinin kuraklık+melatonin uygulamasına tepkileri Elkoca-05 çeşidinde farklılık göstermiştir. qRT-PCR sonuçlarına göre, her iki çeşitte *PvGPAT5* ve *PvGPAT9* genlerinin ifadesinde hem tuz stresi+melatonin hem de kuraklık stresi+melatonine yanıt olarak anlamlı bir artış meydana geldiği bulunmuştur.

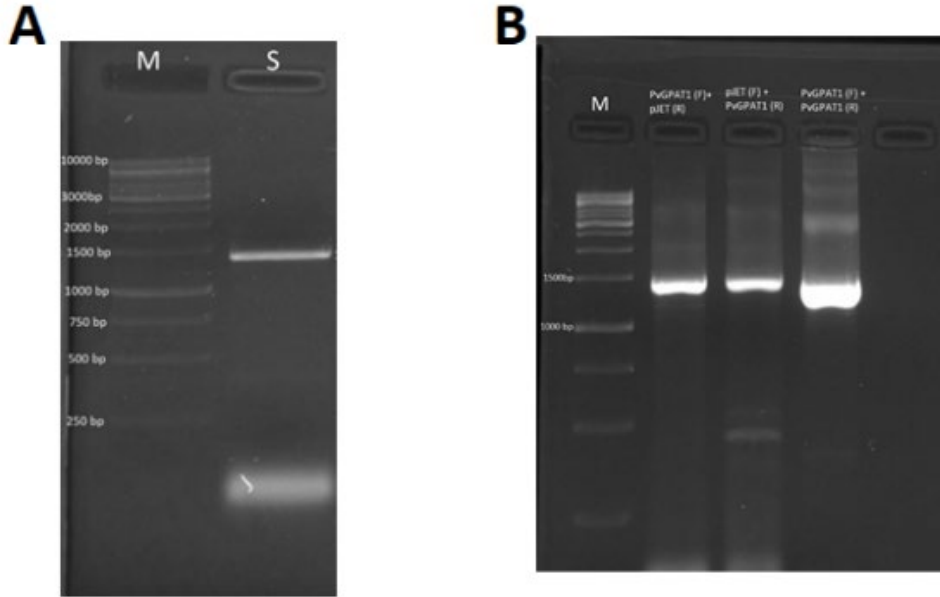


Şekil 4.12. Kuraklık stresi ve melatonin uygulaması altında iki çeşitte (Elkoca-05 ve Serra) *PvGPAT* genlerinin ekspresyon seviyesi grafikleri.

4.1.2. Kuraklık stresi altında *PvGPAT1* geninin transgenik yaklaşımla fonksiyonunun belirlenmesi

4.1.2.1. *PvGPAT1* geninin izole edilmesi ve pJET1.2/blunt vektörüne klonlanması

Vektöre özgün kesim enzim bölgelerini içeren primerler kullanılarak kuraklık stresine maruz bırakılmış fasulyeden elde edilen cDNA kütüphanesinden 1386 bp uzunluğundaki *PvGPAT1* genini izole edilmiştir. Enzim kesim bölgeleri ile birlikte 1399 bp'ye sahip ampikon elde edilmiştir (Şekil 4.13a). *PvGPAT1* geni jelden izole edilerek, TA klonlama yöntemi ile pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarılmıştır. *pJET::PvGPAT1* rekombinant vektörü *PvGPAT1* ve pJET primerleri ile doğrulanmıştır. Yapılan primer kombinasyonları *PvGPAT1* (F) + pJET (R), *PvGPAT1* (R) + pJET (F) ve *PvGPAT1* (F) + *PvGPAT1* (R) şeklinde olup bant boyutları sırasıyla 1416, 1416 ve 1399 bp'dir (Şekil 4.13b).



Şekil 4.13. (a) *Bgl*II ve *Bst*EII enzim kesim bölgelerini içeren primerler ile elde edilen *PvGPAT1*'e ait cDNA'nın jel görüntüsü (b) pJET::GPAT1 rekombinant vektörünün *PvGPAT1* ve pJET primerleriyle yapılan PCR doğrulamasının jel görüntüsü (S: Örnek, M: Marker; 1Kb gene ruler #SM0311 Thermo Fisher).

Doğrulanmış rekombinant vektör JM101 bakterilerinde çoğaltılmıştır. *GPAT1* geninin doğruluğu için pozitif kolonilerden plazmit izolasyonu yapılarak pJET (R) ve

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

pJET (F) primerleriyle çift yönlü okuma yapılmıştır. Sekans okuma sonucu Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Phytozome v13 veri tabanında bulunan *Phvul.002G136600.1 (GPAT1)* geni ile elde ettiğimiz gen bölgesinin %99,78 uyumlu olduğu bulunmuştur.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2543 bits(1377)	0.0	1384/1387(99%)	2/1387(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAGCATGACCGGTTCTTCAGCTTACTATGTGGCACACGCCATCCCTCCCTTCTCCGC	60		
Sbjct 40	ATGAGCATGACCGGTTCTTCAGCTTACTATGTGGCACACGCCATCCCTCCCTTCTCCGC	99		
Query 61	CTTTCCAACAAACTATGTTACTCCTTTCCACGCCGCCAACCACATTCTTCCCTACGTCT	120		
Sbjct 100	CTTTCCAACAAACTATGTTACTCCTTTCCACGCCGCCAACCACATTCTTCCCTACGTCT	159		
Query 121	ACAACTCCTAGGGTTACGCTTctctctcttcaacctcctcctcctcctcctcctcctcct	180		
Sbjct 160	ACAACTCCTAGGGTTACGCTTCTCTCTTCAACCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT	219		
Query 181	ctgcatcttctaccgcgccctcgcccttctgctcctccGTCACCTCTAAAGATAACTGC	240		
Sbjct 220	CTGCGATCTTCTACCGCGCCCTCGCCTTCTGCTCCTCCGTCACTCCTAAAGATAACTGC	279		
Query 241	CTCGCTTCGGCCAAACATTCTCCCCCTAACATGTCCGCTTCCGTCTCTTCCCGCACCTTC	300		
Sbjct 280	CTCGCTTCGGCCAAACATTCTCCCCCTAACATGTCCGCTTCCGTCTCTTCCCGCACCTTC	339		
Query 301	CTCAACGCTCAGAGCGAACAAGACGTTTTTGCTGGAATCAAGAAAGAGTAGAAGCTGGA	360		
Sbjct 340	CTCAACGCTCAGAGCGAACAAGACGTTTTTGCTGGAATCAAGAAAGAGTAGAAGCTGGA	399		
Query 361	TCTCTGCCTGCTAATGTTGCTGCAGGAATGGAAGAAGGTACAATAACTATAAAAAGGCA	420		
Sbjct 400	TCTCTGCCTGCTAATGTTGCTGCAGGAATGGAAGAAGGTACAATAACTATAAAAAGGCA	459		
Query 421	GTTATCCAAAGTGAGATCCCAAGGCAAATGAAATTGTACTGTCAAATATGATTGCTTTA	480		
Sbjct 460	GTTATCCAAAGTGAGATCCCAAGGCAAATGAAATTGTACTGTCAAATATGATTGCTTTA	519		
Query 481	TTAAATCGCGTATTTTTGGATGTGACGGATCCTTTTGTTTTTCAACCACA-CCACAAGGC	539		
Sbjct 520	TTAGATCGCGTATTTTTGGATGTGACGGATCCTTTTGTTTTTCAACCACACCCACAAGGC	579		
Query 540	AAAGAGAGAGCCTTTTGACTACTACGTGTTTGGTCAGAATTACATCCGTCCTTTGGTTGA	599		
Sbjct 580	AAAGAGAGAGCCTTTTGACTACTACGTGTTTGGTCAGAATTACATCCGTCCTTTGGTTGA	639		
Query 600	TTTCAAAAATGCTTATGTTGGCAACATGCCCTTTTCATTGAAATGGAAGAGAACTCAA	659		
Sbjct 640	TTTCAAAAATGCTTATGTTGGCAACATGCCCTTTTCATTGAAATGGAAGAGAACTCAA	699		

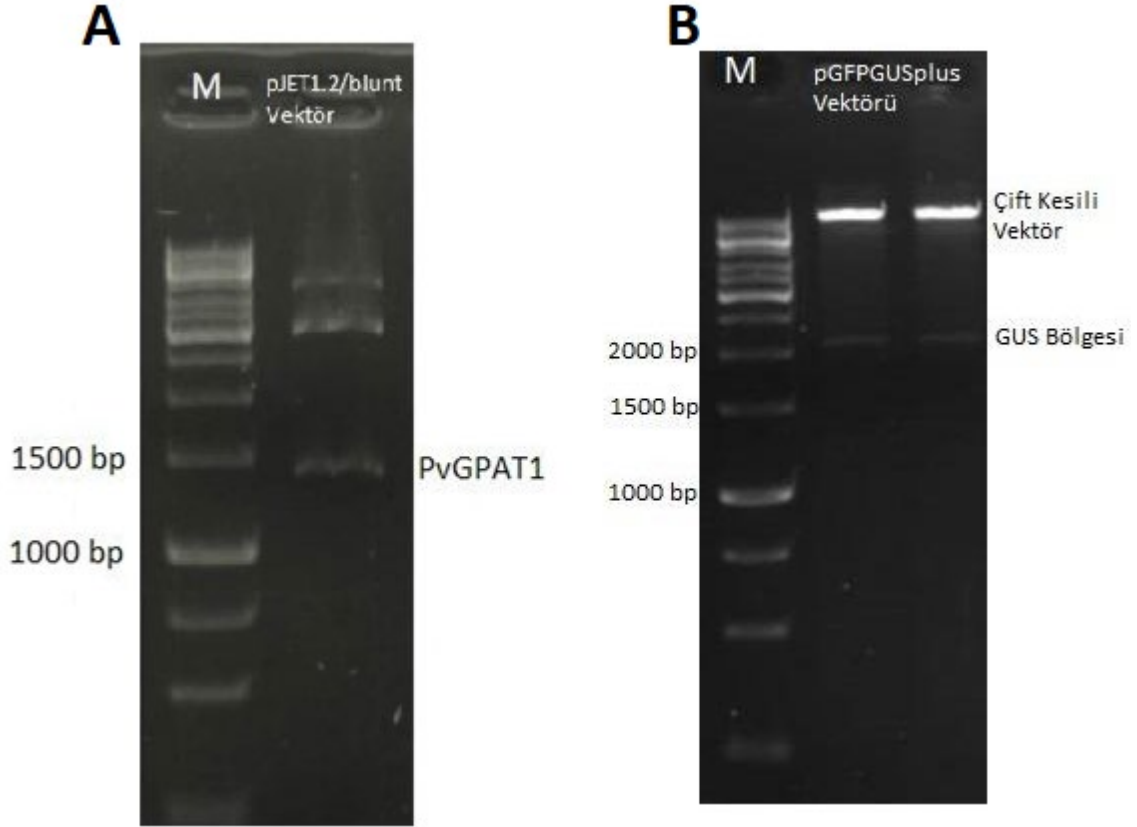
Query	660	GCAGGGACACAACATCATCTTAATGTCAAATCACCAAACCTGAAGCTGATCCAGCCATCAT	719
Sbjct	700	GCAGGGACACAACATCATCTTAATGTCAAATCACCAAACCTGAAGCTGATCCAGCCATCAT	759
Query	720	TTCATTGCTTCTTGAAACACGACTTCCCTATATTGCTGAAAACCTGACCTATGTTGCAGG	779
Sbjct	760	TTCATTGCTTCTTGAAACACGACTTCCCTATATTGCTGAAAACCTGACCTATGTTGCAGG	819
Query	780	AGATAGAGTTATAACTGATCCTCTGTCCAAACCATTTCAGTATTGGCAGGAATCTCATTTG	839
Sbjct	820	AGATAGAGTTATAACTGATCCTCTGTCCAAACCATTTCAGTATTGGCAGGAATCTCATTTG	879
Query	840	TGTTTACTCTAAAAAGCACATGCTTGATGATCCGGCACCTGTTGAGATGAAAAGAACTGC	899
Sbjct	880	TGTTTACTCTAAAAAGCACATGCTTGATGATCCGGCACCTGTTGAGATGAAAAGAACTGC	939
Query	900	AAACATACGAGCTCTGAAGGAAATGGCTATGCTTTTAAGGAATGGATCACAGTTAGTCTG	959
Sbjct	940	AAACATACGAGCTCTGAAGGAAA-GGCTATGCTTTTAAGGAATGGATCACAGTTAGTCTG	998
Query	960	GATTGCCCTAGTGGTGGTAGGGATCGCCAGATGCCAGACCAGAGAATGGGTGCCGGC	1019
Sbjct	999	GATTGCCCTAGTGGTGGTAGGGATCGCCAGATGCCAGACCAGAGAATGGGTGCCGGC	1058
Query	1020	ACCCTTTGATATTTCTTCGGTAGATAATATGCGAAGACTTGTTGAACATTTCAGGTCCACC	1079
Sbjct	1059	ACCCTTTGATATTTCTTCGGTAGATAATATGCGAAGACTTGTTGAACATTTCAGGTCCACC	1118
Query	1080	AGGTCATGTATATCCTTTGGCAATATTGTGCCATGATATCATGCCCCCTCCACTAAAGGT	1139
Sbjct	1119	AGGTCATGTATATCCTTTGGCAATATTGTGCCATGATATCATGCCCCCTCCACTAAAGGT	1178
Query	1140	TGAGAAAGAAATTGGGGAGAAAAGAATTATATGCTTTTCATGGGGCTGGCATATCAGTGGC	1199
Sbjct	1179	TGAGAAAGAAATTGGGGAGAAAAGAATTATATGCTTTTCATGGGGCTGGCATATCAGTGGC	1238
Query	1200	TCCAGCGATAAGCTTTTCTGAAACCACTGCTACTTGTGAAAATCCTGAAAAGGCTAAGGA	1259
Sbjct	1239	TCCAGCGATAAGCTTTTCTGAAACCACTGCTACTTGTGAAAATCCTGAAAAGGCTAAGGA	1298
Query	1260	GGTCTTCTCAAAAGCCCTGTACAATTCTGTGACTGAGCAATATAATGTGCTGAAATCTGC	1319
Sbjct	1299	GGTCTTCTCAAAAGCCCTGTACAATTCTGTGACTGAGCAATATAATGTGCTGAAATCTGC	1358
Query	1320	TATACAAGGaaaaaaGGATTGAAGCATCAACTCCTGTAGTTACTTTGTACAGCCATG	1379
Sbjct	1359	TATACAAGGAAAAAAGGATTGAAGCATCAACTCCTGTAGTTACTTTGTACAGCCATG	1418
Query	1380	GAAGTAG	1386
Sbjct	1419	GAAGTAG	1425

Şekil 4.14. Elde edilen gen bölgesi (Sbjct) ve Phytozome v13 veri tabanındaki *Phvul.002G136600.1* (Query) geni arasındaki BLAST sonucunun görüntüsü.

4.1.2.2. *PvGPAT1* geninin pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektörüne klonlanması ve AGL1 suşuna transformasyonu

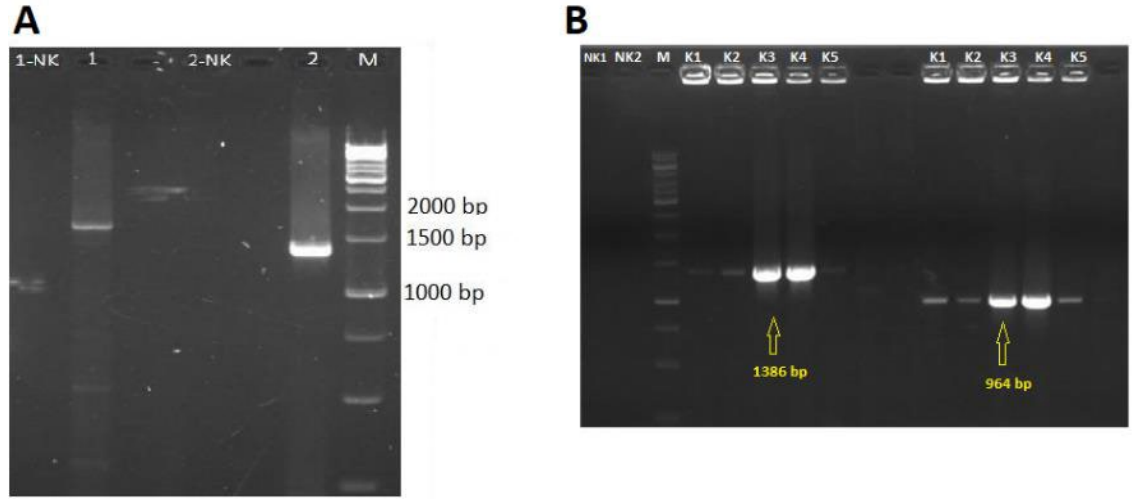
Sekans analizi ile doğrulanan *PvGPAT1* geni pJET1.2/blunt klonlama vektöründen *Bgl*II ve *Bst*EII enzimleri kullanılarak çıkarılmıştır (Şekil 4.15a). Kesim sonucunda yapışkan uçlara sahip *PvGPAT1* geni elde edilmiştir. pGFPGUS*Plus* aşırı

ifade vektöründe bulunan GUS bölgesi de aynı restriksiyon enzimleri kullanılarak çıkarılmıştır. Kesim sonucunda yapışkan uçlara sahip pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektörü elde edilmiştir (Şekil 4.15b). Yapışkan uçlara sahip *PvGPAT1* geni ve pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektörü jelden izole edildikten sonra ligasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 4.15. (a) pJET1.2/blunt vektörünün *Bgl*II ve *Bst*EII enzimleriyle kesiminin jel görüntüsü (b) pGFPGUS*Plus* aşırı ifade vektörünün *Bgl*II ve *Bst*EII enzimleriyle kesiminin jel görüntüsü (*PvGPAT1* geninin bant boyutu: 1399 bp, GUS bölgesinin bant boyutu: 2051 bp, M: Marker 1Kb gene ruler #SM0311 Thermo Fisher).

