

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KROM (VI) STRESİ UYGULANMIŞ FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)
BİTKİSİNDE TCP GEN AİLESİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN
REAL-TIME PCR YÖNTEMİYLE mRNA İFADE SEVİYELERİNİN
İNCELENMESİ**

Seda KESKİN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2019**


Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Seda KESKİN tarafından hazırlanan “Krom (VI) Stresi Uygulanmış Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinde TCP Gen Ailesi Trankripsiyon Faktörlerinin Real Time PCR Yöntemiyle mRNA İfade Seviyelerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 11.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


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

Jüri Üyeleri:


Başkan : Prof. Dr. Murat Kaya
Aksaray Üniversitesi Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı


Üye : Prof. Dr. Sevgi Ertuğrul Karatay
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı


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

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü Vekili

ETİK

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

11.07.2019



Seda KESKİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KROM (VI) STRESİ UYGULANMIŞ FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE TCP GEN AİLESİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN REAL- TIME PCR YÖNTEMİYLE mRNA İFADE SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Seda KESKİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Bitkiler yapıları gereği kolayca biyotik ve abiyotik stres türlerine maruz kalabilirler. Dolayısıyla bitkiler stres faktörleri ile genetik seviyede başa çıkmak zorundadırlar. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ekolojik açıdan ve besleyiciliği bakımından dünyada önemli bir yeri olan ve büyük ölçüde tüketim oranına sahip olan bir baklagil türüdür. Stres faktörleri canlıların çoğunda olduğu gibi fasulye yetiştiriciliğinde de büyüme ve gelişmeyi sınırlayan faktörlerden biridir. Günümüzde, biyoteknolojik uygulamalar bitkilerin değişik stres koşullarına uyumlu hale getirilmesinde ve tarımda verimin artırılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle bitkilerin stres faktörlerine verdikleri moleküler cevapların mekanizmalarının araştırılması oldukça önemlidir. TCP proteinleri yaprak büyümesi, organogenez, yanıl dallanma gibi bitki gelişimi ve büyümesinde rolleri olan önemli transkripsiyon faktörlerini içeren bir gen ailesidir. Krom (VI) yüksek konsantrasyonlarda tohum çimlenmesini engeller, kloroplast ve hücre zarının yapısını değiştirerek reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına neden olur, hayvanlar ve insanlar üzerinde de zarar verici etkileri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında krom stresi altındaki fasulye bitkisinde *Pvul-TCP-2*, *Pvul-TCP-3*, *Pvul-TCP-13*, *Pvul-TCP-20*, *Pvul-TCP-27* gen ifadelerinin mRNA seviyesinde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Tescilli fasulye çeşidi olan Zülbiye tohumları sterilize edilerek steril perlit ortamına ekilmiştir. Fasulye bitkileri 18 gün sonra trifoliat (üç yapraklı) hale geldiklerinde iklim odasında doğrudan kontrol grubu hariç 100 µM K₂Cr₂O₇ (Potasyum dikromat) içeren Hoagland sıvı besi yerine aktarılarak 3 saat ve 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmışlardır. Her bitki örneğinin kök ve yaprakları belirlenen zamanlarda kesilip homojenize edilerek RNA izolasyonu ve cDNA sentezi ardından Real-Time PCR ile analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda beş TCP geninin ifadelerinde kontrole göre artış gözlenmiş; ancak *Pvul-TCP-27* geninin her koşulda kontrole göre anlamlı bir şekilde diğerlerinden daha fazla ifade artışı gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca 24 saat stres altında kalan TCP genlerinin ifadelerinin, 3 saate göre daha fazla artış gösterdiği bulunmuştur. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar TCP gen ailesinin fasulye bitkisinde krom (VI) ağır metal stresine karşı savunma mekanizmasında rol oynadığını savunmaktadır.

Temmuz 2019, 59 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Fasulye, Krom (VI), Real-Time PCR, TCP Gen Ailesi, Bitki Transkripsiyon Faktörleri, Ağır Metal Stresi

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ANALYSIS OF mRNA EXPRESSION LEVELS OF TCP GENE FAMILY TRANSCRIPTION FACTORS USING REAL-TIME PCR METHOD IN CHROMIUM (VI) STRESSED COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

Seda KESKİN

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

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Plants can easily be exposed to abiotic and biotic stresses because of their structure. Consequently, they have to cope with stress factors at genetic level. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is species of legume with a large consumption rate in the world in terms of its ecologically and substantially. Abiotic stress factors restrict growth and development in bean cultivation as in most crop species. Nowadays, biotechnological applications play important roles in adaptation of plants to the different stress conditions and increasing productivity in agriculture. For this reason, it is important to investigate the mechanisms of molecular responses to stress factors in plants. TCP proteins are one of an important transcription factor families, having important functions in plant growth and development, such as leaf growth, organogenesis, lateral branching. Hexavalent chromium prevents seed germination at high concentrations, altering the structure of chloroplasts and cell membranes, leading to the emergence of reactive oxygen species, also harmful effects on animals and humans. In this study we aimed to investigate the changes in *Pvul-TCP-2*, *Pvul-TCP-3*, *Pvul-TCP-13*, *Pvul-TCP-20*, *Pvul-TCP-27* genes expressions in common bean under chromium stress at mRNA level. For this purpose *Phaseolus vulgaris* cv. Zulbiye seeds were sterilized and were planted in sterile perlite medium. Plants that have been grown in climate chamber and become trifoliolate after 18 days, were exposed 100 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (potassium dichromate) containing Hoagland liquid medium for 3 and 24 hours. Then leaf and root samples of exposed and control plants were collected, homogenized immediately and RNA extraction was performed. Real-Time PCR analysis following cDNA synthesis. The result of the analysis showed an increase in the expression of all genes compared to the control; however it has been observed that the expression in, *Pvul-TCP-27* gene is more pronounced than the others in all conditions compared to the control. Furthermore, TCP gene expression was higher in samples exposed to stress for 24 hours compared to 3 hours. The results suggest that the TCP gene family plays an important role in the defense mechanism against hexavalent chromium heavy metal stress in common plants.

July 2019, 59 pages

Key Words: Common Bean, Chromium (VI), Real-Time PCR, TCP Gene Family, Plant Transcription Factors, Heavy Metal Stress

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarımı yönlendiren, maddi, manevi her konuda yanımda ve ilham kaynağı olan başta danışmanım Prof. Dr. E. Sümer ARAS'a, Doç. Dr. Demet CANSARAN-DUMAN'a, Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e, Araş. Gör. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI'na, başta Ayla BEHNEJAD KAZANCIK olmak üzere laboratuvar arkadaşlarıma, bana her zaman inanmış ve daima desteklemiş olan aileme ve bilim yolundaki bütün engelleri kaldırmamızı sağlayan Alexandra Elbakyan'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Seda KESKİN

Ankara, Temmuz 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	2
1.1.1 Tarihçe	2
1.1.2 Sınıflandırılması	2
1.1.3 Türkiye'deki ve Dünya'daki önemi.....	3
1.1.4 Toprak ve iklim istekleri	5
1.2 Stres	5
1.2.1 Ağır metaller.....	6
1.2.2 Ağır metallerin canlılar üzerine etkisi	6
1.2.3 Krom (VI) stresi	9
1.2.4 Krom bileşiklerinin insanlar üzerindeki etkisi.....	10
1.3 TCP Gen Ailesi	11
2. KAYNAK ÖZETLERİ	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi	19
3.1.1 Zülbiye (Kuru fasulye).....	19
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Tohumların yüzey sterilizasyonu.....	19
3.2.2 Çimlenme ortamının sterilizasyonu	20
3.2.3 Tohumların çimlendirilmesi.....	20
3.2.4 Hoagland besi ortamının hazırlanması	21
3.2.5 Bitki stres koşullarının oluşturulması	22
3.2.5.1 100 µM krom (VI) çözeltisinin hazırlanması.....	23

3.2.5.2 Stres koşuluna maruz kalma süresi.....	23
3.2.6 Hidroponik stres ortamının hazırlanması ve stres uygulaması	23
3.2.7 <i>P. vulgaris</i> bitki örneklerinin homojenizasyonu	24
3.2.8 Çalışmada kullanılan bitkilerin kodlanması	25
3.2.9 RNA izolasyonu	25
3.2.10 Agaroz jel elektroforezi	27
3.2.11 cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	27
3.2.12 Real - Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	28
3.2.12.1 Real – Time PCR uygulamasında kullanılan genler ve primer dizayını.....	29
3.2.12.2 Real – Time PCR reaksiyonları	33
3.2.13 Normalizasyon hesaplamaları.....	34
4. BULGULAR	35
4.1 RNA İzolasyonu Sonuçları	35
4.2 cDNA Sonuçları.....	35
4.3 Real – Time PCR Sonuçları	36
4.4 Real – Time PCR.....	38
4.5 Normalizasyon	45
4.6 TCP genlerine ait mRNA Düzeyleri	46
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
cm	Santimetre
Cq	Quantification cycles
Ct	Cycle treshold
dk	Dakika
g	Gram
G	Gravity
l	Litre
n	Mol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
M	Molar
mg	Miligram
s	Saat/Süre
Tm	Melting temperature

Kısaltmalar

ACT	Actine – Aktin
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BR	Brassinosteroidler
Cd	Kadmiyum
cDNA	Komplementer DNA (Tamamlayıcı, Complementary DNA)
CDS	Coding Sequence
CIN	CINCINNATA
Cr	Krom
Cu	Bakır
cv.	Kültivar, kültürvariyete
CYC	CYCLOİDEA
DNA	Deoksiribonükleik asit
DWF4	DWARF4
EtBr	Etidyum bromür
Hg	Cıva
ITS	Internal Transcribed Spacer
LOX2	LIPOXYGENASE 2
Lys	Lizin
miR319	microRNA319

mRNA	Mesajcı RNA
Ni	Nikel
OsTCP19	<i>Oryza sativa</i> -TCP-19
Pb	Kurşun
PB1	Pirinç “ <i>panicle blast 1</i> ” geni
PCF	Proliferating Cell Factors
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pI	İzoelektrik noka
Pvul-TCP	<i>Phaseolus vulgaris</i> -TCP
RNA	Ribonükleik asit
RT PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı PCR)
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
Sn	Kalay
ssDNA	Tek iplikli DNA (Single strand DNA)
TB1	TEOSİNTE BRANCHED 1
TCP	Teosinthe Branched-Cycloidea-PCFs
TFDB	Transcription Factor Database
tRNA	Taşıyıcı RNA
trnK	tRNA ^{Lys} (UUU) kodlayan gen
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UUU	Urasil-Urasil-Urasil
Zn	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Hidroponik stres ortamı	24
Şekil 3.2 RNA izolatlarının görünümü	26
Şekil 4.1 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP2 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği.....	39
Şekil 4.2 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP2 genine ait standart eğri grafiği.....	39
Şekil 4.3 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP3 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği.....	40
Şekil 4.4 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP3 genine ait standart eğri grafiği.....	40
Şekil 4.5 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP13 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği.....	41
Şekil 4.6 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP13 genine ait standart eğri grafiği.....	41
Şekil 4.7 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP20 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği.....	42
Şekil 4.8 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP20 genine ait standart eğri grafiği.....	42
Şekil 4.9 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP27 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği.....	43
Şekil 4.10 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP27 genine ait standart eğri grafiği.....	43
Şekil 4.11 RT-PCR reaksiyonları sonucu ACT genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği	44
Şekil 4.12 RT-PCR reaksiyonları sonucu ACT genine ait standart eğri grafiği	44
Şekil 4.13 3 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yaprak ve köklerindeki mRNA düzeyleri.....	46
Şekil 4.14 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yaprak ve köklerindeki mRNA düzeyleri.....	46
Şekil 4.15 3 saat ve 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yapraklarındaki mRNA düzeyleri.....	47
Şekil 4.16 3 saat ve 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin köklerindeki mRNA düzeyleri	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> L.'in sistematik sınıflandırılması (Davis 1969).....	2
Çizelge 1.2 TÜİK verilerine göre 1988'den 2018'e kadar olan fasulye üretim, ekim alanı ve verim çizelgesi (TÜİK 2019).....	4
Çizelge 3.1 Tohum sterilizasyonunda kullanılan çözeltiler ve muamele süresi	20
Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamı makro besin çözeltisi içeriği (Hoagland ve Amon 1950).....	21
Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamı mikro besin çözeltisi içeriği (Hoagland ve Amon 1950).....	21
Çizelge 3.4 Hoagland besi ortamı için FeEDTA çözeltisi içeriği.....	22
Çizelge 3.5 Hoagland besi ortamının hazırlanışı (Hoagland ve Amon 1950)	22
Çizelge 3.6 Çözeltiye eklenecek stres koşulu olan krom (VI) miktarının hesaplanması	23
Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılacak bitkilerin kodlama sistemi	25
Çizelge 3.8 cDNA sentezi	27
Çizelge 3.9 cDNA sentezi	28
Çizelge 3.10 Hedef olarak seçilen TCP genlerinin bilgileri	32
Çizelge 3.11 TCP genlerinin primer dizileri	33
Çizelge 3.12 Real – Time PCR protokolünde kullanılacak reaksiyon bileşenleri	33
Çizelge 3.13 Real – Time PCR reaksiyonlarının koşulları	34
Çizelge 4.1 RNA izolasyonu sonucu izole edilen RNA'ların saflık ve miktar tayini sonuçları	35
Çizelge 4.2 cDNA izolasyonu sonucu izole edilen cDNA'ların saflık ve miktar tayini sonuçları	36
Çizelge 4.3 RT-PCR sonucu TCP2 genine ait Cq değerleri	36
Çizelge 4.4 RT-PCR sonucu TCP3 genine ait Cq değerleri	37
Çizelge 4.5 RT-PCR sonucu TCP13 genine ait Cq değerleri	37
Çizelge 4.6 RT-PCR sonucu TCP20 genine ait değerleri	37
Çizelge 4.7 RT-PCR sonucu TCP27 genine ait Cq değerleri	38
Çizelge 4.8 RT-PCR sonucu ACT genine ait Cq değerleri.....	38
Çizelge 4.9 Kontrole göre normalize edilmiş tüm bitki örneklerinin TCP genlerine ait mRNA ifade düzeyleri.....	45

1. GİRİŞ

Fasulye; orijini Orta Amerika ve Güney Amerika olan bitkiler âleminin Fabaceae (Baklagiller) familyasına ait, dünya çapında insanların en çok tükettiği, değerli protein ve mikro besinler içeren en önemli baklagillerden biridir (Delgado-Salinas vd 2006, Özdem 2012). Bunun yanında, fasulye bitkisi köklerinden azot fiksasyonu yapabilmesi ve bunun toprağa katkı sağlaması sayesinde tarımın da pozitif yönde sürdürülebilirliği için avantaj sunar (Tate 1995). Dolayısıyla fasulye iklim değişikliğinde önemli zorluklarla başa çıkmada da anahtar rol oynar (Bitocchi vd. 2017).

Biyolojik yapıları nedeniyle buldukları ortamda sesil yaşayan ve ortamın tehlikelerinden kaçamayıp çeşitli stres etkenlerine maruz kalan bitkilerin olumsuz yönde etkilenmesinin, insan beslenmesini de etkilemesi kaçınılmazdır. Sanayileşme, kentleşme, zirai ilaçların özellikle pestisitlerin kullanımı gibi faaliyetler sonucunda hava, su ve toprak gibi ekosistemlerde canlılar için zararlı olan birçok madde birikir (Demir 2009, Kocataş 2012a). Bunlardan biri de yoğun bir şekilde biriken ağır metallerdir. Teknolojinin gelişmesi, nüfusun artışı ve buna bağlı olarak üretimin artması sonucunda ağır metal kullanımı ihtiyacı da artmıştır (Rether 2002, Kahvecioğlu vd. 2003, Kocataş 2012b).

Ağır metal zehirlenmesi, hayvanlar ve bitkiler için ciddi sağlık sorunları oluşturan abiyotik stres çeşididir (Anonim 2004). Yıllarca insanlar tarafından çevreye salınan ağır metaller toprak kirlenmelerine neden olmuştur (Rether 2002, Kahvecioğlu vd. 2003). Yapılan son araştırmalar ile ağır metal kirlenmesinin bitkiler, toprak ve sonuç olarak da insanlara büyük miktarda zarar verdiği doğrulanmıştır (Debnath vd. 2011). Ağır metaller tarafından kirletilmiş alanlarda gelişen bitkilerin metabolizmalarının değiştiği, büyümelerinin ve biyokütle üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Ortamda bulunan ve çevreye zarar verici etkileri olan herhangi bir kirletici madde, yaşam kalitesini azaltarak sonuçta ölüme sebep olabilir (Demir 2009, Nagajyoti vd. 2010).

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.1.1 Tarihçe

Phaseolus cinsine ait yaklaşık 70 türün çoğunun orijini, coğrafik olarak Orta Amerika'ya aittir ve bu cins geçtiğimiz 4-6 milyon yıl önce çeşitlenmeye başlamıştır (Delgado-Salinas vd. 2006). Bu cinse ait farklı türlerin çeşitlenmesi, şimdiki Meksika ülkesinin bulunduğu topraklarda, Geç Miyosen zamanında (5 milyon yıl önce) gerçekleşmiş olan tektonik olayların sonucunda olmuştur (Nieto-Samaniego vd. 1999, Delgado-Salinas vd. 2006).

1.1.2 Sınıflandırılması

Fasulye; Fabaceae (Baklagiller) familyasının *Phaseolus* cinsinin bir türüdür. Filogenetik analizler *Phaseolus* türlerinin iki ana kardeş klada (klad A ve klad B) ayrıldığını göstermiştir ve *Phaseolus vulgaris* B kladında bulunur. α -amilaz inhibitör geninin sekans verilerinin analizi; *P. vulgaris*'in *P. dumosus* ve *P. coccineus*'tan ayrılarak türleştiğini göstermiştir (Gepts vd. 1999, Delgado-Salinas vd. 2006). *Phaseolus vulgaris* L. 'in sistematik sınıflandırılması Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1 *Phaseolus vulgaris* L.'in sistematik sınıflandırılması (Davis 1969)

Domain	Eukarya – Ökaryotlar
Alem	Plantae - Bitkiler
Altalem	Tracheobionta – Damarlı Bitkiler
Üstbölüm	Spermatophyta – Tohumlu Bitkiler
Bölüm	Magnoliophyta – Çiçekli Bitkiler
Sınıf	Magnoliopsida – Dikotiledonlar
Altsınıf	Rosidae
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae – Baklagiller
Cins	<i>Phaseolus</i> L.
Tür	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. - Fasulye

1.1.3 Türkiye'deki ve Dünya'daki önemi

Fasulye; Türkiye'de üretimi en çok yapılan baklagiller arasındadır. Diğer baklagiller gibi yağ oranı düşük, karbonhidrat oranı yüksek, içerdiği bitkisel kaynaklı proteinler sayesinde besleyiciliği fazla olan ve protein ihtiyacının kısmen giderilebileceği besinlerdendir (Anonim 2010).

Fasulye aynı zamanda havadaki serbest azotu, köklerindeki *Rhizobium* bakterilerinin oluşturduğu nodüller sayesinde bitki metabolizmasına alır. Bu da bitkideki protein miktarının artmasına neden olur (İsmailçelebioğlu 1980, Tate 1995).

Türkiye'de Güneydoğu Anadolu, Orta Anadolu ve geçit bölgelerini de içine alan Marmara Bölgesi'nin güneyi, fasulye üretiminin en yoğun olduğu bölgelerdendir (Özdem 2012). 1990 yılı itibari ile dünyada kuru fasulye üretimi 210.000 ton iken, 2016 yılı itibari ile 230.000 ton olmuştur. Bu yıllar arasında baklagil ekim alanlarında önemli oranda düşüş yaşanmasına rağmen verim artmış ve fasulye üretimi artırılmıştır. 1990 yılında kuru fasulye ekim alanı 1.710.000 dekar iken, 2016'da 898.197 dekar ile azalış göstermiştir (TÜİK 2019).

