

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FASULYE BİTKİSİNDE (*Phaseolus vulgaris* L.) MALAT DEHİDROGENAZ  
(MDH) GEN AİLESİNİN BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU ve TUZ  
STRESİ ile OLAN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Serenay YILDIZ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2020**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FASULYE BİTKİSİNDE (*Phaseolus vulgaris* L.) MALAT DEHİDROGENAZ (MDH) GEN AİLESİNİN BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU ve TUZ STRESİ ile OLAN İLİŞKİSİNİN ARAŞIRILMASI

Serenay YILDIZ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker BÜYÜK

MDH gen ailesi bitkilerde TCA döngüsü, sistein ve metionin metabolizması, piruvat, glioksilat metabolizması gibi birçok biyolojik yolakta önemli roller üstlendiği bilinen bir gen ailesidir. Son yıllarda MDH gen ailesi üyelerinin tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik *Phaseolus vulgaris* L. bitkisi hariç birçok bitki türünde biyoinformatik çalışmaları yapılmıştır. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının ilk basamağında çok sayıda biyoinformatik araç ve genom veritabanı kullanmak suretiyle, MDH gen ailesi üyelerinin fasulye bitkisinde genom düzeyinde tanımlanması ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Ardından tanımlanan MDH üyelerinin tuz stresi ile olan ilişkisi hem RNAseq (NCBI-SRA Archive) hem de tuz stresine karşı davranışı farklı olan iki fasulye çeşidi (*P. vulgaris* cv. “Yakutiye” ve “Zülbiye”) ile qRT-PCR analizleri aracılığıyla aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak fasulye genomunda toplamda 8 adet MDH (*Pvul-MDH*) geni tanımlanmıştır. Bu genlerin 5 adetinin fasulye kromozomu üzerinde yerleşik olduğu ve aralarında iki gen çiftinin ise segmental duplikasyona uğramış olduğu belirlenmiştir. Bu segmental duplikasyonların gerçekleştikleri sürelerin 10,96 ve 28,72 milyon yıl öncesine (MYÖ) dayandığı tespit edilmiştir. *P. vulgaris*, *Glycine max* ve *Arabidopsis thaliana* gibi diğer bitki türlerinde bulunan MDH homologları ile oluşturulan filogenetik ağacın 3 ana gruba ayrıldığı ve fasulye MDH genlerinin intron sayılarının 1 ile 12 arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Tanımlanan *Pvul-MDH* genlerinin bitkinin farklı dokularındaki gen ifade seviyeleri ve tuz stresine karşı olan reaksiyonları belirlenmiş ve detaylı olarak sunulmuştur. Bu çalışma, *P. vulgaris*'te MDH genlerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve tuz stresi ile olan ilişkisinin aydınlatılması konularında ilk niteliğindedir ve bu açıdan sonraki çalışmalara kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir.

**Ağustos 2020, 60 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** MDH genleri, biyoinformatik, *Phaseolus vulgaris* L., gen ifadesi, RNAseq

## ABSTRACT

MSc Thesis

### BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION OF MALATE DEHYDROGENASE (MDH) GENE FAMILY IN COMMON BEAN PLANT (*Phaseolus vulgaris* L.) AND INVESTIGATION OF ITS RELATIONSHIP WITH SALT STRESS

Serenay YILDIZ

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

Supervisor: Assoc. Prof. İlker Büyük

MDH is a gene family known to play important roles in many biological pathways in plants such as TCA cycle, cysteine and methionine metabolism, pyruvate, glyoxylate metabolism. Bioinformatics studies have been conducted in many plant species except for the *Phaseolus vulgaris* L. plant regarding the definition and characterization of MDH gene family members recently. In the first part of this study, the aim was to describe and characterize MDH gene family members in common bean at the genome level, using many bioinformatics tools and genome databases. Then, the relationship between MDH genes and salt stress was examined through both RNAseq (NCBI-SRA Archive) and qRT-PCR analyses using two common bean cultivars which naturally display different responses to salt stress (Yakutiye cv. and Zülbiye cv.). As a result, a total of 8 MDH (Pvul-MDH) genes were identified in common bean genome. It was found that these genes were located onto 5 bean chromosomes and two gene pairs had gone through segmental duplication. It was found that the periods when these segmental duplications took place dated back to BC 10,96 and 28, 72 million years ago. It was observed that the phylogenetic tree formed with the MDH homologs found other plant species such as *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana* was divided into three main groups. The intron numbers of MDH genes varied between 1 and 12. The gene expression levels and reactions against salt stress of the defined Pvul-MDH genes were determined and presented in detail. The current study is the first study in terms of description and characterization of MDH genes in *P. vulgaris* and its relationship with salt stress. It is believed that it may be a resource for further studies.

August 2020, 60 pages

**Keywords:** MDH genes, bioinformatics, *Phaseolus vulgaris* L., gene expression, RNAseq

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yönlendiren, kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. İlker Büyük'e ve hem öğrenim hayatım boyunca hemde tez süresince desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Emine Sümer Aras'a ve çalışmalarım boyunca desteğini ve yardımını benden hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Ata Umut Özsoy'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme ve eşim Çağrı Gönül'e sonsuz teşekkürler ederim.

Bu tez çalışması, 'Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' tarafından '20L0430002' proje numaralı 'Fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) malat dehidrogenaz (MDH) gen ailesinin biyoinformatik karakterizasyonu ve tuz stresi ile olan ilişkisinin araştırılması' konulu proje tarafından desteklenmiştir.

Serenay YILDIZ

Ankara, Ağustos 2020

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Fasulye Bitkisi Kısa Tarihçesi.....	2
1.2 Fasulye Bitkisi Sistematiği.....	2
1.3 Fasulye Bitkisinin Dünya’da ve Türkiye’de Üretimi.....	3
1.4 Fasulye Bitkisi İklim ve Toprak İsteği .....	7
2. BİTKİLERDE ABİYOTİK STRES VE GENEL HATLARI .....	8
2.1 Bitkilerde Tuz Stresi .....	9
3. GEN EKSPRESYONU VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNE GENEL BAKIŞ.....	11
3.1 Gen Ekspresyonu Çalışmaları Hakkında Özet Bilgi .....	11
3.2 Transkripsiyon Faktörlerine Genel Bakış .....	12
4. MDH GEN AİLESİ.....	13
5. BİYOİNFORMATİK ÇALIŞMALAR VE ÖNEMİ.....	14
6. KAYNAK ÖZETLERİ .....	15
7. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
7.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> Genomunda Proteinlerinin Tanımlanması.....	19
7.2 Tanımlanan Fasulye MDH Genlerinin Yapısı, Fiziksel Konumu, Gen Duplikasyonları ve Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi .....	20
7.3 Fasulye MDH Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi.....	21
7.4 Filogenetik Analiz ve Dizilerin Hizalanması .....	22
7.5 Gen Duplikasyonlarının ve Benzerlik Oranlarının Belirlenmesi .....	23
7.6 Gen Ontoloji Analizi .....	24
7.7 Pvul-MDH Ailesinin Promotor Analizi ve Hücre İçi Lokalizasyonu .....	25
7.8 Mikro-RNA’ların (miRNA) ve Hedefledikleri Fasulye MDH Genlerin Belirlenmesi .....	27
7.9 Transkriptom Datası ile <i>in silico</i> Gen Ekspresyon Analizi .....	28
7.10 Bitki Materyalleri, Büyüme Koşulları ve Stres Muamelesi .....	29
7.11 Total RNA izolasyonu .....	31
7.12 cDNA (komplementer DNA) Sentezi.....	32
7.13 Primer Dizaynı .....	33
7.14 Real-Time PCR Reaksiyonları.....	33
8. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	35
8.1 Fasulye Genomunda Tanımlanan MDH Genlerinin Özellikleri .....	35
8.2 Fasulye MDH Genlerinin Yapıları ve Kromozomal Dağılımları .....	37
8.3 Fasulye MDH ve Ortolog Proteinlerinin Filogenetik Analizleri.....	38
8.4 Fasulye MDH Proteinlerinin Korunmuş Dizi Motifleri .....	39
8.5 Fasulye MDH Proteinlerinin Üç Boyutlu Homoloji Modellemesi .....	41
8.6 Fasulye Genomunda Bulunan MDH Genlerine Ait Duplikasyonlar .....	41

8.7 Pvul-MDH Ailesinin Hücre İçi Lokalizasyonu ve Promotor Analizi .....	42
8.8 Fasulye MDH Genlerinin Ontoloji Analizleri .....	44
8.9 Fasulye MDH Genlerine Ait Doku-Spesifik mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi .....	45
8.10 Fasulye MDH Genlerinin Tuz Stresi ile İlişkili <i>in silico</i> İfade Analizi .....	46
8.11 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılmış Fasulye Çeşitlerinde MDH Genlerinin mRNA düzeyleri .....	47
9. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	49
KAYNAKLAR .....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	60



## SİMGELER DİZİNİ

Ha	Hektar
qRT-PCR	Real Time PCR
°C	santigrat derece
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
kDa	Kilodalton
mRNA	Mesajcı RNA
UV	Ultraviyole
RNA	Ribo Nükleik asit

### **Kısaltmalar**

FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
TF	Transkripsiyon Faktörleri
MDH	Malat Dehidrogenaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kuru fasulye bitkisinin ülkemizde üretimi .....	3
Şekil 1.2 Türkiye’de fasulye bitkisinin ekim alanları .....	5
Şekil 1.3 Türkiye’de fasulye bitkisinin hasat alanları .....	5
Şekil 1.4 Türkiye’de fasulye bitkisinin üretim miktarı .....	6
Şekil 1.5 Türkiye’de fasulye bitkisinin üretim ve verim detayları.....	6
Şekil 3.1 Gen Ekspresyonuna Genel Bakış.....	11
Şekil 7.1 Phytozome v12.1 veritabanı .....	19
Şekil 7.2 ExPASy Decrease Readundancy Tool.....	20
Şekil 7.3 ExPASy ProtParam Tool .....	20
Şekil 7.4 Gene Structure Display Server Veri Tabanı .....	21
Şekil 7.5 Meme Suite Veri Tabanı.....	21
Şekil.7.6 Phyre2 Veri Tabanı .....	22
Şekil.7.7 Phyre2 Veri Tabanı .....	22
Şekil.7.8 iTOL Veri Tabanı .....	23
Şekil.7.9 Plant Genome Duplication Veri Tabanı.....	24
Şekil.7.10 PAL2NAL Veri Tabanı .....	24
Şekil.7.11 Blast2go Veri Tabanı .....	25
Şekil.7.12 PlantCARE veri tabanı.....	26
Şekil.7.13 WoLF PSORT veri tabanı.....	26
Şekil.7.14 miRBase v22.0 Veri Tabanı.....	27
Şekil.7.15 BLASTX Veri Tabanı.....	27
Şekil.7.16 NCBI Sequnce Read Archive Veri Tabanı .....	28
Şekil.7.17 CIMminer Veri Tabanı .....	29
Şekil 7.18 Fasulye Fideleri. A. Kontrol bitkileri, B. Stres altındaki bitkiler .....	30
Şekil 8.1 Fasulye MDH gen ailesinin detaylı özellikleri .....	36
Şekil 8.2 Fasulye MDH genlerinin yapısal organizasyonu.....	37
Şekil 8.3 Fasulye MDH genlerinin kromozomal dağılımları.....	38
Şekil 8.4 Fasulye MDH ortolog proteinleri.....	39
Şekil 8.5 Fasulye MDH proteinleri korunmuş dizi bölgeleri.....	40
Şekil 8.6 Fasulye MDH proteinlerinin 3 boyutlu modellemeleri.....	41
Şekil 8.7 MDH enzimi ontoloji analizi .....	44
Şekil 8.8 Fasulye MDH genlerinin doku spesifik mRNA seviyeleri .....	46
Şekil 8.9 Fasulye MDH genlerinin tuz stresi altında ifadesi.....	47
Şekil 8.10 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılmış Fasulye Çeşitlerinde MDH Genlerinin mRNA düzeyleri .....	48