Elde edilen ligasyon ürünü 35S ileri primer ile *PvGPAT1* geri primeri (1848 bp) ve *PvGPAT1* ileri primeri ile *PvGPAT1* geri primeri (1386 bp) kullanılarak doğrulanmıştır (Şekil 4.16a). Ardından kompetent *E. coli* JM101 suşuna ligasyon ürününün transformasyonu gerçekleştirilmiştir. pGFPGUS*Plus*::*PvGPAT1* aşırı ifade vektörü JM101 bakterilerinde çoğaltılmıştır. Pozitif koloniler HptII ve *PvGPAT1* primerleri kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16b). Pozitif koloniler *PvGPAT1* primerleri ile 1386 boyutunda ve HptII primerleri ile 964 bp boyutunda ürün oluşturmuştur.



Şekil 4.16. (a) Ligasyon ürünü kontrol PCR gel görüntüsü (b) Koloni PCR sonucu (a)1-NK: 35S ileri primer-PvGPAT1 geri primer negatif kontrol, 1: 35S ileri primer-PvGPAT1 geri primer, 2-NK: PvGPAT1 ileri primer-PvGPAT1 geri primer negatif kontrol, 2: PvGPAT1 ileri primer-PvGPAT1 geri primer (b) NK1: PvGPAT1 negatif kontrol, NK2: HptII negatif kontrol, K1-K5: Koloni1-Koloni5. İlk 5 kuyu kolonilerin PvGPAT1 primerleri ile doğrulaması diğer 5 kuyu HptII primerleri ile doğrulaması.

Pozitif kolonilerden K3 ve K4 kolonileri seçilmiştir ve bu kolonilerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra, ilgili gen bölgesini içeren uygun primerler (35S ileri ve PvGPAT1 geri primerleri) kullanılarak tekrar çift yönlü okuma yapılmıştır. Sekans okuma sonucu Şekil 4.17’de gösterildiği gibidir. NCBI veri tabanında bulunan *PHAVU_002G136600g (GPAT1)* geni ile elde ettiğimiz gen bölgesi %99,21 uyumlu olduğu bulunmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Phaseolus vulgaris hypothetical protein (PHAVU_002G136600g) mRNA, complete cds

Sequence ID: [XM_007158186.1](#) Length: 2133 Number of Matches: 1

Range 1: 109 to 1494 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match!](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2447 bits(2713)	0.0	1375/1386(99%)	6/1386(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAGCATGACCGGTTCTTCAGCTTACTATGTGGCACACGCCATCCCTCCCTTCCTCCGC			60
Sbjct 109	ATGAGCATGACCGGTTCTTCAGCTTACTATGTGGCACACGCCATCCCTCCCTTCCTCCGC			168
Query 61	CTTTCCAACAAAATATGTTACTCCTTTCCACGCCGCCAACACATTCTTCCCTACGTCT			120
Sbjct 169	CTTTCCAACAAAATATGTTACTCCTTTCCACGCCGCCAACACATTCTTCCCTACGTCT			228
Query 121	ACAACCTCAAGGGTTACGCTtctctcttcaacctctctctctctctctccatctct			180
Sbjct 229	ACAACCTCCTAGGGTTACGCTTCTCTCTTCAACCTCCTCCTCCTCCTCTTCTCCATCTCT			288
Query 181	ctgcatctctctaccgcgcctctgccttctctgctctctccGTCACCTCCAAAAGATAACTGC			240
Sbjct 289	CTGCGATCTTCTACCGCGCCCTCGCCTTCTGCTCCTCCGTCACCTCTAAAGATAACTGC			348
Query 241	CTCGCTCCCGCCAAACATTCTCCCCCTAACATGTCGGCTTCCGTCTCTTCCCGCACCTTC			300
Sbjct 349	CTCGCTTCCGCCAAACATTCTCCCCCTAACATGTCGGCTTCCGTCTCTTCCCGCACCTTC			408
Query 301	CTCAACGCTCAGAGCGAACAAGACGTTTTTGTGGAATCAAGAAAGAAGTAGAAGCTGGA			360
Sbjct 409	CTCAACGCTCAGAGCGAACAAGACGTTTTTGTGGAATCAAGAAAGAAGTAGAAGCTGGA			468
Query 361	TCTCTGCCTGCTAATGTTGCTGCAGGAATGGAAGAAGGTACAATAACTATAAAAAGGCA			420
Sbjct 469	TCTCTGCCTGCTAATGTTGCTGCAGGAATGGAAGAAGGTACAATAACTATAAAAAGGCA			528
Query 421	GTTATCCAAGTGGAGATCCCAAGGCAAAATGAAATTGTACTGTCAAAATATGATTGCTTTA			480
Sbjct 529	GTTATCCAAGTGGAGATCCCAAGGCAAAATGAAATTGTACTGTCAAAATATGATTGCTTTA			588
Query 481	TTAGATCGCGTATTTTTGGATGTGACGGATCCTTTTGTTTTCAACCACACCACAAGGCA			540
Sbjct 589	TTAAATCGCGTATTTTTGGATGTGACGGATCCTTTTGTTTTCAACCACACCACAAGGCA			648
Query 541	AAGAGAGAGCCTTTTGACTACTACGTGTTTGGTCAGAATTACATCCGTCCTTTGGTTGAT			600
Sbjct 649	AAGAGAGAGCCTTTTGACTACTACGTGTTTGGTCAGAATTACATCCGTCCTTTGGTTGAT			708
Query 601	TTCAAAAATGCTTATGTTGGCAACATGCCCTTTTCATTGAAATGGAAGAGAACTCAAG			660
Sbjct 709	TTCAAAAATGCTTATGTTGGCAACATGCCCTTTTCATTGAAATGGAAGAGAACTCAAG			768

Query	661	CAGGGACACAACATCATCTTAATGTCAAATCACCAAACCTGAAGCTGATCCAGCCATCATT	720
Sbjct	769	CAGGGACACAACATCATCTTAATGTCAAATCACCAAACCTGAAGCTGATCCAGCCATCATT	828
Query	721	TCATTGCTTCTTGAAACACGACTTCCTATATTGCTGAAAACCTGACCTATGTTGCAGGA	780
Sbjct	829	TCATTGCTTCTTGAAACACGACTTCCTATATTGCTGAAAACCTGACCTATGTTGCAGGA	888
Query	781	GATAGAGTTATAACTGATCCTCTGTCCAAACCATTCAGTATTGGCAGGAATCTCATTTGT	840
Sbjct	889	GATAGAGTTATAACTGATCCTCTGTCCAAACCATTCAGTATTGGCAGGAATCTCATTTGT	948
Query	841	GTTTACTCTAAAAAGCACATGCTTGATGATCCGGCACTTGTTGAGATGAAAAGAACTGCA	900
Sbjct	949	GTTTACTCTAAAAAGCACATGCTTGATGATCCGGCACTTGTTGAGATGAAAAGAACTGCA	1008
Query	901	AACATACGAGCTCTGAAGGAAATGGCTATGCTTTTAAGGAATGGATCACAGTTAGTCTGG	960
Sbjct	1009	AACATACGAGCTCTGAAGGAAATGGCTATGCTTTTAAGGAATGGATCACAGTTAGTCTGG	1068
Query	961	ATTGCCCTAGTGGTGGTAGGGATCGCCAGATGCCAGACCAGAGAATGGGTGCCGGCA	1020
Sbjct	1069	ATTGCCCTAGTGGTGGTAGGGATCGCCAGATGCCAGACCAGAGAATGGGTGCCGGCA	1128
Query	1021	CCCTTTGATATTTCTTCGGTAGATAATATGCGAAGACTTGTTGAACATTCAGGTCCACCA	1080
Sbjct	1129	CCCTTTGATATTTCTTCGGTAGATAATATGCGAAGACTTGTTGAACATTCAGGTCCACCA	1188
Query	1081	GGTCATGTATATCCTTTGGCAATATTGTGCCATGATATCATGCCCTCCACTAAAGGTT	1140
Sbjct	1189	GGTCATGTATATCCTTTGGCAATATTGTGCCATGATATCATGCCCTCCACTAAAGGTT	1248
Query	1141	GAGAAAGAAATTGGGGAGAAAAGAATTATATGCTTTTCATGGGGCTGGCATATCAGTGGCT	1200
Sbjct	1249	GAGAAAGAAATTGGGGAGAAAAGAATTATATGCTTTTCATGGGGCTGGCATATCAGTGGCT	1308
Query	1201	CCAGCGATAAGCTTTTCTGAAACCACTGCTACTTGTGAAAATCCTGAAAAGGCTAAGGAG	1260
Sbjct	1309	CCAGCGATAAGCTTTTCTGAAACCACTGCTACTTGTGAAAATCCTGAAAAGGCTAAGGAG	1368
Query	1261	GTCTTCTCAAAAGCCCTGTACAATTCTGTGACTGAGCAATATAATGTGCTGAAATCTGCT	1320
Sbjct	1369	GTCTTCTCAAAAGCCCTGTACAATTCTGTGACTGAGCAATATAATGTGCTGAAATCTGCT	1428
Query	1321	ATACAAGGaaaaaaGGA-TTGAAGCATCAACTCC-----TAACTTTGTACAGCCATGG	1374
Sbjct	1429	ATACAAGGAAAAAAGGATTTGAAGCATCAACTCCTGTAGTTACTTTGTACAGCCATGG	1488
Query	1375	AAGTAG	1380
Sbjct	1489	AAGTAG	1494

Şekil 4.17. Elde edilen gen bölgesi (Sbjct) ve NCBI veri tabanında bulunan *PHAVU_002G136600g* (Query) geni arasındaki BLAST sonucunun görüntüsü.

Ayrıca *SacI*, *BglII* ve *BstEII* enzimleri ile pGFP_{GUS}*Plus::PvGPAT1* vektörü kesilmiştir. *SacI* enzimi hem *PvGPAT1* gen bölgesinden hem de vektörde dış bölgeden kesim yapmaktadır. Bu nedenle yaklaşık 3313 bp ve 10389 bp boyutlarında iki bant elde edilmelidir. *BglII* ve *BstEII* enzimleri ise *PvGPAT1* gen bölgesini iki ayrı uçtan kesmektedir. Bu nedenle yaklaşık 1386 bp ve 12316 bp boyutlarında iki bant elde edilmelidir. Kesim sonucunda doğru büyüklükte bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.18). Ardından doğrulanan plazmitler AGL1 suşuna elektroporasyon yöntemi ile transforme edilmiştir.

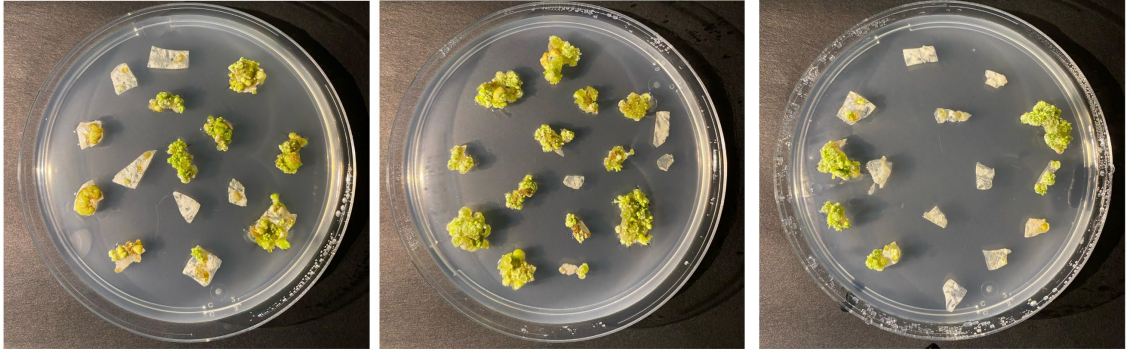


Şekil 4.18. RE enzimleri ile pGFPGUSPlus::PvGPAT1 vektörünün kesim görüntüsü (M: Marker, 1: Kesilmemiş pGFPGUSPlus::PvGPAT1 vektörü, 2: *SacI* enzimi ile kesilmiş pGFPGUSPlus::PvGPAT1 vektörü, 3: *BglII* ve *BstEII* enzimleriyle kesilmiş pGFPGUSPlus::PvGPAT1 vektörü).

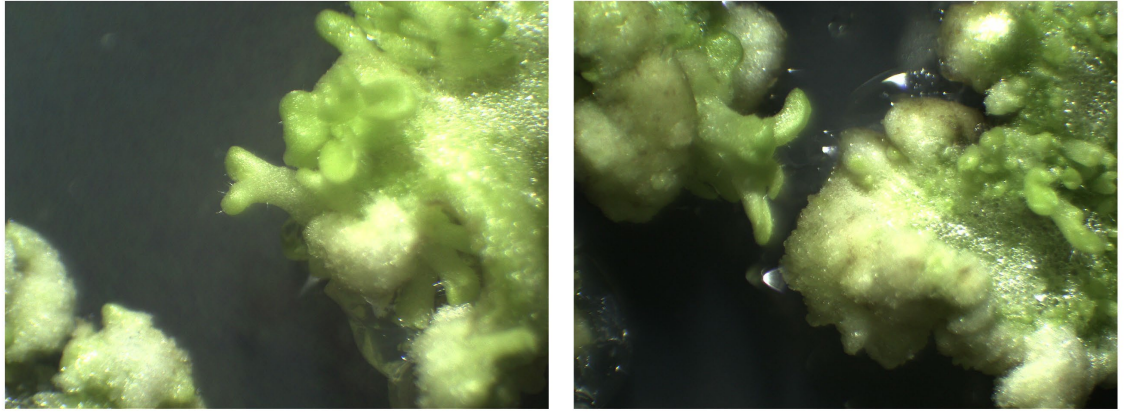
4.1.2.3. pGFPGUSPlus::PvGPAT1 aşırı ifade vektörünün tütün bitkilerine *Agrobacterium* aracılı transformasyonu

Tütün bitkilerine *Agrobacterium* aracılı gen transformasyonunda Ordon et al. (2019) tarafından geliştirilmiş metodun optimize edilmiş versiyonu kullanılmıştır. Sterilize edilen tohumlar hormon içermeyen MS ortamında çimlendirilmiştir. Tütün fideleri 3-5 yapraklı döneme gelinceye kadar steril koşullarda büyütülmüştür. Gen aktarım çalışmalarında eksplant olarak steril tütün bitkilerinin yapraklarından alınan 1cm x 1cm boyutundaki yaprak diskler kullanılmıştır. Transformasyona başlamadan önce sadece pGFPGUSPlus::PvGPAT1 aşırı ifade vektörünü taşıyan AGL1 bakterileri büyütülerek indüksiyon ortamına alınmıştır. Ardından bu bakteriler ile OD₆₀₀=0,8 olacak şekilde *Agrobacterium* solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan *Agrobacterium* solüsyonu yaprak diskler ile muamele edildikten sonra yaprak diskler ko-kültivasyon ortamında 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ko-kültivasyon ortamı, indüksiyon ortamında asetosiringon ile uyarılan *Agrobacterium*'ların yaprak disklerdeki açıklıklara tutunarak koloni oluşturduktan sonra yapısında bulunan vektörü bitki hücrelerine transfer ettiği ortamdır. Ko-kültivasyon ortamından alınan yaprak diskler *Agrobacterium*'dan uzaklaştırıldıktan sonra seleksiyon ve bitki indüksiyonu ortamı olan MSII ortamına alınmıştır. pGFPGUSPlus aşırı ifade vektöründe bitkiye aktarılan gen kaseti içerisinde

bulunan *HptII* gen bölgesi higromisin antibiyotiğine dirençlilik kazandırmaktadır. MSII ortamı, bünyesine aşırı ifade vektöründeki gen kasetini alan yaprak disklerin higromisinli besi ortamında selekte olmasını ve almayan yaprak disklerin ise ölmesini sağlayan ortamdır. MSII ortamının yapısında bulunan sitokinin ve oksinler bitki rejenerasyonunu uyarmaktadır. Yaprak diskler önce kallus oluşumuna ardından bitki rejenerasyonuna doğru ilerlemektedir. MSII ortamında kültüre alınan yaprak diskler 20 gün içerisinde kallus oluşturmuş ve bitki rejenerasyonuna başlamıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).

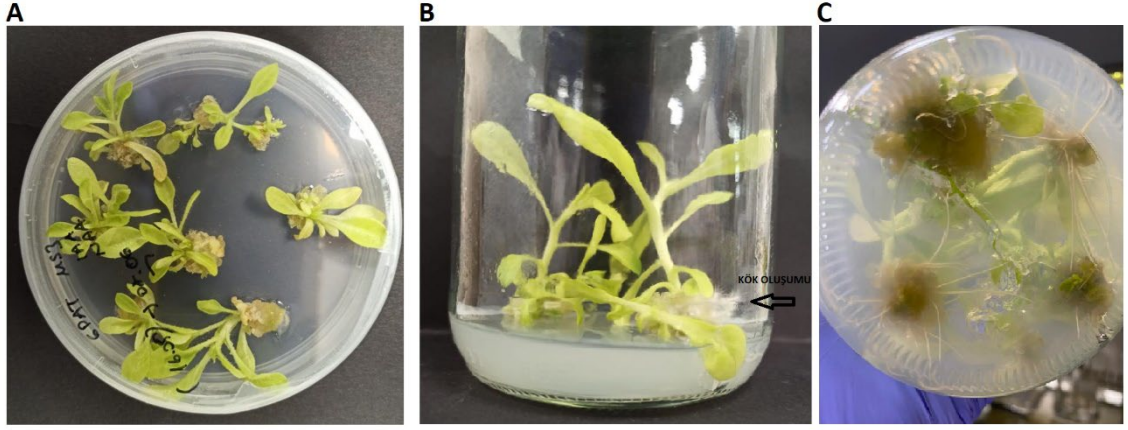


Şekil 4.19. MSII ortamına ekilen yaprak disklerin 20 gün sonraki görüntüsü



Şekil 4.20. MSII ortamında gelişen kalluslarda bitki rejenerasyonu

MSII ortamında gelişen kalluslar ve rejenere olan bitkiler iki haftada bir taze MSII ortamına alınmıştır. MSII ortamında yeterli büyüklüğe ulaşan sürgünler (Şekil 4.21a) oksin oranı fazla olan MSIII ortamında köklendirmeye alınmıştır. MSIII ortamında iyice gelişen sürgünler 2-3 hafta içerisinde köklenmeye başlamıştır (Şekil 4.21b). Rejenere olan bitkilerde 5-6 hafta içinde gerçek kökler oluşmuştur (Şekil 4.21c).