Baklagil üretiminin azalmasının nedenleri arasında en başta kuraklık gelir (Anonim 2010). 1988'den 2018'e kadar olan fasulye, üretim, ekim alanı ve verim TÜİK verisi Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Dünyada üretimi en çok yapılan baklagil fasulyedir. Dünya fasulye üretiminden en çok payı alan ülkeler Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Arjantin, Myanmar, Hindistan ve Çin'dir. Türkiye dünya fasulye üretiminden %1 pay almaktadır (Anonim 2010).

Çizelge 1.2 TÜİK verilerine göre 1988'den 2018'e kadar olan fasulye üretim, ekim alanı ve verim çizelgesi (TÜİK 2019)

Yıllar	Üretim (Ton)	Ekilen alan (Dekar)	Verim (Kg / Dekar)
		Fasulye	
		(kuru)	
		Bean (dry)	
1988	211 000	1 760 000	120
1989	193 000	1 780 000	108
1990	210 000	1 710 000	123
1991	214 000	1 780 000	120
1992	200 000	1 680 000	119
1993	200 000	1 620 000	123
1994	180 000	1 630 000	110
1995	225 000	1 700 000	132
1996	230 000	1 725 000	133
1997	235 000	1 750 000	134
1998	236 000	1 720 000	137
1999	237 000	1 740 000	136
2000	230 000	1 760 000	131
2001	225 000	1 750 000	129
2002	250 000	1 800 000	139
2003	250 000	1 620 000	154
2004	250 000	1 550 000	161
2005	210 000	1 412 000	149
2006	195 970	1 290 515	152
2007	154 243	1 092 497	141
2008	154 630	982 326	157
2009	181 205	949 280	191
2010	212 758	1 033 811	206
2011	200 673	946 254	212
2012	200 000	931 740	215
2013	195 000	847 630	230
2014	215 000	911 103	236
2015	235 000	935 840	251
2016	235 000	898 197	262
2017	239 000	897 221	266
2018	220 000	848 045	259

1.1.4 Toprak ve iklim istekleri

Fasulye; dünya üzerinde çok geniş bir ekim alanına yayılış gösteren ve ılıman iklimlere adapte olmuş bir bitkidir. Kuraklık, sıcaklık ve nem gibi etmenlere duyarlıdır. Bitkinin daha fazla alana yayılamamasının nedeni sıcaklıktır. Yaz aylarında sıcaklığın 10 °C'nin altına düşmesi, baklalarının oluşmamasına; sıcaklığın 32 °C'nin üzerine çıkması da yapraklarının dökülmesine neden olmaktadır (Şehirli 1988).

Tınlı (içerisinde yaklaşık olarak eşit miktarlarda kum, kil ve silt bulunduran toprak) – kumlu topraklarda iyi gelişir (Varankaya 2011).

1.2 Stres

Canlılar sürekli çevre ile ilişki içinde oldukları için, bazen yaşadıkları ortamın koşullarından olumsuz bir şekilde etkilenirler. Bitkiler doğaları gereği bir yere tutunarak yaşamlarını devam ettirdikleri için içinde buldukları ortamın olumsuz koşullarından kaçamazlar ve bu olumsuz koşullara maruz kalırlar (Boyer 1982, Osmond vd. 1987, Büyük vd 2012). Bu da bitkilerin büyüme ve gelişme yollarını kötü etkileyerek onları stres durumuna sokar. Bitkiler bu stres durumlarının üstesinden gelmek için hayatta kalma sürecinde onlara yardım edecek mekanizmalar geliştirmek zorunda kalmışlardır. Bitkilerin biyotik ve abiyotik strese maruz kalmaları bitkinin fizyolojisini bozarak verimlerinin düşmesine neden olur (Boyer 1982, Osmond vd. 1987).

Stres faktörleri biyotik ve abiyotik stres olmak üzere ikiye ayrılır (Levitt 1980). Biyotik stres yaşayan bütün canlıların meydana getirdiği stres çeşididir. Abiyotik stres türleri ise ışık, sıcaklık, su/kuraklık, radyasyon, kimyasal ve mekanik faktörlerin oluşturduğu çevresel etmenlerdir (Lichtenthaler 1996). Bu tür dışarıdan gelen etkiler nedeniyle bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde ciddi olumsuz etkiler ortaya çıkabilmektedir (Boyer 1982). Ayrıca stres faktörlerinin neden olduğu durumlar; bitki türüne, bitkinin adaptasyon yeteneğine, toleransına, maruz kalma süresine, şiddetine göre değişiklik gösterir (Rao vd. 2006). Besin zincirinde üreticiler olarak yer alan bitkilerin çoğu stres

faktörlerine maruz kalırlar (Boyer 1982, Rao vd. 2006). Bu bitkilerde meydana gelen bir bozukluğun besin zincirindeki diğer basamakları da etkileyebileceği anlamına gelir. Bütün bunlar düşünüldüğünde bitkilerin stresle başa çıkma mekanizmalarının araştırılması ve strese toleranslı bitki türlerinin geliştirilmesi bütün canlılar için önemlidir.

1.2.1 Ağır metaller

Nüfus artışı, sanayileşme, üretimin artması, buna bağlı olarak tarım alanlarında pestisit kullanımının artması çevre kirliliğine neden olmakta ve hava, su ve toprak kirliliği doğayı ve doğada yaşayan bütün canlıları olumsuz yönde etkilemektedir (Öztürk 2002, Aksay vd. 2005, Demir 2009). Toprak daha çok ağır metallerce kirlenir ve bitkiler bu kirleticilere maruz kalırlar (Çağlarırnak ve Hepçimen 2010).

Ağır metal; fiziksel olarak yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yüksek olan metaller için kullanılan bir tanımdır. Ağır metallerde demir, krom, kadmiyum, bakır, kobalt, nikel, cıva ve çinko gibi elementlerin yanında 60'tan fazla metal dâhildir. Ağır metaller yapılarından dolayı çevrede oksitlenmiş olarak ya da karbonat, sülfür ve silikatlar ile bileşik oluşturarak bulunurlar (Kahvecioğlu vd. 2003).

Su kaynaklarına ağır metal kontaminasyonu, endüstriyel atıkların çevreye salınması ve asit yağmurlarının toprağı çözmesi ve dolayısıyla çözünen ağır metallerin su kaynaklarına geçmesi ile olurken çevreye geçişi, çimento üretimi, demir çelik sanayisi, termik santraller, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesislerinin işlemleri sonucu olur (Rether 2002).

1.2.2 Ağır metallerin canlılar üzerine etkisi

Nüfusun hızla artması bazı ihtiyaçların da artmasını gerektirir. Bu ihtiyaçların başında beslenme gelir. Dünyada nüfus ve refah düzeyinin artması ile teknoloji alanında da gelişmelerin olması kaçınılmaz hale gelmiştir. Teknolojik gelişmeler arttıkça insan

yaşamı daha da kolaylaşmış, hastalıklar azalmış, sonuç olarak nüfus da artmıştır. Nüfusun artışı tarımsal üretimin de artması gerektiği anlamına gelir. Bu nedenle tarımsal alandaki üretimin verimini artırmak amaçlı çalışmalar yapılmalıdır. Ekim alanlarından elde edilen ürünün miktarı, verimliliği ve kalitesinin artırılmasının yanında insan sağlığını etkileyecek uygulamalardan da kaçınmak gerekir (Asri ve Sönmez 2006). Tarımsal alanda kullanılan gübre ve pestisitler ile endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları, volkanik faaliyetler, kentsel atıklar da çevreye ağır metal salınımına neden olur (Stresty ve Rao 1999).

Ağır metaller bitki dokularında birikerek bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimini olumsuz yönde etkiler (Rout ve Das 2009). Ağır metal toksisitesi aynı zamanda bitkilerde klorofil sentezi metabolizmasını, dolayısıyla fotosentezini, mitoz bölünmeyi, organların büyümesini, çimlenmeyi, enzim aktivitesini, protein sentezini, transpirasyonu, stoma hareketlerini ve sitokin düzeyini olumsuz yönde etkiler (Zengin ve Munzuroğlu 2005, El-Ghamery vd. 2003, Radha vd. 2000, Kennedy ve Gonsalves 1987, Sheoran vd. 1990, Zengin ve Munzuroğlu 2004).

Ağır metaller hücredeki birçok moleküle zarar vererek reaktif oksijen türlerinin (ROS) açığa çıkmasına neden olur. Süperoksit anyonu (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin açığa çıkması bitkiyi oksidatif strese sokmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin artması nükleik asitlerin hasarına, programlı hücre ölümüne, enzim aktivitesinin azalmasına, protein sentezinin engellenmesine, iyon taşınımında aksaklıklara, lipid peroksidasyonuna neden olur (Blokhina vd. 2003).

Ağır metaller, besin zinciri basamaklarının birbirleriyle etkileşimi sonucunda veya havadan, hayvan ve insan vücuduna girmektedir. Ayrıca insanların ağır metal birikimi olan yerlerde yaşaması, çalışması sırasında, cildin ağır metale maruz kalmış ortama teması, ortamda solunum ve ortamda yetiştirilen bitkilerin yenmesi ile de insan vücuduna geçebilir (Asri ve Sönmez 2006).

Yüksek dozlarda ağır metaller insan sağlığını olumsuz yönde etkiler. Örneğin kurşun, kemiklerde belirli bir miktar biriktikten sonra vücutta çözünmeye başlar (Grandjean 1992). Böbrek, kalp, karaciğeri tahrip eder ve demir bağlanma metabolizmasını bozarak anemiye neden olur. Ayrıca beyin ve sinir sistemi fonksiyonlarını bozar (Cory-Clechta 1990)

Kadmiyum; bitkilerin azot ve karbonhidrat metabolizmasını olumsuz etkiler. Proteinlerin tiyol (-SH) gruplarını inaktive ederek enzimlerin çalışmasını ve klorofil sentezi üzerine olumsuz etki göstererek fotosentezi engeller (Sheoran vd. 1990). İlaç sanayisi ve diğer endüstriyel yollarla çevreye salınan kadmiyum ayrıca insan sağlığını da önemli derecede etkiler. Kadmiyumun vücuda girişi sindirim sistemi, solunum sistemi ve deri yolu ile olabilmektedir. Yiyecek ve içeceklerin sindirimi ve sigara tüketilmesi sonucu vücuda giren kadmiyum akciğerlerde birikerek demir eksikliğine neden olur (Godt vd 2006).

Deney hayvanlarının üzerinde yapılan çalışmalar, ağır metallere maruz kalmanın kansere yol açan önemli bir etmen olduğunu göstermiştir (Vural 1993, Casarett ve Doull 2001). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışma sonucu toprak ve su ile fare derisine uygulanan kadmiyumun karaciğerde ve böbrekte biriktiği gözlemlenmiştir (Lansdown ve Simpson 1996).

Aynı şekilde ağır metal zehirlenmelerinin insanlarda da birçok kansere yol açtığı bilinmektedir. Sigara dumanı, bakır rafinerisi, içme suyu ve diğer kimyasal tesislerden çevreye salınan arsenik; kemik ve solunum yollarında lösemi, dermal karsinoma lenfoma ve pulmoner karsinomaya neden olurken, ayrıca saç ve tırnaklarda birikerek deri, akciğer ve mesane kanserlerine de neden olabilmektedir (Casarett ve Doull 2001).

Nikel rafinerisi kaynaklı çevreye salınan nikel ise; pulmoner karsinoma, nazolarinks karsinoma, sarkoma, gastrik ve renal karsinomaya yol açar (Casarett ve Doull 2001). Ayrıca nikelce zengin alanlarda çalışan işçilerin üzerinde yapılan deneylerde, işçilerin mide ve akciğer kanserine yakalanma olasılığının yüksek olduğu gösterilmiştir (Vural 1993).

1.2.3 Krom (VI) stresi

Krom; 1789 yılında Louis Vauquelin tarafından keşfedilmiştir ve çok renkli olması dolayısıyla yunanca “çok renkli” anlamına gelen “krom” ismi verilmiştir. Yerkürede en çok bulunan elementler arasında 7. sıradadır ve endüstriyel kullanımdan ötürü atmosfere salındığında önemli bir çevresel kirlenici olmaktadır (Kahvecioğlu vd. 2013).

Krom doğada mobilite, biyoyararlanım ve toksisite özellikleri bakımından Cr^{+3} (trivalent krom, krom (III)) ve Cr^{+6} (heksavalent krom, krom (VI) olmak üzere iki farklı türde bulunur. Krom (III) yaşayan organizmalar için gerekli bir iz element olup memelilerde glukoz ve yağ metabolizmasında görevlidir (Anderson 1989). Krom (VI), krom (III)'dan daha toksiktir. Krom (VI)'nın kromat ve dikromat türleri suda yüksek derecede çözünebilirliğe sahiptir. Kromat (CrO_4^{2-}) ve dikromat ($Cr_2O_7^{2-}$) negatif yüklü oldukları için oldukça reaktiftirler ve organik materyallere tutunma yetenekleri çok yüksektir. Krom (III) de krom (VI) da çelik, deri ve tekstil endüstrilerinde yaygın bir şekilde kullanılır (Panda ve Choudhury 2005, Trinh vd. 2013). Dolayısıyla sanayileşmenin artması, kromun çevrede normal şartlarda bulunması gerekenden çok daha fazla bulunmasına, sonuçta kirliliğe neden olmaktadır.

İçeriğinde krom bulunan endüstriyel ürünlerin oksidasyonu, fosil yakıtların, odunsu elemanların yanması sonucu doğaya krom (VI) yayılmaktadır. Okside olan krom ekosistemde bulunan su, organik yapılar ve toprak gibi alanlarda trivalent değeri indirgenir. Kaya ve topraktan suya, sudan bütün ekosisteme, havaya ve tekrar toprağa geçmesiyle kendi içerisinde kararlı bir döngüsü vardır (Kotaş ve Stasicka 2000, Kahvecioğlu vd. 2013).

Krom fitotoksitesisi, tohum çimlenmesini engeller, pigmentleri degrades eder, bitkinin oksidatif strese girmesine neden olur, kloroplast ve membran yapısını değiştirir (McGrath 1982). Kromozomal sapmalar sonucu hücre bölünmesinin düzgün bir şekilde gerçekleşmesini engeller (Liu vd. 1993). Krom (VI); büyümeyi geciktirir, yapraklarda palizat parenkiması ve sünger parenkiması hücrelerini azaltır, ksilem ve floem duvarlarındaki elektron dengesini bozar ve vakuollerini artırır (Han vd. 2004). Ayrıca

krom stresi bitkilerde fotosentetik elemanların (klorofil-a, klorofil-b, karotenoidler) içeriğini ve şeker miktarını önemli derecede düşürür (Aldoobie ve Beltagi 2013)

1.2.4 Krom bileşiklerinin insanlar üzerindeki etkisi

Kromun bütün değerlikleri göz önünde bulundurulduğu zaman insan vücudunun günlük krom ihtiyacı ortalama olarak 30-200 µg'dır ve bu oranın insan vücudu için hiçbir toksik etkisi yoktur. Kromun günlük olarak vücudumuza girişi tahıl, et, bakliyat ve baharatları tüketmemiz vasıtasıyla olmaktadır (Kahvecioğlu vd. 2013). Vücuda alınan krom belli metabolizmalarda rol oynadıktan sonra deri tarafından absorbe edilip kırmızı kan hücreleri tarafından böbreklere taşınır ve üre bileşiği olarak vücut dışına atılır (Mertz 1986, Underwood 2012).

Kromun insan vücuduna fazla alınımı sonucunda akut zehirlenme, gastrointestinal sorunlar, kanama bozuklukları, nöbetler ve kalp damar sisteminde şoka bağlı ölümler ile sonuçlanabilmektedir (Tunçok 2008). Vücuda solunum yoluyla alınan ve vücutta tutulan krom (VI) burun septumunda delik açabilmekte, astım, bronşit, akciğer iltihabı, gırtlak iltihabı ve bronkojenik karsinomaya yol açabilmektedir. Krom (VI)'ya deri yoluyla maruz kalındığında ise deri alerjileri, dermatit ve deri aşınmasına neden olabilmektedir (Gad 1989, Lee vd. 1989).

Ayrıca kromun deney hayvanlarının enjeksiyon bölgelerinde sarkoma ve karsinomaya neden olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında sadece deney hayvanlarıyla kalmayıp krom rafinerisi, krom üretimi gibi yollarla yaşam alanımıza giren kromun insanlarda pulmoner karsinomaya ve gastrointestinal karsinomaya neden olduğu gözlemlenmiştir (Casarett ve Doull 2001).

1.2.4 Bitkilerin ağır metal stresine verdikleri moleküler cevaplar

Ağır metal stresi; bitkilerde birçok fizyolojik ve metabolik yolağı etkileyerek bitkiye zarar vermekte, ürün kalitesini bozmaktadır. Bitkiler de bu etkilere cevap olarak bazı moleküler savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Büyük vd. 2012).

Bitkiler ağır metal stresine karşı reaktif oksijen türlerini (ROT) oluştururlar. Reaktif oksijen türleri; peroksizomlarda, fotosentez reaksiyonlarında, plastitlerde, mitokondride gerçekleşen sitrik asit döngüsünde oluşurlar (Van Breusegem ve Dat, 2006, Van Camp vd, 1998). Atom ve moleküllerden bir elektron çıkması ya da ilavesiyle radikal bir molekül oluşur ve bu halde elektron alıp verebildiklerinden dolayı indirgen ve yükseltgen özelliklerine sahiptirler. Önemli reaktif oksijen türleri hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), singlet oksijen (1O_2) ve hidrosil radikalidir (OH^-). Bu moleküller normal şartlarda da hücrelerde bulunur, fakat miktarları sürekli denge halindedir (Halliwell ve Gutteridge 2015).

Tuz, kuraklık, UV radyasyonu, ağır metal toksisitesi, soğuk gibi biyotik ve abiyotik strese karşı bitkilerde oluşan metabolik dengesizliğe cevap olarak bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin arttığı gözlemlenmiştir (Mithöfer 2004).

1.3 TCP Gen Ailesi

Transkripsiyon faktörleri hücre çoğalması ve büyümesi açısından önemli düzenleyici genler olup aynı zamanda birçok gelişimsel süreçte rol oynarlar. TCP genlerinin bitki gelişiminde hayati rolleri vardır ve bir grup bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Farklı dokularda ifade olurlar ve hücre büyüme ve gelişmesini düzenlerler (Chai vd 2017). TCP genleri bitkilerde yüksek oranda korunmuştur (Kosugi ve Ohashi 1997). Bu genler hücre çoğalması, büyümesi ve farklılaşması, uç apikal meristem gelişimi, yaprak gelişimi, çiçek gelişimi ve yanal dallanma gibi süreçlerde görev alırlar (Hubbard vd. 2002).

TCP genleri 4 farklı gen ailesinin genlerinden oluşur; Teosinte Branched1 (TB1 *Zea mays*'ta bulunmuştur), Cycloidea (CYC *Antirrhinum majus*'ta bulunmuştur) ve 2 farklı sınıfa ayrılan Proliferating Cell Factors (PCF *Oryza sativa*'da bulunmuştur) (Luo vd. 1996, Busch ve Zachgo 2009, Cubas vd 1999, Doebley ve Hubbard 1997, Kosugi ve Ohashi 1997). TCP genleri ayrıca DNA bağlanma proteinleri olan temel heliks-sarmal-heliks (bHLH) yapısını kodlar (Cubas vd 1999, Aggarwal vd 2010).

TB1 genleri, yanal dallanma sürecinde negatif düzenleyici olarak görev yapar. Pirinçte OsTB1 genleri yan tomurcukların oluşmasını ve yanal dallanma gelişimini düzenleyen faktörlerden biri olarak belirlenmiştir (Takeda vd. 2003).

CYC genleri dorsoventral çiçeklenme sürecinde negatif düzenleyici olarak görev yapar (Doebley vd 1995). CYC genleri ayrıca petal şekli oluşumunda rol alır ve ayrıca çiçek bilateral simetrisini belirlemede de görev aldığı düşünülmektedir (Luo vd 1996, Luo vd. 1999).

PCF faktörleri olan PCF1 ve PCF2; çoğalan hücre nükleer antijeni olan PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)'nın promotor bölgesine bağlanır ve organ büyümesi, DNA replikasyonu ve onarımında görev alan proteinlerin sentezi, kromozom ayrışması, kromatin yapısı onarımı ve hücre çoğalması gibi süreçlerde pozitif bir düzenleyici olarak görev yapar. (Kosugi ve Ohashi 1997).