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin sistematik çizelgesi.....	2
Çizelge 1.2 FAO; Ticaret Haritası .....	4
Çizelge 7.1 DNase inkübasyon solüsyonu komponentleri ve hacimleri.....	31
Çizelge 7.2 cDNA Sentez Kiti ve Bileşenleri .....	32
Çizelge 7.3 Çalışmada kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları.....	33
Çizelge 7.4 Real-Time PCR protokolü .....	33
Çizelge 7.5 Real-Time PCR Döngüsü .....	34
Çizelge 8.1 Fasulye’de bulunan MDH genlerinin CDS ve intron sayıları.....	37
Çizelge 8.2 Fasulye’de bulunan MDH genlerinin CDS, upstream\downstream ve intron sayıları .....	40
Çizelge 8.3 Fasulye MDH proteinlerinin korunmuş motiflerinin özellikleri.....	42
Çizelge 8.4 Fasulye MDH genlerinin hücre içi lokalizasyonu ve promotor analizi .....	42

## 1. GİRİŞ

2020 yılındaki tahminlere göre dünya nüfusu 7,78 milyarı geçmekte olup; mercimek, nohut, fasulye, bezelye gibi baklagiller dünya nüfusunu besleyen temel besinler olarak belirtilmiştir. Baklagiller, üyeleri kutup bölgeleri hariç neredeyse her yerde yetişebilen, tek ve çok yıllık karakterde toplamda 12.000 adet türü içerisinde barındıran önemli bir bitki grubudur. Günümüzde baklagillerden sadece 200 tanesinin tarımı yapıldığı bilinmektedir (Gülümser 2016). Tarımı yapılan fasulye bitkisi çeşitlerinden yemeklik olarak tüketilenler fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), nohut (*Cicer arietinum* L.), mercimek (*Lens culinaris* Medik., *Lens esculenta* Moench.), bakla (*Vicia faba* L.), börülce (*Vigna sinensis* L.) ve bezelye (*Pisum sativum* L.)'dir (Gülümser 2016). Gün geçtikçe artan dünya nüfusu ve ilerleyen yıllarda doğabilecek muhtemel besin kıtlığı problemleri; zengin protein içeriği ve yetiştirilebilir olması gibi nedenlerden dolayı baklagiller ailesinden olan fasulye bitkisinin önemini daha da arttırmaktadır.

2018 yılı FAO verilerine göre kuru fasulye 34 milyon tondan daha fazla üretime sahip bir bitki grubudur (Anonymus 2018). Fasulye bitkisi karbonhidrat oranı yüksek, yağ oranı düşük ve besleyicidir. Ülkemizde tarımı yapılan bitkilerin toplam 15,6 milyon hektar alanın 0,8 milyon hektarında yemeklik tane baklagil ekimi-dikimi yapılmaktadır. Fasulye, nohut gibi tarla bitkileri ekim alanı ve üretimi bakımından tahıllardan sonra gelen tane ürünüdürler. Ayrıca dünyada yıllık 63 milyon ha alanda, 58,7 milyon ton baklagil yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonim 2015).

İnsan beslenmesinde gıda olarak değerlendirilmeyen fasulye posaları (sap, yaprak vb.) hayvan beslenmesinde kullanılabilen, bunun yanı sıra fasulye bitkisi topraktaki serbest azotu da özümseyebilmektedir. Artan et fiyatları nedeniyle özellikle gelişmekte olan ikinci dünya ülkelerinde kıymetli bir protein kaynağı olarak görülmektedir (Anonim 2018, Anonim 2015).

Transkripsiyon faktörleri (TF) canlılar aleminde bitkilerden hayvanlara kadar çoğu canlıda bulunan önemli proteinlerdir ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Özellikle bitkilerde hemen hemen bütün biyolojik süreçlerde rol alırlar. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında fasulye bitkisinde (*Phaseolus vulgaris* L.) Malat Dehidrogenaz

(MDH) gen ailesinin biyoinformatik yaklaşım aracılığıyla tanımlanması, gen ve protein düzeyinde detaylı şekilde karakterize edilmesi ve bulunan MDH üyelerinin abiyotik stres koşulları altındaki rollerinin Real-Time PCR (qRT-PCR) ile mRNA düzeyinde analizi hedeflenmiştir.

### 1.1 Fasulye Bitkisinin Kısa Tarihçesi

Kökene çok uzun yıllardır tartışma konusu olan fasulyenin geçmişten günümüze birçok coğrafyada yetiştirildiği bilinmektedir. Ünlü botanikçi De Condelle (1959) ekilen fasulyelerin eski veya yeni dünyaya mı ait olduğundan emin değildi (De Candolle 1886, Gentry 1969). '1935'te Vavilov (Vavilov 1935), Kuzey Amerika'da bulunan zengin bitki çeşitliğinden dolayı ortak kökeninin merkezi olarak Mezoamerika'yı aday gösterdi. Müller (1881) fasulyenin Avustralya, Rein ise (1887) Afrika kökenli olduğunu dile getirmiştir. Ancak Peru'daki eski mezarlarda bulunan tohumlar arasında fasulye tohumlarının da bulunması fasulyenin Amerika kökenli olabileceği bilgisine ulaşmamızı sağlamıştır. Türkiye'de ise yaklaşık olarak 200 yıldır üretiminin yapıldığı tahmin edilmektedir (Aydoğan vd. 2015).

### 1.2 Fasulye Bitkisi Sistematığı

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.); Leguminosae veya Fabaceae (baklagiller) familyasında *Phaseolus* cinsi içerisinde yer almaktadır. Dünyada fasulyenin yaklaşık 230 kadar cinsinin bulunduğu ve bunların 20 adetinin insan beslenmesinde kullanıldığı, en fazla üretimi yapılan türün ise *Phaseolus vulgaris* L. olduğu bilinmektedir (Uysal 2002, Broughton vd. 2004, Günay 2005, Myers ve Bagget 1999).

Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin sistematik çizelgesi

Alem	<i>Plantae</i>
Alt Alem	<i>Tracheobionta</i>
Üst Divizyon	<i>Spermatophyta</i>
Divizyon	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Alt Sınıf	<i>Rosidae</i>
Takım	<i>Fabales</i>
Aile	<i>Fabaceae/Leguminosae</i>
Cins	<i>Phaseolus</i>
Tür	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

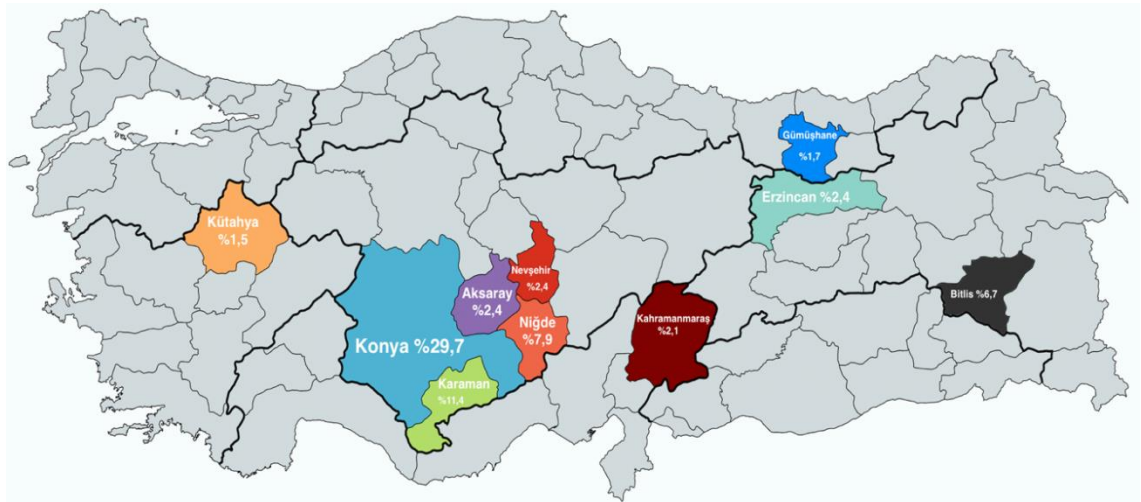
Kuru fasulyeler, dehidrasyon sonrası olgun kuru tohum olarak tüketilen, taze fasulyeler ise kabuğu olgunlaşmadan taze olarak tüketilen fasulyelerdir (Karataş 2017).

Başlıca Türleri,

1. *P. acitufolius* A. Gray (Tepary bean)
2. *P. coccineus* L. (Runner bean)
3. *P. lunatus* (Lima veya siava bean)
4. *P. vulgaris* (Common bean)

Bu türler içerisinde dünyada ve Türkiye’de en çok tarımı yapılan tür *Phaseolus vulgaris* L. türüdür. Sarılıcı ve bodur türleri bulunmaktadır. TSE tarafından belirlenmiş TS141 kuru fasulye standartının revizyonu ve tadiline ilişkin dış ticarete standardizasyon tebliği tebliğ no: (2009\45)’e göre kuru fasulyeler ülkemizde morfolojik yapılarına göre tombul, çalı, horoz, dermason, selanik, battal, şeker, bomba, barbunya ve sıra olarak 10’ a ayrılmıştır (Anonim 2009).