Şekil 4.21. (a) MSII ortamında gelişen sürgünlerin MSIII ortamına alındığı görüntü (b) MSIII ortamına alınan sürgünlerde ilk kök oluşum görüntüsü (c) Rejenere olan bitkilerde gelişen gerçek köklerin görüntüsü.

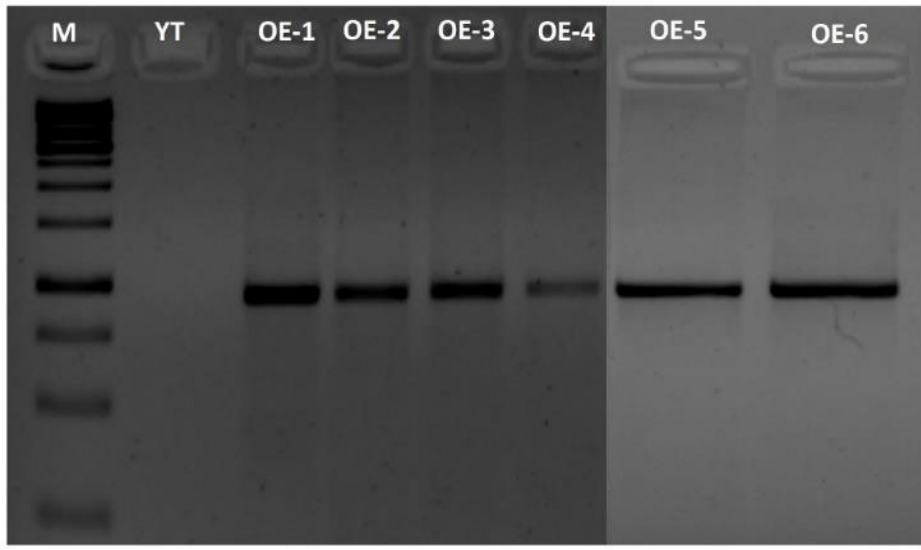
Kökleri iyice gelişen muhtemel T_0 bitkileri toprağa alıştırılmıştır. Besi yeri kalıntılarından tamamen uzaklaştırılan bitkiler önceden elenmiş ve otoklavlanmış steril toprak içeren kavanozlara aktarılmıştır. Kavanozun ağzı steril poşet ile kapatılmış ve birkaç delik açılarak hava girişine izin verilmiştir. Bir hafta sonra poşetler çıkarılarak dış ortama alıştırılmıştır (Şekil 4.22a). Tohum verene kadar bitkiler düzenli aralıkla steril su ile sulanmıştır. T_0 bitkilerinin ilk tohumları yaklaşık 30 gün sonra elde edilmiştir (Şekil 4.22b).



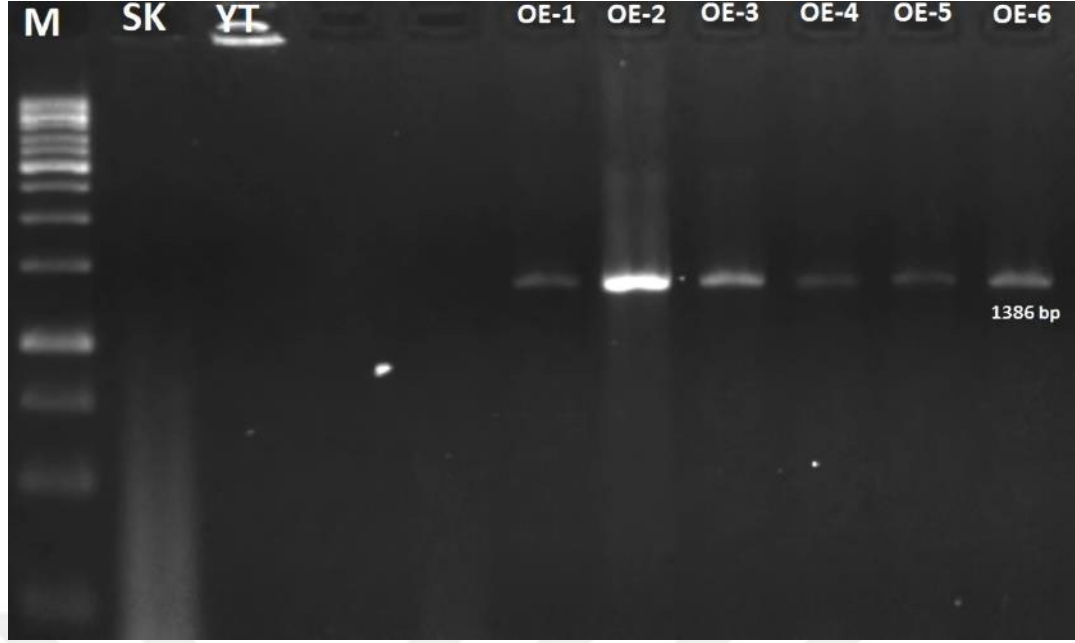
Şekil 4.22. (a) T_0 bitkilerini toprağa alıştırma düzeneği ve T_0 bitkilerinin dış ortama alıştırılması (b) T_0 bitkilerinin çiçek oluşumu ve tohum eldesi.

T_0 bitkilerinden elde edilen tohumlar T_1 tohumları olarak isimlendirilmiştir. Elde edilen T_1 tohumları higromisin içeren hormonsuz MS ortamında çimlendirilmiştir. 3 yapraklı döneme kadar büyütülen tütün fideleri toprağa alınmıştır. T_1 bitkileri 7-8

yapraklı döneme gelene kadar büyütülmüştür. Yabani tip tütün bitkilerinde mevcut olmayan ve transgenik tütün bitkilerinde olması gereken gen bölgeleri *HptII* ve *PvGPAT1* gen bölgeleridir. Bu bölgelerin varlığı test edilerek transgenik T₁ bitkileri belirlenmiştir. Higromisin içeren ortamda büyümeyi başaran 21 adet muhtemel transgenik T₁ bitkisi elde edilmiştir. Muhtemel transgenik 21 T₁ bitkisinin yapraklarından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. *HptII* ve *PvGPAT1* primerleri ile PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. 21 bitkinin 6'sında parlak ve uygun boyutta bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

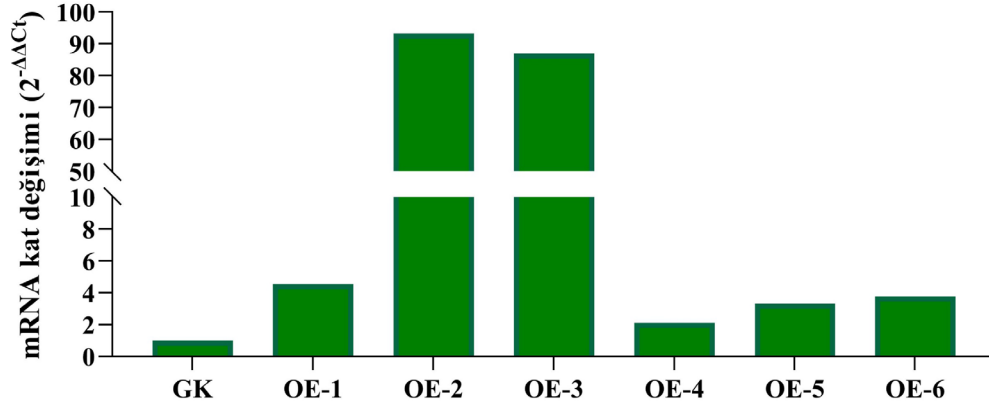


Şekil 4.23. Transgenik T₁ bitkilerinin *HptII* primerleri ile yapılan PCR sonucu (M: Marker, YT: Yabani tip tütün, OE-1, OE-2, OE-3, OE-4, OE-5 ve OE-6: Transgenik T₁ bitkileri).



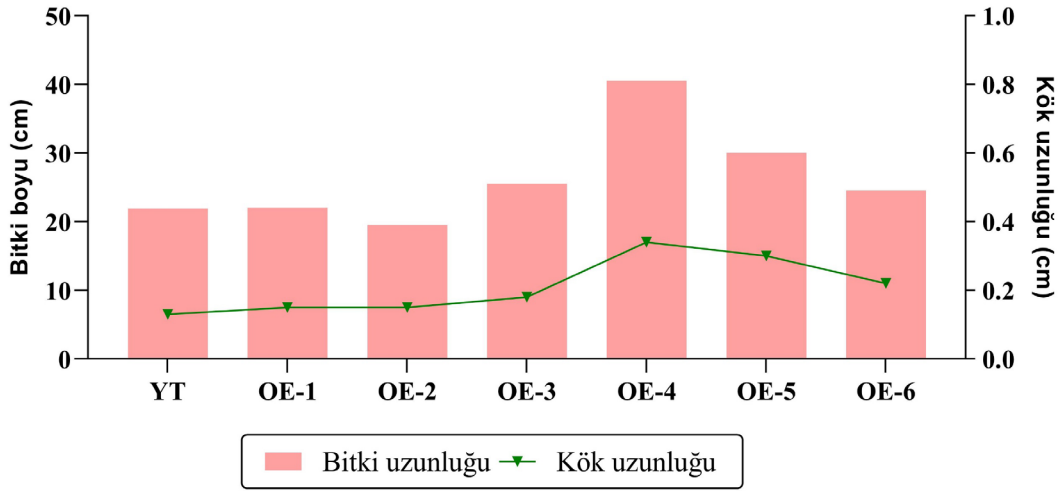
Şekil 4.24. Transgenik T₁ bitkilerinin PvGPAT primerleri ile yapılan PCR sonucu (M: Marker, SK: Su Kontrol, YT: Yabancı tip tütün, OE-1, OE-2, OE-3, OE-4, OE-5 ve OE-6: Transgenik T₁ bitkileri).

T₁ bitkilerinde *PvGPAT1* geninin kopya sayısındaki değişimi tespit etmek amacıyla qRT-PCR için uygun olan ve sadece *PvGPAT1* gen bölgesine bağlanan ileri (5'-GGTCAGAATTACATCCGTCCTT-3') ve geri primerler (5'-GTGTCCCTGCTTGAGTTTCT-3') tasarlanmıştır. qRT-PCR yöntemi ile 6 adet tütün bitkisinde *PvGPAT1* geninin ifade seviyesi belirlenmiştir. Gen kontrolü (GK) olarak *PvGPAT1* geninin izole edildiği fasulye cDNA'sı kullanılmıştır. (Şekil 4.25). Kontrole göre kıyaslandığında bu altı bitkide *PvGPAT1* geninin ifade seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Özellikle OE-2 ve OE-3 bitkilerinin ifade seviyelerindeki artış yaklaşık 90 kat olmuştur.



Şekil 4.25. T₁ bitkilerinde *PvGPAT1* geninin ifade seviyesi grafiği

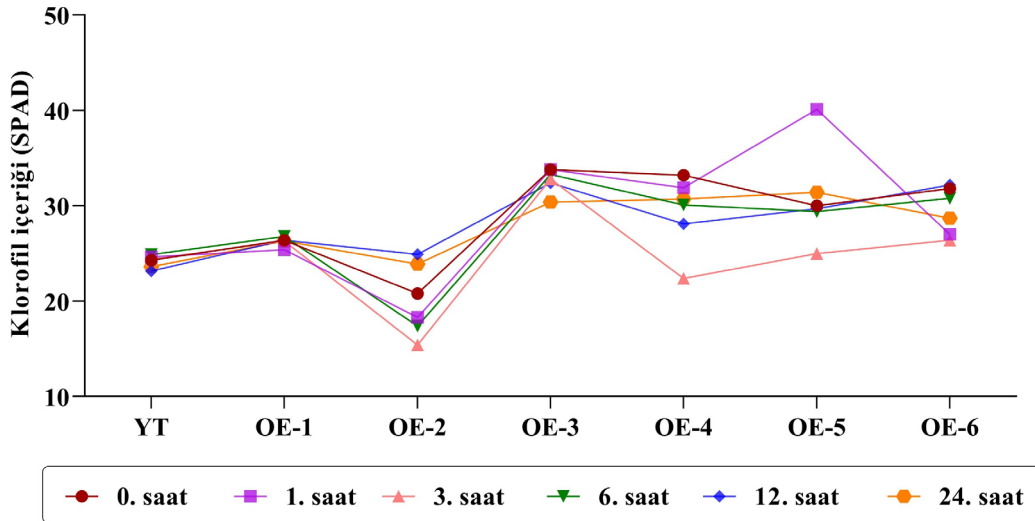
Sekiz yapraklı döneme gelen 6 adet T₁ ve yabancı tip tütün bitkilerinin bitki boyu ve kök uzunluğu ölçülmüştür (Şekil 4.26). Yabancı tip tütün ile karşılaştırıldığında OE-3, OE-4, OE-5 ve OE-6 bitkilerinin bitki boyu ve kök uzunluğu daha fazla olduğu bulunmuştur. Sadece OE-2 bitkisinde kontrole göre bitki boyu azalmıştır. Yapılan transgenik çalışmalar bitkiyi morfolojik açıdan olumsuz etkilememiş olup aksine bitki boyuna ve kök uzunluğuna pozitif yönde etki sağlamıştır.



Şekil 4.26. Yabancı tütün ve T₁ bitkilerinin sekiz yapraklı dönemindeki bitki ve kök uzunluğu.

4.1.2.4. T₁ ve yabani tip bitkilere kuraklık stres uygulaması ve stres toleransının belirlenmesi

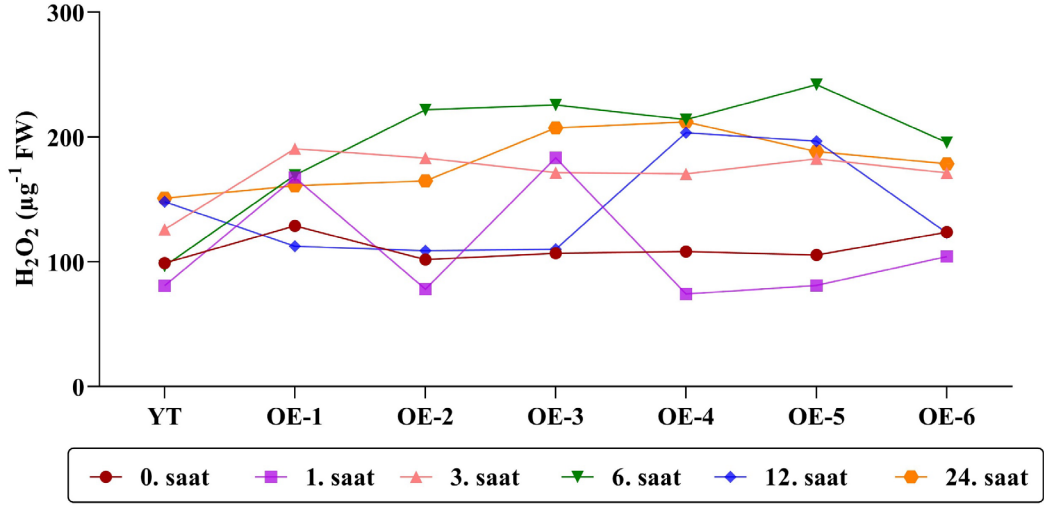
Aynı büyüklüğe ve sekiz yaprağa sahip T₁ ve yabani tütün bitkileri öncelikle hidrofonik ortama alınmıştır. Hidrofonik ortama alışan bitkiler PEG6000 (%10) kullanılarak kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Kuraklık stresinin farklı zamanlardaki etkilerini incelemek için 0., 1., 3., 6., 12. ve 24. saatlerde bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Bu yaprak örneklerinde nispi klorofil miktarı, klorofil floresans değerleri, MDA ve H₂O₂ ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca kuraklık öncesi ve sonrası membran hasarını belirlemek için 0. ve 24. saatlerde bağıl elektrik iletkenliği ölçümü yapılmıştır.



Şekil 4.27. Kuraklık stresini uygulanan yabani tütün ve T₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki klorofil içeriği.