Biyoinformatik ve filogenetik analizlere göre TCP genleri iki sınıfa ayrılır. Sınıf I TCP genleri TCP-P adını alırken, Sınıf II TCP genleri angiospermlere özgü CINCINNATA (CIN) ve CYC/TB1 olmak üzere iki altsınıfa ayrılan TCP-C sınıfıdır (Cubas vd 1999, Nath vd 2003, Cubas 2002, Crawford vd 2004). CINCINNATA (CIN) genleri TCP ailesine bağlı genler olup yanal organ gelişiminde rol oynar (Nath vd. 2003)

TCP genleri ayrıca brasinosteroid (BR), jasmonik asit (JA) ve flavonoidler gibi biyoaktif metabolitlerin biyosentetik yollarını uyararak bitki gelişimi sürecinde savunma mekanizmalarını düzenler (Schommer vd 2008, Danisman vd. 2012, Guo vd. 2010, Li ve Zachgo 2013).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Stres altındaki fasulye bitkisinin transkripsiyon faktörlerindeki ifade değişimi konusunda yapılan literatür taramasında Türkiye ve Dünya genelinde yapılan çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür. Literatür taraması sonucu tez çalışmasında kullanılan fasulye bitkisi, ağır metaller, krom metali, TCP gen ailesi konularındaki kaynakların özetleri bu bölümde sunulmuştur.

Gepts vd. (1999)'nin yaptığı α -amilaz inhibitör geninin sekans verilerinin analizi sonucu *Phaseolus vulgaris*'in yaklaşık iki milyon yıl önce *P. dumosus* ve *P. coccineus*'tan ayrılarak türleştiğini göstermişlerdir. Ayrıca yaptıkları filogenetik analizlerle *Phaseolus* türlerinin iki ana kardeş klada ayrıldığını ve *P. vulgaris*'in B kladında bulunduğunu ortaya koymuşlardır.

Delgado-Salinas vd. (2006)'nin 70 farklı *Phaseolus* türünden aldığı 143 nükleer ribozomal ITS/5.8 S sekansı ve 71 plastid trnK sekansı ile yaptıkları combined (birleşik) parsimony analizleri sonucunda *Phaseolus* cinsi türlerinin 4-6 milyon yıl önce Geç Miyosen'de Orta Amerika bölgesinden çeşitlendiğini bulmuşlardır.

Varankaya (2011) 22 farklı *Phaseolus vulgaris* genotipinde bitki boyu, dal sayısı, boğum sayısı, yaprak sayısı, bakla boyu ve sayısı tane verimi, protein oranı ve verimini tespit etmek amacıyla yaptığı çalışmada; araştırılan konuların genetik yapının kontrolüne ve iklim/toprak gereksinimlerine göre değişiklik gösterdiğini bunun sonucunda ise seleksiyon yoluyla oluşturacak ticari fasulye hattı için 7 tane genotipin daha çok üzerinde durulması gerektiğini göstermiştir.

Genel olarak bakıldığında çeşitli yollarla ekosisteme geçen ağır metallerin en çok bitkiler ve besin zinciri dolayısıyla da diğer canlılar üzerinde olumsuz etkileri olmaktadır. Ağır metaller bitkiler üzerinde yapısal ve fonksiyonel birçok molekül ve yapıya zarar vererek oksidatif strese yol açmaktadır. Oksidatif stresin sonuçlarından birisi de bitki hücresinin genetik materyallerini etkilemesidir ki bu da genotoksositeye

neden olur (Boyer 1982, Lichtenthaler 1996, Blokhina vd 2003, Asri ve Sönmez 2006, Nagajyoti 2010, Debnath vd 2011).

McGrath (1982)'nin *Avena sativa* L. cv. Manod (yulaf) bitkisine 2, 20 ve 200 µM olacak şekilde uyguladığı krom (III) ve krom (VI) çözeltileri ve kontrol grubuyla gerçekleştirdiği çalışması sonucunda yulaf bitkisinin filizlerinin ve köklerinin kontrole göre ağırlıklarının daha az olduğunu gözlemlemiştir.

Liu vd. (1992) *Allium cepa* L. bitkisine 0,2 molardan 2×10^{-7} molara kadar 7 farklı konsantrasyonla uyguladığı krom (III) ve krom (VI) çözeltileri ile bu ağır metalin kök büyümesini engellediğini ve anafaz köprüleri, kromozom yapışıklılığı, kromozom parçalanması ve gecikmesini içeren mitotik düzensizliklere yol açtığını ortaya çıkarmışlardır.

Han vd. (2003) *Brassica juncea* L. (hardal otu) bitkisine farklı konsantrasyonlarda krom (III) ve krom (VI) bileşikleri uyguladıktan sonra yaptıkları kimyasal analizler ve ışık mikroskobu, elektron mikroskobu gözlemleri sonucu, krom stresinin ksilem ve floemleri degrede ettiği, yapraklarda palizat ve sünger parenkiması hücrelerinin boyutlarını küçülttüğünü göstermişlerdir.

El-Ghamery vd. (2003)'nin *Nigella sativa* L. ve *Triticum vulgare* L. bitkileri üzerinde yaptıkları ağır metal stres çalışmasında; 5, 10, 15, 20,25 mg/l'lik çinko sülfat bileşiği 6, 12, 18 ve 24 saat boyunca uygulanmış ve bunun sonucunda bu ağır metalin *Nigella* tohumlarında çimlenme yüzdesini azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca iki bitkide de kök büyümesini engellediği bulunmuştur. 25 mg/l ve 24 saatlik ağır metal uygulamasında bu bileşiğin letal etki gösterdiği; letal olmayan konsantrasyonlar için de iki bitkide de hücre bölünmesini engelleyici etkide bulunduğu ve mitoz bölünme oranını düşürdüğü bulunmuştur.

Zengin ve Munzuroğlu (2004)'nin *Phaseolus vulgaris* cv. Strike bitkisi üzerinde yaptığı çalışmada; fasulye fidelerini 10 gün boyunca (ayrı ayrı kaplarda) hazırladıkları farklı

konsantrasyonlarda kurşun, cıva, bakır ve kadmiyum içeren Hoagland sıvı besiyerinde büyümüşler ve köklerdeki sitokinin oranının önemli oranda azaldığını gözlemlemişlerdir.

Zengin ve Munzuroğlu (2005)'nin *Phaseolus vulgaris* cv. Strike bitkisinde yaptıkları deneylerde; yedi günlük fasulye fidelerini farklı konsantrasyonlarda nikel, kobalt, krom ve çinko tuzları ile hazırladıkları Hoagland sıvı besiyerinde 10 gün bekletmiş ve bu ağır metallerin bitkinin klorofil-a, klorofil-b, total pigment-I, total pigment-II miktarlarında azalışa; karotenoid miktarında ise artışa neden olduğunu bulmuşlardır.

Sheoran vd. (1990)'nin *Cajanus cajan* bitkisine 30 ve 70 gün boyunca kadmiyum ve nikel ağır metal çözeltisi uyguladıkları çalışmalarında; erken vejetatif dönemde fotosentezin kadmiyum uygulamasında (0,5 mM) %50, nikel uygulamasında (1,0 mM) %32 azaldığını, farklı seviyelerde (%2-61) de fotosentezin karbon tepkimelerindeki önemli enzimlerin aktivitelerinin azaldığını bulmuşlardır. Geç vejetatif dönemde ise kadmiyum konsantrasyonunu artırarak (10,0 mM) bitkiye uyguladıklarında fotosentezin %86 oranında, enzim aktivitesinin %40 oranında azaldığını; nikel uygulamasında ise fotosentezin %65 azaldığını, enzim aktivitesinin ise çok az bir miktar azaldığını gözlemlemişlerdir. Kloroplast izolasyonu sonucu gözlemlenen fotosentezin azalışı; klorofil içeriğini ve stoma iletkenliğini azaltmış, yapraklardan oksijen verimini de engellemiştir.

Aldoobie ve Beltagi (2013)'nin *Phaseolus vulgaris* cv. Nebraska bitkisine uyguladığı (0,2 ppm konsantrasyonlarında) kurşun, krom, kadmiyum, nikel, çinko stresi sonucu yapılan kimyasal karbonhidrat analizi ile; bu stres türlerinin bitkinin şeker miktarını ve fotosentetik pigmentleri olan klorofil-a, klorofil-b ve karotenoid içeriğini önemli derecede azalttığını ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca bitkiden izole edilen proteinler ile SDS-PAGE analizi sonucu bitki tarafından en çok kurşun ve kromun sonra kadmiyum, çinko ve nikelin absorbe edildiği bulunmuştur.

Bitkiler doğaları gereği sesil yaşamak zorundadırlar ve yaşadıkları ortamda meydana gelen farklı çevre koşullarına direkt olarak maruz kalırlar. Bunun sonucu bitkilerde bir

takım değişiklikler olur ve bu değişiklikler sonucu bitkinin çevreye karşı verdiği cevaba stres denir. Bitkiler geliştirdikleri bir takım mekanizmalar ve barındırdıkları özellikler sayesinde stres faktörlerine karşı tepki verirler (Levitt 1972, Büyük 2012)

Luo vd. (1996 ve 1999) *Antirrhinum* bitkisinde yaptıkları çalışmada DNA'ya bağlanan proteinleri kodlayan TCP genlerine ait genlerden biri olan CYC genlerinin bitkinin petal şekillerini oluşturmada ve çiçek bilateral simetrisini oluşturduğunu göstermişlerdir.

Doebley vd. (1997)'nin *tb1* genleri mutant mısır bitkisinde yaptıkları deneylerde bitkinin aksiler meristemlerinde alttaki tomurcuklarda aşırı büyümenin engellenirken yukarıda bulunan tomurcuklarda büyümenin aşırı derecede fazla olduğunu ve bu sayede *tb1* geninin bitki gelişimi kontrolünde ve bu sayede evrimde rol oynadığını ortaya çıkarmışlardır.

Kosugi ve Ohashi (1997) pirinç bitkisinde yaptıkları cDNA analizlerinde iki farklı transkripsiyon faktörü olan PCF1 ve PCF2'nin PCNA promotor bölgesine bağlanarak çalıştığını bulmuşlardır. Ayrıca bu faktörlerin, DNA'ya bağlanan proteinler olduğunu ve homodimer ve heterodimerizasyon aktivitelerini sürdürdüğünü. PCNA geninin de DNA replikasyonunda ve onarımında yer alan bir proteini kodladığını, kromatin yapısı onarımını, kromozom ayrışmasını ve hücre döngüsü devamlılığını düzenlediğini belirlemişlerdir.

Cubas vd (1999); *tb1* ve CYC genleri arasındaki korunmuş bölgeler olan bHLH (basic helix loop helix motifi) sekonder yapılarını analiz edip, ilişkili proteinlerin fonksiyonlarını incelemişlerdir. Yapılan analizler bu korunmuş bölgelerin (bHLH motifi) N-terminalinde 59 tane amino asit kalıntısının bulunduğunu ve bu bölgenin kodladığı proteinlerin DNA'ya bağlanan proteinler ile protein-protein etkileşim süreçlerinde rol aldığını göstermiştir. Cubas vd; bu korunmuş bölgelerin DNA'ya bağlanan proteinler olan PCF1 ve PCF2'de de bulunduğunu ve bu 3 farklı proteinde de bu domain'in bulunmasının muhtemelen yeni bir transkripsiyon faktörü ailesinin tanımlanması demek olduğunu belirterek bu gen ailesini proteinlerin isimlerinin baş

harflerini alarak (TB1, CYC, PCF'ler) bu yeni aileyi TCP gen ailesi olarak nitelendirmişlerdir.

Nath vd. (2003)'nin *cin* genleri mutant olan *Antirrhinum majus* bitkisinin yapraklarının kontrole göre şekil, boyut ve eğriliklerine bakarak yaptıkları araştırma sonucu; *cin* genlerinin yaprakların gelişimi sırasında şekil, boyut ve eğriliklerinin belirlenmesinde rol aldığını ortaya çıkarmışlardır.

Schommer vd. (2008); *Arabidopsis thaliana* yapraklarından alınan ekstraktlardan izole edilmiş 5 TCP geni ile (TCP2, TCP3, TCP4, TCP10, TCP24) yaptıkları biyokimyasal ve genom boyu (biyoinformatik) analizleri ile genetik çalışmalarında; miR319 kontrolündeki bu 5 TCP geninin downstream düzenlenmesinin sonuçlarını analiz etmişlerdir. MiR319 ifadesi değiştirilmiş bitkiler ve kontrol bitkileri arasında yapılan deneylerde ifadesi değiştirilmiş bitkilerde jasmonik asit seviyesinin arttığı ayrıca senesens davranışlarının da değiştiğini gözlemlemişlerdir.

Guo vd. (2010)'nun transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkisinin yaprak TCP1 genlerinde yaptıkları brassinosteroid analizleri sonucu TCP1 geninin BR biyosentezinde anahtar rol oynayan bir enzim olan DWARF4 (DWF4)'ün fonksiyonunu pozitif bir şekilde kontrol ettiğini böylece bitki büyüme ve gelişmesinde rol aldığını göstermişlerdir. Ayrıca yaptıkları Real-Time PCR analizleri ile; TCP1 geninin DWF4 geninin transkripsiyon seviyelerini düzenlediğini, kromatin immunoçökelleme deneyleri ile TCP1'in DWF4 geninin promotor bölgesi ile etkileşim içinde olduğunu, eşodaklı mikroskop gözlemleri ile de TCP1 proteinin daha çok hücre çekirdeği sınırları içerisinde bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Danisman vd. (2012)'nin *Arabidopsis thaliana* bitkisinin I numaralı sınıfına mensup olan mutant *tcp20* geninde yaptıkları detaylı fenotipik analizleri sonucu yaprak yüzey hücrelerinin boyutlarının arttığı gözlemlemişlerdir. Ayrıca yaprak gelişimi sırasında TCP20 proteinin potansiyel hedeflerini tanımlamak için glikokortikoid reseptör indüksiyon tayini ve kromatin immunoçökelleme analizi sonucu TCP20 proteininin LİPOKSİJENAZ2 (LOX2) genini hedefleyerek LOX2 geninin microRNA kontrolünde

jasmonik asit sentezlediğini ve jasmonik asit sinyal yolağı aracılığıyla da yaprak gelişiminin kontrolünü sağlayarak Sınıf I ve Sınıf II TCP genlerinin birbirlerine zıt çalıştıklarını analiz etmişlerdir.

Li ve Zachgo (2013)'nun transgenik *Arabidopsis thaliana* bitkisinin tohum ve fidelerinde mutant TCP3 geni hakkında yaptıkları genetik analizler ve mikroskopik gözlemler sonucu, tohum ve fidelerde flavanol, antosiyaninler ve proantosiyaninlerin bulunduğu ortaya çıkmıştır. Genel olarak TCP3 proteinin flavanoid biyosentezini uyardığını ve oksinin sorumluluğundaki süreçleri negatif olarak değiştirdiğini dolayısıyla oksin ilişkili gelişimsel hataların fazlalığına neden olduğunu vurgulamışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışması Kasım 2016 ve Temmuz 2017 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Moleküler Biyolojisi I – II Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

Yapılan bu tez çalışmasında T. C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Zülbiye çeşidi fasulyeler (*Phaseolus vulgaris* L.) kullanılmıştır.

3.1.1 Zülbiye (Kuru fasulye)

Zülbiye çeşidi fasulye, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescillendirilmiştir. Bodur kuru fasulye türünde olup 100-105 günde olgunlaşır. Olgun bitki ortalama 40-45 cm boyundadır. Tohum şekli konik, tohum kabuğunun yüzeyi düzdür. Bakla kesitinden alınan kesit oval şekildedir. Olgunlaşmamış baklalar renksiz, olgunlaşmış baklalar saman sarısı rengindedir (Cengiz 2007).

3.2 Yöntem

3.2.1 Tohumların yüzey sterilizasyonu

Bu tez çalışmasında kullanılacak olan fasulye tohumlarının sterilizasyonunu gerçekleştirmek için %5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl), %70'lik etil alkol (C₂H₅OH) ve otoklavlanmış bidistile (ddH₂O) su kullanılmıştır. Seçilen yaklaşık 50 tane tohumun sterilizasyonu; beher içinde, manyetik karıştırıcıda, Çizelge 3.1' de sunulduğu gibi yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Tohum sterilizasyonunda kullanılan çözeltiler ve muamele süresi

Basamak	Süre (dk)	Çözelti
1	2	ddH ₂ O
2	5	%70'lik etil alkol
3	3	ddH ₂ O
4	20	%5'lik sodyum hipoklorit
5	2	ddH ₂ O

3.2.2 Çimlenme ortamının sterilizasyonu

Seçilen ve sterilize edilen 50 tohumu çimlendirmek için ticari olarak elde edilen perlit çimlendirme ortamı kullanılmıştır. Perlit önce %5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) ile muamele edilip sonra otoklavlanmış ddH₂O su ile yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra bez bir torbaya aktarılıp 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Bundan sonra kuruması için 70 °C sıcaklığındaki etüve konulmuştur.

Ekim kabını sterilize etmek için, kap önce sodyum hipokloritli otoklavlanmış ddH₂O su ile muamele edilmiştir. Sonra yıkanarak %70'lik etil alkol ile muamele edilmiştir. Ardından tekrar otoklavlanmış ddH₂O su ile yıkanmıştır.

3.2.3 Tohumların çimlendirilmesi

Çalışma için seçilen ve sterilize edilen 50 tohum, steril kapların içindeki steril perlit içine derinlikleri 1-2 cm arasında, birbirlerinden uzaklıkları 3-4 cm arasında olacak şekilde düzenli bir şekilde ekilmiştir.

Ekim yapılan kaplar Hoagland besin çözeltisi ile sulandıktan sonra büyüme kabine (iklim kabini/growth chamber) konulmuştur. Büyüme kabininin koşulları, 25°C, %70 oranında nemde ve 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Tohumlar trifoliat (3 yaprak) haline gelene kadar (yaklaşık 15 gün) iki gün arayla Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır.

3.2.4 Hoagland besi ortamının hazırlanması

Zülbiye çeşidine ait tohumlar, 15 gün boyunca aşağıda içeriği bulunan 1/10'luk Hoagland besi ortamı ile geliştirilmiştir. Hoagland besi ortamı içeriği Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te; Hoagland besi ortamının hazırlanışı Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.2 Hoagland besi ortamı makro besin çözeltisi içeriği (Hoagland ve Amon 1950)

Makro Besin Çözeltisi		
Ca(NO₃)₂·4H₂O	236,1 g	Her biri
KNO₃	101.1 g	1 L saf su
KH₂PO₄	136,1 g	içerisinde
MgSO₄·7H₂O	246,5 g	çözülür

Çizelge 3.3 Hoagland besi ortamı mikro besin çözeltisi içeriği (Hoagland ve Amon 1950)

Mikro Besin Çözeltisi		
H₃BO₃	2,8 g	
MnCl₂·4H₂O	1,8 g	1 L saf su
ZnSO₄·7H₂O	0,2 g	içerisinde
CuSO₄·5H₂O	0,1 g	çözülür
NaMoO₄	0,025 g	

Hoagland besi ortamı içeriğinde ayrıca FeEDTA çözeltisi de bulunur. FeEDTA yapımı aşağıdaki Çizelge 3.4'te anlatılmıştır.

Çizelge 3.4 Hoagland besi ortamı için FeEDTA çözeltisi içeriği

FeEDTA Çözeltisi		
EDTA	10,4 g	1 L saf su
FeSO ₄ .7H ₂ O	7,8 g	içerisinde
KOH	56,1 g	çözülür

FeEDTA çözeltisini hazırlarken pH değerinin 5.5 olmasına dikkat edilmiştir.

Hoagland besi ortamı, yukarıda stok çözeltileri kullanılarak aşağıda Çizelge 3.5'te verilen miktarlara göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 Hoagland besi ortamının hazırlanışı (Hoagland ve Amon 1950)

Hoagland besin ortamı		
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	7 ml	
KNO ₃	5 ml	
KH ₂ PO ₄	2 ml	1 L saf su
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 ml	içerisinde
Mikro Element Çözeltisi	1 ml	çözülür
FeEDTA	1 ml	

3.2.5 Bitki stres koşullarının oluşturulması

Bitkilerin besini daha kolay almaları ve direkt olarak strese maruz kalmaları amacıyla bitki yetiştirme uygulamaları toprak yerine sıvı besin solüsyonu (hidroponik olarak) kullanılarak yapılmıştır. Buna bağlı olarak, krom (VI) çözeltisi hazırlanan Hoagland sıvı besin ortamına eklenmiş ve bitkiler hidroponik ortama aktarılmıştır.