### 1.3 Fasulye Bitkisinin Dünya’da ve Türkiye’de Üretimi



Şekil 1.1 Kuru fasulye bitkisinin ülkemizde üretimi (Resim için kaynak verilmeli)

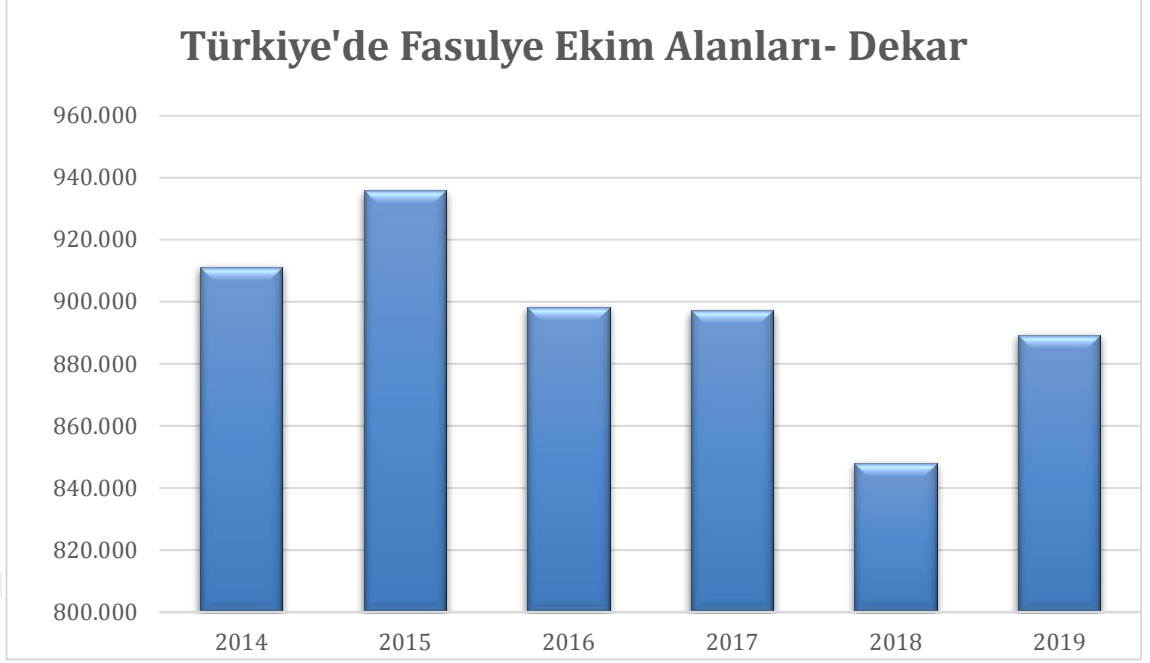
Çizelge 1.2’de görüldüğü üzere kuru fasulye bitkisinin üretimi 2013 yılından 2017 yılına kadar %13,6 oranında artmıştır. Bu artışın hızla artan dünya nüfusu ile doğru

orantılı olduğu düşünülmektedir. Bu durum baklagiller ailesinden olan kuru fasulyenin besin kaynağı açısından önemini ve ekonomik olarak değerini ispatlar niteliktedir (Anonim 2019).

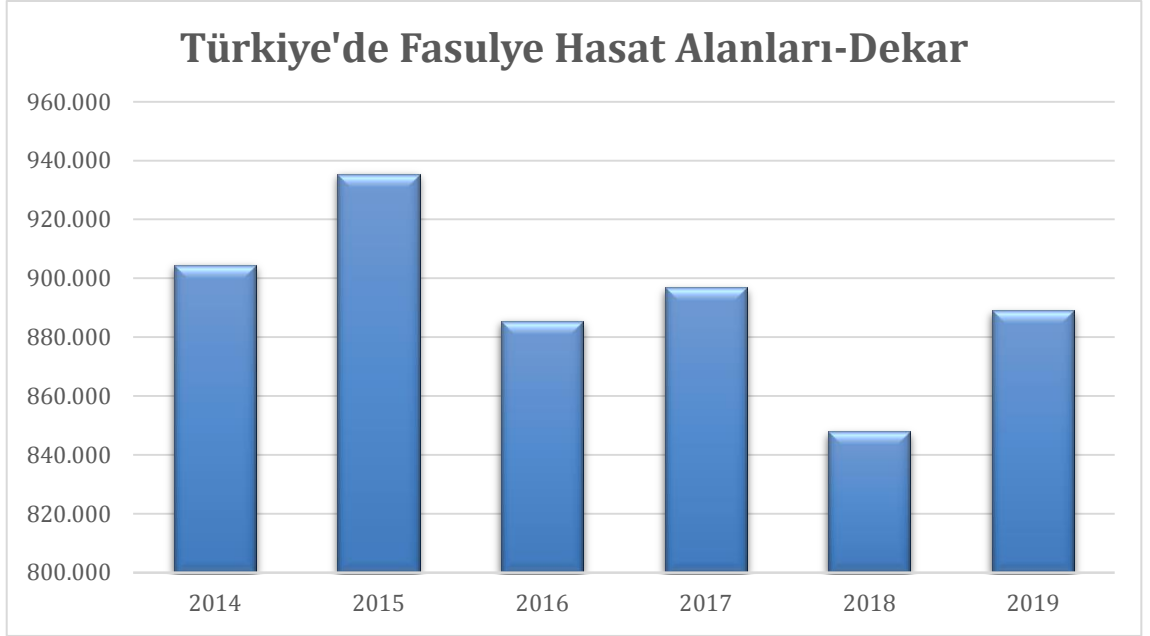
Çizelge 1.2 FAO; ticaret verileri (11.01.2019) 1/ verisi bulunan son iki yılın değişimini göstermektedir (Anonim 2019).

<b>Dünya'da Kuru Fasulye verileri (bin ton)</b>						
	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>Değişim (%)</b>
<b>Alan (bin ha)</b>	29.308	30.293	30.701	29.393	37.264	21,4
<b>Verim (ton/ha)</b>	0.84	0.89	0.9	0.91	0.86	-4,4
<b>Üretim (bin ton)</b>	24617	26854	27644	26833	31405	13,6
<b>İthalat (bin ton)</b>	1.818	1.745	1.665	1.948	-	-4,6
<b>İhracat (bin ton)</b>	1.794	1.860	1.781	1.907	-	7,1
<b>İhracat Fiyatı (\$/ton)</b>	1.073	1.091	867	855	855	-1,4

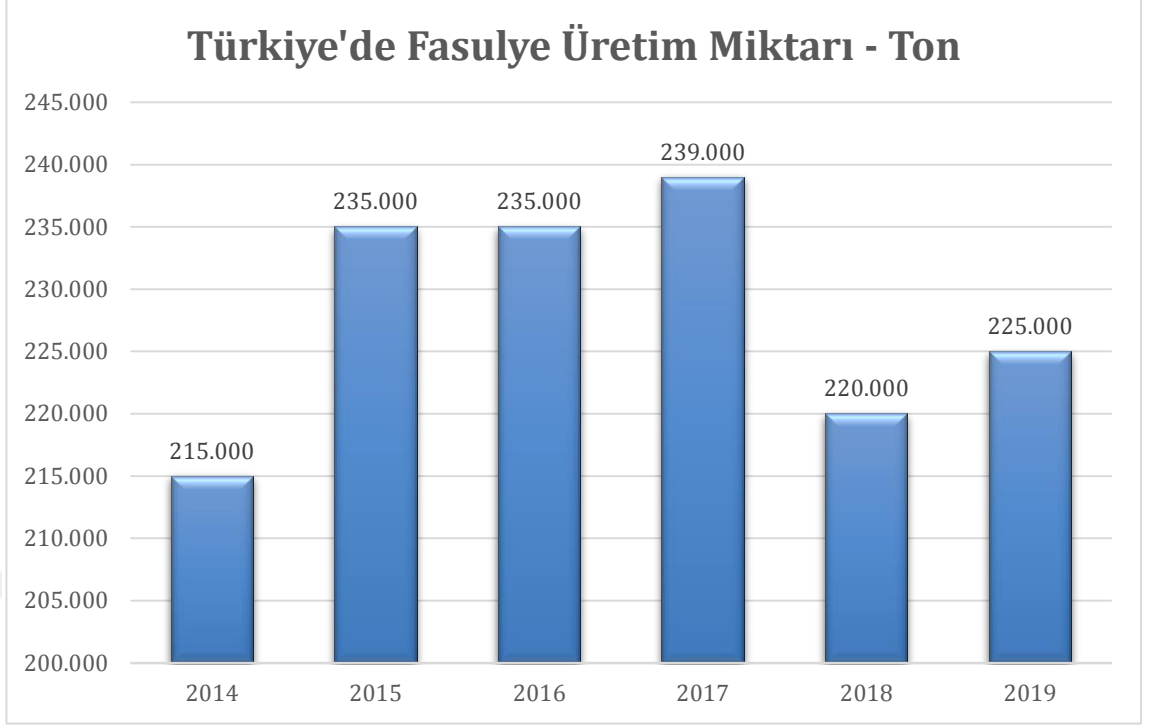
Fasulye bitkisinin özellikle Asya ve Amerika kıtasında önemli derecede üretimi yapılmaktadır. Ağırlıklı olarak bu iki kıtada yetiştirilen kuru fasulyenin ekim alanları 1980 – 2000 yılları arasında 25 milyon hektar düzeyinde iken; son 10 yılda %12 artış göstererek 37 milyon hektara ulaşmıştır. Ek olarak fasulye; 2017 yılı itibariyle baklagil ekim alanlarının %36'sını, baklagil üretiminin ise %33'ünü oluşturmaktadır. Dünya genelinde 2017 senesi itibariyle 37 milyon hektar (ha) alanda 31 milyon ton fasulye üretilmiştir (Anonim 2019). Çizelge 1.2' de çeşitli bölgelerde tarımı yapılan fasulye (*P. vulgaris* L.) bitkisinin üretim alanları, ithalat ve ihracat oranları detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Daha detaylı veriler Şekil 1.3, Şekil 1.4, Şekil 1.8 ve Şekil 1.6'da sunulmuştur.



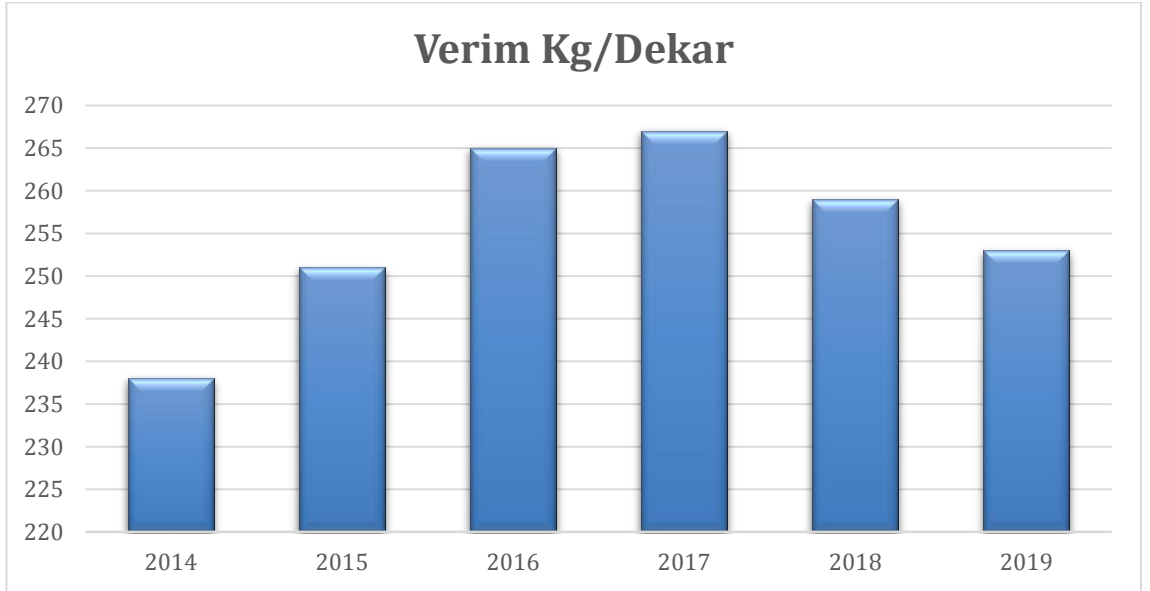
Şekil 1.2 Türkiye’de fasulye bitkisinin ekim alanları (TÜİK, 2019)



Şekil 1.3 Türkiye’de fasulye bitkisinin hasat alanları (TÜİK, 2019)



Şekil 1.4 Türkiye’de fasulye bitkisinin üretim miktarı (TÜİK, 2019)



Şekil 1.5 Türkiye’de fasulye bitkisinin üretim ve verim detayları (TÜİK, 2019)

#### **1.4 Fasulye Bitkisi İklim ve Toprak İsteği**

Fasulye bitkisi yetiştirme koşulları ve toprak isteği açısından fazla seçici olmayan ve yetiştiriciliği kolay olan bir bitkidir. Buna karşın organik madde bakımından bol, yumuşak, iyi havalandan, ve su tutma yetisi yüksek olan topraklarda daha çok verim alınabilmektedir. Fazla asit karakterli topraklardan hoşlanmaz. Toprak pH değerinin 5.5-6.7 olduğu durumlarda ziraatı yapılan üründen başarılı sonuçlar alınmaktadır. Fasulye ılık iklim seven bir bitkidir. Sıcaklık değerini sıfırın altına indiğinde bitki büyük zarar görmektedir. Sıcaklığın optimum 15,5-21°C derece olduğu yerlerde rahat bir gelişme göstermektedir (Anonim).