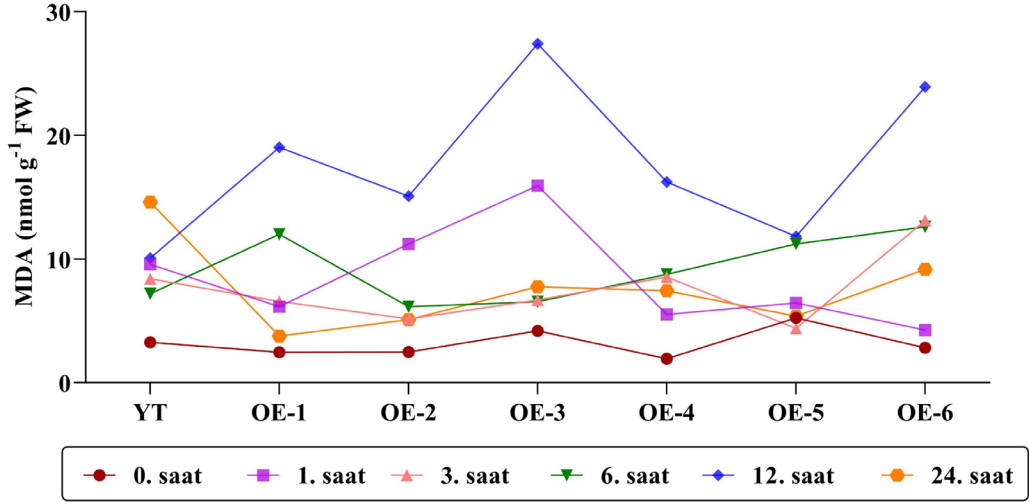
Altı T₁ ve yabani tip tütün bitkilerinin klorofil içeriği SPAD cihazı ile iki dalga boyundaki (650 nm ve 940 nm) optik yoğunluk farkından yararlanılarak kuraklık stresinin altı farklı zamanında ölçülmüştür (Şekil 4.27). Kuraklık stresinin farklı zaman noktalarında yabani tip tütün bitkisinin nispi klorofil içeriği hemen hemen aynıdır. Yabani tip tütün bitkisi ile karşılaştırıldığında OE-1, OE-3, OE-4, OE-5 ve OE-6 bitkilerinde *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi klorofil içeriğinde artış meydana getirmiştir. Kuraklık stresinin 3. saatinde OE4, OE-5 ve OE-6 bitkilerinin klorofil içeriği stresin etkisiyle azalmıştır. OE-5 bitkisinin klorofil içeriği kuraklık stresinin 1. saatinde artış göstermiştir. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi klorofil içeriğinde artış meydana getirirken uygulanan

kuraklık stresi klorofil içeriğinde azalma meydana getirmiştir. OE-1, OE-3 ve OE-6 bitkileri kuraklık stresinin tüm saatlerinde klorofil içeriğini nispeten korumuştur. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi kuraklık stresinde klorofil içeriğinin azalmasına engel olmamıştır. Fakat transgenik bitkilerde başlangıç klorofil miktarının artışının stres ile azalan klorofil miktarının dengelenmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir.



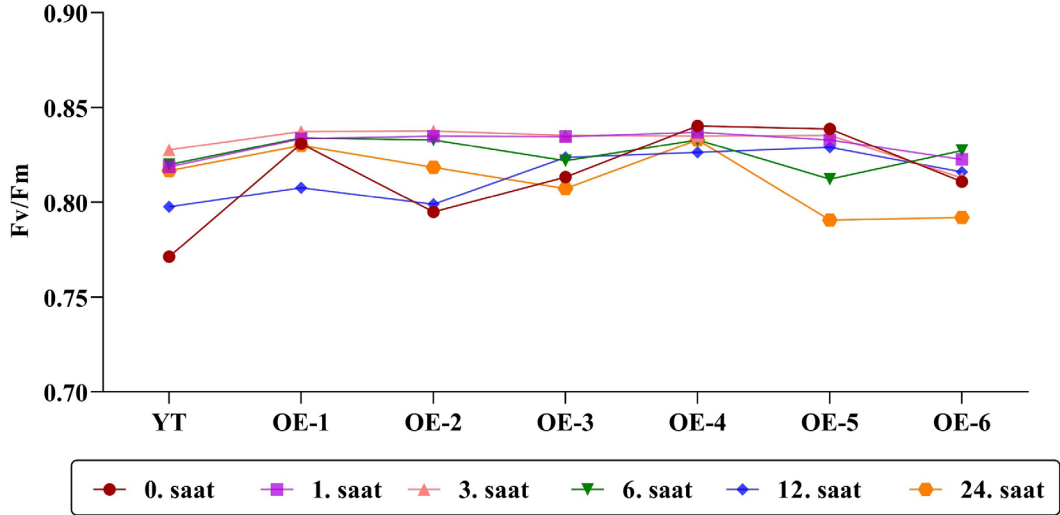
Şekil 4.28. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki H₂O₂ miktarı.

H₂O₂ ölçümünde kuraklığın 0. saatinde H₂O₂ içeriği tüm bitkilerde hemen hemen aynıdır. 1. saatte ise yabani tütün, OE-2, OE-4, OE-5 ve OE-6 ve bitkilerinde H₂O₂ içeriği azalmıştır. 3. ve 6. saatte H₂O₂ içeriği tüm bitkilerde artmıştır. Fakat yabani tütün bitkisinin 6. saatte düşüş meydana gelmiştir. Kuraklık stresinin 12. saatte T₁ bitkilerinin H₂O₂ birikimi bir önceki saate göre azalırken yabani tütünde artış göstermiştir. Kuraklık stresinin iyice arttığı 24. saatte ise tüm bitkilerin H₂O₂ içeriği bir önceki saate göre artış göstermiştir. H₂O₂ içeriği bakımından özellikle OE-1 ve OE-6 bitkileri artan kuraklık süresine bağlı strese karşı yanıtı daha iyi yönetmiştir (Şekil 4.28).



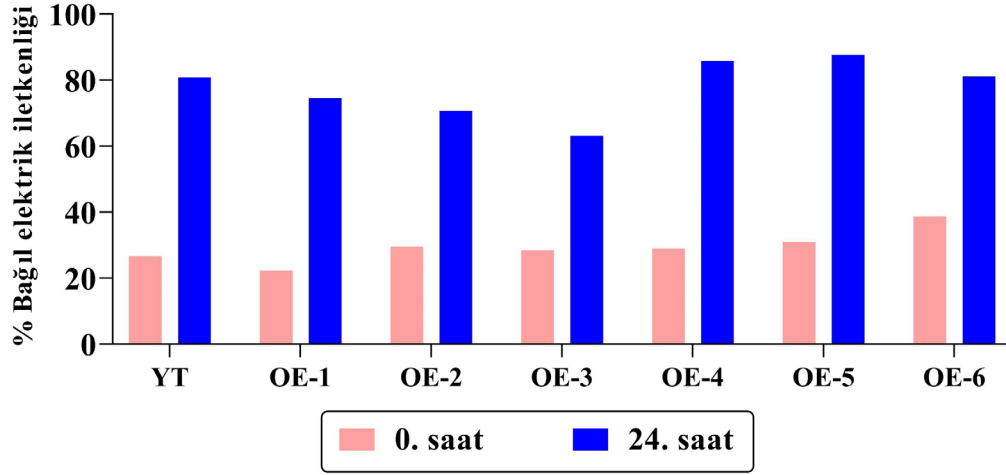
Şekil 4.29. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki MDA miktarı.

Kuraklık stresinin 0. saatinde OE-3, OE-5 ve OE-6 bitkilerinin MDA içeriği diğer bitkilere oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi yabani tütün ile karşılaştırıldığında OE-3, OE-5 ve OE-6 bitkilerinin MDA içeriğinin artmasına neden olurken diğer bitkilerin MDA içeriğinde azalma meydana getirmiştir. Kuraklığın 1. saatinde tüm bitkilerin MDA içeriği artmıştır. Kuraklığın 3. saatinde ise yabani tütün bitkisi ile karşılaştırıldığında OE-6 hariç diğer bitkilerinin MDA içeriği daha az olduğu belirlenmiştir. Bitkilerin çoğunun MDA içeriği bir önceki saate göre 6. saatte artış göstermiştir. Kuraklığın 12. saatinde tüm bitkilerin MDA içeriği artmış olup yabani tütüne kıyasla bu artış oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. 24. saatte ise tüm örneklerin MDA içeriği azalmış olup OE-1 ve OE-5 bitkilerinde başlangıç seviyesine kadar düşmüştür. MDA içeriği bakımından özellikle OE-5 bitkisi kuraklık stresi yanıtını en iyi yönetmiştir (Şekil 4.29). *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi kuraklık stresinde MDA içeriğini üzerinde etkili olmuştur.



Şekil 4.30. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T₁ bitkilerinin altı farklı zaman noktasındaki PSII verimliliği.

Fotosistem II'nin (PSII; F_v/F_m) maksimum fotokimyasal etkinliği yani fotoinhibisyonu belirlemek için klorofil floresan analizi yapılmıştır (Şekil 4.30). Karanlığa uyum sağlamış örneklerde tüm PSII reaksiyon merkezlerinin açık olduğu durumdaki minimum klorofil floresan verimi (F_o), karanlığa uyum sağlamış örnekte tüm PSII reaksiyon merkezlerinin kapalı olduğu durumdaki maksimum klorofil floresan verimi (F_m), fotokimyasal olayların dışındaki süreçlerdeki değişken floresans (F_v) ölçümleri yapılmıştır. Maksimum fotokimyasal verimlilik $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ olarak hesaplanmıştır. Yabani tütün bitkisi ile kıyaslandığında T₁ bitkilerinin F_v/F_m oranı artmıştır. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi transgenik bitkilerin genelinde PSII'nin fotokimyasal etkinliğini artırmıştır. Kuraklık stresi ilk 6 saate fotosistem mekanizmaları uyarak PSII'nin verimliliği artırmıştır. Fakat artan kuraklık süresi PSII'nin verimliliğini nerdeyse tüm bitkilerde PSII'nin verimliliğini düşürmüştür. Özellikle stresin son saatinde OE-5 ve OE-6 bitkilerinde ani bir düşüş meydana gelmiştir. OE-1, OE-2, OE-3 ve OE-4 bitkileri kuraklık stresi boyunca PSII'nin verimliliğini dengede tutmaya çalışmıştır. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesinin kuraklık stresinin erken döneminde fotoinhibisyonu azaltmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.31. Kuraklık stresi uygulanan yabani tütün ve T₁ bitkilerinin 0. ve 24. saatlerindeki membran hasarı.

Kuraklık stresinin oluşturduğu membran hasarını belirlemek için bağıl elektrik iletkenliği analizi yapılmıştır (Şekil 4.31). Kuraklık öncesinde OE-1 hariç diğer T₁ bitkilerinin % Bağıl elektrik iletkenliği (%EC) değeri yabani tütün bitkisine kıyasla daha fazladır. Kuraklık stresi sonrasında tüm bitkilerin %EC değeri artmıştır. Yabani tütün ile karşılaştırıldığında OE-5 en fazla OE-3 en az %EC değerine sahiptir. OE-4 ve OE-5 hariç diğer transgenik bitkiler yabani tütüne göre daha az membran hasarına sahip olduğu bulunmuştur. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi transgenik bitkilerin çoğunda kuraklık stresinde oluşan membran hasarını azaltmaya yardımcı olmuştur.

4.2. Tartışma

Kapsamlı biyoinformatik araçları sayesinde, bitkilerdeki farklı gen ailelerinin tanımlanması ve karakterizasyonu yapılabilmektedir. Bu çalışmada, GPAT genlerinin *P. vulgaris*'teki rollerini anlamak için gen yapılarını, evrimsel ilişkilerini, seleksiyon baskısını ve farklı abiyotik streslere yanıt olarak ifade profillerini analiz ettik. Bu araştırma, GPAT genleri üzerine gelecekte yapılacak araştırmalar için detaylı bir bilgi tabanı oluşturacaktır. Çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik yollarda önemli rol oynayan *GPAT* genleri (PlsC domaini içeren), çeltik (26) (Safder et al. 2021) ve mısır (15) (Xu et al. 2019; Zhu et al. 2019) dahil olmak üzere birçok bitkide karakterize edilmiştir. Bu çalışmada, PlsC domaini içeren 13 *PvGPAT* geni karakterize edilmiştir. PlsC domainine ek olarak, *PvGPAT* genleri GPAT_N ve HAD domainleri ve LPLAT süper ailesini içerir. *B. napus*'ta yapılan araştırmalar, *BnGPAT19*, *20*, *21* ve *22* genlerinin ilave hidrolaz ve açıltransferaz domainlerini içerdiğini ortaya koymuştur (Wang et al. 2020). Bu durum, *GPAT* genlerinin açıltransferaz aktivitesine ek olarak başka aktivitelere de sahip olduğunu gösterebilir. *PvGPAT1* geninde olduğu gibi, *Arabidopsis*'in *AtATSI* geninde, *G. max*'ın *GmGPAT1* geninde ve mısırın *ZmGPAT12* geninde ek bir GPAT_N domaini bulunur (Waschburger et al. 2018; Zhu et al. 2019). Aynı gen ailesinin üyeleri benzer amino asit dizilerine ve benzer motiflere sahiptir ve sonuç olarak benzer görevleri yerine getirirler (Bailey et al. 2006).

Fasulye ve diğer bitkilerle oluşturulan filogenetik ağaç üç gruba ayrılmıştır. *GPAT* genleri hücrede farklı lokasyonlarda bulunmasına rağmen, çoğunlukla kloroplast, endoplazmik retikulum ve mitokondride yer almaktadır. Benzer lokasyonlarda bulunan genler filogenetik ağaçta aynı dallanma modelini göstermiştir. Mısırdaki GPAT proteinlerinin filogenetik analizleri, GPAT'ların üç gruba ayrıldığını göstermiştir: I, II ve III (Zhu et al. 2019). Benzer şekilde, Cui et al. (2019) pamuk çeşitlerinin *GPAT* genlerini filogenetik olarak incelemiş ve bu *GPAT* genlerinin üç grupta toplandığını keşfetmiştir. Waschburger et al. (2018) çeşitli bitkilerdeki *GPAT* genlerini çalışmıştır ve bu genlerin *Arabidopsis* *GPAT* genleri ile olan bağlantısını ve benzerliğini göstermiştir. Ayrıca bu genlerin hangi hücre altı bileşende lokalize olduğunu da belirlemişlerdir. Bu çalışmada olduğu gibi aynı hücrel lokalizasyona ve benzer intron-ekzon dağılımına sahip GPAT proteinleri, filogenetik ağaçta benzer dallanma modeli göstermiştir. *PvGPAT2* ve

PvGPAT3, *AtGPAT9* ile yüksek bir homolojiye sahip olup endoplazmik retikulumda yer alırken, *PvGPAT1*, *AtATSI* ile yüksek bir homoloji göstermektedir ve kloroplastta yer almaktadır. Filogenetik ağaç incelendiğinde, kloroplastta bulunan genler *ATSI* benzeri grupta toplanmıştır. Yapılan çalışmalarda çözünebilir *GPAT* genleri bir grupta toplanmış ve bu gruptaki tüm *GPAT* genleri kloroplastta yer almıştır (Waschburger et al. 2018; Cui et al. 2019; Zhu et al. 2019). Ortolog ve paralog genlerin intron-ekzon mimarileri bitki türleri arasında korunmuştur, bu da onları türler arasındaki mesafeyi tahmin etmek için değerli bir araç haline getirmiştir (Wang et al. 2020).

GPAT genlerinin evrimsel sürecini daha iyi anlamak için duplike gen çiftleri taranmıştır. Duplike gen çiftleri, evrimleri boyunca işlev kazanımı, işlev kaybı ve yeni işlevselleşmeye maruz kalmaktadır (Lynch and Conery 2000). Eşanlamlı olmayan ikame oranı (K_a), eşanlamlı ikame oranı (K_s) ve K_a/K_s oranları, evrimin yönünü ve kodlama dizisindeki seçim gücünü analiz etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Li et al. 2009). Bu algoritmalar, farklı sekans özelliklerini dikkate alan çeşitli varsayımlara dayanan çeşitli ikame veya mutasyon modelleri kullanır (Muse 1996). Bu da evrimsel mesafe hakkında çeşitli tahminler yapılmasını sağlar. $K_a/K_s > 1$ pozitif seleksiyon ile hızlanan evrimi; $K_a/K_s = 1$ nötr seleksiyonu; $K_a/K_s < 1$ ise arındırıcı (negatif) seleksiyon ile işlevsel sınırlamayı göstermektedir (İlhan 2018; Kasapoğlu et al. 2020; Kızılkaya et al. 2020). Fasulyedeki duplike gen çiftleri, evrimsel süreç boyunca arındırıcı seleksiyona maruz kaldığı bulunmuştur. Dört farklı pamuk türüne ait *GPAT* genleri üzerinde yapılan araştırma, bazı duplike *GPAT* genlerinin K_a/K_s oranının birden az olduğunu ve diğer duplike genlerin K_a/K_s oranının birden büyük olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, *GPAT* genlerinin evrimsel süreç boyunca pozitif ve negatif seleksiyon baskısına maruz kaldığını göstermektedir (Cui et al. 2019).

Fasulye GPAT proteinleri hizalandığında, açıltransferaz aktivitesi için önemli olan 4 korunmuş motif tespit edilmiştir (EK2). Aynı durum daha önceki bir çalışmada *A. thaliana* GPAT'larında da gözlenmiştir. *A. thaliana* GPAT'larının genom çapında yapılan bir analizine göre, GPAT'lar açıltransferaz aktivitesi için gerekli dört korunmuş amino asit motifi (Blok I-IV) içerir (Lewin et al. 1999). Motif 3, Blok I ve Blok II'yi içerirken, Motif 1 Blok III ve Blok IV'ü içerir. Blok I (VCNHRTLLDP), Blok II (VRLTR), Blok III (VCPEGT) ve Blok IV (IVPVA) açıltransferaz aktivitesi için kritik olan dört

korunmuş amino asit dizisidir (Mañas-Fernández et al. 2010). Blok I'deki histidin (H) ve aspartik asit (D) kalıntıları, Blok III'teki glisin (G) kalıntıları ve Blok IV'teki prolin (P) kalıntıları dahil olmak üzere çok sayıda amino asit kalıntısının katalizde rolü olduğu bulunmuştur. Gliserol-3-fosfat substratına bağlanmada önemli olan korunmuş bölgeler Blok III'te glutamat ve serin ile Blok II'de fenilalanin ve argininden oluşmaktadır (Gonzales-Baro et al. 2007). *PvGPAT* genleri de bu bölgeleri içermektedir. Bu da tüm organizmalarda GPAT genlerindeki dört bloğun (I-II-III-IV) dizilimlerinin evrimsel süreç boyunca korunduğunu göstermektedir. *GPAT* genlerinin intron-ekzon modelleri incelendiğinde diğer türlere benzer bir organizasyon gösterdikleri belirlenmiştir. Örneğin Waschburger et al. (2018) *GPAT* genlerinin intron-ekzon analizinde *AtATSI* ve *AtGPAT9*'a oldukça benzediğini ve fasulyede tespit ettiğimiz gibi 12 ekzon ve 11 introndan oluştuğunu bulmuşlardır. Buna göre, *GPAT* genlerinin intron-ekzon organizasyonu farklı türler arasında korunmuştur.