3.2.5.1 100 µM krom (VI) çözeltisinin hazırlanması

100 µM'lık krom (VI) çözeltisi hazırlamak için K₂Cr₂O₇ (Potasyum dikromat) kimyasalı kullanılmıştır. Potasyum dikromat konsantrasyonu ile ilgili hesaplamalar Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6 Çözeltiye eklenecek stres koşulu olan krom (VI) miktarının hesaplanması

$M(\text{Molar}) = \frac{n(\text{mol})}{V(\text{litre})}$	$n(\text{mol}) = \frac{m(\text{gram})}{m_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}$
$100 \mu\text{M} = \frac{n(\text{mol})}{1 \text{ litre}}$	$m(\text{gram}) = 0.0001 \text{ mol} \times 294,185 \text{ gram/mol}$
$n(\text{mol}) = 0,0001 \text{ mol}$	$m(\text{gram}) = 0,0294185 \text{ gr K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

0,0294 gr K₂Cr₂O₇ tartılıp daha önceden hazırlanmış olan 1 litre hacmindeki Hoagland besi ortamında çözünmüştür.

3.2.5.2 Stres koşuluna maruz kalma süresi

Bitkilerin stres koşuluna maruz kalma süreleri 3 saat ve 24 saat olarak seçilmiştir. Bitkinin stres koşuluna erken cevabını incelemek için 3 saat; geç cevabını incelemek için de 24 saatlik maruz kalma süreleri seçilmiştir.

3.2.6 Hidroponik stres ortamının hazırlanması ve stres uygulaması

Trifoliat haline gelmiş fasülye bitkileri perlit ortamından alınıp köklerindeki perlitler temizlenmiş ve tüm bitki otoklavlanmış ddH₂O su ile yıkanmıştır. Bitkiler yıkandıktan sonra 3 gruba ayrılmıştır. 3 grup için ayrı ayrı bitkilerin konulacağı viyoller hazırlanıp ayrılan bitkiler viyollerin içlerine konulmuştur.

Kontrol grubu Hoagland besi ortamı ile; 3 saat ve 24 saat deneme grubu ise 100 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ içeren Hoagland besi ortamı ile muamele edilmiştir. Hidroponik stres ortamı planı Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 Hidroponik stres ortamı

3.2.7 *P. vulgaris* bitki örneklerinin homojenizasyonu

3 ve 24 saat strese maruz kalan bitkiler bu saatlerin sonunda alınmış ve yaprakları sadece lamina (yaprak ayası) olacak şekilde petiyol kısmı (yaprak sapı) alınmadan %70’lik alkol ile sterilize edilen bistüri ile kesilmiştir. Aynı işlem kökler için de uygulanmış, kökler kesilirken dalların veya yeşil dokuların karışmamasına özen gösterilmiştir. Kesilen her doku ayrı ayrı alüminyum folyoya sarılıp üzerlerine isimleri yazılıp sıvı azot dolu kaba atılmıştır. Aynı işlem kontrol grubundaki bitkiler ve için de uygulanmıştır.

Bitki homojenizasyonu için gerekli malzemeler sterilize edilmiş $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de kullanıma kadar bekletilmiştir. Örneklere verilen kodlamalar Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Her örnek sırasıyla ayrı ayrı havanlara alınıp sıvı azot ile ezilmiş, spatula yardımı ile tüplere alınmış ve ileri aşamalarda kullanılana dek -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.8 Çalışmada kullanılan bitkilerin kodlanması

Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılacak bitkilerin kodlama sistemi

Numara	Örnek	Kodlama
①	Zülbiye - Yaprak - 3 Saat	Y 3
②	Zülbiye - Kök - 3 Saat	K 3
③	Zülbiye - Yaprak - 24 Saat	Y 24
④	Zülbiye - Kök - 24 Saat	K 24
⑤	Zülbiye - Yaprak - Kontrol	Y K
⑥	Zülbiye - Kök - Kontrol	K K

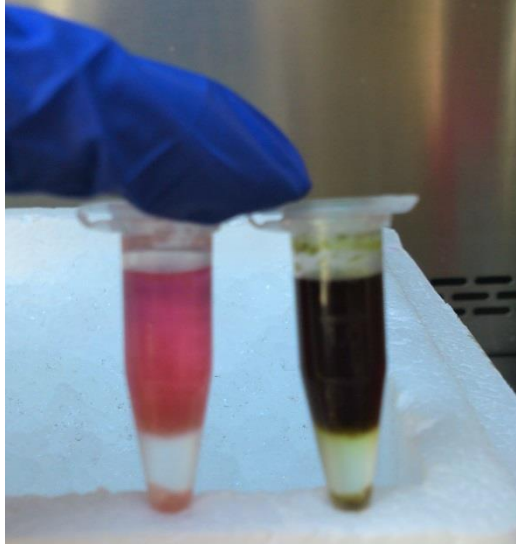
3.2.9 RNA izolasyonu

Sıvı azotla ezilip -80 °C’de muhafaza edilen homojenatlar kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu Macherey-Nagel RNA Isolation NucleoSpin® RNA protokolüne göre yapılmıştır. Deney yapılırken soğuk zincirinin aksamamasına dikkat edilmiştir.

Macherey-Nagel RNA Isolation NucleoSpin® RNA İzolasyonu Protokolü

1. Yaklaşık 500 mg örnek eppendorf tüpüne alınır. Üzerine 350 µl lizis tamponu RA1 ve 3,5 µl β-mercaptoethanol 1,5 ml’lik tüpe eklenir ve vorteks yapılır.
2. 1,5 ml’lik tüpteki lizat, mor renkli kolona aktarılır ve 1,5 ml’lik tüp; 2 ml’lik kapaksız koleksiyon tüpüne geçirilir. 11.000 g’de 1 dk santrifüj edilir.
3. Mor halkalı kolon çıkarılıp atılır, altta kalan sıvı 1,5 ml’lik tüpe aktarılır. Üzerine 350 µl %70’lik etanol koyulur ve 5 kere pipetaj yapılır.

4. Lizat açık mavi tüplere aktarılır. 2-3 kere pipetaj yapılır. 11.000 G'de 30 sn santrifüj edilir. Ardından altta kalan tüp atılır, yeni 2 ml'lik kapaksız koleksiyon tüpü takılır.
5. Lizata 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) eklenir ve 11.000 g'de 11 dk santrifüjlenir.
6. Ayrı bir 1.5 ml'lik tüpe DNaz Reaksiyon Karışımı hazırlanır: 10 µl reconstituted rDNase ve 90 µl reaksiyon tamponu eklenir. 95 µl kolonun silika membranına direkt olarak uygulanır. 15 dk boyunca 37 °C ısı bloğunda bekletilir.
7. 200 µl wash buffer RAW2 kolona eklenir. 11.000 g'de 30 sn santrifüj edilir. Kolon çıkarılır ve yeni koleksiyon tüpüne takılır.
8. Kolona 600 µl wash buffer RA3 eklenir. 11.000 g'de 30 sn santrifüj edilir. Koleksiyon tüpüne inen sıvı dökülür, kolon aynı tüpe geri takılır.
9. Kolona 250 µl wash buffer RA3 eklenir. 11.000 g'de iki dk santrifüj edilir. Kolon yeni 1,5 ml'lik tüpe takılır.
10. Kolona 40 µl RNaz bulunmayan su eklenir. 11.000 g'de bir dk santrifüj edilir.



Şekil 3.2 RNA izolatlarının görünümü (soldaki kök dokusu, sağdaki yaprak dokusu)

İzole edilen RNA'ların miktar ve saflık tayinleri ND-Spectrometer 1000 cihazı ile spektroskopik olarak ölçülerek yapılmıştır. ND-Spectrometer 1000 cihazı ile ölçüm

yaparken RNA seçeneğini seçilmiştir. Bu tayinler daha sonra yapılacak deneyler için devamlılığın sağlanıp sağlanmaması açısından önem teşkil etmektedir.

3.2.10 Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen RNA'ları incelemek amacıyla %1'lik agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. 1 g toz agaroz tartılıp erlene koyulmuştur. Üzerine 6,5 µl etidyum bromür (EtBr) eklenmiş, ardından jel tankına dökülmüştür. 7 µl yükleme boyası, 3 µl RNA olacak şekilde 10 µl'lik karışım jel kuyularına yüklenmiş ve jel yürütülmüştür. 30 dakika yürütülen jel tanktan alınıp UV cihazına konulmuş ve çift bantlar gözlemlenmiştir.

3.2.11 cDNA (Komplementer DNA) sentezi

Real Time PCR tekniğini kullanmak amacıyla RNA izolatlarından tek cDNA sentezi yapılmıştır. Sentez Biolab cDNA Synthesis Kit protokolü ile gerçekleştirilmiştir. Biolab cDNA Sentezi Protokolü Çizelge 3.8, 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.8 cDNA sentezi

1. Adım	
RNA (1000 ng/µl)	2 µl
Oligo dT	1 µl
H ₂ O	2 µl
Toplam	5 µl

Karışımdan 5'er µl her örnek için ayrı tüpe dağıtıldıktan sonra tüpler PCR cihazına yüklenir. PCR cihazında kayıtlı olan 1. adıma ait program seçilir. Reaksiyon 65 °C'de 10 dk olarak gerçekleştirildikten sonra cihaz tarafından 4°C'ye soğutulur

Bu adımdan sonra örnekler 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. Ardından Çizelge 3.11’de miktarları verilmiş olan karışım hazırlanıp tüplere dağıtılır. Dağıtım her örneğe 6’şar μl olacak şekilde yapılır.

Çizelge 3.9 cDNA sentezi

2. Adım	
Reaction mix	5 μl
Enzyme mix	1 μl
Toplam	6 μl

Örnekler PCR cihazında kayıtlı olan 2. adıma ait programa göre 70 °C’de 5 dk, 42 °C’de 60 dk, 80 °C’de 5 dk reaksiyona girdikten sonra cihazın sıcaklığı 16 °C’ye düşer ve reaksiyon tamamlanır.

Cihazdan alınan cDNA’ların saflık ve miktar tayini ND-Spectrometer 1000 cihazı ile ölçülmüştür. ND-Spectrophotometer 1000 cihazı ile ölçüm yaparken önce DNA sonra ssDNA seçenekleri seçilmiştir.

Elde edilen cDNA’lar 1/10 oranında seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi 2 μl cDNA ve 18 μl su ile yapılır. cDNA örnekleri Real Time PCR reaksiyonu yapılana kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.12 Real - Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Elde edilen cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık analizleri yapıldıktan sonra ifade analizleri Real – Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Real – Time PCR uygulamaları Roche LightCycler ® Nano cihazında, SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Deneyde kullanılmak üzere hedef gen olarak *Pvul-TCP-2*, *Pvul-TCP-3*, *Pvul-TCP-13*, *Pvul-TCP-20*, *Pvul-TCP-27* olmak üzere beş adet TCP geni seçilmiştir. Genler, İlhan

vd. 2018'nin "Transcriptome – Scale characterization of salt responsive bean TCP transcription" çalışmasında kullanılan 27 adet TCP geninin içerisinde RNAseq analizleri sonucu abiyotik stres durumuna karşılık olarak en iyi moleküler cevabı veren genler olmaları nedeniyle seçilmişlerdir.

Deneilerin kontrolünü sağlamak amacıyla da housekeeping gen olarak aktin (ACT) geni kullanılmıştır.

3.2.12.1 Real – Time PCR uygulamasında kullanılan genler ve primer dizaynı

Hedef gen olarak belirlenen *Pvul-TCP-2*, *Pvul-TCP-3*, *Pvul-TCP-13*, *Pvul-TCP-20*, *Pvul-TCP-27* genleri ve housekeeping gen olarak kullanılan aktin (ACT) genine ait diziler Plant Transcription Factor Database sitesinden alınmış ve bu dizilere ait primerler tasarlanmıştır. Genlere ait kodlanan diziler (CDS: Coding Sequence) aşağıdaki gibidir:

- **Phvul.001G089100.1:**

```
ATGGATCCCAAGAGCTCAAAGCAGCCTCTGGCACAGGAGGTGGTACCAAACCTTTCTTAGC
CTCCCCAACAACAATCACCACCACCACAGCAGCAGCAACAAGGTAACAATAACAAC
ATGGGAGAGAACAAGCCAGCAGAGATGAAGGATTTCCAGATAGTGGTTGCTGAGAAGGAT
GAGAGCAAGAAGCAGTTGGCCCCAAGAGGAGTTCGAACAAGGACAGACACACCAAGGTT
GAAGGGAGGGGAAGGAGGATAAGGATGCCTGCTCTTTGTGCAGCAAGAATCTTCCAGTTG
ACCAGAGAATTGGGTCACAAATCTGATGGGGAAACCATCCAGTGGCTTCTTCAGCAGGCT
GAGCCATCCATAATAGCTGCTACTGGAACAGGTACAATCCCAGCATCTGCTTTGGCTGCT
GCTGGCAACTCGGTTTCACCACAAGGGGCCCTCTCTTTCATCAGGGTTGCACCAAAGATT
GATGAATTGGGAGGGCCAATATGGGGTCAGGTAGCAGTAGGACCAGTTGGCAAATGGTT
GGGGGAATTTGGGAGACCCCATGTGGCCACGGGCCTATGGCCCCCATGTCAGTGGA
TTTGGATTTTCAGACATCCTCTGGTCCATCTAATGCCACCCTAGGCACTGAGAGTTCAAAT
TACCTGCAGAAGATTGGGTTCCCTGGCTTTGACTTGCCTGCTGCTGCCACCAACATGGGT
CACATGAGTTTCACCTCAATTTTGGGTGGTGGGGTACCCAGCAGATGCCTGGTTTGGAG
CTGGGGTTGTCCAGGATGGCCATATTGGTGTCTTGAATCCACTTGCTTGAGCCAGATT
TATCAGCAGATGGGTCAGGCTACTAGAGTGCAGCAGCAACAACAACAACATCAGCAA
ACTCTGCAAAGGATGATTCTCAAGGCTCAGGACAGTAG
```

• **Phvul.002G086600.1**

ATGGAATTGGAGCCTGATCATCATCAAATGGGATCCGAACCAGACCCAATTTCCCTCTG
CAGCTGTTAGAGAAAAAGGACCTTGATGACGTCACAGAGCAACCTTGTTCACCACTACC
AGGGACACTGTGCTAACTGCAACTACTATTACTACTACTTCTGCTACTAATAACAACCTC
CACTTGGCCGACCAGTCCAAAAAGCCTCCGCCAAAGAGGACTTCCACAAAGGACCGCCAC
ACCAAGGTCGATGGCCGAGGCCGCCGGATCCGTATGCCGGCGGCCTGTGCTGCCAGAGTC
TTTCAGCTCACGCGTGAGCTCGGACACAAGTCTGATGGAGAGACCATCGAGTGGCTCCTT
CAGCAGGCGGAGCCTTCCGGTCATCGCTGCCACCGGCACCGGCACCATTCCAGCCAACCTC
ACCTCCCTCAACATCTCCCTCCGCAGCTCCGGCTCCACCATGTCCGGCGCCGTGCGACTAC
TTCCGCGGAAACTACTTCAACCCTAGCACGTTCTCCACCTCCACTGCCGCGCTGCGGCT
GCGGCGCAGCTAAGGAACCGCGCAGAGTGGGACCGGAACATGAGCATGGTGTATGGAGGAT
TCTCGTAGGAGCATGTTGGAGAACAATCTTCCATCTCCGCAATTTTGAATTTTAACCCCT
ATGGGTAACATCAATGTAATTCAGCAAGCGAAACAAGAGCTTCGAGAAGAATCAGGTGGC
GGTCTTGAATTGGTGGCTACGGATTCTGATGGAAGCTTAGGGAGAAAGAGAAGGCCAGAG
CAAGAACTATCACAAATGGGAAGCTATTTGATACAATCGAGCACAGGCTCACTTCCGGCG
AGCCACGCTTCCAATACGGCGGCGTTTTGGATGGTGGCGGGTCACGGTAACCAATCCATG
AGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGCAGCAATGGTAACGATAATCCCATTTGGGCAATT
CCCTCTGTTGGGAACAGTGGGGTGTATAGAGGAGCTATGTCTCCCCGGGTGGCATTTCAT
TTCATGAATTTTGTCTTCTCCGATGCCCTTATGCCCGGTGGTCAACTAGGTTTCAAGGTATG
GTAGGTAGCGGAGGTGGCGGCAGCGGCAGTGTCTCAACTCCTAAGTGAAAGTAACCTTAGGC
ATGCTTGCGGCCCTTAATGCCTACAGACAGATTCCGGCGAACGGCGTCTCGGAGTCTCCG
GGAAGCGCTGGACAACCTCACGGCGGAGATGATGGACGTGACTCAACCAGTCAACATTCC
TGA

• **Phvul.002G086600.1**

ATGGAATTGGAGCCTGATCATCATCAAATGGGATCCGAACCAGACCCAATTTCCCTCTG
CAGCTGTTAGAGAAAAAGGACCTTGATGACGTCACAGAGCAACCTTGTTCACCACTACC
AGGGACACTGTGCTAACTGCAACTACTATTACTACTACTTCTGCTACTAATAACAACCTC
CACTTGGCCGACCAGTCCAAAAAGCCTCCGCCAAAGAGGACTTCCACAAAGGACCGCCAC
ACCAAGGTCGATGGCCGAGGCCGCCGGATCCGTATGCCGGCGGCCTGTGCTGCCAGAGTC
TTTCAGCTCACGCGTGAGCTCGGACACAAGTCTGATGGAGAGACCATCGAGTGGCTCCTT
CAGCAGGCGGAGCCTTCCGGTCATCGCTGCCACCGGCACCGGCACCATTCCAGCCAACCTC
ACCTCCCTCAACATCTCCCTCCGCAGCTCCGGCTCCACCATGTCCGGCGCCGTGCGACTAC
TTCCGCGGAAACTACTTCAACCCTAGCACGTTCTCCACCTCCACTGCCGCGCTGCGGCT
GCGGCGCAGCTAAGGAACCGCGCAGAGTGGGACCGGAACATGAGCATGGTGTATGGAGGAT
TCTCGTAGGAGCATGTTGGAGAACAATCTTCCATCTCCGCAATTTTGAATTTTAACCCCT
ATGGGTAACATCAATGTAATTCAGCAAGCGAAACAAGAGCTTCGAGAAGAATCAGGTGGC
GGTCTTGAATTGGTGGCTACGGATTCTGATGGAAGCTTAGGGAGAAAGAGAAGGCCAGAG
CAAGAACTATCACAAATGGGAAGCTATTTGATACAATCGAGCACAGGCTCACTTCCGGCG
AGCCACGCTTCCAATACGGCGGCGTTTTGGATGGTGGCGGGTCACGGTAACCAATCCATG
AGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGGCAGCAATGGTAACGATAATCCCATTTGGGCAATT
CCCTCTGTTGGGAACAGTGGGGTGTATAGAGGAGCTATGTCTCCCCGGGTGGCATTTCAT
TTCATGAATTTTGTCTTCTCCGATGCCCTTATGCCCGGTGGTCAACTAGGTTTCAAGGTATG
GTAGGTAGCGGAGGTGGCGGCAGCGGCAGTGTCTCAACTCCTAAGTGAAAGTAACCTTAGGC
ATGCTTGCGGCCCTTAATGCCTACAGACAGATTCCGGCGAACGGCGTCTCGGAGTCTCCG
GGAAGCGCTGGACAACCTCACGGCGGAGATGATGGACGTGACTCAACCAGTCAACATTCC
TGA