## 2. BİTKİLERDE ABİYOTİK STRES VE GENEL HATLARI

Bitkiler yaşamları boyunca sesil doğaları gereği çeşitli uygun olmayan koşullarla karşılaşmaktadırlar. Bu koşulların temelini oluşturan bileşenler abiyotik veya biyotik olarak iki grupta incelenmekte ve bitkilerin gelişimini olumsuz yönde etkileyen stres faktörleri olarak adlandırılmaktadırlar. Stres faktörü, bitkilerde önemli fizyolojik ve metabolik değişikliklere yol açarak bitkinin büyümesini ve gelişmesini baskılayan, bitkinin yaşam döngüsünü olumsuz yönde etkileyen, bitkiden alınan ürünün kalitesini ve miktarını azaltarak bitkinin ölmesine veya organ kayıpları yaşamasına neden olabilen bir unsurdur (İpek 2015).

Stres faktörlerinin bitkide oluşturduğu olumsuz etki bitkinin bulunduğu çevreye ve genetik yapısında barındırdığı adaptasyon yeteneğine bağlı olarak değişmektedir. Bitkiler strese karşı oluşturdukları savunma mekanizmaları sayesinde stres etmenlerini önleyebilir veya bu stres etmenlerine karşı koymak suretiyle yaşam döngülerini sürdürebilirler (Dubey 1994).

Stres etmenleri Levitt'e göre biyotik ve fizikokimyasal olarak sınıflandırılmaktadır (Büyük vd. 2012, Levitt 1972). Biyotik faktörler; mikroorganizma (fungus, bakteri ve virüs) bulaşı ile canlıların zarar vermek üzere gerçekleştirdikleri saldırılar sonucu oluşan stres faktörleridir. Abiyotik faktörler ise su, sıcaklık, radyasyon ve kimyasallar gibi çevresel faktörlerdir (Büyük vd. 2012, Lichtenhaler 1996). Diğer bir ifadeyle, abiyotik stres; canlı olmayan faktörlerin belirli bir ortamda yaşayan canlı organizmalar üzerindeki olumsuz yöndeki etkisidir.

Abiyotik stres genel olarak kaçınılmazdır ve hayvanları da etkilemektedir. Ancak bitkiler sesil doğaları gereği buldukları ortama bağımlı yaşadıkları için bitkilerin yaşam döngülerinde daha kısıtlayıcı bir rol oynayabilmektedir. Dünya üzerinde yetişen mahsullerin büyümesi ve verimliliği açısından abiyotik stres en zararlı stres türü olarak görülmektedir (Gao vd. 2007). Buna ek olarak yapılan araştırmalar birden fazla abiyotik stres unsurunun bitkiler üzerindeki ortak etkilerinin çok daha zararlı olabileceğini göstermektedir (Mittler 2006).

Abiyotik stres faktörlerine örnek olarak yüksek sıcaklık, UV, radyasyon ve pH seviyesinde meydana gelen değişiklikler gösterilebilmektedir.

Bir bitkinin abiyotik strese karşı geliştirdiği ilk savunma mekanizması genellikle kök dokularında meydana gelmektedir. Bitkiyi toprağa bağlayan kökler sağlıklı bir biçimde bulunduğu ortama adapte olmuşsa bitkinin stres koşulları altında yaşama şansı daha yüksektir (Brussaard vd. 2007).

## **2.1 Bitkilerde Tuz Stresi**

Bitkilerde tuz stresi dünyanın değişik bölgelerinde özellikle yarı-kurak ve kurak bölgelerde yetişen bitkilerde görülmektedir. Bunun sebebi yağışı bol alan bölgelerde tuzların yıkanarak yer altı sularına karışıp daha sonra akarsu ve denizlere taşınmasıdır. Ancak deniz suyuna yakın olan bölgeler bu durumun dışında tutulmaktadır (Çulha ve Çakırlar 2011).

Bitkiler yaşamları boyunca karşılaştıkları tuz seviyesine göre iki gruba ayrılabilirler. Halofitler; toprakta bulunan tuz seviyesine alışık olup bu ortamdan etkilenmeden yaşam döngülerini sürdürebilen bitkilerdir. Glikofitler olarak adlandırılan bitkiler ise halofit olmayan bitkiler olarak bilinmektedir ve ortamdaki tuzluluk düzeyinden etkilenebilmektedirler. Glikofit bitkiler için toprakta bulunan tuz, bitkinin tolerans eşiğini geçtiğinde bitkinin yaşam döngüsünde bozulmalar meydana getirir (İpek 2015).

Suda çözülebilir tuzların, toprakta bitki üretimini olumsuz yönde etkileyecek oranda birikmesi yaklaşık 831 milyon hektarlık araziye etkileyen küresel bir sorundur. Daha özel ölçekte; tuzluluk dünyadaki su kullanılan tarım alanlarının %19,5'ini ve kuru tarım alanlarının %2,1'ini tehdit etmektedir (Neto Azevedo vd. 2004).

Toprağın yüksek tuzluluk oranına sahip olması bitkiler için zararlı olabilmektedir. Çünkü suda çözünen tuzlar ozmotik potansiyel gradyanlarını değiştirebilir ve böylece hücrel birçok fonksiyonu inhibe edebilirler (Neto Azevedo vd. 2004, Lu ve Vonshak 2002).

Tuz stresi ile karşılaşan bitkilerde, potasyum ( $K^+$ ) ve sodyum ( $Na^+$ ) iyon konsantrasyon balansının sağlanması ve bu nedenle iyon taşınımının dzenlenmesi hayati önem taşımaktadır (Büyük vd. 2012). Ayrıca, toprağın yüksek oranda tuz barındırması bitkinin su alımını kısıtlayarak fotosentez sürecini engelleyebilmektedir (Lu ve Vonshak 2002). Bitkiler,  $Na^+$  iyonunu gelişimi sırasında oluşan azalışı ve hücre ölümlerini engellemek amacıyla uzaklaştırabilir veya vakuollerinde bölümlere ayırarak depolayabilirler (Büyük vd. 2012).

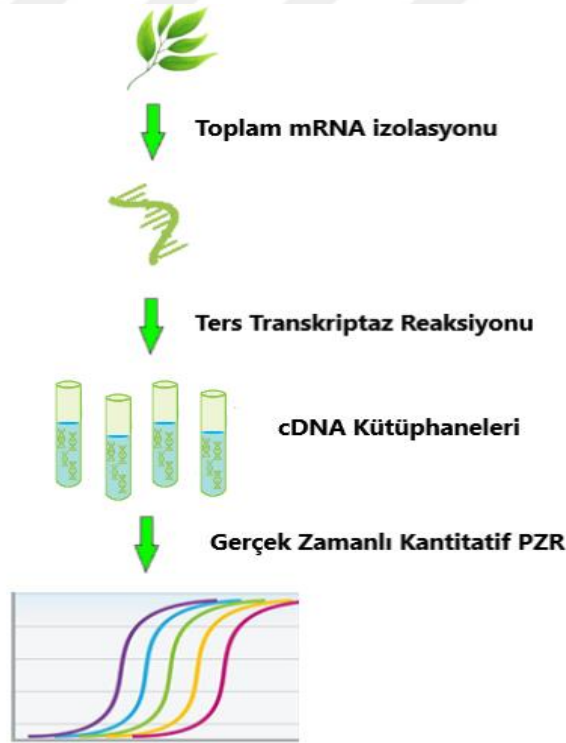
Birçok bitki türü evrimsel süreç boyunca, tuzluluğun etkilerine karşı koyabilmek için farklı mekanizmalar ve mutasyonlar geliştirmiştir (Neto Azevedo vd. 2004). Örneğin, etilen hormonu bitkilerin tuzlulukla başa çıkmasında kullanılan en etkili savunma mekanizmalarından birisidir. Bu hormon, bitki büyümesini ve gelişmesini dzenleyen ve bitkinin stres cevapları oluşturmasında etkili bir hormon olarak bilinmektedir (Tao vd. 2015).

Bitkiler, büyüme sürecinde yer alan etilenin salınması için ETO2, ERS1 ve EIN2 gibi birçok merkezi membran proteinini kullanmaktadır. Bu proteinlerdeki mutasyonlar tuz hassasiyetinin artmasına neden olabilir ve bitki büyümesini sınırlayabilir. Tuzluluğun etkilerini belirlemek için; ERS1, ERS2, ETR1, ETR2 ve EIN4 mutasyona uğramış proteinler *Arabidopsis* bitkileri üzerinde çalışılmıştır. Bu proteinler, tuz gibi belirli stres koşullarına karşı etilen sinyalizasyonu için kullanılır ve etilen salınımı öncüsü ACC, tuz stresine karşı herhangi bir hassasiyeti bastırmak için kullanılır (Lei vd. 2011).

### 3. GEN İFADESİ VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNE GENEL BAKIŞ

#### 3.1 Gen İfadesi Çalışmaları Hakkında Özet Bilgi

Gen ifade çalışmalarında yararlanılmak üzere günümüze kadar birçok teknik geliştirilmiştir. Kullanılan teknikler metodoloji olarak birbirinden farklı olsa da hepsinin temelinde DNA'dan sentezlenen mRNA molekülünün miktarsal olarak karşılaştırılması bulunmaktadır. Günümüzde gen ifadesi çalışmalarında kullanılan en yaygın teknik PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) temelli bir yöntem olan gerçek zamanlı kantitatif PZR'dir. Gerçek zamanlı kantitatif PZR tekniğinde çalışılmak istenen dokudan toplam mRNA izolasyonu yapılır ve ters transkriptaz PZR yöntemi ile izole edilen mRNA'lar cDNA formuna çevrilir. Gen, özgün primerler kullanılarak gerçek zamanlı kantitatif PZR metodu ile çoğaltılır ve PZR cihazı tarafından amplifikasyon sırasında oluşan floresans miktarı ölçülebilir. İlgilenen gen bölgesinin miktarsal analizinin yapılabilmesi için referans gen kullanımı ve bu genlerin doğrulukla (18S RNA vb.) seçilmesi çok önemlidir (Kömürçü-Bayrak ve Erginel-Ünaltuna 2011).



Şekil 3.1 Gen ekspresyonuna genel bakış

### 3.2 Transkripsiyon Faktörlerine Genel Bakış

Transkripsiyon faktörleri ökaryot kromozomlarında bulunan bir takım özel genlerin ifade seviyelerini düzenler. Buna örnek olarak 5S ribozomal RNA genlerinin transkripsiyonu DNA’da belirli spesifik bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörlerinin gen regülasyonunu düzenlemesine bağlıdır (Büyükgüzel 2000, Pabo 1992, Fairall vd.1986).