Fasulye *GPAT* genlerinin promotör bölgesinde kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik streslerle ilişkili cis-elementlerin varlığı, *GPAT* genlerinin stres metabolizmasında da rol oynadığını göstermektedir. Promotör bölgelerdeki farklı cis-etkili elementlerin dağılımı, genlerin düzenlenmesi ve işlevindeki farklılıkların bir nedenidir (Hernandez-Garcia and Finer 2014). Promotör bölgeler, yapısındaki özel cis düzenleyiciler ile abiyotik ve biyotik strese yanıt olarak bazı genlerin transkripsiyonunu inhibe ederek veya artırarak gen ekspresyonunun düzenlemesini sağlamaktadır. Kuraklığa duyarlı element (DRE), kuraklık ve tuzlulukla bağlantılı MYB elementi ve yüksek tuz, dehidrasyon ve düşük sıcaklıklara duyarlı ABRE elementi dahil olmak üzere çok sayıda cis-etkili element keşfedilmiştir (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005). Xu et al. (2019) tarafından mısır *GPAT* genlerinde yapılan promotör bölge analizi sonucunda, stres ve savunma ile ilişkili olabilecek LTR, TC-zengin ve MBS gibi birçok cis-etkili element tespit edilmiştir. Cui et al. (2019), pamuk *GPAT* genlerinin promotör bölge analizi nedeniyle strese duyarlı birçok cis-etkili element tespit etmiştir. Bu çalışma ve önceki çalışmalar göz önüne alındığında, *GPAT* genlerinin sadece bitki büyümesinde değil, aynı zamanda stres adaptasyonunda da rol oynadığı sonucuna varılabilir.

Amino asit dizilimi protein yapısını belirlerken, proteinin üç boyutlu yapısı da biyokimyasal işlevselliğini belirler. Benzer amino asit dizilimine sahip proteinler

genellikle benzer biyokimyasal işlevlere sahiptir (Alberts et al. 2002). GPAT proteinleri yapısal olarak birbirlerine çok benzemekle birlikte, farklı etkileşim alanlarına da sahiptirler. Benzer biyokimyasal aktivitelere sahip olmalarının yanı sıra ek aktiviteleri de vardır. Protein-protein etkileşimleri (PPI), hücreler arası etkileşimler ve metabolik ve gelişimsel düzenlemeler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri yönetir (Braun and Gingras 2012). Bazı kalıntı yan zincirler arasındaki kovalent olmayan temaslar protein katlanmasının, protein agregasyonunun ve PPI'nin temelini oluşturur (Ofra and Rost 2003). PvGPAT proteinleri çoğunlukla gliserol degradasyonu, diaçilgliserol/triaçil gliserol biyosentezi ve fosfatidilkolin açıl düzenleme yollarındaki proteinlerle etkileşime girmiştir. Gliserol kinaz, gliserolü Gliserol-3-fosfata fosforile ederek doğrudan gliserol yıkımına dahil olan ilk enzimdir ve daha sonra trigliserit sentez yoluna girebilir (Ditlecadet et al. 2011; Chen et al. 2023). Triaçilgliserolün de novo üretimindeki ilk adım GPAT tarafından katalize edilir (Cao et al. 2006). Bu temaslar, proteinler arasında çeşitli etkileşimlere ve ilişkilere neden olur. Örneğin, *Arabidopsis*'te AtGPAT9 proteini, gliserolipid metabolizmasında yer alan AtLPAAT2 ve AtLPCAT2 proteinleriyle homomerik ve heteromerik etkileşime girer ve gliserolipid biyosentezine birlikte katılır (Shockey et al. 2016). Ayrıca, strese maruz kalan bitkiler membranlarının yapısını değiştirir. Bu değişim sonucunda fosfatidik asit gibi lipitler oluşur ve stres sinyali olarak rol oynar (Lavell and Benning 2019). Bu çalışmadan elde edilen veriler ile gelecekteki fonksiyonel çalışmalar için gliserolipid biyosentezinde en fazla etkiye sahip genler hakkında bilgiler sunulmuştur.

PvGPAT genlerinin çoğu fasulyenin çiçek dokusunda daha fazla ifade edilmiştir. *AtGPAT* genleri gibi *PvGPAT* genleri de farklı dokularda benzer ifade modelleri sergilemiştir. Önceki çalışmalar *AtGPAT1*'in polen verimliliği için gerekli olduğunu (Zheng et al. 2003), *AtGPAT4*, *AtGPAT5* ve *AtGPAT8*'in ise kütin veya suberin sentezi için gerekli olduğunu göstermiştir (Beisson et al. 2007). Ayrıca, *AtGPAT9*, büyüyen yapraklarda polar lipitlerin ve TAG'ın üretiminin yanı sıra gelişmekte olan polen tanelerinde lipit damlacıklarının oluşturulmasında rol oynar (Singer et al. 2016). *AtGPAT6*'nın ifadesi çanak yapraklarda, taç yapraklarda ve stamenlerde diğer dokulara göre daha yüksek olup çiçek oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Cui et al. 2019). *GPAT* genleri bitki çiçek gelişimi ve stres tepkisi ile ilişkilidir (Shen et al. 2023).

PvGPAT genleri tuz ve kuraklık stresleri altında farklı ifade profilleri göstermiştir. *PvGPAT* genleri genellikle tuz stresinde yukarı doğru düzenlenerek bir stres tepkisi oluşturmuştur. Etkili bir tuz stresi tepkisinin temeli, birçok genin ifadesinin yeniden programlanmasıdır. Bazı genlerin ifade düzeyleri artarken diğerlerinin ifade düzeyleri azalır (Mareri et al. 2022). Kuraklık stresinde, *PvGPAT* genlerinin çoğu aşağı regüle edilmiştir. Kuraklık stresine yanıt olarak, birçok genin ve gen ailesinin yanı sıra çeşitli hormonların ifade seviyeleri yukarı/aşağı düzenlenir (Mareri et al. 2022). Mısırdaki tuz, soğuk ve UV stresi altında (Xu et al. 2019) ve pamukta soğuk ve tuz stresi altında (Cui et al. 2019) *GPAT* genlerinin in silico ifade analizi farklı ifade modelleri göstermiştir. Bu çalışmalarda, *GPAT* genleri genellikle strese yanıt olarak yukarı doğru düzenlenmiştir. Çevresel streslere yanıt olarak, lipid biyosentezindeki genler yukarı regüle edilmiş, böylece hücre zarlarında lipid birikimi artmıştır. Böylece bitkiler çeşitli stres faktörlerine karşı direnç kazanmaktadır (Nam et al. 2022). Melatonin ve stres bir arada olduğunda, çoğu *PvGPAT* geninin ifade seviyesinde artış gözlenmiştir ve melatoninin stres üzerinde iyileştirici bir etkisi olduğu söylenebilir. Melatonin, tuz stresi tarafından baskılanan genlerin ifadesini artırmakta ve stresin gen ifadesi üzerindeki baskılayıcı etkilerini hafifletmektedir. Melatoninin soya fasulyesine uygulanan kuraklık ve tuz stresine karşı iyileştirici olduğunu daha önceki bir çalışmada kanıtlamıştır (Wei et al. 2015).

Bu çalışmada uygulanan işlemler sonucunda iki fasulye çeşidindeki ifade düzeyleri bazı genlerde aynı değişimleri gösterirken bazı genlerde farklı değişimler göstermiştir. Bu durum, kuraklık, tuz ve melatonin uygulamalarının aynı türün farklı bireyleri arasında gen ifadesi düzeyinde farklı tepkiler yarattığını göstermektedir. Bitkilerdeki genetik çeşitlilik, farklı çevresel koşullara adaptasyonu sağlar ve böylece bazı mahsul çeşitleri hayatta kalır. Bununla birlikte, genetik çeşitlilikten yoksun türler farklı streslere karşı hassas hale gelebilir. Genetik çeşitlilik, aynı türün bireyleri arasında kalite özellikleri ve çeşitli streslere karşı tolerans gibi farklılıkların varlığıdır. Bu farklılığın nedenlerinden biri bazı genlerin ifade düzeyinden kaynaklanmaktadır (Salgotra et al. 2023). *GPAT* gen ailesi hem bitki gelişiminde hem de stres metabolizmasında etkili olan bir gen ailesidir.

Arabidopsis kloroplastik *GPAT* geninin (*ATSI*) fonksiyonel karakterizasyonu, PG ve C16 yağ asidi içeriğinde azalma sergileyen ancak fenotiplerde belirgin bir değişiklik

olmayan atsls mutant hatlarının tanımlanmasına dayanmaktadır (Xu et al. 2006). Kloroplast *GPAT* genleri aynı zamanda birçok başka bitki türünde de tanımlanmış ve kabak, ıspanak, domates, tatlı biber ve *S. salsa* dahil olmak üzere birçoğunda işlevsel olarak karakterize edilmiştir (Sun et al. 2011; Ivanov et al. 2012). Bu genlerden birkaçının soğuk ve yüksek tuzluluk tarafından indüklendiği ancak ısı, kuraklık, tuz ve absisik asit uygulamalarıyla bastırıldığı gösterilmiştir (Li et al. 2018). *Arabidopsis AtGPAT*'ın tütünde aşırı ekspresyonu, PG yani doymamış yağ asidi içeriğini artırarak tütünün abiyotik strese karşı direnci artırmıştır (Murata et al. 1992). Kloroplastik *GPAT* genleri, *Arabidopsis* (Nishida et al. 1993), *Vicia faba* (Liu et al. 1999), bezelye (Weber et al. 1991) gibi çeşitli bitkilerden klonlanarak fonksiyonel olarak çalışılmıştır. Kloroplastik *GPAT* geninin bitkilerin kuraklığa stresi altında aşırı üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif strese karşı toleransı etkileyip etkilemediği hakkında çok az sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda da fasulye kloroplastik *GPAT* geninin tütün bitkisinde aşırı ifadesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen transgenik bitkiler kuraklık stresine maruz bırakıldıktan sonra yabani tütün ve transgenik bitkiler arasında kuraklık stresinin oluşturduğu etkiler araştırılmıştır.

Kuraklık stresi hem serbest hem de serbest olmayan radikalleri içeren reaktif oksijen türlerinin üretiminin artması şeklinde moleküler düzeyde kendini gösterir. Bunlar hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi molekülleri içerir. Abiyotik stresler fotosentetik aktivitelerde azalmaya ve ROS birikimine yol açar (Shakya 2024). Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artması ve serbest radikallere karşı antioksidan savunma mekanizmalarının azalması nedeniyle redoks durumunda bir bozukluk olduğunda ortaya çıkar. H_2O_2 orta derecede reaktif ve toksik olmakla birlikte nispeten daha kararlı ve daha saldırgan bir ROS'tur. Aşırı H_2O_2 birikimi bitki hücrelerinde enzimlerin inaktivasyonu, lipid perkoksidayonu (LPO) ve hücre ölümü gibi hasarlara neden olabilir (Gill and Tuteja 2010; Shakya 2024). *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi kuraklık stresinin 12. saatinde oluşan H_2O_2 birikimini bir önceki saate göre oldukça düşürmüştür. Kloroplast lipidlerinin doymamışlığının artması kloroplasttaki antioksidan enzimlerin faaliyetlerini artırmaya yardımcı olabilir ve böylece transgenik bitkilerdeki aşırı H_2O_2 birikimini temizleme kapasitesi gelişebilir (Xue et al. 2019). Domates *LeGPAT* geninin aşırı ifadesinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini

artıran ve düşük sıcaklık stresi altında O_2^- ve H_2O_2 içeriğini azaltan önemli kanıtlar sunulmuştur (Sui et al. 2007; Sun et al. 2011).

Lipid peroksidasyonu, kloroplasttaki tilakoid membranlardaki doymamış yağ asitlerinde meydana geldiği bilinen en zararlı süreç olarak kabul edilir (Gill and Tuteja 2010). Kuraklık stresi sonucunda meydana gelen bitki zarlarındaki lipid peroksidasyonu sonucunda MDA oluşur (Liu et al. 2021; Li et al 2024). MDA ve 4-hidroksi-2 nonenal gibi LPO ürünleri makromoleküllerle reaksiyona girerek bitki hücrelerinde membran akışkanlığını azaltma, membran sızıntısını artırma ve membran proteinlerini inaktive etme gibi sorunlara neden olabilir (Gill and Tuteja 2010). Tütünde *PvGPAT1*'in aşırı ifadesi yabancı tütüne kıyasla transgenik bitkilerde kuraklık stresi sonucunda oluşan MDA birikiminin azalmasına yardımcı olmuştur. Buna göre *PvGPAT1*'in aşırı ifadesi ile arttığı düşünülen doymamış yağ asitleri, membran akışkanlığını ve bütünlüğünü ve dolayısıyla kloroplasttaki antioksidan enzimlerin aktivitelerini iyileştirmeye yardımcı olmuş olabilir. Bunun sonucunda kloroplast membranlarında LPO engellenmiş olabilir. Kuraklık stresinde MDA içeriğine paralel olarak bağlı elektriksel iletkenlik (EC) içeriğinde artış klorofil içeriğinde ise azalma meydana gelmektedir (Xie et al. 2021). Bağlı elektrik iletkenliği esas olarak hücrel membranların hasarını yansıtmak için kullanılır. Bu çalışmada *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesinin çoğu transgenik bitkinin kuraklık stresinde oluşan membran hasarını azaltmaya yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada kloroplastik *GPAT* geninin aşırı ifadesinin yabancı tip bitkiye kıyasla transgenik bitkilerde düşük sıcaklık stresi sonucunda oluşan MDA ve H_2O_2 birikimini azalttığı ve EC oranını düşürdüğü rapor edilmiştir (Xue et al. 2019). Bitkilerin soğuk ve kuraklık stresine bireysel olarak tepki kalıpları benzerdir (Rizhsky et al. 2003; Hussain et al. 2018).

Membranların hidrofobik olan ve lipitten oluşan iç kısmı birçok iyon ve büyük moleküllerin geçişini sınırlayabilmektedir (Upchurch 2008). PG, PSII'de oksijenik elektron taşıma bölgesidir ve aynı zamanda tilakoid membranların yapısında bulunan tek fosfolipittir (Wada and Murata 1998). Bu nedenle, PG yağ asidi türlerindeki değişiklikler, tilakoid membran bütünlüğünü, PSII'nin fotosentetik mekanizmasının fonksiyonunu ve kloroplastik antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkileyebilir. PSII verimliğindeki düşüş bitkide fotoinhibisyona dolayısıyla fotosentez reaksiyonlarının engellenmesine neden

olur (Huang et al. 2017). Kabak ve domateste yapılan çalışmalarda artan PG içeriğinin, soğğun neden olduğu PSII'nin fotoinhibisyonunun geri kazanılmasında önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Sun et al. 2011). Bizim çalışmamızda da *PvGPAT1*'in aşırı ifadesi ile arttığı düşünölen PG sayesinde transgenik bitkilerin PSII verimliliği artmıştır. Kuraklık stresi sonrasında azalan PSII verimliliği transgenik bitkilerin çoğunda pozitif yönde iyileşme sergilemiştir. En belirgin iyileşme OE-1, OE-2, OE-3 ve OE-4'te görölmüştür. Domateste *LeGPAT*'ın aşırı ifadesi sonucunda artan PG içeriği tüm transgenik bitkilerde soğuk ve tuz stresinin düşördüğü PSII verimliliğini yabani tipe göre artırmıştır (Sun et al. 2010). Ayrıca *S. salsa* bitkisinde PG içeriğinin artmasının PSII'nin tuz stresine karşı toleransı arttırdığı rapor edilmiştir (Sui et al. 2017). *AtGPAT*'ın çeltikte aşırı ekspresyonu, PG'yi artırarak fotosentetik oranları ve düşük sıcaklıklarda büyümeyi geliştirmiştir (Ariizumi et al. 2002). Tütönde gerçekleştirilen in vivo ve transgenik çalışmalar bitki boyu ve kök uzunluğunda olumsuz bir etki oluşturmamıştır. *PvGPAT1* geninin aşırı ifadesi transgenik bitkilerin çoğunun bitki boyu ve kök uzunluğu parametrelerini olumlu yönde etkilemiştir.

Bitkilerde stres, fotosentetik organların geçici olarak fotoinhibisyonuna veya olumsuzluk nedeniyle tahribata yol açarak klorofil floresans parametrelerinde bir azalmaya neden olabilir (Morant-Manceau et al. 2004; Aazami et al. 2021). Kuraklık stresi kloroplastın üst yapısında bir bozulmaya neden olur, PSII'nin kloroplast membranlarında elektron transferini engeller. Ayrıca kloroplast pigment sentaz aktivitesini azaltır, bu da klorofil sentezi için yetersiz hammadde tedariğine neden olur. Bu nedenle bitki metabolizmasını yavaşlatır ve yapraklarındaki klorofil içeriğini azaltır (Prasch and Sonnewald 2013; Li et al. 2024). *PvGPAT1*'in ifadesindeki artış OE-2 hariç tüm transgenik bitkilerin klorofil miktarındaki artışa yol açmıştır. Kuraklık stresi sonucunda PSII'de gerçekleşen sorunlar klorofil miktarındaki azalmaları da beraberinde getirmiştir. *PvGPAT1*'in aşırı ifadesi stresin etkilerini tamamen ortadan kaldıramaz ama stresin yıkıcı etkilerini hafifletmeye yardımcı olabilir.