• **Phvul.006G166600.1**

ATGGAAGAGGATGAGATTCAAGCACAGGCAGTGTGTAAGTTTCCTAGAGTTGGAAATGGA
AGGAGCGAGCAATACCAAGAGGAGGAAGAAGAAGGAGACATAAGAAGAAGAGGTATTGGT
GGTGGTGGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGTGATGCTAGTACAAACCATTTCCAA
AGCAGTTGGCACCCTCTTCGAGAATCATAAGGGTTTCTCGTGCATCTGGTGGCAAAGAC
AGGCACAGCAAGGTGATGACTTCAAAGGGGTTAAGAGATAGAAGGGTTAGGCTCTCGGTG
ACCACAGCCATTAGTTCACGACCTTCAAGATCGGTTGGGTTATGACCAACCTAGTAAG
GCTGTGGAGTGGTTAATCAATGCTGCTTCAGATGCTATCTCAGAGCTCCCTTCTCTCAAC
AACCCTTCCCTGATACCCCTAAGCAGCCAAGTGATGAGAAAAGGCCAACTAGTGGTCAA
CGTGGTGGTCAACCACAGGCCTTTGACGAGGTAGATGGAGACACCAATTTCTCCAGCAA
AGCCAAAACCAAAGCCAGAACCTCTCTCTCTCCAAGTCCGCTTGTAGCAGCACTTCCGAG
ACAAGCAAGGGTTCAGGCTTGTCCCTCTCAAGGTCTGAGATCCGTGTGAACCGTGTGAAG
GCAAGGGAGAGGGCAAGGGTAAGAGCAGCAAAAAGAGAAGGGAAAAGATAGGGACAAGGAG
AAAGAGAAAGAGAAAGAGAACGAGTCTGGCGTTGCACACCACCACCACCACCACAAT
GTGAACAACCCCAACCATATGTCTCACACTGCTTCCTTCACTGAGCTTCTCACTGGTGGG
ATTGGGAGCACAGTAACAGTTAACCCACCACCACAGCAAGTCCTAACGGATCATCTGTT
CATCAGATCCATGAGGGTCATGATGAGGCCAATCTATTCCACAAGGGAAAGACAACAACAA
CATTGGTCTTCAACAGTGACACCAATGGACTACTTCAGCCCAGGAGGCCTCTTGGTGGGA
CCTTCTTTCATCATCTGCAAGAAATCAACACCAACATCAACATCAACATCAATCTTCTTCA
GGACAGTTCCAATGGGACATGCCCTTCCCATCTCACCATTAGTGGAGAAAACCACTCG
GATCAGCTGCAGCATTTTTCTTTCATGCCAGACCCTTAACATGCCAGCTGTGGTCACT
TCTTCTTCTTCTGCTTCTCAGCCCAGCGGGGTGACAATTACAACCTCAACTTCAGCATC
TCTTCGGGCCTTGTGCTTTCAATAGGGGGACCCTTTCAGTCCAATTCTCCGTCTTTTTTG
CCTCACCTCCAGAGGTTTTCAACCTTTAGACGGATCATCCAATCTACCTTTCTTCATTGGA
GCTCCTGCTCCTTCTTCTGCTCCTCCAACCATGACACCAACAACAATAACAACCACCAC
CACCTTCAGTTCTCTCCCGTCTTCGATGGCCGCTTGAACCTTTGCTATGGCGATGGAACC
AGGCATTCTGACCACAAGGGCAAGGGAAAGAACTAA

• **Phvul.011G156900.1**

ATGGGAGAATCACAGAACCACCTTCTCCTTACCAAACAGCAACACCGTCGAGATCGACG
ATGAGAGGCGGGCGGCTCGGGGAGATCGTGGAGGTGCAAGGCGGCCACATTGTCCGCTCC
ACCGGGCGGAAGGACCGCCACAGCAAGGTCTGCACTGCAAAAAGGCCCCAGAGACCGCCGT
GTGCGCCTGGCGGGCGCACACCGCCATCCAATTCTACGACGTCCAGGACCGCCTCGGCTAT
GACCGCCCCAGCAAGGCGGTGGACTGGCTCATAAAAAAGCTAAGGCGGCCATCGACGAG
CTCGCAGAGCTCCCACCGTGGAAACCGACGGCCACGTCAATGCAACCGCCTCAGCAACAG
GAAATCGTCTCCGCGACAACAAGTCTCTCTATAGAAGACCCAATAGCCTTTGGCAGC
CGTGGCGAGAGCAACGTTGTCTCCGGCGCTACCAGAGTTCAAGAACAATTTTCTCACCAA
CAGTTGGAGAGTGAATGCTAACATGAGCAACAGCAAGTACAACAGTGGTCCGGGTTTTT
CTGCCACCGTCTTTGGACACTGATAACATTGCTGAGACAATCAAGACTTTCTTTCCCGTC
GAAGCTACCACGACGTCATTTTCAGAGTTACCTCCGCCGGCACCAGGATTTGAGGCAGCAA
GATCTTCGTTTGTGCTTGCAGTCTTTTCAGGACCCTATCATGCTTCAGCAAGAGCCTCAG
AGCCACCACGAGCCTGTGCTGTTCCGCCGAGCGACGCTCGGCTTCGACGGCGGTTCCGGC
TGGTCGGAGCACCAGCACCACCTCGGAGGAGCATAGGTTTCTCTTTGGTGGCAACAGT
GGCCATGGCGGTGGGTTTTGTGTTCAACACGCCGGCGCCGGCGTTTTGGCCAATTTTTTTCT
CAGAGGGGACCCCTTCAGTCCAGTAACACCCCTTCAGTTCGTGCTTGGATAGACCCTTCG
GTCGATCACCACCACCAACCATCACTACCTCTCGTTCGCTGATCCACCAGGGCTCCGTC
GCTGGCGGCTTCTCCGCCGGTGGTGGATTCTCTGGCTTCCGCATTCCAGCACGAATTCAG
GGTGAAGAGGAACACGACGGCGTATCCGACAAGCCGTCTCTGCTTCTCTGATTCTCGC
CATTGA

- **ACT – Aktin Geni** (NCBI, Entrez Gene ID: CV537379)

```
GGTACCTCAGCCACACACATACACACACAAATTTACAAACTTCGAAAAACACGACACA
CTCTCATAACACACACGTTGTGCGACACACATTCCTTCTTTCCGCAGCAACAAACGTCCTT
ACCTTAAACGACAATGGCCGATGCCGAGGATATTTCAACCCCTAGTCTGCGATAATGGAAC
TGGAATGGTCAAGGCTGGTTTTGCCGGAGATGATGCTCCGAGGGCGGTGTTTCCTAGCAT
TGTGGGACGCCCACGTCACACTGGGGTGATGGTTGGGATGGGGCAGAAGGATGCGTATGT
TGGGGACGAGGCTCAATCGAAGAGGGGTATTTGACTCTGAAATACCCTATTGAGCATGG
GATTGTGAGTAATTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCT
TCGTGTGGCTCCTGAAGAACACCCCGTGCTTCTCACCGAGGCACCGCTTAATCCTAAGGC
TAATCGTGAGAAAAATGACTCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACTCCTGCTATGTATGT
TGCCATCCAAGCTGTGCTTTCCCTTTACGCTAGTGGCCGTACAACCTGGTATTGTTCTGGA
CTCCGGAGACGGTGTGAGTCACACGGTTCTATCTATGAAGGCTATGCCCTCCCGCATGC
AATCTTGCCTTTGGACCTTGCAGGGCGTGATCTCACCGATGCCCTCATGAAAATCCTGAC
CGAGCGTGGTTACTCTTTCACCACATCTGCAGAGCGGGAAATTGTGAGGGACAT
```

Hedef gen olarak seçilen beş TCP geninin isimlendirilmesi ve bilgileri Çizelge 3.12’de verilmiştir

Çizelge 3.10 Hedef olarak seçilen TCP genlerinin bilgileri

TCP Numarası	Plant TFDB’deki Adı	Uzunluk (amino asit)	Moleküler Ağırlık (kDa)	İzoelektronik Nokta (pI)
<i>Pvul-TCP-2</i>	Phvul.001G089100.1	312	33.1469	9.01
<i>Pvul-TCP-3</i>	Phvul.002G086600.1	420	44.2139	6.84
<i>Pvul-TCP-13</i>	Phvul.006G166600.1	511	55.6474	7.24
<i>Pvul-TCP-20</i>	Phvul.009G188100.1	385	42.1512	6.55
<i>Pvul-TCP-27</i>	Phvul.0011G156900.1	381	41.6798	6.28

Çalışmada kullanılacak olan TCP genleri için dizayn edilmiş primer dizileri Çizelge 3.13’te verilmiştir.

Çizelge 3.11 TCP genlerinin primer dizileri

Genin Adı	Forward Primeri (5'→3')	Reverse Primeri (5'→3')	Primer Uzunluğu (bç)
<i>Pvul-TCP-2</i>	GGGCCTCTCTTTCATCAGGG	CCCCAACCATTGCCAACTG	99
<i>Pvul-TCP-3</i>	GCCAACTTCACCTCCCTCAA	CTCATGTTCCGGTCCCCTC	173
<i>Pvul-TCP-13</i>	CCTCCAGCAAAGCCAAAACC	ACACGGTTCACACGGATCTC	126
<i>Pvul-TCP-20</i>	CCTCCAACCTCAACCCCATCC	CTTTGGTGTGGCGGTCTTTG	114
<i>Pvul-TCP-27</i>	CCATCACTACCTCTCGTCGC	GGCGAGAATCAGAGGAAGCA	161
ACT	TGAGCAAGGAGATTACAGCATTGG	CATACTCTGCCTTCGCAATCCAC	150

3.2.12.2 Real – Time PCR reaksiyonları

Analizlerde kullanılacak olan beş TCP geni ve aktin geni için optimizasyon koşulları denenmiştir. Reaksiyonlarda kullanılan cDNA'lar 1/10 seyreltme yapıldıktan sonra Real – Time PCR reaksiyonları kurulmuştur (Çizelge 4.2). Reaksiyonlar Roche Diagnostics Light Cycler ® Nano cihazında SYBR Green I Master Mix boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Real – Time PCR reaksiyonlarına ait bileşenler Çizelge 3.12'te verilmiştir.

Çizelge 3.12 Real – Time PCR protokolünde kullanılacak reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
cDNA	2
Forward Primer	0,7
Reverse Primer	0,7
SYBR Green I Boyası	5
Su	1,6

Her gen için 10 birim hacminde PCR karışımı hazırlanmış, Çizelge 3.7’de verilen hedef bölgelerin her birisi için reaksiyonlar kurulmuştur. Reaksiyonlar kurulduktan sonra PCR tüpleri Roche Light Cycler ® Nano cihazına yerleştirilmiş ve reaksiyon koşulları bilgisayardan Light Cycler ® Nano Software programına girilmiştir. Light Cycler ® Nano Software programına girilen reaksiyon koşulları Çizelge 3.13’te verilmiştir.

Çizelge 3.13 Real – Time PCR reaksiyonlarının koşulları

Program	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	600 s (10 dk)	1
Denatürasyon	95	15	
Bağlanma	60	20	45
Uzama	72	20	
Erime Eğrisi Analizi	60-95	Sürekli okuma	1

3.2.13 Normalizasyon hesaplamaları

Gen ifadesi analizi; deney grubunun Cq değerleri ile housekeeping gen olan aktin (ACT) ve kontrol grubunun Cq değerleri esas alınarak yapılmıştır. Sonuçları normalize etmek amacıyla aşağıda detayları verilmiş olan Livak ve Schmittgen’e ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001). Bu yöntemin hesaplamaları

4. BULGULAR

4.1 RNA İzolasyonu Sonuçları

Machery-Nagel RNA Isolation NucleoSpin® protokolüne göre izole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık tayini NanoDrop® ND-Spectrometer 1000 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 RNA izolasyonu sonucu izole edilen RNA’ların saflık ve miktar tayini sonuçları

Örnekler	Saflık (260/280 nm)	Miktar (ng/µl)
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	2,15	418,1
Zülbiye – Yaprak – 3saat	2,15	571,9
Zülbiye – Yaprak – 24saat	2,16	1070,9
Zülbiye – Kök – Kontrol	2,09	160,0
Zülbiye – Kök – 3saat	2,10	98,0
Zülbiye – Kök – 24saat	2,11	102,0

4.2 cDNA Sonuçları

İzole edilen cDNA’ların miktar ve saflık tayini sonuçları Çizelge 4.2’te verilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu için cDNA miktarlarının yaklaşık 100 ng olması gerekmektedir.

Çizelge 4.2 cDNA izolasyonu sonucu izole edilen cDNA'ların saflık ve miktar tayini sonuçları

Örnekler	Saflık (260/280 nm)	Miktar (ng/µl)
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	1,89	1036,2
Zülbiye – Yaprak – 3saat	1,89	971,4
Zülbiye – Yaprak – 24saat	1,89	952,9
Zülbiye – Kök – Kontrol	1,85	796,2
Zülbiye – Kök – 3saat	1,85	820,9
Zülbiye – Kök – 24saat	1,85	814,1

4.3 Real – Time PCR Sonuçları

TCP ve ACT genlerine ait Cq ve Tm değerleri Çizelge 4.3 – 4. 8'de ifade edilmiştir. Cq değeri; PCR reaksiyonuna ait pik profilinde logaritmik artış fazına geçilen döngüyü; Tm değeri; çift zincirli DNA'nın %50'sinin denatüre olduğu sıcaklığı ifade eder.

Çizelge 4.3 RT-PCR sonucu TCP2 genine ait Cq değerleri

Örnekler	Cq Değerleri
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	27,284
Zülbiye – Yaprak – 3saat	26,364
Zülbiye – Yaprak – 24saat	27,088
Zülbiye – Kök – Kontrol	28,585
Zülbiye – Kök – 3saat	26,519
Zülbiye – Kök – 24saat	27,825

Çizelge 4.4 RT-PCR sonucu TCP3 genine ait Cq değerleri

Örnekler	Cq Değerleri
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	28,59
Zülbiye – Yaprak – 3saat	27,492
Zülbiye – Yaprak – 24saat	27,92
Zülbiye – Kök – Kontrol	29,005
Zülbiye – Kök – 3saat	26,869
Zülbiye – Kök – 24saat	31,117

Çizelge 4.5 RT-PCR sonucu TCP13 genine ait Cq değerleri

Örnekler	Cq Değerleri
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	27,746
Zülbiye – Yaprak – 3saat	25,678
Zülbiye – Yaprak – 24saat	27,024
Zülbiye – Kök – Kontrol	29,296
Zülbiye – Kök – 3saat	27,971
Zülbiye – Kök – 24saat	29,691

Çizelge 4.6 RT-PCR sonucu TCP20 genine ait değerleri

Örnekler	Cq Değerleri
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	28,055
Zülbiye – Yaprak – 3saat	26,802
Zülbiye – Yaprak – 24saat	28,001
Zülbiye – Kök – Kontrol	28,813
Zülbiye – Kök – 3saat	27,234
Zülbiye – Kök – 24saat	28,392

Çizelge 4.7 RT-PCR sonucu TCP27 genine ait Cq değerleri

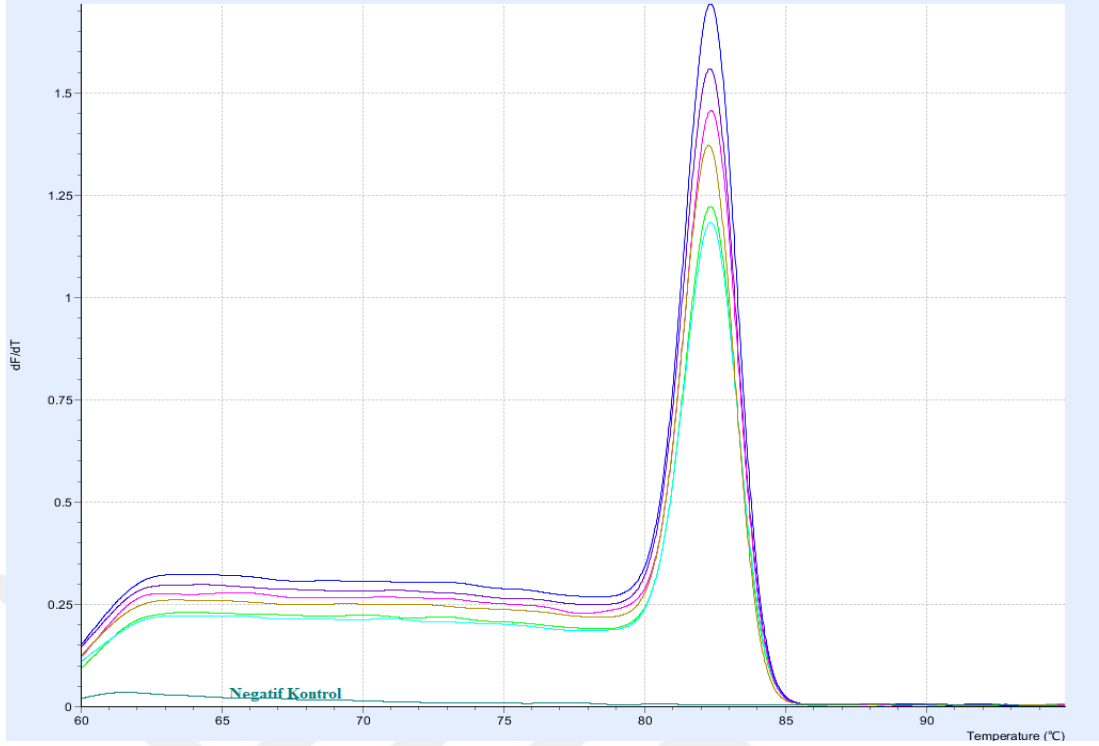
Örnekler	Cq Değerleri
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	29,,906
Zülbiye – Yaprak – 3saat	27,688
Zülbiye – Yaprak – 24saat	28,895
Zülbiye – Kök – Kontrol	29,616
Zülbiye – Kök – 3saat	27,456
Zülbiye – Kök – 24saat	28,485

Çizelge 4.8 RT-PCR sonucu ACT genine ait Cq değerleri

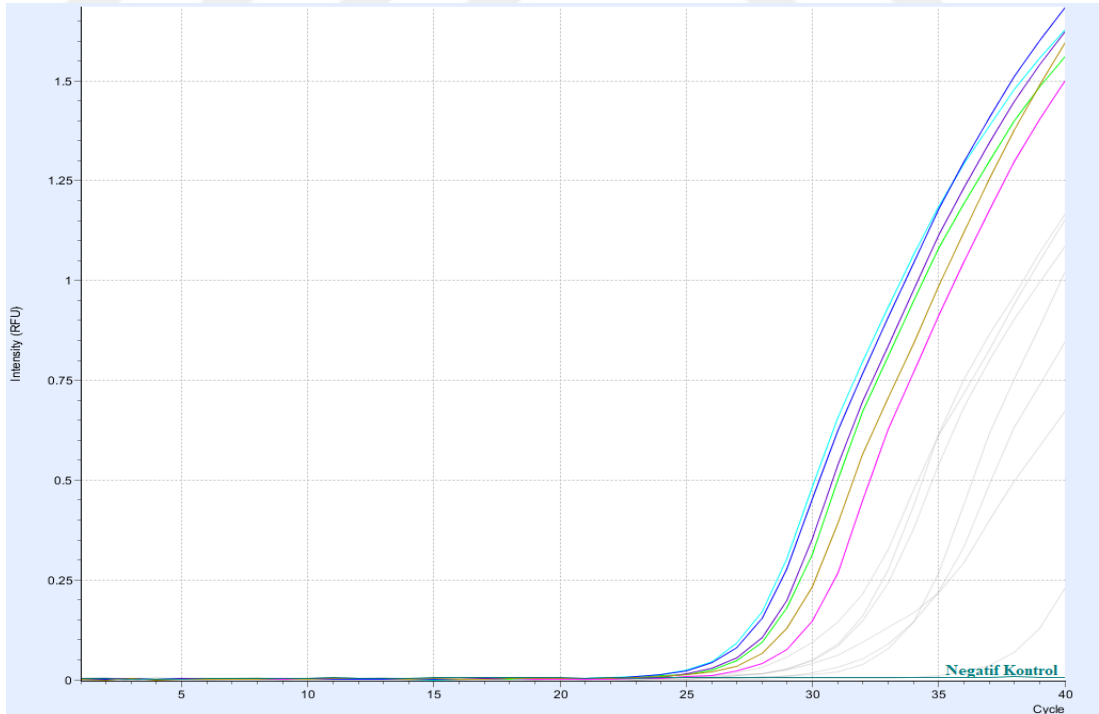
Örnekler	Cq Değerleri
Zülbiye – Yaprak – Kontrol	31,907
Zülbiye – Yaprak – 3saat	28,675
Zülbiye – Yaprak – 24saat	30,312
Zülbiye – Kök – Kontrol	32,891
Zülbiye – Kök – 3saat	28,759
Zülbiye – Kök – 24saat	32,208