Ökaryotik kromozomlarda transkripsiyonu düzenleyen üç temel düzenleyici bulunmaktadır. Bunlar promotorlar, sessizleştiriciler ve kuvvetlendiricilerdir. Farklı DNA sekanslarından oluşan bu etmenler, DNA’nın ilgili bir bölgesine bağlanan proteinler için bağlanma alanlarını oluşturmaktadır. Proteinler DNA’ya, kimyasal yapılarında bulunan birtakım ortak motifler vasıtasıyla bağlanmaktadır. Ökaryotlardaki regülatör proteinlerin kullanıldığı ortak motifler, Heliks–Dönüş–Heliks (Sarmal–İlmek–Sarmal), Çinko Parmağı ve Lösin Fermuarı olarak isimlendirilmektedir (Büyükgüzel 2000).

#### 4. MDH GEN AİLESİ

Hayvanlar ve bitkilerde yaygın şekilde bulunan malat dehidrogenaz (MDH, EC1.1.1.37), malat ve oksaloasetatın (OAA) dönüşümünü katalize etmekte ve trikarboksilik asit döngüsü, glikoksilat bypass, fotosentez ve C4-dikarboksilik asit döngüsü gibi birçok metabolik yolda önemli rol oynamaktadır (Gielt 1992, Selinski vd 2014). MDH geni bakteriler, arkeler, mantarlar, bitkiler ve memeliler dahil olmak üzere birçok farklı kaynaktan ve mitokondri, kloroplastlar, glikoksizomlar ve peroksizomlar gibi hücre altı organelerden izole edilmiştir (Goward ve Nicholls 1994).

MDH'ler, genellikle 30 ila 35 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip dimerler veya tetramerler şeklinde düzenlenmiş özdeş alt birimlerden oluşan multimerik enzimlerdir (Banaszak ve Bradshaw 1975).

Aminoasit sekanslarına göre, MDH'in mitokondriyal izoenzimlere veya sitoplazmik / kloroplast izozimlere yakından benzeyen iki ana filogenetik gruba ayrıldığı görülmektedir (Goward ve Nicholls 1994). Mitokondrilerdeki malat dehidrogenazın sekans dizilimi sitoplazmik izozime göre prokaryotik atalarına daha çok benzerlik gösterdiğinden mitokondri ve kloroplastların endosimbioz teorisi yoluyla geliştiğini akla yatkın kılar (McAlister-Henn 1988).

Arkeal MDH amino asit sekansları, diğer organizmaların MDH amino asit sekanslarından ziyade daha çok LDH dizilerine benzerlik göstermektedir. Bu durum laktat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz arasında olası bir evrimsel bağlantı olduğunu gösterir (Cendrin vd.1993).

Malat dehidrogenazın, enzimin katalitik aktivitesinde önemli bir rolü olan mobil bir döngü bölgesine sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar, substrat bağlandıktan sonra bu döngü bölgesinin açık konformasyondan kapalı konformasyona konformasyonel değişikliğinin, substrat ve katalitik amino asitlerin solventten korunması yoluyla MDH katalizini arttırdığını göstermiştir. Çalışmalar ayrıca bu döngü bölgesinin malat dehidrogenazda yüksek oranda korunduğunu göstermiştir (Goward ve Nicholls 1994).

## 5. BİYOİNFORMATİK ÇALIŞMALAR VE ÖNEMİ

Biyoinformatik kelimesi, biyoloji ve informatik kelimelerinin birleşmesiyle türetilmiştir. Canlı bilimi olan biyolojinin informatik yöntemler kullanılarak açıklanması gereğine dayanan teknolojinin gün geçtikçe gelişmesiyle ortaya çıkmış bir disiplinlerarası yaklaşımdır. Biyoinformatik; biyolojik verileri yorumlamak ve analiz etmek için bilgisayar, yazılım gibi bilişim teknolojilerinin yanı sıra matematik ve istatistik gibi bilimlere dayanır. Biyoinformatik yaklaşımlar ile in silico koşullarda biyolojik sorgulara cevap aranmaktadır.

Biyoinformatik; karmaşık biyolojik verilerin derlenmesi, depolanması ve analiz edilmesi bilimi olarak da düşünülebilir. Genomik(s), Transkriptomik(s), proteomik(s), Metabolomik(s) teknolojilerini içine alan bilimsel bir yaklaşımdır.

Bilgisayar teknolojilerinin biyoloji, moleküler biyoloji ve tıp alanlarında sıklıkla kullanılmasıyla birlikte moleküler yapıların 2 ve 3 boyutlu temsili grafik çizimleri, moleküler dizilerin yapıları ve genetik şifrelerinin veritabanları oluşturulmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar teknolojinin gelişmesiyle beraber hızla takip edilemez bir hal almıştır. Örneğin insan ve bakteri genom projeleri biyoinformatik sayesinde yapılmış olan önemli çalışmalardan sadece birkaç tanesidir. Özellikle insan genom projesi biyoinformatiğin gelişmesinde çok büyük bir rol oynamıştır (Collins vd.2003).

## 6. KAYNAK ÖZETLERİ

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, fasulyede malat dehidrogenaz enziminin (MDH) yapısı, özellikleri, fonksiyonları ve genetik kontrolü hakkında genel bilgi sahibi olunması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, fasulye bitkisinde (*P. vulgaris* L.) Malat Dehidrogenaz (MDH) gen ailesinin biyoinformatik yaklaşım aracılığıyla tanımlanması, gen ve protein düzeyinde detaylı şekilde karakterize edilmesi ve bulunan MDH üyelerinin abiyotik stres koşulları altındaki rollerinin kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) ile mRNA düzeyinde analizine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Malat dehidrogenaz birçok bitki ve hayvanda bulunan ve birçok metabolik süreçte önemli roller oynayan bir enzimdir. Ancak günümüzde bu gen ailesi ile ilgili yapılan çalışmaların sayısının hala yetersiz olduğu görülmektedir (Chen vd. 2019).

Enzimler, yaşayan organizmalardaki kimyasal tepkimelerin süresini kısaltan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük grubunu oluştururlar. Bir canlı cinsinde birbirleriyle benzer tepkimeyi katalizleyen aynı olmayan kimyasal yapıya sahip enzimler izoenzim (izozim) olarak adlandırılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 1993). İzoenzimleri ilk olarak saptayan Markert ve Moller'e (1959) göre izoenzimler, başka lokustaki genler aracılığıyla kodlanan, özdeş substrat niteliğindeki enzimlerin çoklu moleküler şekilleridir (Bilgen ve ark. 1995). Yine, Rodwell (1993), izoenzimleri benzer organizmanın eş olmayan dokularında ve hücre tiplerinde benzer karakteristik etkinliğin aynı olmayan şekilleri olarak belirtmiştir (Taşpınar ve Tosun 2002). Rahatça tanımlanmasıyla beraber bitkilerin birden çok yapısında ve organında varolması, malat dehidrogenaz enziminin emniyetli bir ölçü olduğunu göstermektedir.

Bitkilerde malat dehidrogenaz (MDH, EC 1.1.1.37) çok sayıda izoforma sahiptir ve NAD elektron havuzunun indirgenme-oksidasyonuna bağlı malat ve oksaloasetatın (OAA) birbirine dönüşümünü katalizler (Gield 1992). Birbirinden farklı kinetik özelliklere ve fizyolojik fonksiyonlara sahip NAD'a bağlı MDH'lar, sitozol, plastid, mitokondri, peroksizomlar ve kloroplastlarda bulunurlar (Gield 1992; Scheibe 2004). Genel olarak, MDH'ların, alt üniteleri 30,01 ila 35,01 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahiptir ve dimer ya da tetramer olarak kararlı yapıdadırlar. *Nitzschia alba*'da



tanımlanan MDH tek oktamerik bir enzimdir ve 8 alt birimden oluşur (Yueh vd. 1989). Her bir alt birim, dinükleotit NAD bağlama alanında korunmuş bir NAD bağlayıcı bölge (glisin motifi) ve katalitik C-terminalinde (Musrati vd. 1998) bulunan bir substrat bağlama bölgesi (H-site / aktif bölge) içerir.

Gen organizasyonu ve protein dizi benzerliğine bağlı olarak, farklı MDH'lar farklı reaksiyon gereksinimlerine, malat seçiciliğine ve hücre içi yerleşime sahiptirler (Musrati vd. 1998). Bugüne kadar buğday (Ding ve Ma 2004), *Arabidopsis* (Tomaz vd. 2010), mısır (Longo ve Scandalios 1969), elma (Yao vd. 2011) ve pamuk (Wang vd. 2010) dahil olmak üzere birçok bitki türünde MDH genlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Şimdiye dek tanımlananlar arasında, mitokondriyal ve sitozolik MDH genleri, bitkiler aleminde bolca bulunmalarından dolayı en sık araştırılan MDH üyeleri olmuştur (Mohammad vd. 2016). Gün geçtikçe artan çalışmalar, MDH'ların ve bunların katalitik ürünü malatların, kök büyümesi (Menckhoff vd. 2013), tohum gelişimi (Beeler vd. 2014) ve yaprak solunumu (Tomaz vd. 2010) gibi çeşitli bitki büyüme ve gelişme süreçlerinde yer aldığını göstermektedir. MDH'lar ayrıca patojen (Rudrappa vd. 2008), besin maddesi (Wang vd. 2010), tuz ve soğuk (Yao vd. 2011) stresleri gibi çeşitli biyotik ve abiyotik streslerde de önemli rol oynamaktadırlar (Mohammad vd. 2016).

Yao vd., (2011) elmadaki sitozolik NAD-bağımlı MDH geninin ifadesinin, bitki büyümesi/gelişmesi ve metabolik aktivitesiyle pozitif korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca NAD-bağımlı MDH geninin düşük sıcaklıklara ve tuz stresine yanıtta önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır (Yao vd. 2011).

Bir başka çalışmada, kloroplastlarda NADP bağımlı MDH geninin aşırı ifadesinin, transgenik patates bitkilerinde ferredoksinin redoks durumunu önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Backhausen vd.,1998).

Iannetta vd., (2004) tarafından, mitokondriyal NAD bağımlı MDH geninin çileklerdeki aktivitesinin olgunlaşma sürecinde önemli ölçüde arttığı ve bu aktivite artışının meyvenin büyümesi ve gelişmesiyle yakından ilgili olduğu gösterilmiştir.

Salatalıktan izole edilen NAD-bağımlı MDH geninin, peroksizom ve glisoksizomda rol oynadığı ve mRNA düzeyinin tohum çimlenmesi sırasında önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Kim ve Smith, 1994).

Kavak, uzun bir yetiştirme geçmişine sahiptir ve endüstriyel malzeme olarak kullanımı değerlidir. Aynı zamanda ekonomik bir orman ağacı türü olarak da ekolojiyi korumada yaygın bir etki sahibidir (Tun vd., 2018). Toprak tuzluluğunun artmasıyla birlikte, tuz stresi orman ağaçlarının büyümesini sınırlayan önemli bir faktör haline gelmiştir (Zhou vd. 2018). Bu nedenle, tuz toleransı ile ilgili genlerin fonksiyonlarını öğrenmek için yapılan çalışmalar ilgi görmektedir (Chen vd. 2019).