PvGPAT1 geninin aşırı ifadesi transgenik bitkilerin kuraklık stresinin oluşturduğu olumsuz etkilerle savaşmasına yardımcı olmuştur. Fakat *PvGPAT1* geni OE-2 bitkisinde en fazla ifade seviyesine sahip olup klorofil içeriği, bitki boyu ve PSII verimliliği parametrelerinde negatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu negatif etkinin muhtemel

nedeni bitkilerin kuraklık stresine maruz kaldıklarında, su emilimini artırmak ve su kaybını azaltmak için morfolojik yapılarını ve fizyolojik süreçlerini değiştirmesi olabilir (Gong et al. 2020). Bitkilerdeki bu morfolojik ve fizyolojik düzenlemeler, birden fazla genin ifadesinden ve baskılanmasından kaynaklanabilmektedir (Zhu et al. 2022).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda fasulye genomundaki *GPAT* genlerinin karakterizasyonu çeşitli biyoinformatik araçlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fasulye genomunda 13 *GPAT* geni keşfedilmiş bu genler fasulyenin altı kromozomuna dağılmıştır. İki çeşit fasulye çeşidinde *PvGPAT* genlerinin tuz, kuraklık ve melatonin uygulamalarına tepkisi qRT-PCR tekniği ile ifade düzeyinde incelenmiştir. qRT-PCR sonuçlarına göre, stres ve melatonin uygulamaları her iki çeşitte de *PvGPAT5* ve *PvGPAT9* genlerinin ifade düzeyinde önemli bir artışa neden olmuştur. Diğer genlerin ifade düzeyleri her iki çeşitte de farklılık göstermiştir. Çeşitler aynı türün farklı bireyleri olmalarına rağmen, çevresel uyaranlara verdikleri tepkilerdeki farklılıkları ortaya çıkaran bazı genetik farklılıklara sahiptirler. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, *GPAT* genlerinin gliserolipid biyosentezinin yanı sıra strese yanıtta da rol oynadığını göstermektedir. Diğer taraftan tütün bitkisinde kloroplastik *PvGPAT1* geninin kuraklık stresi altındaki fonksiyonu tespit edilmeye çalışmıştır. Buna göre yapılan analizler sonucunda transgenik bitkilerde *PvGPAT1* geninin kuraklık stresine karşı toleransı geliştirebileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında *PvGPAT1* geninin kuraklık stresine yanıtındaki rolü hakkında literatürde bulunan boşluğu dolduracağı beklenilmektedir. Ayrıca ilerleyen jenerasyonlarda kuraklık stresine verilen yanıtın sürdürülebilirliği ve tarla koşulları altında bu genin fonksiyonunun araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aazami, M. A., Asghari-Aruq, M., Hassanpouraghdam, M. B., Ercisli, S., Baron, M. and Sochor, J. 2021. Low temperature stress mediates the antioxidants pool and chlorophyll fluorescence in *Vitis vinifera* L. cultivars. *Plants*, 10(9), 1877.
- Abdelhakim, L. O. A., Palma, C. F. F., Zhou, R., Wollenweber, B., Ottosen, C. O. and Rosenqvist, E. 2021. The effect of individual and combined drought and heat stress under elevated CO₂ on physiological responses in spring wheat genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 301-314.
- Adak, M. S., Güler, M. ve Kayan, N. 2010. Yemeliklik baklagillerin üretimini artırma olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak, Bildiriler Kitabı, Is: 329-341Ankara.
- Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K. H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M. and Zhou, W. 2020. Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2590.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. Analyzing protein structure and function. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
- Alemu, K. 2015. The role and application of bioinformatics in plant disease management. *Advances in Life Science and Technology*, 28, 28-33.
- Anonymous, 2023a. Web Sitesi: <https://ourworldindata.org/>, Erişim Tarihi: 29.12.2023.
- Anonymous, 2023b. Web Sitesi: <https://www.biorender.com/>, Erişim Tarihi: 30.12.2023.
- Anonymous, 2023c. Web Sitesi: <https://www.addgene.org/>, Erişim Tarihi: 30.12.2023.
- Anonymous, 2023d. Web Sitesi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, Erişim Tarihi: 01.02.2024.
- Anonymous, 2023e. Web Sitesi: <https://eu.idtdna.com/pages/>, Erişim Tarihi: 30.12.2023.
- Ariizumi, T., Kishitani, S., Inatsugi, R., Nishida, I., Murata, N. and Toriyama, K. 2002. An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidyl-glycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant Cell Physiology*, 43, 751–758.
- Arnao, M. B. and Hernández-Ruiz, J. 2020. Is phyto-melatonin a new plant hormone?. *Agronomy*, 10(1), 95.

- Arnao, M. B. and Hernández-Ruiz, J. 2021. Melatonin as a plant biostimulant in crops and during post-harvest: a new approach is needed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(13), 5297-5304.
- Arnao, M. B., Cano, A. and Hernández-Ruiz, J. 2022. Phytomelatonin: an unexpected molecule with amazing performances in plants. *Journal of Experimental Botany*, 73(17), 5779-5800.
- Arumuganathan, K. and Earle, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208-218.
- Aygören, A. S., Güneş, E., Muslu, S., Kasapoğlu, A. G., Yiğider, E., Aydın, M. 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.
- Bai, Q., Li, M., Zhou, J., Imran, A., de Souza, T. S., Barrow, C. and Suleria, H. A. 2023. Influence of processing methods on phytochemical composition of different varieties of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Reviews International*, 1-39.
- Bailey, T. L., Williams, N., Mischel, C. and Li, W. W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 34, W369-W373.
- Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmaeili, N. and Zhang, H. 2023. Plants' response mechanisms to salinity stress. *Plants*, 12, 2253.
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R. and Waterhouse, P. M. 2018. The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 405-426.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M. and Ohlrogge, J. B. 2007. The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 351-368.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y. and Pollard, M. 2012. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 329-337.
- Blum, A. 2018. *Plant breeding for stress environments*. CRC Press.
- Braun, P. and Gingras, A. C. 2012. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics*, 12(10), 1478-1498.
- Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M., Yang, W. and Jefferson, R. A. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433(7026), 629-633.
- Bukhari, S. A. H., Peerzada, A. M., Javed, M. H., Dawood, M., Hussain, N. and Ahmad, S. 2019. Growth and Development Dynamics in Agronomic Crops under

Environmental Stress. In *Agronomic Crops*. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 83–114.

- Büyük, İ., Inal, B., İlhan, E., Tanriseven, M., Aras, S. and Erayman, M. 2016. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean. *Molecular Biology Reports*, 43(11), 1251-1266.
- Cao, J., Li, J. L., Li, D. M., Tobin, J. F. and Gimeno, R. E. 2006. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 19695–19700.
- Castañeda, 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).
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Chaudhary, M. T., Majeed, S., Rana, I. A., Ali, Z., Jia, Y., Du, X. and Azhar, M. T. 2024. Impact of salinity stress on cotton and opportunities for improvement through conventional and biotechnological approaches. *BMC Plant Biology*, 24(1), 20.
- 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, G., Zhou, Y., Kishchenko, O., Stepanenko, A., Jatayev, S., Zhang, D. and Borisjuk, N. 2021. Gene editing to facilitate hybrid crop production. *Biotechnology Advances*, 46, 107676.
- Chen, X., Chen, G., Truksa, M., Snyder, C. L., Shah, S. and Weselake, R. J. 2014. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 is essential for the normal development of reproductive organs and the embryo in *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4201–4215.
- Chen, X., Truksa, M., Snyder, C. L., El-Mezawy, A., Shah, S. and Weselake, R. J. 2011. Three homologous genes encoding sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 exhibit different expression patterns and functional divergence in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 155(2), 851-865.
- Chen, Y., Wu, X., Lai, J., Yan, B. and Gong, Q. 2023. Molecular mechanisms of physiological change under acute total dissolved gas supersaturation stress in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(43), 97911-97924.
- Chi, X., Yang, Q., Pan, L., Chen, N., Wang, T., Wang, M. and Yu, S. 2015. Isolation and expression analysis of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes from peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Grasas y Aceites*, 66(3), e093-e093.

- Choung, M. G., Choi, B. R., An, Y. N., Chu, Y. H. and Cho, Y. S. 2003. Anthocyanin Profile of Korean Cultivated Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7040.
- Clemente, T. 2006. *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Agrobacterium protocols*, 143-154.
- Coşkun, Ö. F. 2023. The Effect of Grafting on Morphological, Physiological and Molecular Changes Induced by Drought Stress in Cucumber. *Sustainability*, 15(1), 875.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. and Brenner, S. E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188-1190.
- Cui, Y., Ma, J., Liu, G., Wang, N., Pei, W., Wu, M. and Yu, J. 2019. Genome-wide identification, sequence variation, and expression of the glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene family in *Gossypium*. *Frontiers in Genetics*, 10, 116.
- Dai, A. 2011. Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2, 45-65.
- 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.
- Dev, S. M. 2012. Small Farmers in India: Challenges and Opportunities. WP-2012-014, Indira Gandhi Institute of Development Research, Mumbai.
- Dhiman, P., Rajora, N., Bhardwaj, S., Sudhakaran, S. S., Kumar, A., Raturi, G. and Deshmukh, R. 2021. Fascinating role of silicon to combat salinity stress in plants: An updated overview. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 110-123.
- Ditlecadet, D., Short, C. E. and Driedzic, W. R. 2011. Glycerol loss to water exceeds glycerol catabolism via glycerol kinase in freeze-resistant rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300, 674–684.
- Dunnett, C. W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50(272), 1096-1121.
- El Sabagh, A. E., Hossain, A., Islam, M. S., Barutcular, C., Hussain, S., Hasanuzzaman, M. and Saneoka, H. 2019. Drought and salinity stresses in barley: consequences and mitigation strategies. *Australian Journal of Crop Science*, 13(6), 810-820.
- Ergo, V. V., Lascano, R. vega, C. R., Parola, R. and Carrera, C. S. 2018. Heat and water stressed field-grown soybean: A multivariate study on the relationship between physiological-biochemical traits and yield. *Environmental and Experimental Botany*, 148, 1-11.

- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A. and Huang, J. 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science*, 1147.
- FAO. 2023. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Web sitesi: <https://www.fao.org/food-agriculture-statistics/en/>. Erişim tarihi: 20 Eki. 2023.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N. S. M. A., Fujita, D. B. S. M. A. and Basra, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*, 153.
- Fawke, S., Torode, T. A., Gogleva, A., Fich, E. A., Sørensen, I., Yunusov, T., Rose, J. K. and Schornack, S. 2019. Glycerol phosphate acyltransferase 6 controls filamentous pathogen interactions and cell wall properties of the tomato and *Nicotiana benthamiana* leaf epidermis. *New Phytologist*, 223, 1547–1559.
- Ganesan, K. and Xu, B. 2017. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2331.
- Gelvin, S. B. 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the ‘gene jockeying’ tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37.
- Gelvin, S. B. 2017. Integration of Agrobacterium T-DNA into the plant genome. *Annual review of genetics*, 51, 195-217.
- Gidra, S. K., Shockey, J. M., Rothstein, S. J., Dyer, J. M. and Mullen, R. T. 2009. *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 867–879.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G. and Zhu, J. K. 2020. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, 63, 635-674.
- Gonzalez-Baro, M. R., Lewin, T. M. and Coleman, R. A. 2007. Regulation of triglyceride metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, G1195–G1199.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J. and Rokhsar, D. S. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1178-D1186.

- Götz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J. and Conesa, A. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, 36(10), 3420-35.
- 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, 1-20.
- 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, 174.
- Guschina, I. A., Everard, J. D., Kinney, A. J., Quant, P. A. and Harwood, J. L. 2014. Studies on the regulation of lipid biosynthesis in plants: application of control analysis to soybean. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1838(6), 1488-1500.
- Hao, S., Zhang, Y., Li, R., Qu, P. and Cheng, C. 2024. Agrobacterium-mediated in planta transformation of horticultural plants: Current status and future prospects. *Scientia Horticulturae*, 325, 112693.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A. and Bashir, S. 2014. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.): An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 580.
- Hernandez-Garcia, C. M. and Finer, J. J. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science*, 217, 109-119.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347(2nd edit).
- 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, W585-W587.
- Hosfield, G., Varner, G., Uebersax, M. and Kelly, J. 2004. Registration of 'Merlot' Small Red Bean. *Crop Science*, 44(1), 351.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., et al. 2007. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biology*, 8, R183.
- Huang, J., Xue, C., Wang, H., Wang, L., Schmidt, W., Shen, R., et al. 2017. Genes of ACYL CARRIER PROTEIN family show different expression profiles and overexpression of ACYL CARRIER PROTEIN 5 modulates fatty acid

- composition and enhances salt stress tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 987.
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S. and Wang, L. 2018. Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 9, 393.
- Ismail, A. M. and Horie, T. 2017. Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 405–434.
- Ivanov, A. G., Allakhverdiev, S. I., Huner, N. P. A. and Murata, N. 2012. Genetic decrease in fatty acid unsaturation of phosphatidylglycerol increased photoinhibition of photosystem I at low temperature in tobacco leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(8), 1374–1379.
- İlhan, E. 2018. *Eucalyptus grandis* YABBY Transcription Factors: Genome-Wide Analysis. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 5(2), 158-166.
- Jatoi, S. A., Latif, M. M., Arif, M., Ahson, M. U. H. A. M. M. A. D. and Siddiqui, S. U. 2014. Comparative assessment of wheat landraces against polyethylene glycol simulated drought stress. *Science Technology and Development*, 33(1), 1-6.
- Jayaram, B. and Dhingra, P. 2010. *Bioinformatics for a better tomorrow*. Indian Institute of Technology, HauzKhas, New Delhi - 110016, India.
- Kadıoğlu, M., Ünal, Y., İlhan, A. and Yürük, C. 2017. Türkiye'de iklim değişikliği ve tarımda sürdürülebilirlik. Türkiye Gıda ve İçecek Sanayi Dernekleri Federasyonu. Web sitesi: <http://www.hidropolitikakademi.org/>, Erişim tarihi: 23 Ekim 2017.
- Kallam, K., Moreno-Giménez, E., Mateos-Fernández, R., Tansley, C., Gianoglio, S., Orzaez, D. and Patron, N. 2023. Tunable control of insect pheromone biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal*.
- Kappachery, S., AlHosani, M., Khan, T. A., AlKharoossi, S. N., AlMansoori, N., AlShehhi, S. A. S. and Gururani, M. A. 2024. Modulation of antioxidant defense and PSII components by exogenously applied acetate mitigates salinity stress in *Avena sativa*. *Scientific Reports*, 14(1), 620.
- Kasapoğlu, A. G., İlhan, E., Kizilkaya, D., Hossein-Pour, A. and Haliloğlu, K. 2020. Genome-wide analysis of BES1 transcription factor family in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] genome. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(1), 85-95.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Sternberg, M. J. E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.

- Kelly, L. J., Leitch, A. R., Clarkson, J. J., Knapp, S. and Chase, M. W. 2013. Reconstructing the complex evolutionary origin of wild allopolyploid tobaccos (*Nicotiana section suaveolentes*). *Evolution*, 67, 80–94.
- Kizilkaya, D., Kasapoğlu, A. G., Hosseinpour, A., Haliloğlu, K., Muslu, S. and İlhan, E. 2020. Genome-wide analysis of *Sorghum bicolor* L. CAMTA transcription factors. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi/Atatürk University Journal of Agricultural Faculty*, 51(3), 267-278.
- Kong, J., Martin-Ortigosa, S., Finer, J., Orchard, N., Gunadi, A., Batts, L. A. and Pacheco-Villalobos, D. 2020. Overexpression of the transcription factor GROWTH-REGULATING FACTOR5 improves transformation of dicot and monocot species. *Frontiers in Plant Science*, 11, 572319.
- Korgaonkar, S. and Bhandari, R. 2023. Drought Stress in Plants: Effects and Tolerance. *Journal of Stress Physiology ve Biochemistry*, 19(1), 5-17.
- Kornberg, A. and Pricer, W. E. 1987. Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 1953, 3293-430.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kushwaha, U. K. S., Deo, I., Jaiswal, J. P. and Prasad, B. 2017. Role of bioinformatics in crop improvement. *Global Journal of Science Frontier Research D: Agriculture and Veterinary*, 17(1), 13-23.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R. and Huala, E. 2011. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1202–D1210.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin, 506p.
- Lavell, A. A. and Benning, C. 2019. Cellular organization and regulation of plant glycerolipid metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 60(6), 1176-1183.
- Lein, W., Usadel, B., Stitt, M., Reindl, A., Ehrhardt, T., Sonnewald, U. and Bornke, F. 2008. Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnology Journal*, 6, 246–263.
- 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), 325-7.
- Leterme, P., Muñoz, L. C. 2002. Factors Influencing Pulse Consumption in Latin America. *Br. J. Nutr.*, 88(S3), 251.