4.4 Real – Time PCR

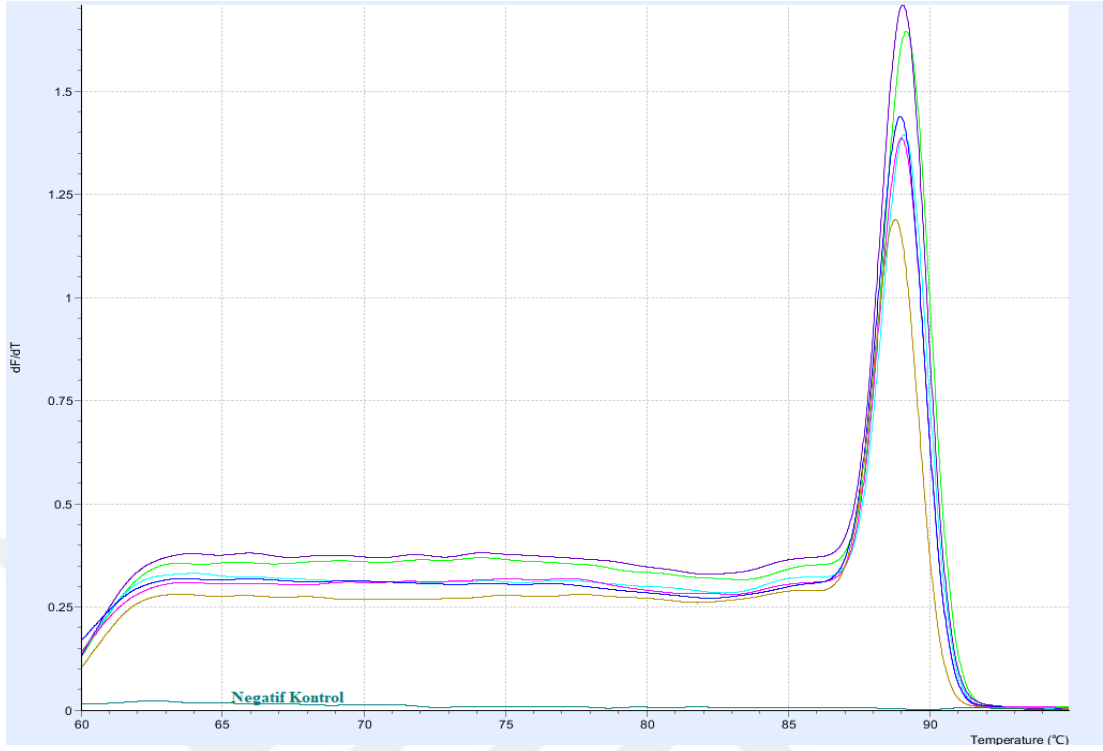
Real – Time PCR reaksiyonlarının erime eğrisi (melting curve) ve standart eğri grafikleri Şekil 4.1 – Şekil 4.12’de verilmiştir. Erime eğrisi grafikleri Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.8 arasında Tm değeri olarak verilen değerlerin grafiksel olarak gösterimidir. Aynı zamanda standart eğri grafiklerinde de Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.8 arasında Cq değeri olarak verilen değerlerin grafiksel olarak gösterimleri verilmiştir.



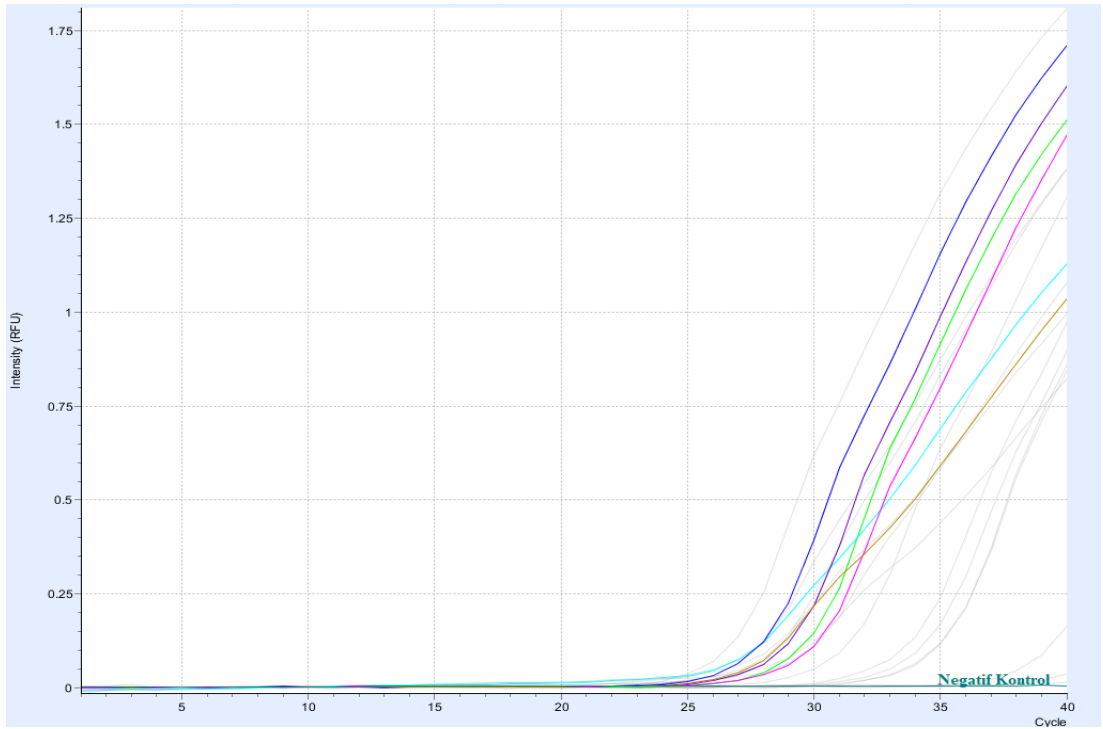
Şekil 4.1 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP2 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği



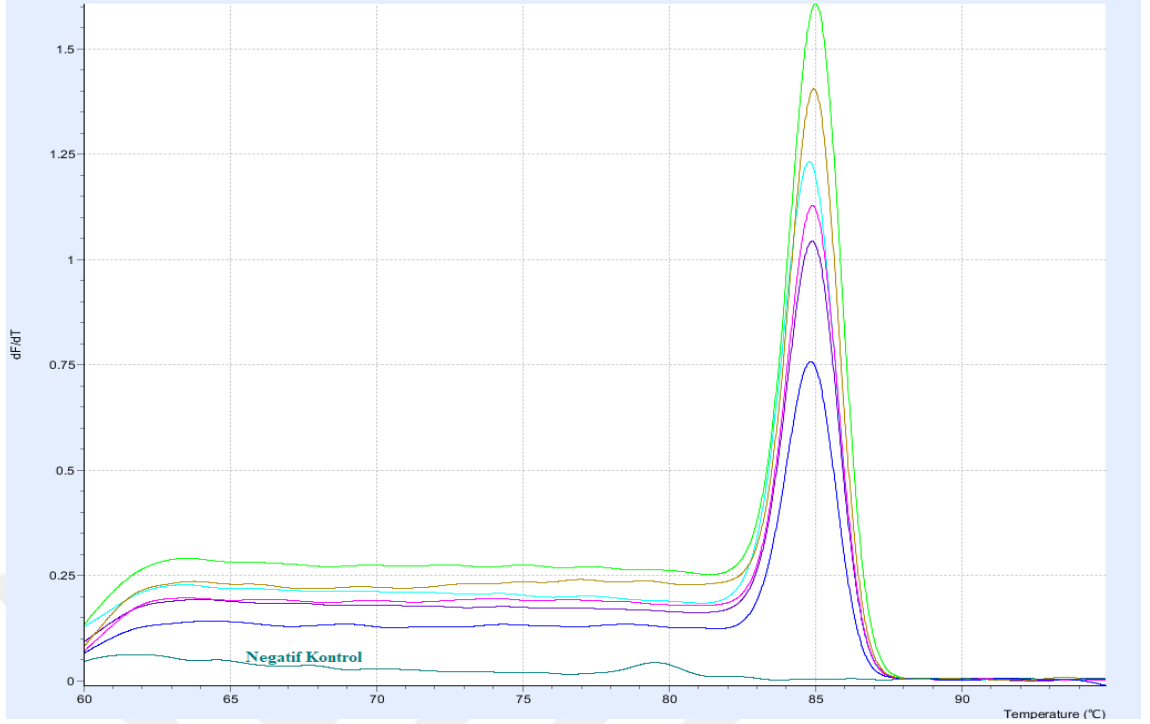
Şekil 4.2 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP2 genine ait standart eğri grafiği



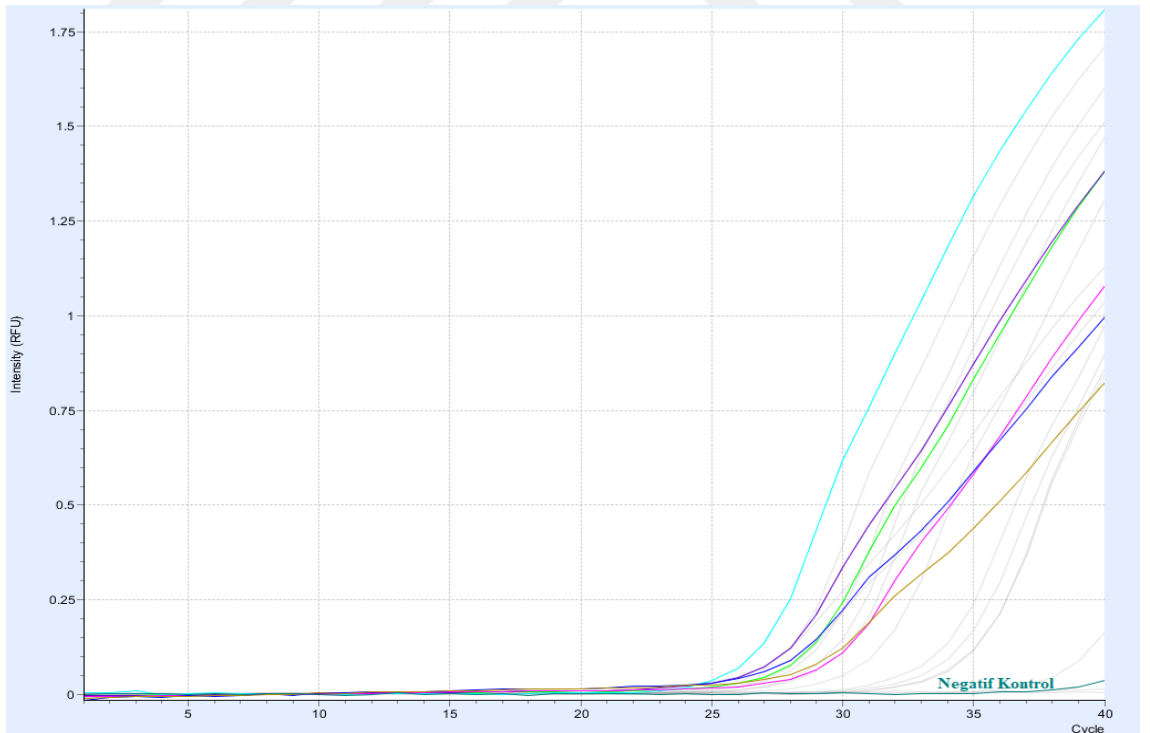
Şekil 4.3 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP3 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği



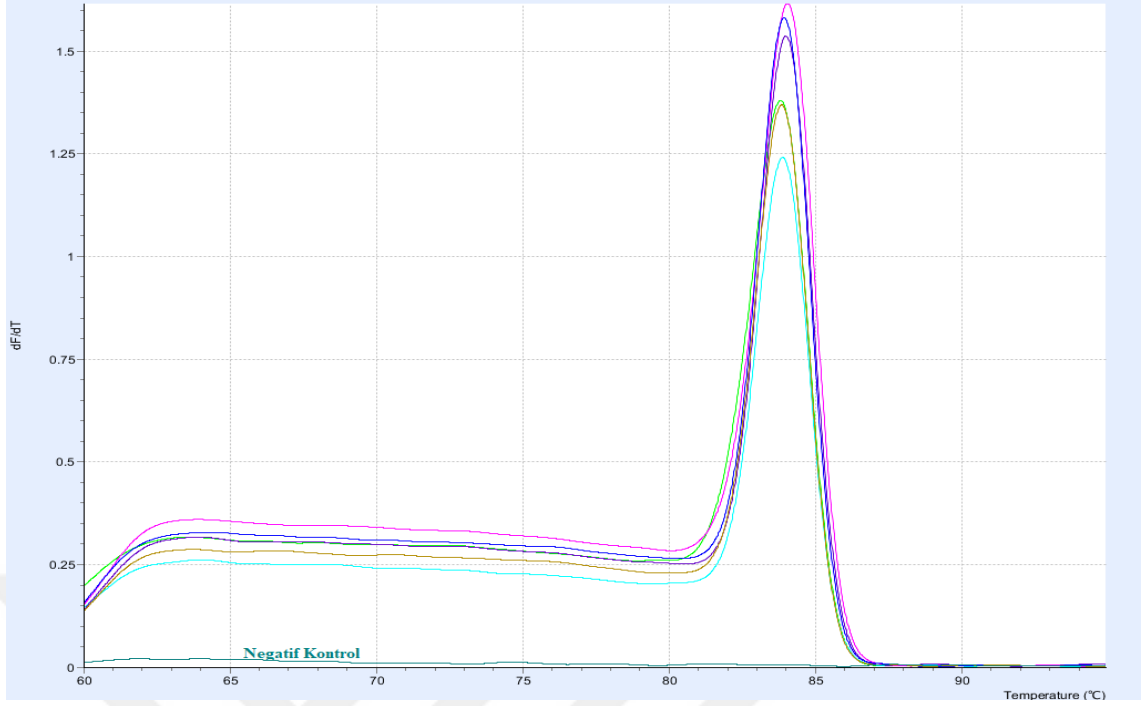
Şekil 4.4 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP3 genine ait standart eğri grafiği



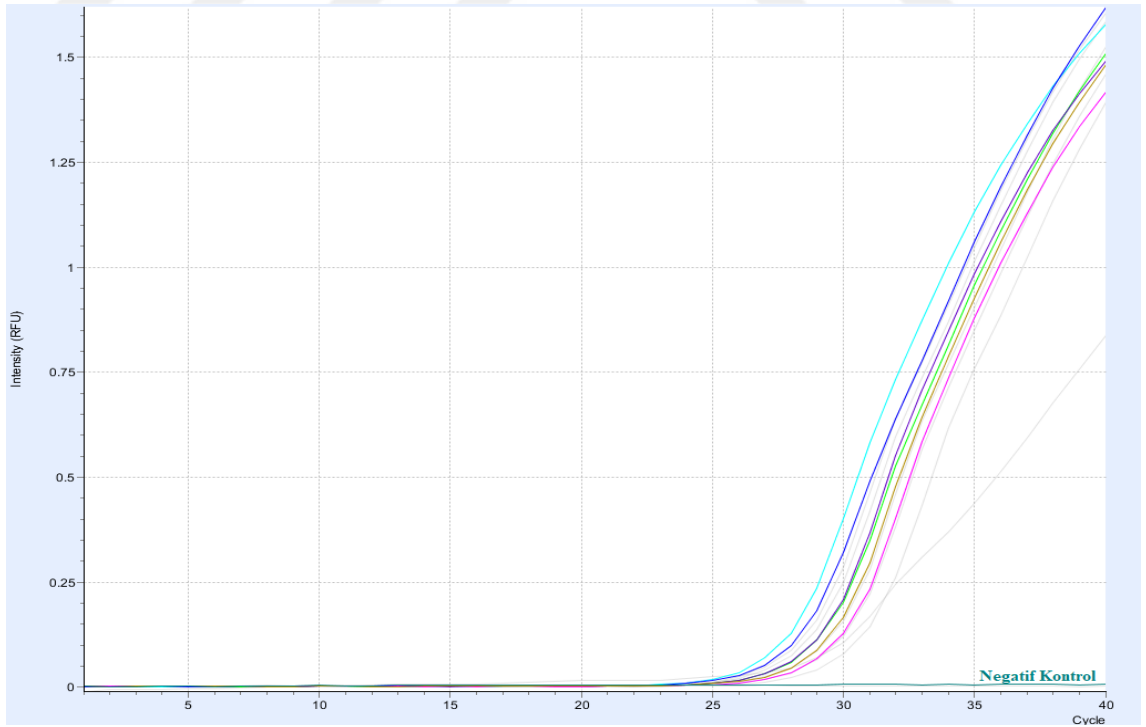
Şekil 4.5 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP13 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği



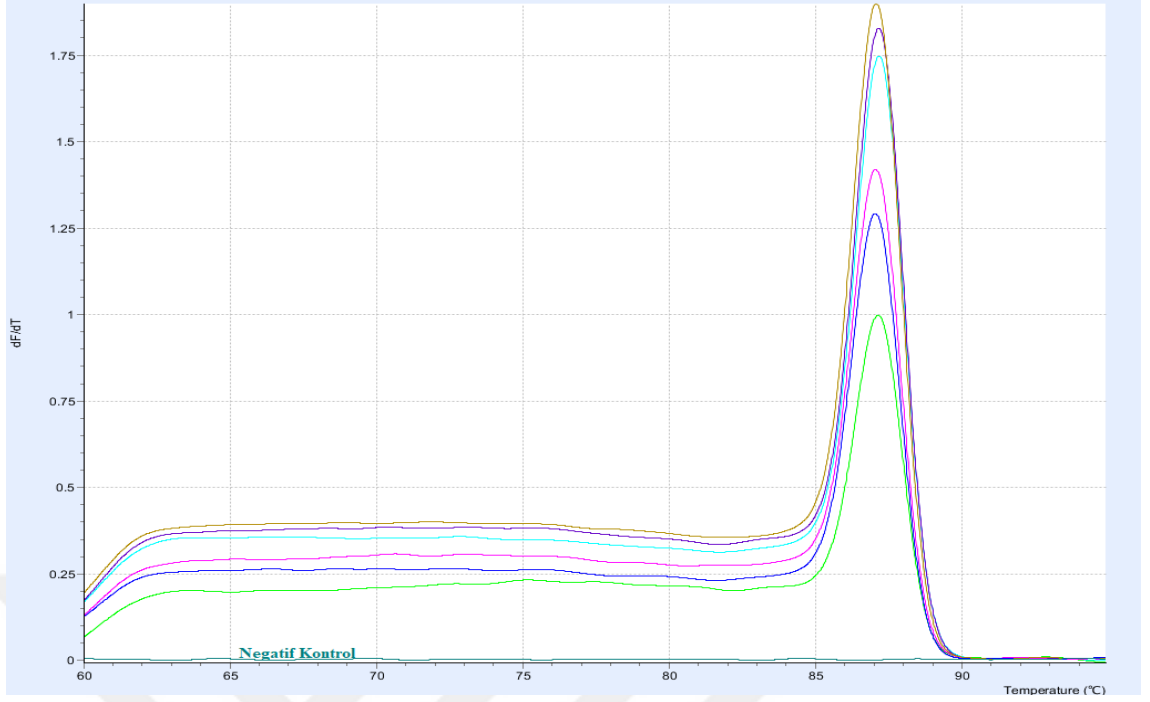
Şekil 4.6 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP13 genine ait standart eğri grafiği