Mısır bitkisinde kalıtsal saflığın belirlenmesi için dört adet birbirinden farklı izoenzimle (MDH, PGI, ADH ve PGM) elektroforetik analiz yapan Bilgen ve ark. (1995), bu melez mısırların her biri için farklı bantlar belirlemişlerdir ve bu bant desenlerini belirten zimogramlar çizmişlerdir. Araştırmacılar zimogramları anodal migrasyonlu bantların sayısal miktarına ve kalınlığına göre yorumlamışlar ve böylelikle MDH izoenziminin melez mısır ticari varyasyonlarında polimorfik olarak bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma nihayetinde izoenzim elektroforezinin hem genotiplerin saptanmasında hem de melez bitkilerin kalıtsal saflığının kontrol edilmesi için uygun bir yöntem olduğunu ve buna bağlı olarak izoenzimlerin güvenilir genetik belirteç olarak yaygın bir uygulama alanında sahip olacağını bildirmişlerdir (Bilgen vd. 2002).

Birbiyle benzer olmayan buğday-çavdar adisyon hatlarında (bir veya birkaç kromozom ilave edilmiş hatlar) çalışma yapan Salinas ve Benito (1984), çavdarda (*Secale cereale* L.) peroksidaz izoenziminin oluşmasını sağlayan yapısal genlerin kromozomlarda bulunduğu alanların ortaya çıkarılması için kuru tohum, yaprak ve köklerden elde ettikleri enzimler üzerinde araştırma yapmışlardır. Araştırmacılar, bu enzimi yöneten genlerin kromozom üzerindeki alanlarını saptamışlardır. Yine Benito ve Salinas'ın (1985) gerçekleştirdiği bir denemede, malat dehidrogenaz izoenziminin şifrelediği yapısal genleri göstermeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar, malat dehidrogenaz enziminin monomerik ve dimerik davranışlarıyla, bu enzimin yapılmasını sağlayan kromozom kollarını ortaya çıkarmışlardır (Bilgen vd. 2002).

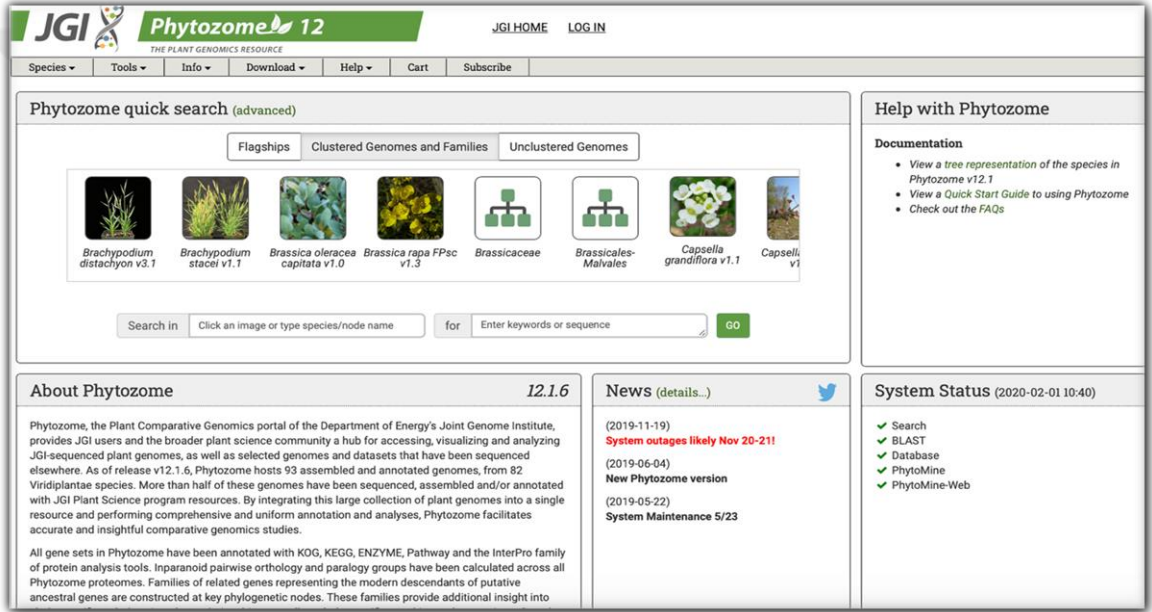
MDH gen ailesinde yapılan çalışmalar neticesinde araştırmacılar tarafından bu gen ailesinin türlere ilişkin filogeni çalışmalarında kullanılabileceği belirtilmiştir. Örneğin; Taşınar'ın (1996) gerekteştirdiği bir çalışmada kültür avdarının ve çok yıllık çavdarın diploid ve tetraploidleri elektroforez metodu kullanılarak malat dehidrogenaz gibi bazı izoenzimler (peroksidaz, polifenol oksidaz ve malatdehidrogenaz) açısından değerlendirilmiştir. Bu enzimlerin, tek yıllık kültür avdarı ile çok yıllık avdar arasındaki kalıtsal akrabalığın belirlenmesinde belirteç olup olmayacağı araştırılmıştır. Araştırma nihayetinde incelenen enzimlerin meydana getirdikleri bant desenlerine göre, *Secale cereale*'nin evrimine *Secale montanum*'un genitr olarak görev yaptığı görülmüştür. Böylelikle avdar bitkisinde yapılacak olan akrabalık saptama araştırmalarında bu enzimlerin belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Taşınar 1996, Bilgen vd. 2002).

Benzer bir şekilde Biruk ve Kazlovskya (2008) 57 adet elma ağacı çeşidinin akrabalık ilişkilerini belirlemeye yönelik gerekteştirdikleri bir çalışmada malat dehidrogenaza dayalı izozim analizinden yararlanmışlardır. Bir başka çalışmada ise 290 adet şeftali çeşidine ilişkin ışlah programında polimorfik MDH lokuslarından istifade edilmiştir (Arulsekar vd. 1986; Yudina 2012).

## 7. MATERYAL VE YÖNTEM

### 7.1 *Phaseolus vulgaris* Genomunda MDH Proteinlerinin Tanımlanması

*A. thaliana*, *Cucumis sativus*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Medicago truncatula*, *N. tabacum*, *Oryza sativa*, *Physcomitrella patens*, *Ricinus cummunis*, *Solanum lycopersicum*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Vigna radiate*, *Vitis vinifera* ve *Zea mays*'a ait MDH protein ailesi üyeleri Şekil 7.1 Phytozome v12.1 veritabanından indirilmiştir.



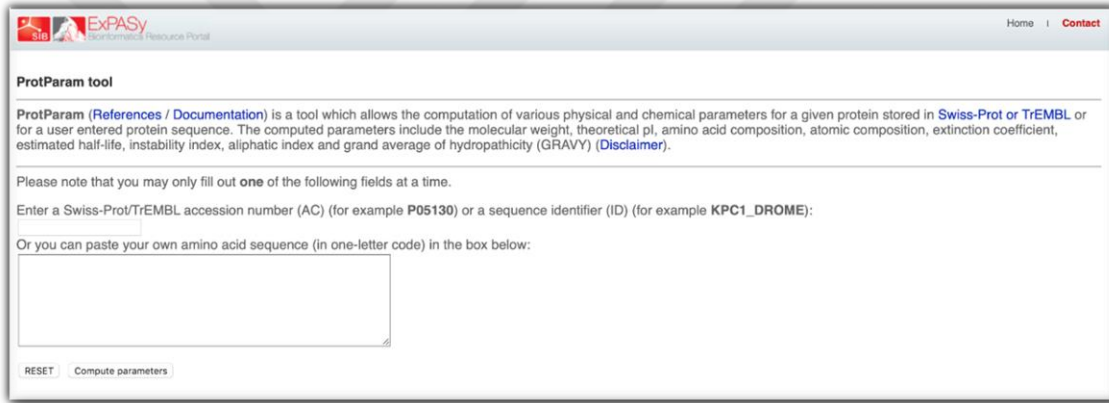
Şekil 7.1 Phytozome v12.1 veritabanı

Olası tüm MDH proteinlerini fasulye genomunda tanımlamak amacıyla Phytozome v12.1 veritabanında (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) ve hidden Markov model veritabanında (HMM, <http://www.ebi.ac.uk>) fasulye proteomuna karşı protein blastlama (blastp) işlemi gerçekleştirilmiş ve aday MDH proteinlerinin hipotetik karakterizasyonu için NCBI blastp modulünde arama yapılmıştır (Goodstein vd. 2012). MDH gen ailesine ait ihtiyaç fazlası ve tekrarlayan diziler ise 'decrease redundancy tool' ([http://web.expasy.org/decrease\\_redundancy/](http://web.expasy.org/decrease_redundancy/)) kullanılarak tespit edilip çalışmadan çıkartılmıştır. Tanımlanan proteinlerin moleküler ağırlıkları, kararsızlık indeksleri ve

teorik izoelektrik noktaları (pI) ‘expasy ProtParam Tool’ aracılığıyla belirlenmiştir. (Şekil 7.2 ve Şekil 7.3)



Şekil 7.2 ExPASy Decrease Readundancy Tool



Şekil 7.3 ExPASy ProtParam Tool

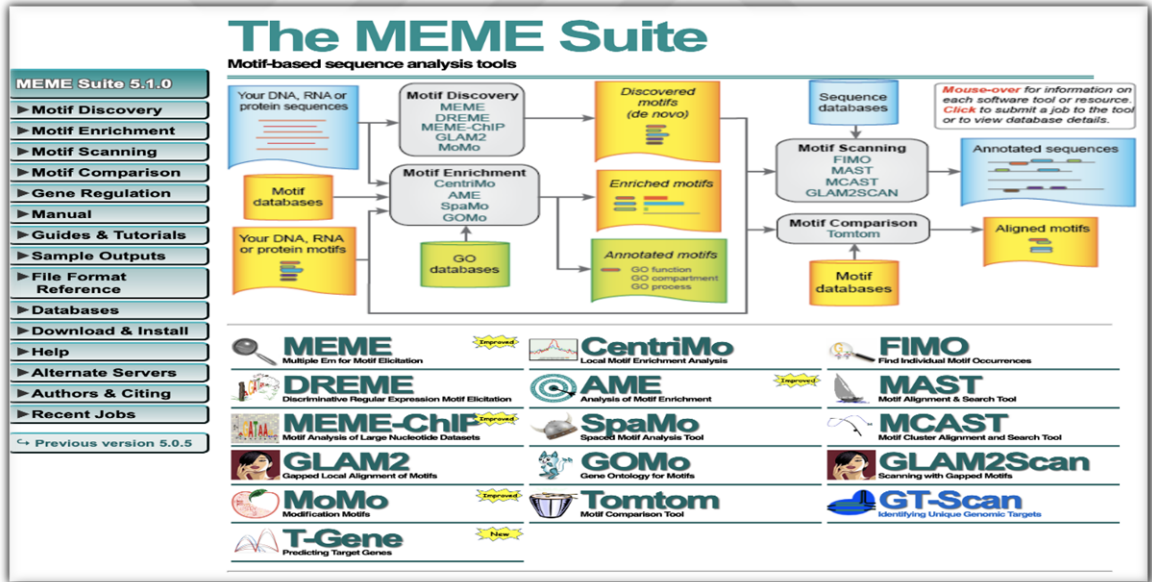
## 7.2 Tanımlanan Fasulye MDH Genlerinin Yapısı, Fiziksel Konumu, Gen Duplikasyonları ve Korunmuş Motiflerin Belirlenmesi

Fasulye’deki MDH gen bölgelerinin ekzon-intron yapısı hakkında bilgi sahibi olmak için MDH genlerinin genom ve kodlayan dizileri Şekil 7.4 Gene Structure Display Server v2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) kullanılarak analiz edilmiştir. Kromozomal yerleşim, büyüklük (bp) ve intron sayıları hakkındaki veriler Phytozome v12.1 veritabanı kullanılarak saptanmıştır. Tanımlanan tüm MDH genleri MapChart programı aracılığıyla fasulye kromozomları üzerinde çizilerek gösterilmiştir. Kodlanan dizilerin ve amino asitlerin hizalanmasının ardından %80 ve üzeri benzerlik gösteren gen bölgeleri gen duplikasyonu olarak belirlenmiştir ve gen duplikasyonları tandem veya

segmental duplikasyon olarak sınıflandırılmıştır. Fasulye MDH proteinlerindeki diğer korunmuş motifleri tanımlamak için Şekil 7.5 Multiple EM for Elicitation tool (MEME v4.11.1; <http://meme-suite.org/>) kullanılmıştır (Bailey vd. 2006).