- Letunic, I. and Bork, P. 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res*, 39:W475-W478.
- Lewin, T. M., Wang, P., Coleman, R. A. 1999. Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry*, 38:5764–5771.
- 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, J., Zhang, Z., Vang, S., Yu, J., Wong, G. K. S., Wang, J. 2009. Correlation between Ka/Ks and Ks is related to substitution model and evolutionary lineage. *Journal of Molecular Evolution*, 68(4), 414-423.
- Li, X. C., Zhu, J., Yang, J., Zhang, G. R., Xing, W. F., Zhang, S., Yang, Z. N. 2012. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6 (GPAT6) is important for tapetum development in Arabidopsis and plays multiple roles in plant fertility. *Mol Plant*, 5:131–142.
- Li, X. T., Liu, P., Yang, P. P., Fan, C. Z., Sun, X. M., 2018. Characterization of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene and its real-time expression under cold stress in *Paeonia lactiflora* Pall. *PLoS One* 13 (8), e0202168.
- Li, Y., Beisson, F., Koo, A. J., Molina, I., Pollard, M., Ohlrogge, J. 2007. Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:18339–18344.
- Liang, Y., Huang, Y., Liu, C., Chen, K. and Li, M. 2023. Functions and interaction of plant lipid signaling under abiotic stresses. *Plant Biology*, 25(3), 361-378.
- Lin, L. Z., Harnly, J. M., Pastor-Corrales, M. S. and Luthria, D. L. 2008. The Polyphenolic Profiles of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 107(1), 399.
- Lin, L., Wu, J., Jiang, M. and Wang, Y. 2021. Plant mitogen-activated protein kinase cascades in environmental stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1543. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, H., Zhao, J., Chen, F., Wu, Z., Tan, J., Nguyen, N. H. and Weng, Y. 2023. Improving *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Genetic Transformation for Gene Function Studies and Mutagenesis in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genes*, 14(3), 601.
- Liu, J. M., Chen, S. N., Yan, B., Huang, X. Q. and Yang, M. Z. 1999. Cloning and sequencing of the cDNA (Accession No. AF090734) coding for glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Vicia faba*. *Plant Physiology*, 20:934.
- Liu, Y., Li, D., Qian, J., Di, B., Zhang, G. and Ren, Z. 2021. Electrical impedance spectroscopy (EIS) in plant roots research: A review. *Plant Methods*, 17, 118.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Luthria, D. L. and Pastor-Corrales, M. A. 2006. Phenolic Acids Content of Fifteen Dry Edible Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2), 205.
- Lynch, M. and Conery, J. S. 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290, 1151–1155.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A. F., Bahramnejad, B., Struik, P. C. and Sohrabi, Y. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 580-585.
- Mañas-Fernández, A., Li-Beisson, Y., Alonso, D. L. and García-Maroto, F. 2010. Cloning and molecular characterization of a glycerol 3-phosphate O-acyltransferase (GPAT) gene from *Echium* (Boraginaceae) involved in the biosynthesis of cutin polyesters. *Planta*, 232, 987–997.
- Mangal, V., Lal, M. K., Tiwari, R. K., Altaf, M. A., Sood, S., Kumar, D. and Aftab, T. 2023. Molecular insights into the role of reactive oxygen, nitrogen and sulphur species in conferring salinity stress tolerance in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(2), 554-574.
- Mareri, L., Parrotta, L. and Cai, G. 2022. Environmental Stress and Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5416.
- Mehrotra, S. and Goyal, V. 2012. Agrobacterium-mediated gene transfer in plants and biosafety considerations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1953-1975.
- Men, X., Shi, J., Liang, W., Zhang, Q., Lian, G., Quan, S., Zhu, L., Luo, Z., Chen, M., Zhang, D. 2017. Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (OsGPAT3) is required for anther development and male fertility in rice. *Journal of Experimental Botany*, 68: 513–526.
- Mendhulkar, V. D. and Nisha, K. 2015. Physiological and biochemical effects of polyethylene glycol (Peg) induced drought stress conditions in four varieties of Indian Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *International Journal of Pharma and BioSciences*. 6(4): (B) 971 – 980.
- Mishra, A. K. and Singh, V. P. 2011. Drought modeling—A review. *Journal of Hydrology*, 403, 157-175.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. and Bateman, A. 2021. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412-D419.

- Molina-Hidalgo, F. J., Vazquez-Vilar, M., D'Andrea, L., Demurtas, O. C., Fraser, P., Giuliano, G., Bock, R. et al. 2021. Engineering metabolism in *Nicotiana* species: a promising future. *Trends in Biotechnology*, 39, 901–913.
- Morant-Manceau, A., Pradier, E. and Tremblin, G. 2004. Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 161(1), 25–33.
- Moustafa-Farag, M., Elkelish, A., Dafea, M., Khan, M., Arnao, M. B., Abdelhamid, M. T. and Ai, S. 2020. Role of melatonin in plant tolerance to soil stressors: salinity, pH and heavy metals. *Molecules*, 25(22), 5359.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y., Nishida, I. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*, 356: 710–712.
- Muse, S. V. 1996. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 105–114.
- Nakamura, Y. 2017. Plant phospholipid diversity: emerging functions in metabolism and protein–lipid interactions. *Trends in Plant Science*, 22: 1027–1040.
- Nam, J. W., Lee, H. G., Do, H., Kim, H. U., ve Seo, P. J. 2022. Transcriptional regulation of triacylglycerol accumulation in plants under environmental stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 73(9), 2905–2917.
- Nishida, I., Tasaka, Y., Shiraishi, H., Murata, N. 1993. The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 21: 267–277.
- Nyau, V. 2014. Nutraceuical Perspectives and Utilization of Common Beans (*Phaseolus Vulgaris* L.): A Review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 14(7), 9483.
- Ofran, Y. and Rost, B. 2003. Analysing six types of protein-protein interfaces. *Journal of Molecular Biology*, 325(2): 377–387.
- Okazaki, Y. and Saito, K. 2014. Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *Plant Journal*, 79: 584–596.
- Okla, M. K., Saleem, M. H., Saleh, I. A., Zomot, N., Perveen, S., Parveen, A. 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.
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Samuel, C., Fatai, A., Magaji, U., Kareem, I., Kamarudin, Z. S., Muhammad, I. I., Kolapo, K. 2019. Drought resistance in rice from

- conventional to molecular breeding: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3519.
- Ordon, J., Espenhahn, H., Kretschmer, C. and Stuttmann, J. 2019. Stable transformation of *Nicotiana benthamiana*. *Protocols.io*, 10.
- Papa, R., Acosta, J., Delgado-Salinas, A., Gepts, P. 2005. A Genome-Wide Analysis of Differentiation Between Wild and Domesticated *Phaseolus Vulgaris* from Mesoamerica. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(6), 1147.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P. and Prasad, S. M. 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4056–4075.
- Payá-Milans, M., Aznar-Moreno, J. A., Balbuena, T. S., Haslam, R. P., Gidda, S. K., Pérez-Hormaeche, J. and negas-Calerón, M. 2016. Sunflower HaGPAT9-1 is the predominant GPAT during seed development. *Plant Science*, 252, 42-52.
- Petit, J., Bres, C., Mauxion, J. P., Tai, F. W. J., Martin, L. B., Fich, E. A. and Rothan, C. 2016. The glycerol-3-phosphate acyltransferase GPAT6 from tomato plays a central role in fruit cutin biosynthesis. *Plant Physiology*, 171(2), 894-913.
- 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*, 1624, 1849–1866.
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y. et al. 2009. PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *Plant Cell*, 21, 3718-3731.
- Qi, M., Zheng, X., Niu, G., Ye, A., Rather, S. A., Ahmed, N. and Zhang, L. 2023. Supplementation of acetylcholine mediates physiological and biochemical changes in tobacco lead to alleviation of damaging effects of drought stress on growth and photosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), 4616-4628.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33, W116-W120.
- Read, J. J., Reddy, K. R., Jenkins, J. N. 2006. Yield and fiber quality of upland cotton as influenced by nitrogen and potassium nutrition. *European Journal of Agronomy*, 24, 282–290.
- Ribeiro, T. P.; Basso, M. F.; de Carvalho, M. H.; de Macedo, L. L. P.; da Silva, D. M. L.; Lourenço-Tessutti, I. T.; de Oliveira-Neto, O. B.; de Campos-Pinto, E. R.; Lucena, W. A.; da Silva, M. C. M.; et al. 2019. Stability and tissue-specific Cry10Aa overexpression improves cotton resistance to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research and Innovation*, 3, 27–41.

- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. 2003. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*, 1303, 1143–1151.
- Rohamare, Y., Dhumal, K. N. and Nikam, T. D. 2014. Response of Ajowan to water stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000 during seed germination and seedling growth. *Journal of Environmental Biology*, 35(5), 789.
- Roughan, P. G., and Slack, C. R. 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 97–132.
- Rouphael, Y.; Cardarelli, M.; Schwarz, D.; Franken, P.; Colla, G. 2012. Effects of Drought on Nutrient Uptake and Assimilation in Vegetable Crops. In *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*; Aroca, R., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 171–195.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O., Baulcombe, D. C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10, 937–946.
- Rustgi, S. and Luo, H. 2020. Biolistic DNA delivery in plants: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*, 2124.
- Safder, I., Shao, G., Sheng, Z., Hu, P. and Tang, S. 2021. Identification and analysis of the structure, expression and nucleotide polymorphism of the GPAT gene family in rice. *Plant Gene*, 26, 100290.
- Salgotra, R. K. and Chauhan, B. S. 2023. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14(1), 174.
- Schmutz, J., McClean, P., Mamidi, S., et al. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46, 707–713.
- 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, 194–199.
- Sevik, H. and Cetin, M. 2015. Effects of water stress on seed germination for select landscape plants. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24, 689–693.
- Shabala, S. 2000. Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. *Plant, Cell ve Environment*, 23, 825–837.
- Shakya, R. 2024. Markers of oxidative Stress in plants. In *Ecophysiology of Tropical Plants* (pp. 298–310). CRC Press.
- Shams, M. K. 2019. Tuz Stresinin Biberde Bitki Gelişimi, Fizyolojik Ve Biokimyasal Özellikler, DNA Metilasyonu İle Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Sharma, P., Thakur, N., Mann, N. A. and Umar, A. 2024. Melatonin as plant growth regulator in sustainable agriculture. *Scientia Horticulturae*, 323, 112421.

- Shen, Y., Shen, Y., Liu, Y., Bai, Y., Liang, M., Zhang, X. and Chen, Z. 2023. Characterization and functional analysis of AhGPAT9 gene involved in lipid synthesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14, 1144306.
- Sheng, J. and Citovsky, V. 1996. Agrobacterium–plant cell interaction: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell*, 8, 1699–1710.
- Shimelis, E. A. and Rakshit, S. K. 2005. Proximate Composition and Physico-Chemical Properties of Improved Dry Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Varieties Grown in Ethiopia. *LWT - Food Science and Technology*, 38(4), 331.
- Shockey, J., Regmi, A., Cotton, K., Adhikari, N., Browse, J. and Bates, P. D. 2016. Identification of Arabidopsis GPAT9 (At5g60620) as an essential gene involved in triacylglycerol biosynthesis. *Plant Physiology*, 170, 163–179.
- Shulaeva, V., Cortesa, D., Miller, G. and Mittler, R. 2008. Metabolomics for plant stress response. *Physiologia Plantarum*, 132, 199–208.
- Singer, S. D., Chen, G., Mietkiewska, E., Tomasi, P., Jayawardhane, K., Dyer, J. M., et al. 2016. Arabidopsis GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids. *Journal of Experimental Botany*, 67, 4627–4638.
- Singh, A. and Sengar, R.S. 2014. Salinity stress in rice: An overview. *Plant Archives*, 14, 643–648.
- Singh, V. K., Singh, A. K., Chand, R. and Kushwaha, C. 2011. Role of bioinformatics in agriculture and sustainable development. *International Journal of Bioinformatics Research*, 3(2), 221–226.
- Smith, H. O., Danner, D. B., Deich, R. A. 1981. Genetic Transformation. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 41–68.
- Sui, N., Li, M., Li, K., Song, J. and Wang, B. S. 2010. Increase in unsaturated fatty acids in membrane lipids of *Suaeda salsa* L. enhances protection of photosystem II under high salinity. *Photosynthetica*, 48, 623–629.
- Sui, N., Li, M., Liu, X. Y., Wang, N., Fang, W. and Meng, Q. W. 2007. Response of xanthophyll cycle and chloroplastic antioxidant enzymes to chilling stress in tomato over-expressing glycerol-3-phosphate acyltransferase gene. *Photosynthetica*, 45, 447–454.
- Sui, N., Tian, S., Wang, W., Wang, M. and Fan, H. 2017. Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Suaeda salsa* improves salt tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1337.

- Sun, X. L., Yang, S., Wang, L. Y., Zhang, Q. Y., Zhao, S. J. and Meng, Q. W. 2011. The unsaturation of phosphatidylglycerol in thylakoid membrane alleviates PSII photoinhibition under chilling stress. *Plant Cell Reports*, 30 (10), 1939–1947.
- Sun, Y. L., Li, F., Sui, N., Sun, X. L., Zhao, S. J. and Meng, Q. W. 2010. The increase in unsaturation of fatty acids of phosphatidylglycerol in thylakoid membrane enhanced salt tolerance in tomato. *Photosynthetica*, 48, 400–408.
- SYGM (Taşkın ve Kuraklık Yönetimi Dairesi Başkanlığı). 2023. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Su Yönetimi Genel Müdürlüğü.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S. and von Mering, C. 2021. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic acids research*, 49(D1), D605-D612.
- Şehirali, S. 1988. Yemeklik Dane Baklagiller Kitabı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1989 Ders Kitabı:314, ANKARA.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and 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.
- Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W. and Harwood, W. A. 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23, 780–789.
- Turan, E. S. 2018. Türkiye'nin iklim değişikliğine bağlı kuraklık durumu.
- TÜİK. 2022. Bitkisel Üretim İstatistikleri. Web sitesi: www.tuik.gov.tr
- Tzfira, T., Hohn, B. and Gelvin, S. B. 2017. Transfer of genetic information from Agrobacterium to plants. In *Reference Module in Life Sciences*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
- Upchurch, R. G. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30, 967–977.
- Valliyodan, B., Cannon, S. B., Bayer, P. E., Shu, S., Brown, A. V., Ren, L. and Nguyen, H. T. 2019. Construction and comparison of three reference-quality genome assemblies for soybean. *The Plant Journal*, 100(5), 1066-1082.
- Védère, C., Lebrun, M., Biron, P., Planchais, S., Bordenave-Jacquemin, M., Honvault, N. and Rumpel, C. 2023. The older, the better: Ageing improves the efficiency of biochar-compost mixture to alleviate drought stress in plant and soil. *Science of The Total Environment*, 856, 158920.

- Vickers, C. E., Possell, M., Cojocariu, C. I., Velikova, V. B., Laothawornkitkul, J., Ryan, A. and Nicholas Hewitt, C. 2009. Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress. *Plant, Cell and Environment*, 32(5), 520-531.
- Vickers, C. E., Schenk, P. M., Li, D., Mullineaux, P. M. and Gresshoff, P. M. 2007. pGFP-GUS Plus, a new binary vector for gene expression studies and optimising transformation systems in plants. *Biotechnology Letters*, 29, 1793-1796.
- Wada, H. and Murata, N. 1998. Membrane lipids in cyanobacteria. In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* (pp. 65–81). Springer.
- Wada, H. and Murata, N. 2007. The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 92(2), 205–215.
- Wang, J., Singh, S. K., Geng, S., Zhang, S. and Yuan, L. 2020. Genome-wide analysis of glycerol-3-phosphate O-acyltransferase gene family and functional characterization of two cutin group GPATs in *Brassica napus*. *Planta*, 251, 1-16.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X. and Paterson, A. H. 2012. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic acids research*, 40(7), e49-e49.
- Wang, Y., You, F. M., Lazo, G. R., Luo, M. C., Thilmony, R., Gordon, S., Kianian, S. F. and Gu, Y. Q. 2013. PIECE: A database for plant gene structure comparison and evolution. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D1159-D1166.
- Waschburger, E., Kulcheski, F. R. and Veto, N. M. 2018. Genome-wide analysis of the glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) gene family reveals the evolution and diversification of plant GPATs. *Genetics and Molecular Biology*, 41, 355–370.
- Weber, S., Wolter, F. P., Buck, F., Frentzen, M. and Heinz, E. 1991. Purification and cDNA sequencing of an oleate-selective acyl- ACO:sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, 17, 1067–1076.
- Weeda, S., Zhang, N., Zhao, X. L., Ndip, G., Guo, Y. D., Buck, G. A., Fu, C. G., Ren, S. X. 2014. Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PLoS One* 9, e93462.
- Wei, W., Li, Q. T., Chu, Y. N., Reiter, R. J., Yu, X. M., Zhu, D. H., Chen, S. Y. 2015. Melatonin enhances plant growth and abiotic stress tolerance in soybean plants. *J. Exp. Bot.* 66(3), 695-707.
- Weiss, B. S., Kennedy, P. E., Kiyasu, Y. J. 1939. The enzymatic synthesis of triglycerides. *J. Biol. Chem.* 235:40-44.
- World Climate Research Program (WCRP). 2021. PMIP – Paleoclimate Modeling Intercomparison Project. URL: <https://www.wcrp-climate.org/modelling-wgcm-mip-catalogue/cmip6-endorsed-mips-article/1064-modelling-cmip6-pmip>

- World Health Organization (WHO). Climate change 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>.
- Xie, H., Bai, G., Lu, P., Li, H., Fei, M., Xiao, B. G., Chen, X. J., Tong, Z.J., Wang, Z. Y., Yang, D. H. 2021. Exogenous citric acid enhances drought tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Biol.* 24:333–343.
- Xiong, J. 2009. Essential bioinformatics: introduction and biological databases. Cambridge University press, USA. <http://www.cambridge.org/catalogue>.
- Xu, C., Yu, B., Cornish, A. J., Froehlich, J. E., Benning, C. 2006. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J.* 47:296–309
- Xu, X., Yan, B., Zhao, Y., Wang, F., Zhao, X., He, L., ... Zhao, C. 2019. Characterization and expression analysis of GPAT gene family in maize. *Can. J. Plant Sci.* 99(5), 577-588.
- Xue, M., Guo, T., Ren, M., Wang, Z., Tang, K., Zhang, W. and Wang, M. 2019. Constitutive expression of chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Ammopiptanthus mongolicus* enhances unsaturation of chloroplast lipids and tolerance to chilling, freezing and oxidative stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 143, 375-387.
- Xue, R., Wu, X., Wang, Y., Zhuang, Y., Chen, J., Wu, J. and Blair, M. W. 2017. Hairy root transgene expression analysis of a secretory peroxidase (PvPOX1) from common bean infected by *Fusarium* wilt. *Plant Sci.* 260, 1-7.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10:88-94.
- Yan, R., Gao, S., Yang, W., Cao M., Wang, S., Chen, F. 2008. Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. *Plant, Soil Environ.* 54: 294–300.
- Yang, W., Simpson, J. P., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Pollard, M., Ohlrogge, J. B. 2012. A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: substrate specificity, sn-2 preference, and evolution. *Plant Physiol.* 160:638–652
- Yang, Z. H. 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24(8):1586-1591.
- Yao, P., Sun, L., Dekomah, S., Bi, Z., Sun, C., Mao, J. and Bai, J. 2023. Evolutionary Analysis of StSnRK2 Family Genes and Their Overexpression in Transgenic Tobacco Improve Drought Tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 24(2), 1000.
- Yılmaz, E., Tuna, A. L. and Bürün, B. 2011. Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri - Tolerance strategies developed by plants to the effects of salt stress. *Celal Bayar University Journal of Science*, 7(1), 47-66.

- Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. 2018. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia plantarum*, 162(1), 2-12.
- Zhang, J. Z. 2003. Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 430-440.
- Zhang, L., Luo, H., Zhao, Y., Chen, X., Huang, Y., Yan, S., Li, S., Liu, M., Huang, W., Zhang, X., Jin, W. 2018. Maize male sterile 33 encodes a putative glycerol-3-phosphate acyltransferase that mediates anther cuticle formation and microspore development. *BMC Plant Biol*, 18:318.
- Zheng, Z., Xia, Q., Dauk, M., Shen, W., Selvaraj, G. and Zou, J. 2003. Arabidopsis AtGPAT1, a member of the membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase gene family, is essential for tapetum differentiation and male fertility. *Plant Cell*, 15, 1872–1887.
- Zhou, Y., Huang, X., Hu, T., Chen, S., Wang, Y., Shi, X. and Jia, X. 2023. Genome-Wide Analysis of Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase (GPAT) Family in *Perilla frutescens* and Functional Characterization of PfGPAT9 Crucial for Biosynthesis of Storage Oils Rich in High-Value Lipids. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15106.
- Zhu, T., Wu, S., Zhang, D., Li, Z., Xie, K., An, X. and Wan, X. 2019. Genome-wide analysis of maize GPAT gene family and cytological characterization and breeding application of ZmMs33/ZmGPAT6 gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(7), 2137-2154.
- Zhu, Y., Liu, Y., Zhou, K., Tian, C., Aslam, M., Zhang, B. and Zou, H. 2022. Overexpression of ZmEREBP60 enhances drought tolerance in maize. *Journal of Plant Physiology*, 275, 153763.

EKLER

EK1

>PvGPAT1

MSMTGSSAYVVAHAIPPFLRLSNKTMLLLSTPPTTFPSTTPRVTLSSSTSSSSSSSISLRSSTAPSP
SCSSVTPKDNCLASAKHSPPNMSASVSSRTFLNAQSEQDVFAGIKKEVEAGSLPANVAAGMEEV
YNNYKKAIVIQSGDPKANEIVLSNMIALLNRFVLDVTDPFVFQPHHKAKREPFDYVFGQNYIRPL
VDFKNAYVGNMPLFIEMEEKLKQGHNIILMSNHQTEADPAIISLLETRLPIYAENLTYVAGDRVI
TDPLSKPFSIGNLICVYSKKHMLDDPALVEMKRTANIRALKEMAMLLRNGSQLVWIAPSGGRD
RPDAQTREWVPAPFDISSVDNMRRLEHSGPPGHVYPLAILCHDIMPPPLKVEKEIGEKRIFCFHG
AGISVAPAISFSETTATCENPEKAKEVFSKALYNSVTEQYNVLKSAIQGKKGFESTPVVTLSPW
K

>PvGPAT2

MNRTAKLKSSSELDLDRPNIEDYLPSGSSVQHERQGKLRCLDLIDISPSLSEAAGAIVDDSFTRCF
KSNPPEPWNWNVYLFPLWCCGLVIRYLIIFPIRILVLTGLWIIFLSFIPVHCLLKGNDDLRRKKIERC
LVEMMCSFFVASWTGVVKYHGPSPVRPKQVVFVANHTSMIDFIIEQMTAFVIMQKHPGWVG
LLQSTILESVCIFWNRTEAKDREIVARKLREHVQGANNNPLLIFPEGTCVNNHYTVMFKKGAFE
LGCTVCPVAIKYNKIFVDAFWNSRQQSFTTHLLQLMTSWAVVCDVWYLEPQNLKPGETSIEFAE
RVRAIISHRAGLKMVPWDGYLKYSRSPSKHRESKQQNFAQSVLRRLEEK

>PvGPAT3

MNNPGTLKSSSELDLDQPNIEDYLPSGSTIQQEPHGKFLHDLLNISPTLSEAAGAIVDDTFTRCF
KSNPPEPWNWNLYLFPLWCFGVVIRYLIFPIRVIGLTLGWIIFLSFIPVHFLKGGDKLRRSIERS
LVEMMCSFFVASWTGVVKYHGPSPRRPKQVVFVANHTSMIDFIVLEQMTAFVIMQKHPGWVG
LLQSTILESGLCWFNRAEAKDREIVAKKLRDHVQGANNNPLLIFPEGTCVNNHYTVMFKKGAFE
LGCTVCPVAIKYNKIFVDAFWNSRKQSFTMHLLQLMTSWAVVCDVWYLEPQNLKPGETAIEFA
ERVREIISLRAGLKKVPWDGYLKYSRSPSKHREKQQNFAELVLRLEEK

>PvGPAT4

MVSSMEFLRLANWLMNQVLVKSCYGIARKIKNHGFQWGDLSKPLQQPSSFPNIIKCDLEDGRS
QTLVCDHFHKVLLRTHSFFPYFMLVAFEGGSIFRAFLLLCSCPILWILNYEMKLRVMIFISFCGLKV
KDMENTSRAVLPKFYLENLNLEAYEVVASVGSRVIFTTMRVMVEGFLKEYLNADAVIATELHT
AGCYFTGLLSKSGLLVKHSALMDYFGDTKPDLGIGNTSLHDQLFISLCKEAYVVMNEGKVIPRN
KYPKSLIFHDGRLAFLPTPLATLFMFMWLPIGFVMALYRIFLGVFLCFKFTMALGVWSGINLNFK
DNNQKSKSNEGVLVYVCTHRTLLDPIFLSSCLGRPLTAVTYSLSKVAEFIAPIRTIRLTRDRKQDG
ETMKRLLSEGDLVVFEGTTCREPYLLRFSSLFAELADEIVPVAMKAQVSMFYGTASGLKVLDP
IYFFMNP RPRIYDIEILEKVPKELTCAGGRSSHEVANYIQKQLGYALGFECTNLTRDKYMMLAG
NEGVVQEKKGRIFS

>PvGPAT5

MVLVFLYPFVCVVGREMGLKIMVMTCLGKASSFRVGRSVLPKFLLLEDVGSEMFEMLKKGKK
QVGVSRLPRVMVESFLREYLEIDL VVG GELKTF CGYYLGLMENIKTTHALDLLKEGKGCSDMIGI
ISLNNTPNHEFFSHCKEVLVSEADKRSWQKLERERYPRPLIFHDGRLALRPTPMESIAIFMWLPY
AII SVLRIFLSLSLPFTISTPLLIMTGLRLTTSASTEQNVTRKNNLYVCNHRTLLDPLYISFSLQKN
MTALTYSLSKMSEMLSPIKTVRLMRNRDEDANMMKHLLGQGDLVVCPEGTTCREPYLLRFSPFL
SEMCEIVPVAVDTHVSMFHGTTAGGLKCLDPFFFLMNPSPYITVKLLQHVFPSQFSHTTTTHVD
QDSSKFQVANQVQSQIGTALGFHCTKLTRDKYLMLAGNEGTVSNHGRAARCS

>PvGPAT6

MDGTLIGRSSFPYFALISFEAGGVLRLFFVLASPLAALLYFISESAGIQVLIFAAMAGMKVSSI
ESVARAVLPKFYAEDVHPESWRVFSSCGKRCVLTANPRVMVEPFLKEFLGADVVLGTEIGTYRG
RATGLVCRPGVLVGKNKAEALLNTFGEDKPHLGLGDRLTDAPFMALCKEGYIVPAKSEVKSVC
TEKLPKPIIFHDGRLVQKPTPVVALLTILWIPIGFPLACLRIAAGSLLPMNLVYAFWALGVRVLV
KGTPTTQTLTKSNPNPNTSSSGVLFICSHRTLLDPIFLSVALRRPIPAVTYSVSRLEIISPIKTVRLSRD

RDTDAAMIKKLLQDGDLAICPEGTTCREPFLLRFSALFAELTDELVPVAMVNRMSMFHGTTARG
WKGMDPFYFFMNPSPAYEVTFLKKLPQELTCGSGKKTSHEVANYIQRVIASTLSYECTGFTRKD
KYRALAGNDGVVVEKSQVANNKANKIMGC

>PvGPAT7

MVMGAFRHFQPIISKCTTEHRSHQTVASDLDTLLSPSAFPYYMLVAIEAGSFLRALLLLISVPFV
YFTYIFLSEVAAIKFLILMAFGGLKVVDVEMVATSVLPKFYAEDVHPDTWRVFNSFGKRYIVTAS
PRVMVEPFVKAFLGADKVLGTQLQVTSQGRFTGFVKEPGVLVGEHKKLAVLKEFQGNPDGL
GDSKSDHQFMSICKEGYMVPRTKCEPLPRNKLLSPIIFHEGRFVQRPTPLAALLTFLWLPIGIIL
RVYLNIPLERIAWYNYKLLGIRVIVKGTTPPPPKKGQSGVLVFCNHRVTLDPVVTAVALGRKISC
VTYSISKFTIISPIKAVALSREREKDAANIKRLLEEGDLVICPEGTTCREPFLLRFSALFAELTDRI
VPAINTKQSVFYGTTARGHKLLDPYFVFMNPMPTYEITFLNQLPKELTCGSGKSAIEVANYIQRV
LAGTLGFECTNLTRKSKYAMLATDGTVPSSKEKA

>PvGPAT8

MNPNCSKMRTISFVQQKAELANNETQVFDFEGTLLRSTSLFPYFMLVAFEAGGILRSVILFLSYPL
VWLVGEDQLGLKIMVFLCFGIRKDTFRGSAVLPKFFLEDIRGEIFEALMCYERTVATSQLPRIM
VENFLKDYLGVEAVMARELKSFSGFFLGVEKNNPNKISSYKINGGKGRNINNKTGMVDSNH
IEFIDQQLHQFKEVCLADENRNCHVLSREKYPKPLIFHDGRLAFRPTLVSSLVLFWLPLFGFL
CLLRTIGIALPLNVSAPILALSGRTRTISRQSTVSLVHSEEKKKGMLYVCNHRITLLDPLYVSIVL
GKPLSTVYSLRSLSETVSPKTIIRLDREREKDMNKLLSLGNLVVCPGTTCREPYLLRFSPLF
AELAANIVPAIDVKVSMFYGTTASGYKCLDPFFHFMNPNPTYTIKLEMLQQSQTCGSGGKSKI
EVANFVQKEICKALGFVCTSMTRKDKYLVLAGNEGVSSCNCNQ

>PvGPAT9

MNPSCTSKIKTASLVHKTQELTNKTVVFEFEGTLLRSTSLFSYFMLVAFEAGGLLRSLILFLSYPL
VWLLGEDQLGLKIMVFLSLFGIRKDTFRIGSAILPKFFLEDVWEGFEAVMRYEKKVALSKLPRV
MVEGFLKDYLGVEGVVARDIKSFKGYFLGLFEERKENNTHLYEAKADHEKPIGITGSHIGYIEQQ
LSPEFKKDCILSSQERRNWHVLPKERYPKPLIFHDGRLAFRPTASTLAFFMWLPLGLFLSIFRFT
FGIALPFNVSAPIAFSGTRTTVSRPESPLSLVNEENQKGMLYVCNHRITLLDPLYIAYVLDKPLS
AVTYSLSRFNELVSPITVRLTRDRERDRATMEKLSLGNLVVCPGTTCREPYLLRFSPLFAELT
DDIVPVAVDVTVSMFYGTTASGLKCLDPFFHLMNPNPTHFIEILDQLPRSQTCHEGGKSRIEVANS
VQREIANALGFACTSLTRKDKYMILAGNEGVNEGPCNHCN

>PvGPAT10

MEFPMVLLRLADWVLYQLLANSYYRAARKMKSYGFHFGYLSSKPPPQSSFPVAKYDFEGRES
HTLVACDIHRVLLRSHSFFPYFMLVAFEGGSIFRALLLLSCPVLWILNHELRLRVMTFITFCGLRT
NAMESISRVLPKFYLENLNLHSYQVLASAGSKVFTSVPRVMVEGFLKEYLSVGAVVGTELHT
VGCYFTGLLSGGLLVKHRALKDYFGDTKPDIGVGSSAVHDHLFLSLCKEAYVNNNEESKNSS
SVMPRDKYPKPLIFHDGRLAFLPTSAALYMFMFPPFGIVLAIYRILLGVLLPYGVALSLGVWSG
LNINIKGSIPEQNQGVLYVCSHRTLLDPVFLSTSLAKPLTAVTYSLSKVSSELIAPITVRLTRD
RKKDGETMERLLREGDLVVCPEGTTCREPYLLRFSLSFAELADEIVPAINTHVSMFYGTTASGL
KCLDPIFFLMNPRPSCNIEVLRKVPKELTCAGGRSSCEVANYIQKQLADALGFECTTLTRKDKYM
MLAGNEGIVKQDKWTTKC

>PvGPAT11

MESVVSELEGTLKDSDAFSYFMLVAFEASGLVRFALLLALWPVIRFLDMVGMDDVSLKLMIFV
AVAGVPKSEIESVARAVLPKFYMDDLMEKWKVFSSYEKRVVVTKTPEIMVEMFVKEHLHADE
VVGTLQSFNRFDLATGFVHGHSSNTISQRVANLLSNGAPTLVMDQSHPPVLTQNYDHQLLRPL
PVIFHDGRLVKRPTSTSLILLWMPVGIVLAIFRIALGSILPFWSSIPYTSRLFTGKIIVKGKPPVPS
GSNSGVLFVCTHRTLLDPVVLSSVLRRIPAVTYISRLSEILSPIPTVRLTRRHVDAEKIKQELSK
GDLVVCPEGTTCREPFLLRFSALFAELTDRIVPVAMNYRVGFFHATTARGWKGLDPIFFFMNPRP
VYEVTFLNQLPVEATCSSGKSPHDVANYVQRLAATLGFECTNFTRKDKYKVLGNDGTASPTF
SLVDQMVKVVRTFIL

>PvGPAT12

MGITPRFASITQCTTKHRSNQTVVSDLDGTLLLSRSAPFYLLVALEAGSILRALTLTLLPFIHFT
NLVISEATAATKTLVFTVFAGLKLVDEVVARSVLSRFYAEDVHPHTWHVFNAFGKRIFIVTASPR
VMVEPFAKTFLGADKVLGTTELHVTPSGRMSGFIEQVGLAGDHKRDVIVKEFGSNLPDVGNGR
VTDFDFMSICKEGYMVPKCEPLPRNKLLSPIIFHEGRLVQRPTPLVALLTFLWMPIGFVLSILR

VYLNIP LPERIAWYNYKLLGIRIIRKGT PPPPSKKGQSGVLFVCNHR TVLDPVVT AVALGRKISCV
TYSISK FNEIISPIKAVALSRERDRDAANIKK LLEEGDLVICPEGTT CREPFLLRFSALFAELTDRIVP
IAINTKQSVFFGTSVRGYKLLDPYFVFMNPMPTYEITFLNQLPAELTCKGGKSSFEVANYIQRVLA
GTLGFECTNLTRKDKYAILSGTDGTIPKKNA

>PvGPAT13

MATARRNFPSITECNGTKSSPPDSVAADLDGTL LSSSSFPYFMMVAVEAGSLLRGFILL LAVPLII
FAYLFISESLGIQILIFISY SGLKIRDIELVSRAVLPRFYAADVRKESFEMFDRCKRKVVVTANPTV
MVEPFVKDFLGDKVLGTEIEVNP KTKATGFVKKPGVLVGK LKRLAVSKEFGEDSPDIGLGDR
KTD FDFMSICKEGYMVPPSKSAKVPQERLKSRLIFHDGRFVQKPDPLNALITFLWLPFGFILSIIR
VYFNLPLPERIVRYTYEM LGIKLVRGHRPPPPSPGTPGNLYVCNHR TALDPIVIAIALGRK VSCVT
YSVSKLSRFLSPIAVALTRDRAADAARITEILQKGDLVVCPEGTT CREPFLLRFSALFAELSDRIV
PVAVDCKQNMFFGTTVRGIKFWDPYFFFMNPRPVYEVTFDPLPEEM SCKAGGKSSIEVANHVQ
KVLGDVLGFECTGLTRKDKYLLLGGNDGKVESLYGSKK

EK2