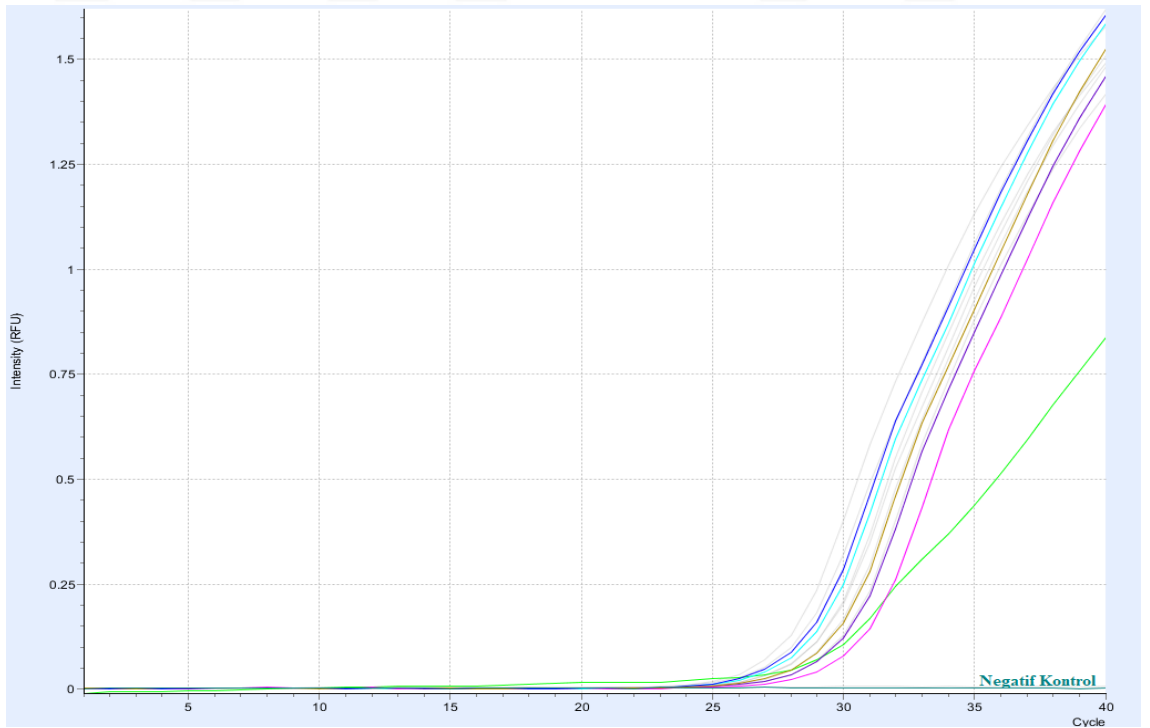
Şekil 4.7 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP20 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği



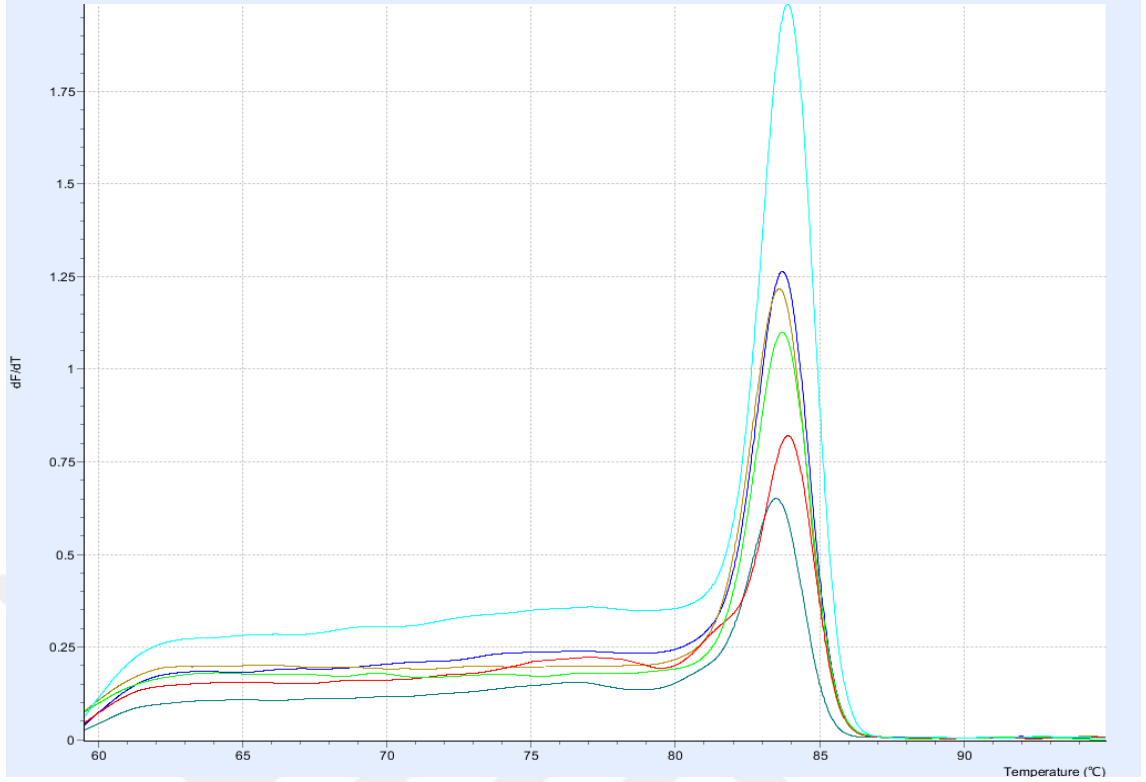
Şekil 4.8 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP20 genine ait standart eğri grafiği



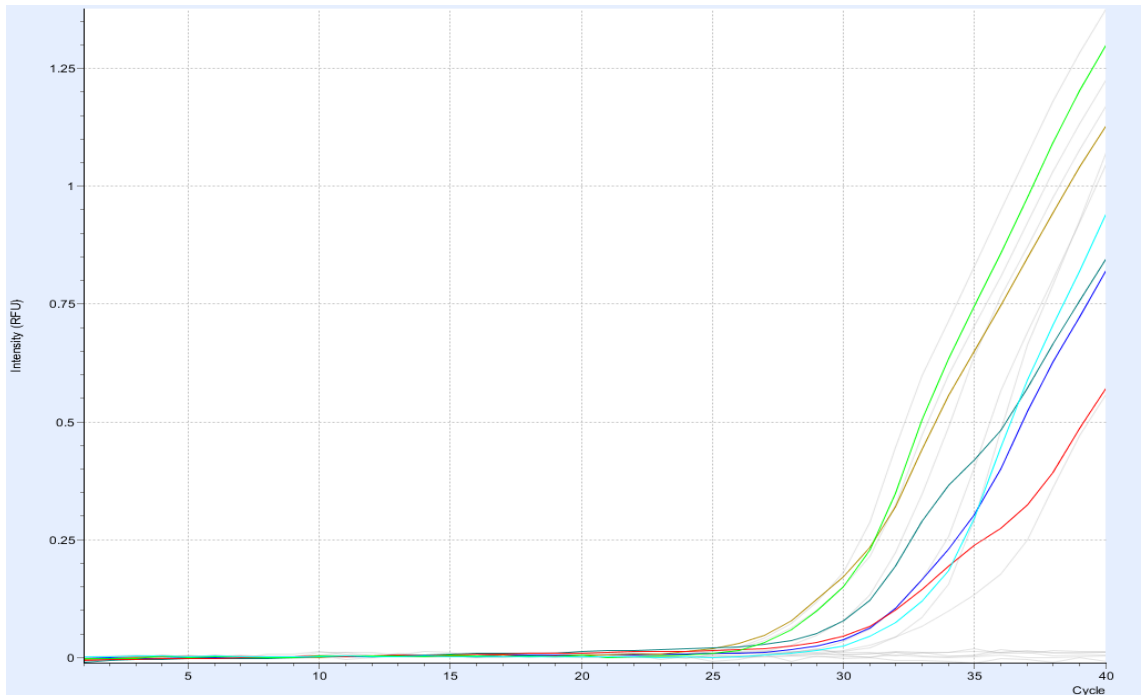
Şekil 4.9 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP27 genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği



Şekil 4.10 RT-PCR reaksiyonları sonucu TCP27 genine ait standart eğri grafiği



Şekil 4.11 RT-PCR reaksiyonları sonucu ACT genine ait erime eğrisi (melting curve) grafiği



Şekil 4.12 RT-PCR reaksiyonları sonucu ACT genine ait standart eğri grafiği

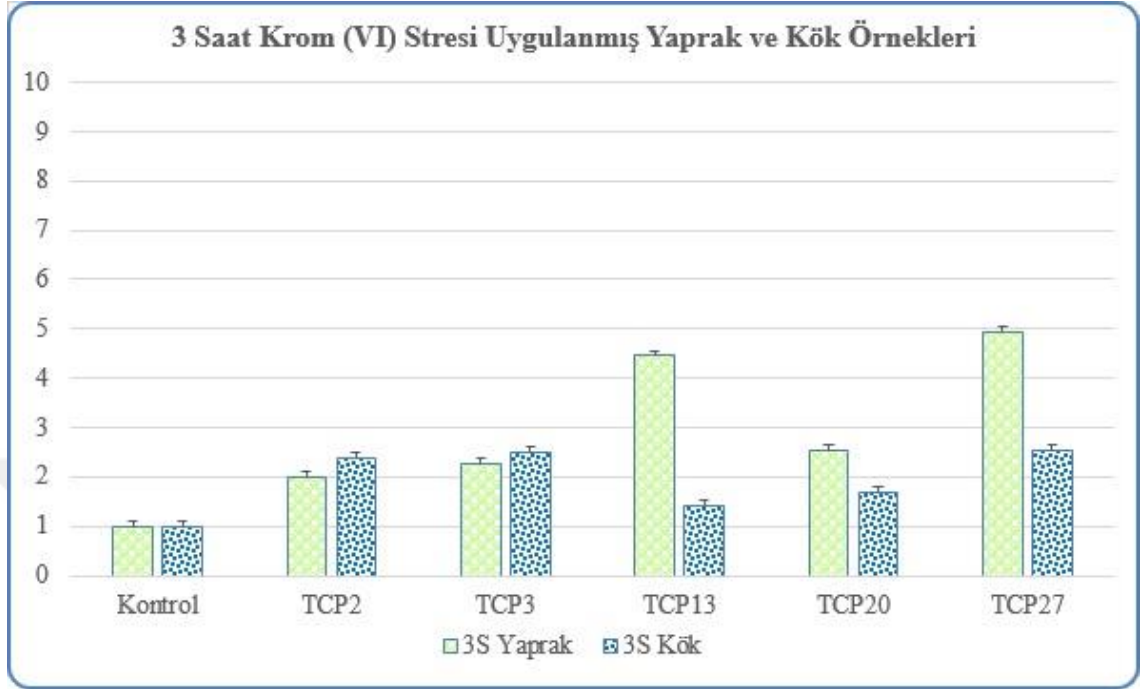
4.5 Normalizasyon

Hedef gen olan TCP genlerinin ifadelerine ait sonuçlar, ACT geni sonuçları ve kontrol grubu sonuçları kullanılarak Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001).

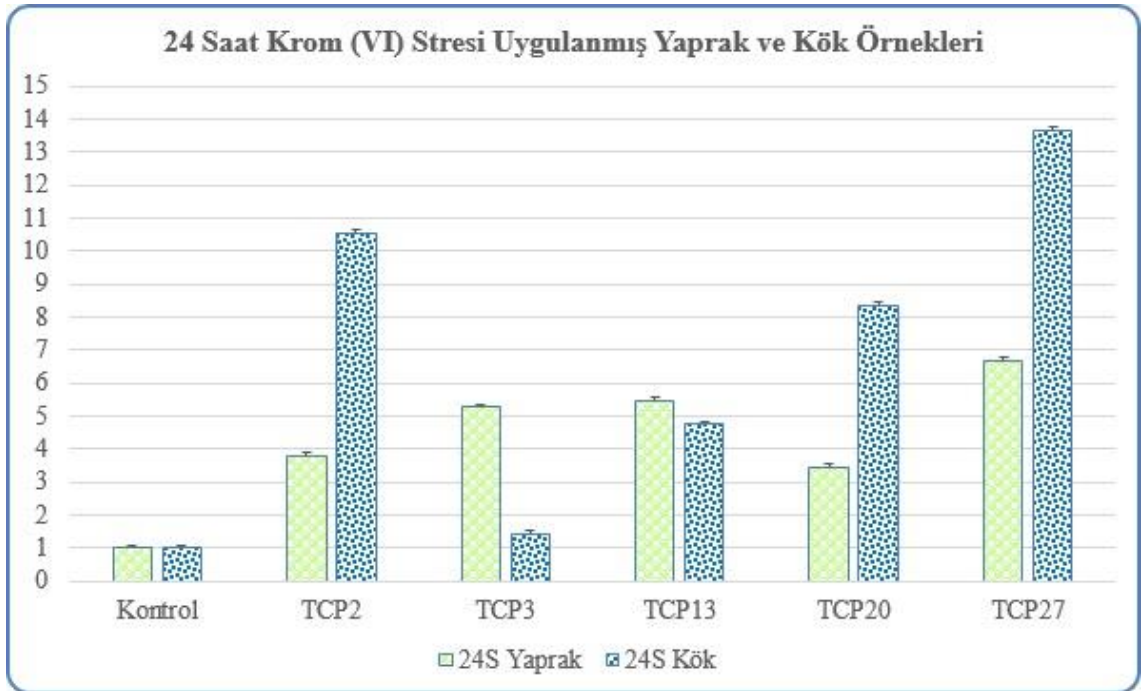
Çizelge 4.9 Kontrole göre normalize edilmiş tüm bitki örneklerinin TCP genlerine ait mRNA ifade düzeyleri

<i>Örnek İsmi</i>	<i>Genler</i>	<i>mRNA İfade Düzeyleri</i>
<i>Yaprak – 3 Saat</i>	TCP2	2,013810728
	TCP3	2,278253202
	TCP13	4,462734857
	TCP20	2,536656366
	TCP27	4,95171436
<i>Yaprak – 24 Saat</i>	TCP2	3,791918863
	TCP3	5,26680518
	TCP13	5,460102729
	TCP20	3,436471739
	TCP27	6,671115848
<i>Kök – 3 Saat</i>	TCP2	2,388207341
	TCP3	2,50694109
	TCP13	1,428922919
	TCP20	1,704003259
	TCP27	2,548994207
<i>Kök – 24 Saat</i>	TCP2	10,54822317
	TCP3	1,440857933
	TCP13	4,736850353
	TCP20	8,339310438
	TCP27	13,64147835

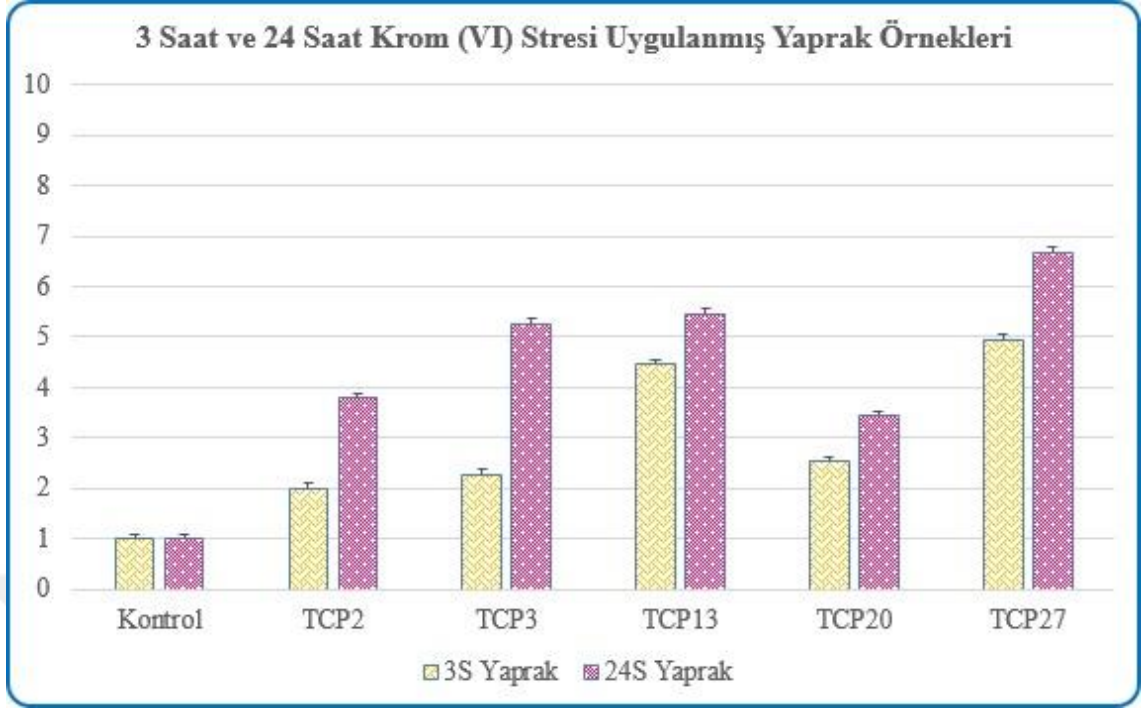
4.6 TCP genlerine ait mRNA Düzeyleri



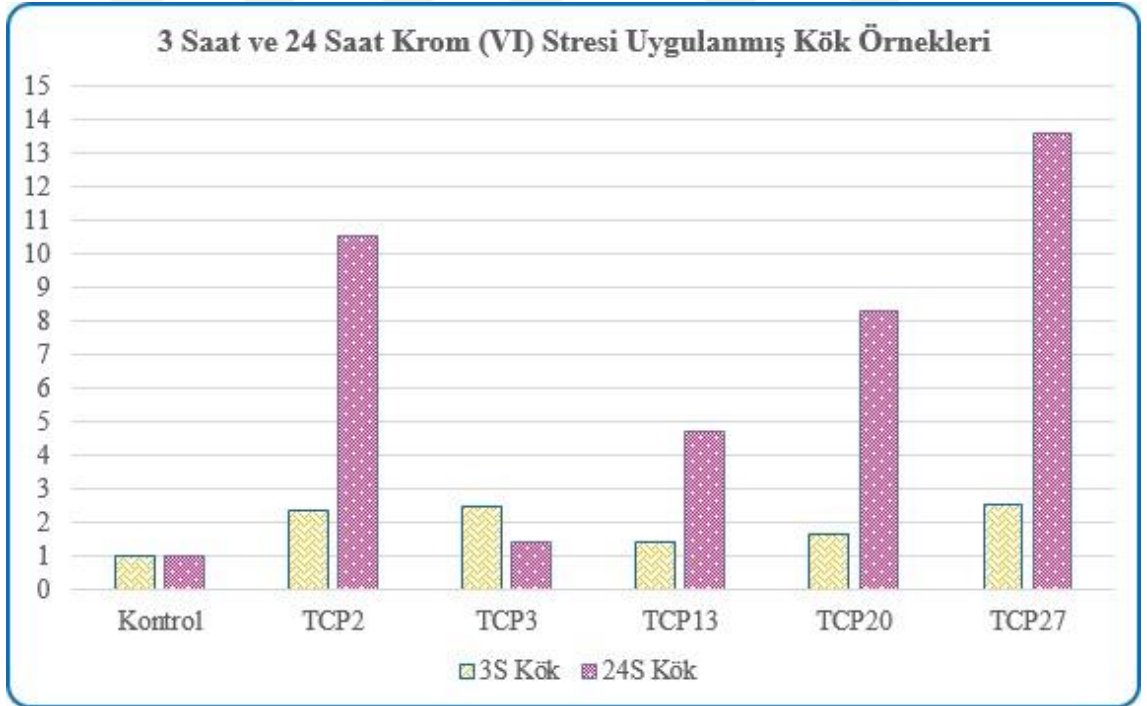
Şekil 4.13 3 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yaprak ve köklerindeki mRNA düzeyleri



Şekil 4.14 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yaprak ve köklerindeki mRNA düzeyleri



Şekil 4.15 3 saat ve 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin yapraklarındaki mRNA düzeyleri



Şekil 4.16 3 saat ve 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış fasulye bitkisinin köklerindeki mRNA düzeyleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada; farklı zaman aralıklarında 100 µM krom (VI) stresi ile muamele edilmiş Zülbiye çeşidi fasulye bitkisinde, stres savunmasında ilişkili olduğu bilinen TCP genlerinin yaprak ve köklerinde mRNA düzeyleri belirlenmiş ve strese karşı geliştirilen tolerans mekanizmasındaki ifade değışimleri araştırılmıştır.