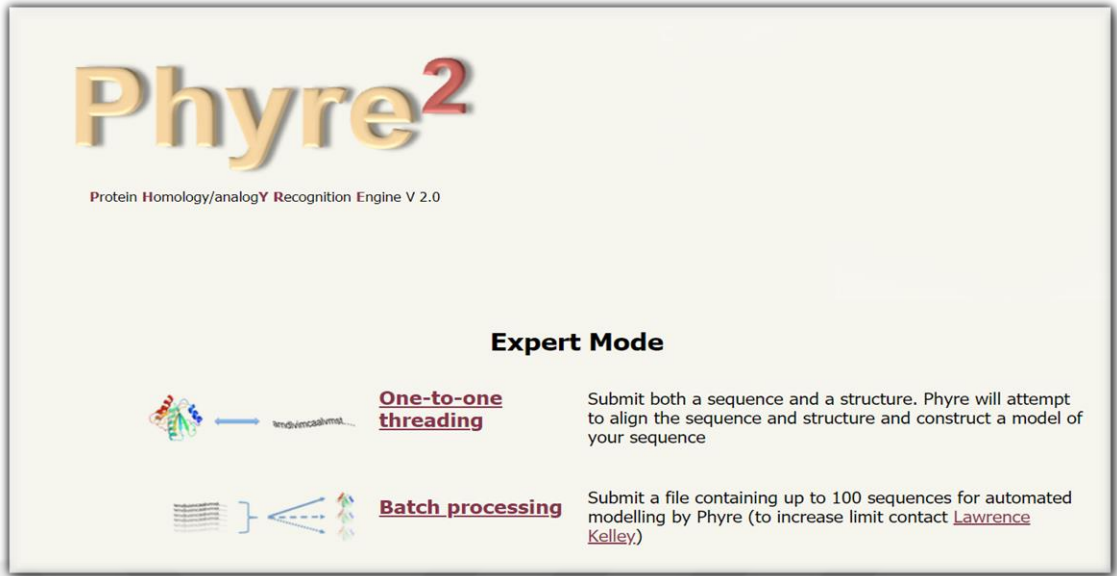
Şekil 7.4 Gene Structure Display Server veri tabanı



Şekil 7.5 Meme Suite Veri Tabanı

### 7.3 Fasulye MDH Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi

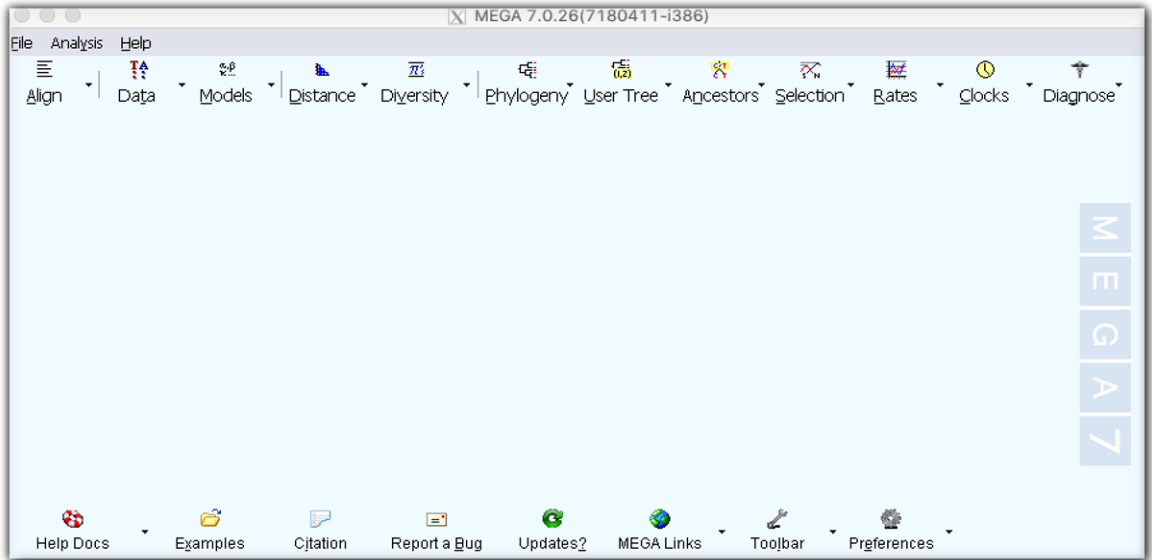
Veri tabanlarından elde edilen Fasulye MDH protein dizilerinin homoloji modellemesi Şekil 7.6 Phyre2 programı (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/login.html>) ile elde edilmiştir. MDH proteinlerinin 3 boyutlu yapıları tahminleri yapıldıktan sonra güvenilirlik düzeyi %90 üstü ve %90 altı olarak sınıflandırılmıştır.



Şekil 7.6 Phyre2 Veri Tabanı

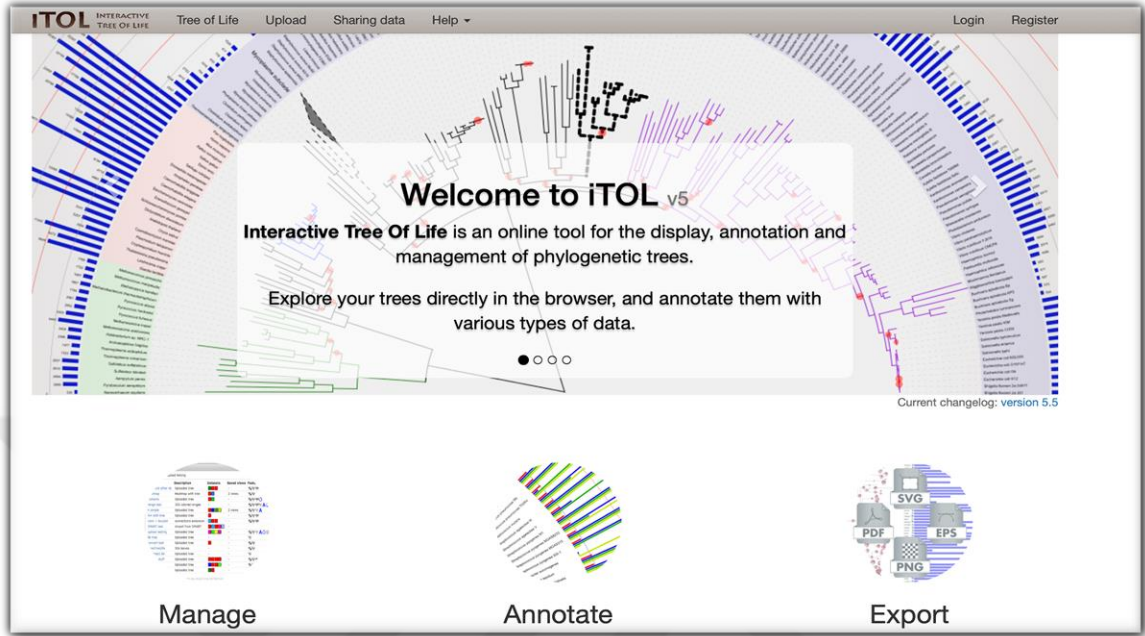
#### 7.4 Filogenetik Analiz ve Dizilerin Hizalanması

Fasulye MDH protein dizileri ClustalW (Thompson vd., 1997) yardımı ile hizalandıktan sonra Şekil 7.7 MEGA7 kullanılarak bootstrap değeri 1000 tekrar içeren Neighbor joining (NJ) metodu ile filogenetik analizi yapılmıştır ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur.



Şekil 7.7 Mega 7 Veri Tabanı

Oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 7.8 iTOL (<http://itol.embl.de/index.shtml>) ile görsel hale getirilerek düzenlenmiştir (Letunic ve Bork 2011, Tamura vd. 2011).



Şekil 7.8 iTOL Veri Tabanı

## 7.5 Gen Duplikasyonlarının ve Benzerlik Oranlarının Belirlenmesi

Fasulye genomunda bulunan segmental gen duplikasyonları Plant Genome Duplication Database (<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/index/locus>) kullanılarak belirlenmiştir. CLUSTALW ile ilgili diziler hizalandıktan sonra CODEML program olan PAL2NAL ile homolog ( $K_a$ ) ve homolog olmayan ( $K_s$ ) değişim oranları belirlenmiştir (Şekil 7.9 ve Şekil 7.10). Duplikasyon zamanları (Milyon yıl önce, MYÖ)  $T = K_s / 2\lambda$  ( $\lambda = 6.56E-9$ ) formülü ile hesaplanmıştır (Yang ve Nielsen 2000, Lynch ve Conery 2003).



**PGDD**

PLANT GENOME DUPLICATION DATABASE






**While PGDD is no longer funded and therefore is not being regularly updated, we intend to keep it online for as long as resources permit and interest warrants. Periodic updates may occur but cannot be assured. Note the last update of PGDD was in 2014.**

PGDD is a public database to identify and catalog plant genes in terms of intragenome or cross-genome syntenic relationships. Current efforts focus on flowering plants with available whole genome sequences (preferably assembled pseudomolecules with ordered gene models).