Zülbiye çeşidi fasulye örneklerine ait yaprak ve köklerden alınan dokular ile beş farklı TCP geninin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kantitatif Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Kantitatif Real-Time PCR; reaksiyon gerçekleşirken her döngüde boyanın çift zincirli kalıp cDNA'ya bağlanarak oluşan floresans ışımının monitörize edildiğı ve reaksiyon sonunda ürün miktarını kantitatif gösteren bir PCR yöntemidir.

Gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde çalışılan yaprak ve kök dokuları için TCP genlerine ait ifadelerin kontrole göre farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.13-4.16).

3 saat krom (VI) stresine maruz kalmış fasulye bitkisinin yaprak ve köklerdeki TCP2, TCP3, TCP13, TCP20 ve TCP27 gen ifadelerinde kontrole göre artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). En yüksek artış değeri 4,95 kat ile yaprak TCP27 ve 4,46 kat ile TCP13 mRNA seviyelerinde gözlenirken, aynı genlerin kökteki ifadelerinin artış değeri incelendiğinde TCP27 geninin 2,54 kat ile en yüksek artışı gösterdiği belirlenmiştir.

24 saat krom (VI) stresine maruz kalmış fasulye bitkisinin yaprak ve köklerdeki TCP2, TCP3, TCP13, TCP20 ve TCP27 genlerinin hepsinde kontrole göre ifade artışı gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). Yaprak dokularındaki genlerden en yüksek ifade artış değeri 6,67 kat ile TCP27 geninde; bunu takiben yakın ifade artış değeri ile sırasıyla 5,46 kat ile TCP13 ve 5,26 kat ile TCP3 geninde gözlemlenmiştir. Köklerdeki en fazla ifade artış değeri 13,64 kat ile TCP27 geninde, ardından 10,54 kat ile TCP2 geninde gözlemlenmiştir. En az ifade artışı ise 1,44 kat ile TCP3 geninde gözlemlenmiştir. 24

saatlik stres karşılaştırılmasında kökte de yaprakta da en yüksek ifade artışı TCP27 geninde gözlemlenmektedir.

Tüm Real-Time PCR verilerinin bir arada değerlendirilmesi sonucu Zülbiye çeşidi fasulye bitkisinin yaprak ve köklerindeki incelediğimiz TCP genleri arasında TCP27 geninin her koşulda en fazla ifade artışını gösterdiği gözlemlenmiştir. Seçtiğimiz TCP genleri arasında TCP27 geninin en fazla ifade artışına sahip olması; krom (VI) stresine karşı daha tolerans mekanizmasında rolü olduğunun göstergesi olabilir.

Diğer yandan 3 saat krom (VI) stresi ile muamele edilmiş yaprak ve kök dokuları arasında genel olarak yaprak dokularındaki TCP genlerinin, kök dokularındaki TCP genlerinden kontrole göre daha fazla ifade olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.13).

Aynı şekilde 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış yaprak ve kök dokuları arasından genel olarak kök TCP genlerinin kontrole göre daha fazla ifade olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.14).

Bunların yanı sıra 3 saat ve 24 saat krom (VI) stresine maruz bırakılmış yaprak dokularındaki TCP genlerinin ifade seviyeleri karşılaştırıldığında yaprak dokularındaki TCP genlerinden 24 saatlik stres ile muamele edilmiş dokulardaki genlerin, 3 saat stresle muamele edilmiş dokulardaki genlerin ifadelerinden kontrole göre daha fazla ifadelerinin artmış olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Dolayısıyla seçilen TCP genleri cevap mekanizmasının işlevselliği bakımından, 24 saat strese maruz kalmış yaprak dokularında, 3 saat strese maruz kalmış dokulardan daha etkin bir şekilde görev alıyor olabileceği ifade edilebilir.

Benzer şekilde genel olarak 24 saat strese maruz bırakılmış kök dokularındaki TCP genlerinin ifadelerinin 3 saat strese maruz bırakılmış kök dokularından kontrole göre daha fazla artış gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.16). Dolayısıyla seçilen TCP genleri cevap mekanizmasının işlevselliği bakımından, 24 saat strese maruz kalmış kök

dokularında, 3 saat strese maruz kalmış dokulardan daha etkin bir şekilde görev alıyor olabilir denebilir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde; TCP genlerinin abiyotik stres koşulları altında strese karşı cevabı ile ilgili az sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Mukhopadhyay ve Tyagi'nin (2015) pirincin farklı kültürvariyetelerinde yaptığı çalışmada; OsTCP19'un absisik asit yolakları denetimindeki abiyotik stres sinyal iletiminde önemli bir rolü olduğu bulunmuştur. Araştırmacıların bulgularına göre 200 mM NaCl (tuz) stresi altında OsTCP19'un ifadesinin; tuza toleranslı pirinç kültürvariyetesi olan Pokkalinin kök dokularında, strese karşı duyarlı PB1 kültürvariyetesinin kök dokularında olduğundan daha fazla olduğu belirlenmiştir.

İlhan vd.'nin (2018) Yakutiye ve Zülbiye fasulye kültürvariyetelerinde Real-Time PCR yöntemiyle gerçekleştirdiği çalışmada 27 farklı TCP geninin tuz stresi altındaki ifade seviyelerinin değişimleri incelenmiştir. Zülbiye yaprak dokularındaki TCP genlerinden Pvul-TCP-2, Pvul-TCP-13, Pvul-TCP-17, Pvul-TCP-20 ve Pvul-TCP-26'nın tuz stresine karşı ifadelerinde artış olmuştur. Ayrıca kök dokularındaki TCP genlerinin tamamında da ifade artışı gözlenmiş, en fazla artış Pvul-TCP-6, Pvul-TCP-13, Pvul-TCP-26 ve Pvul-TCP-27 genlerinde görülmüştür. Bu çalışmada bahsi geçen genlerin de içinde olduğu 10 tane TCP geninin tuz stresi cevabı ile ilişkili olduğu tanımlanmıştır.

Gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında fasulye bitkisinin kültürvariyetesi olan Zülbiye'nin yaprak ve kök dokularındaki beş farklı TCP transkripsiyon faktörüne ait genin krom (VI) stresi altındaki erken ve geç etkilerini araştırmak amacıyla 3 ve 24 saat süreleri seçilmiştir. Stres, doku ve farklı gen parametreleri göz önünde bulundurulduğunda 5 TCP geninin tüm dokularda kontrole göre 24. saatte, 3. saate göre daha fazla ifade olduğu gözlemlenmektedir. Buna karşılık kontrolün altında bir gen ifadesi seviyesi gözlemlenmemiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular beş farklı TCP geninin fasulye çeşitlerinde strese karşı olan savunmada rol oynayabileceğini belirtmektedir. Ayrıca bu TCP genlerinin farklı fasulye çeşitlerinde krom (VI) stresine karşı olan dayanıklılıklarının

değerlendirilmesinde moleküler bir belirteç (marker) olarak kullanılabilceğini de öngörmektedir.

Yakın geleceğimizi tehdit eden iklim değışikliği, kuraklık, artan nüfus ve sanayileşme, toprak, su, hava kirliliği gibi unsurlar sonucu gıda üretimi tehlikeye girmektedir ve bu nedenlerle temel besin maddelerinin üretiminin bazı genetik uygulamalar sonucu artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu belirteçleri ve diğer uygulamaları kullanarak strese karşı dayanıklı türler geliştirmek önemli araştırma konuları arasındadır. Bu çalışmada, ağır metal stresine cevap oluşturmada önemli olabilecek beş farklı TCP geninin krom (VI) stresi altındaki fasulye bitkisinde analizi gerçekleştirilmiş ve stres mekanizması hakkında bilgi edinilmiştir. Önemli baklagil olan fasulye bitkisine ait genel abiyotik stres mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalara destek sağlayacak nitelikte sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, P., Gupta, M. D., Joseph, A. P., Chatterjee, N., Srinivasan, N., & Nath, U. (2010). Identification of specific DNA binding residues in the TCP family of transcription factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(4), 1174-1189.
- Aksay, C. S., Ketenoğlu, O., & Kurt, L. (2005). Küresel Isınma ve İklim Değişikliği. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 1(25), 29-42.
- Aldoobie, N. F., & Beltagi, M. S. (2013). Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. *African Journal of Biotechnology*, 12(29).
- Aly, A. M. A., Shehata, N. G., & Kobbia, T. M. (1991). Effect of cobalt on tomato plant growth and mineral content. *Annals of Agricultural Science, Ain Shams Univ. (Egypt)*.
- Anderson, R. A. (1989). Essentiality of chromium in humans. *Science of the Total Environment*, 86(1-2), 75-81.
- Anonim 2004. Lenntech Water Treatment and Air Purification (2004) Water treatment. Lenntech, Rotterdamseweg, Netherlands (<http://www.excelwater.com/thp/filters/Water-Purification.htm>) Erişim Tarihi: 30.11.2017
- Anonim, 2010. Türkiye Ziraat Odaları Birliği, Baklagil Raporu, 1s. Erişim tarihi; 8.12.2017.
- Anonim, 2010. Türkiye Ziraat Odaları Birliği, Baklagil Raporu, 3s. Erişim tarihi; 8.12.2017.
- Anonim, 2019. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünler, Kuru Baklagiller. Erişim tarihi; 19.05.2019.
- Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, 1227-1238.
- Asri, F. Ö., & Sönmez, S. (2006). Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. *Derim*, 23(2), 36-45.
- Bishnoi, N. R., Dua, A., Gupta, V. K., & Sawhney, S. K. (1993). Effect of chromium on seed germination, seedling growth and yield of peas. *Agriculture, ecosystems & environment*, 47(1), 47-57.
- Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M. L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G., & Papa, R. (2017). Beans (*Phaseolus spp.*) as a Model for Understanding Crop Evolution. *Frontiers in plant science*, 8.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.

- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(4571), 443-448.
- Busch, A., & Zachgo, S. (2009). Flower symmetry evolution: towards understanding the abominable mystery of angiosperm radiation. *Bioessays*, 31(11), 1181-1190.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., & Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2).
- Casarett, S. and Doull, C. 2001. *Toxicology, The Basic Science of Poisons*. 6th Edition. pp. 230-300
- Cengiz, B. 2007. Sakarya ve Eskişehir lokasyonlarında yetiştirilen bazı kuru fasulye çeşitlerinin kalite özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Chai, W., Jiang, P., Huang, G., Jiang, H., & Li, X. (2017). Identification and expression profiling analysis of TCP family genes involved in growth and development in maize. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4), 779-791.
- Cory-Slechta, D. A. (1990). Alterations in tissue Pb distribution and hematopoietic indices during advanced age. *Archives of toxicology*, 64(1), 31-37.
- Crawford, B. C., Nath, U., Carpenter, R., & Coen, E. S. (2004). CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *Antirrhinum*. *Plant physiology*, 135(1), 244-253.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., & Coen, E. (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *The Plant Journal*, 18(2), 215-222.
- Çağlarırnak, N., & Hepçimen, A. Z. (2010). Ağır metal toprak kirliliğinin gıda zinciri ve insan sağlığına etkisi. *Akademik Gıda*, 8(2), 31-35.
- Danisman, S., Van der Wal, F., Dhondt, S., Waites, R., de Folter, S., Bimbo, A., ... & Angenent, G. C. (2012). *Arabidopsis* class I and class II TCP transcription factors regulate jasmonic acid metabolism and leaf development antagonistically. *Plant physiology*, 159(4), 1511-1523.
- Davis, P.H. 1969. *Flora of Turkey and the East Aegeans Islands*. Vol:3, The University Press. Edinburgh, England.
- Debnath, M., Pandey, M., & Bisen, P. S. (2011). An omics approach to understand the plant abiotic stress. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(11), 739-762.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006). Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.

- Demir, A. (2009). Küresel iklim değişikliğinin biyolojik çeşitlilik ve ekosistem kaynakları üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi*, 1(2), 37-54.
- Doebley, J., Stec, A., & Gustus, C. (1995). teosinte branched1 and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics*, 141(1), 333-346.
- Doebley, J., Stec, A., & Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386(6624), 485.
- El-Ghamery, A. A., El-Kholy, M. A., & El-Yousser, M. A. (2003). Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 29-41.
- Gad, S. C. (1989). Acute and chronic systemic chromium toxicity. *Science of the Total Environment*, 86(1-2), 149-157.
- Gepts, P., Papa, R., Coulibaly, S., Mejía, A. G., & Pasquet, R. (1999). Wild legume diversity and domestication-insights from molecular methods. In *The Seventh Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF), Japan, International Workshop on Genetic Resources, Ibaraki, Japan, 13-15 October, 1999: Part 1, wild legumes*. (pp. 19-31). National Institute of Agrobiological Resources (NIAR).
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., & Groneberg, D. A. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of occupational medicine and toxicology*, 1(1), 22.
- Grandjean P. Health significance of metals-lead. Maxcy-Rosenau-Last Buc-blic Health and Preventive Medicine Ed: Last JM, Wallace RB, 13. Baskı: 389- 391, 1992.
- Guo, Z., Fujioka, S., Blancaflor, E. B., Miao, S., Gou, X., & Li, J. (2010). TCP1 modulates brassinosteroid biosynthesis by regulating the expression of the key biosynthetic gene DWARF4 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22(4), 1161-1173.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. 20-23. Oxford University Press, USA.
- Han, F. X., Sridhar, B. B., Monts, D. L., & Su, Y. (2004). Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. *New Phytologist*, 162(2), 489-499.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347.

- Hubbard, L., McSteen, P., Doebley, J., & Hake, S. (2002). Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics*, 162(4), 1927-1935.
- İlhan, E., Büyük, İ., & İnal, B. (2018). Transcriptome–Scale characterization of salt responsive bean TCP transcription factors. *Gene*, 642, 64-73.
- İsmailçelebioğlu, Y. N. (1980). *Rhizobium*'dan *Agrobacterium*'a NIF genleri transformasyonu yoluyla baklagil olmayan kültür bitkilerinde ürün artırma olanaklarının araştırılması. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No. 167.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., & Timur, S. (2003). Metallerin çevresel etkileri-I. Metalurji Dergisi, 136, 47-53.
- Kennedy, C. D., & Gonsalves, F. A. N. (1987). The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H⁺, efflux of excised roots. *Journal of Experimental Botany*, 38(5), 800-817.
- Kocataş, A. (1994a). Ekoloji Çevre Biyolojisi. *Ege Üniversitesi Basımevi*. 444
- Kocataş, A. (1994b). Ekoloji Çevre Biyolojisi. *Ege Üniversitesi Basımevi*. 447-455
- Kosugi, S., & Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *The Plant Cell*, 9(9), 1607-1619.
- Kotaś, J., & Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental pollution*, 107(3), 263-283.
- Lee, K. P., Ulrich, C. E., Geil, R. G., & Trochimowicz, H. J. (1989). Inhalation toxicity of chromium dioxide dust to rats after two years exposure. *Science of the Total Environment*, 86(1-2), 83-108.
- Levitt, J. (1980). *Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses*. Academic Press..
- Li, S., & Zachgo, S. (2013). TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 76(6), 901-913.
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology*, 148(1-2), 4-14.
- Liu, D., Jiang, W., & Li, M. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, 117(1), 23-29.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.

- Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., & Coen, E. (1999). Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell*, 99(4), 367-376.
- Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., & Coen, E. (1996). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature*, 383(6603), 794.
- Martín-Trillo, M., & Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in plant science*, 15(1), 31-39.
- McGrath, S. P. (1982). The uptake and translocation of tri- and hexa-valent chromium and effects on the growth of oat in flowing nutrient solution and in soil. *New Phytologist*, 92(3), 381-390.
- Mertz, W. (2012). Trace elements in human and animal nutrition (Vol. 2). 300. Elsevier.
- Mithöfer, A., Schulze, B., & Boland, W. (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS letters*, 566(1-3), 1-5.
- Mukhopadhyay, P., & Tyagi, A. K. (2015). OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways. *Scientific reports*, 5, 9998.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216.
- Nath, U., Crawford, B. C., Carpenter, R., & Coen, E. (2003). Genetic control of surface curvature. *Science*, 299(5611), 1404-1407.
- Nieto-Samaniego, Á. F., Ferrari, L., Alaniz-Alvarez, S. A., Labarthe-Hernández, G., & Rosas-Elguera, J. (1999). Variation of Cenozoic extension and volcanism across the southern Sierra Madre Occidental volcanic province, Mexico. *Geological Society of America Bulletin*, 111(3), 347-363.
- Osmond, C. B., Austin, M. P., Berry, J. A., Billings, W. D., Boyer, J. S., Dacey, J. W. H., Nobel, P. S., Smith, S. D. & Winner, W. E. (1987). Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience*, 37(1), 38-48.
- Özdem, M. A. 2012. Dünya ve Türkiye’de Kuru Baklagiller. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. TEPGE BAKIŞ. Ocak 2012 / ISSN: 1303-8346 / Nüsha:7, Ankara
- Öztürk, K. (2002). Küresel İklim Değişikliği ve Türkiye’ye Olası Etkileri. *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 22(1).
- Panda, S. K., & Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 95-102.
- Radha, J., Srivastava, S., & Madan, V. K. (2000). Influence of chromium on growth and cell division of sugarcane. *Indian Journal of Plant Physiology*, 5(3), 228-231.

- Rao, K. M., Raghavendra, A. S., & Reddy, K. J. (Eds.). (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer Science & Business Media.
- Rether, A. (2002). Entwicklung und Charaktisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen (*PhD thesis. Munich Technical University*).
- Rout, G. R., & Das, P. (2009). Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. In *Sustainable Agriculture* (pp. 873-884). Springer, Dordrecht.
- Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U. & Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS biology*, 6(9), e230.
- Sheoran, I. S., Singal, H. R., & Singh, R. (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23(3), 345-351.
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58.
- Sresty, T. V. S., & Rao, K. M. (1999). Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea. *Environmental and Experimental Botany*, 41(1), 3-13.
- Şehirali, S. 1988. Yemeklik Dane Baklagiller. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayın No: 1089. S.435. Ankara.
- Takeda, T., Suwa, Y., Suzuki, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Matsuoka, M. & Ueguchi, C. (2003). The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *The Plant Journal*, 33(3), 513-520.
- Tate, R. L. (1995). Soil microbiology (symbiotic nitrogen fixation). *Inc., New York*, 307-333.
- Trinh, N. N., Huang, T. L., Chi, W. C., Fu, S. F., Chen, C. C., & Huang, H. J. (2014). Chromium stress response effect on signal transduction and expression of signaling genes in rice. *Physiologia Plantarum*, 150(2), 205-224.
- Tunçok, Y. (2008). İçme Suyunda Ağır Metaller ve İnsan Sağlığına Etkileri, Dokuz Eylül Üniversitesi. *Farmakoloji Anabilim Dalı*, 38s.
- Underwood, E. (2012). Trace elements in human and animal nutrition. 356. Elsevier.
- Van Breusegem, F., & Dat, J. F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant physiology*, 141(2), 384-390.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1998). H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 3(9), 330-334.

- Varankaya, S. 2011. Yozgat ekolojik şartlarında yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin bazı tarımsal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Vural, H. (1993). Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler. *Ekoloji*, 8,3-8.
- Zeid, I. M. (2001). Response of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatment. *Plant Biology*, 44, 111-115.
- Zengin, F. K., & Munzuroğlu, Ö. (2004). Fasulye fidelerindeki (*Phaseolus vulgaris* cv. Strike) Sitokinin İçeriği Üzerine Ağır Metallerin (Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺ ve Pb⁺⁺) Etkileri. *Doğu Anadolu Araştırmaları (Research of Eastern Anatolia Region)*, 2(2), 48-54.
- Zengin, K. F., & Munzuroğlu, Ö. (2005). Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Zn²⁺) etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(1), 164-172.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seda KESKİN
Doğum Yeri : Afyonkarahisar
Doğum Tarihi : 13.02.1993
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Alanya Lisesi (2011)
Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2011-2015)
İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2014-2015)
(Farabi Değişim Programı)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
(2015-2019)

SCI ve diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Keskin, S., Büyük, I., **Bölükbaşı, E.** and Aras, E.S. 2018. Analysis of mRNA expression of TCP gene family transcription factors using real Time PCR method in chromium (VI) stressed common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Plant Physiol. Pathol., 6. 32. 10.4172/2329-955X-C4-023.