**DATA SOURCES**

**Plant genomes in this database (47 genomes)**

Species name	Common name	Version	Gene number	Access	Reference
<i>Actinidia chinensis</i>	Kiwifruit	May 2013	32,670	KGD	Nature Communications
<i>Amborella trichopoda</i>	Amborella	Version 1.0	26,846	AGD	Science
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Lyrate rockcress	Version 1.0	32,670	JGI	Nature Genetics
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	TAIR10	27,416	TAIR	Nature
<i>Brachypodium distachyon</i>	Purple false brome	Version 2.1	31,694	JGI	Nature
<i>Brassica oleracea</i>	Kale	Version 2.1	59,225	BRAD	Genome Biology
<i>Brassica rapa</i>	Chinese cabbage	Version 1.3	40,492	BRAD	Nature Genetics
<i>Beta vulgaris</i>	Sugar beet	RefBeet-1.1	27,421	BVR	Nature
<i>Cajanus cajan</i>	Pigeonpea	Nov 2011	48,680	IIPG	Nature Biotechnology
<i>Capsella rubella</i>	Capsella	Version 1.0	26,521	JGI	Nature Genetics
<i>Capsicum annuum</i>	Hot pepper	Version 1.55	34,899	PepperGenomeDB	Nature Genetics
<i>Carica papaya</i>	Papaya	ASGPBv0.4	24,782	Hawaii	Nature
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Green algae	Version 5.5	17,741	JGI	Science

  
[HOME](#)  
[DOT PLOT](#)  
[LOCUS SEARCH](#)  
[MAP VIEW](#)  
[DOWNLOADS](#)  
[ABOUT](#)  
[CONTACT](#)  
[MCSCAN](#)  
**TOOLS FOR SYNTENY**  
  
  
  


Şekil 7.9 Plant Genome Duplication Veri Tabanı

**PAL2NAL**

[What is PAL2NAL?](#) [What's new](#) [Reference](#) [Run PAL2NAL](#) [Download](#) [Contact](#)

**What is PAL2NAL?** [Top](#)

PAL2NAL is a program that converts a multiple sequence alignment of proteins and the corresponding DNA (or mRNA) sequences into a codon alignment. The program automatically assigns the corresponding codon sequence even if the input DNA sequence has mismatches with the input protein sequence, or contains UTRs, polyA tails. It can also deal with frame shifts in the input alignment, which is suitable for the analysis of pseudogenes. The resulting codon alignment can further be subjected to the calculation of synonymous ( $d_S$ ) and non-synonymous ( $d_N$ ) substitution rates.

If the input is a pair of sequences, PAL2NAL automatically calculates  $d_S$  and  $d_N$  by the codeml program in [PAML](#).

**What's new** [Top](#)

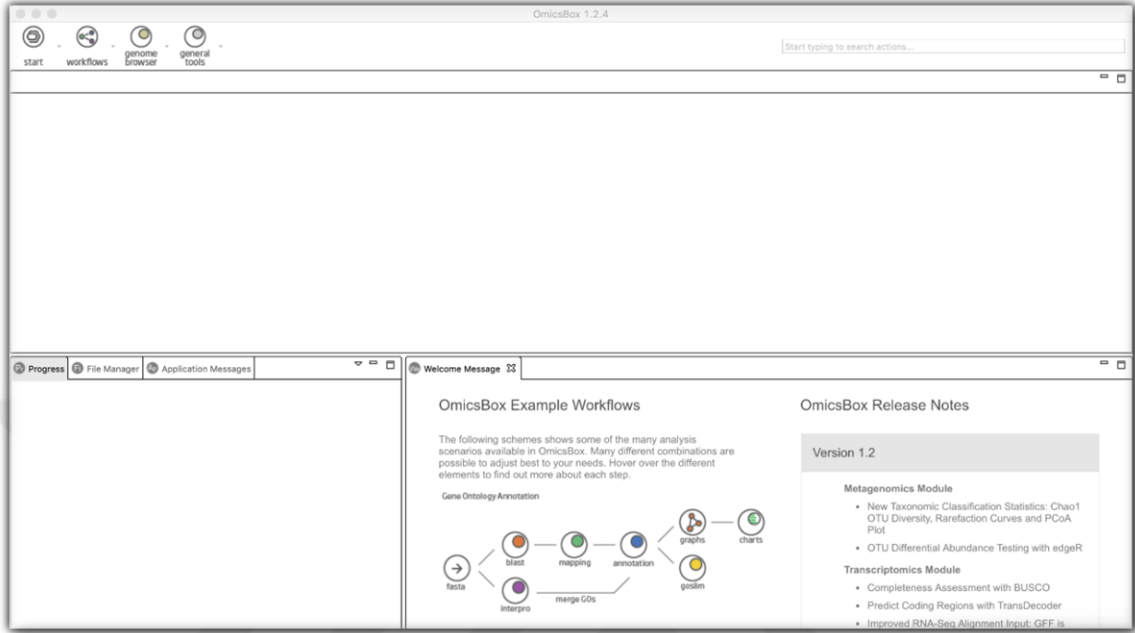
- Dec 02, 2011: Updated to version 14.
  - Codon tables are expanded. (Now all the [codon tables in NCBI](#) are covered.)
- Jul 26, 2010: The script in the distribution version is updated to v13.
- Sep 08, 2009: If  $d_S$  and  $d_N$  are calculated, the numbers of synonymous (S) and non-synonymous (N) sites are also reported.
- Apr 03, 2009: New mirror site for [PAL2NAL at Kyoto University](#).
- Feb 05, 2007: Updated to version 12.
  - If you use the same IDs in the input files 1 and 2, then the order of the sequences does not have to be the same.
  - Some routines in the script is optimized, and now it is faster than before.
  - In case of the error ("inconsistency between pep and nuc"), the script automatically runs bi2seq to show why the protein seq and DNA seq don't match.

Şekil 7.10 PAL2NAL Veri Tabanı

## 7.6 Gen Ontoloji Analizi

Fasulye MDH protein dizilerinin fonksiyonel ontolojileri Şekil 7.11 Blast2GO (<http://www.blast2go.com>) programı kullanılarak belirlenmiştir. Protein dizilerinin ontoloji analizleri öncelikle BLASTp, ardından haritalama ve ontoloji algoritmaları ile

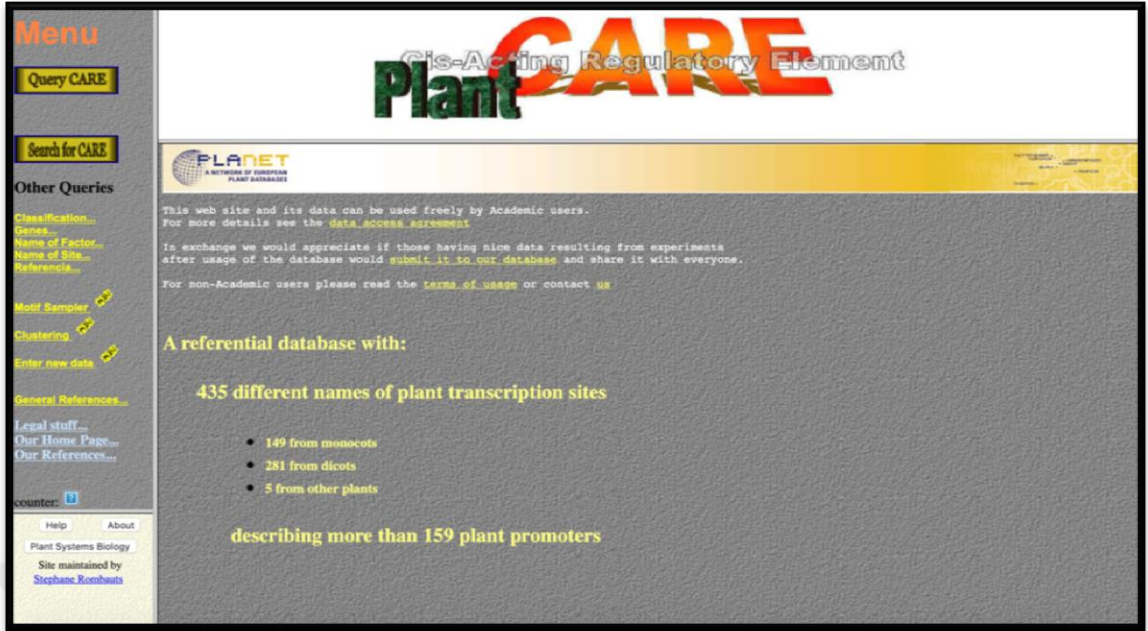
sınanarak proteinlerin moleküler fonksiyonları, hücresel bileşenleri ve biyolojik süreçleri değerlendirilmiştir.



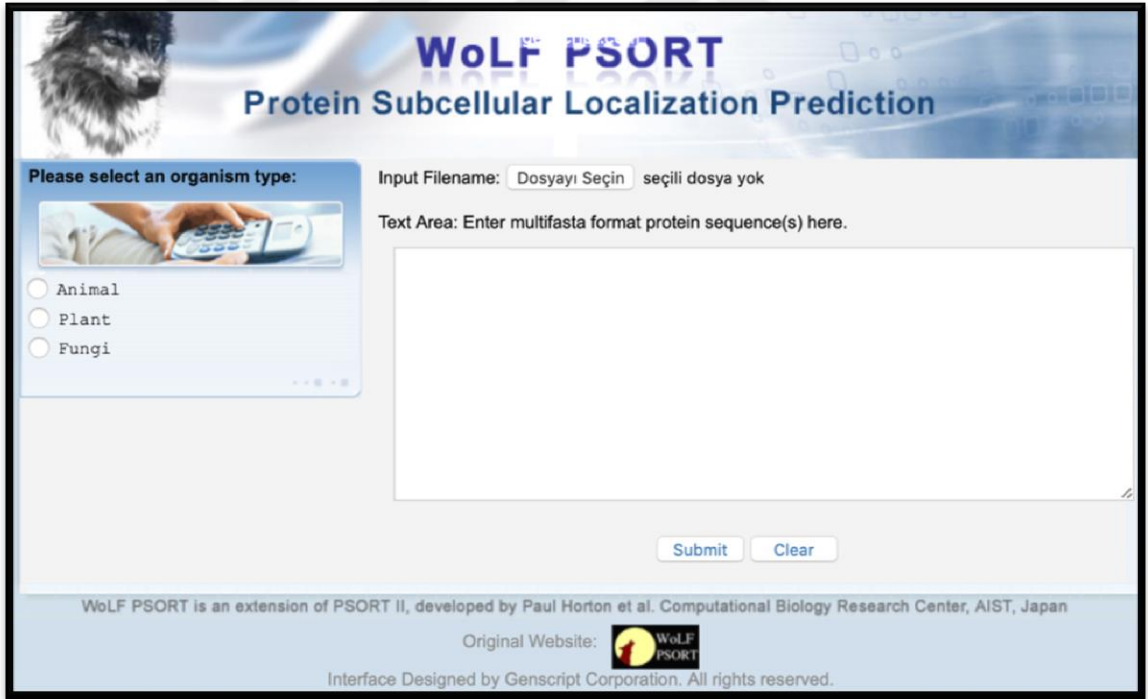
Şekil 7.11 Blast2go Veri Tabanı

## 7.7 Pvul-MDH Ailesinin Promotor Analizi ve Hücre İçi Lokalizasyonu

5' upstream akış bölgeleri analizinde (Pvul-MDH ailesinin her bir geninin 2 kb DNA dizisi) Phytozome database v11 ve cis-element taraması için Şekil 7.12 plantCARE veritabanı (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) kullanılmıştır. Pvul-MDH proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu, WoLF PSORT ([http://www.genscript.com/psort/wolf\\_psort.html](http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)) ve TargetP Şekil 7.13 1.1 veritabanı (<http://www.cb0s.dtu.dk/services>) kullanılarak belirlenmiştir (Emanuelsson vd. 2007, Horton vd. 2007).



Şekil 7.12 PlantCARE veri tabanı



Şekil 7.13 WoLF PSORT veri tabanı

## 7.8 Mikro-RNA'ların (miRNA) ve hedefledikleri fasulye MDH genlerin belirlenmesi

Bilinen tüm bitki miRNA dizileri miRBase v22.0 (<http://www.mirbase.org>) veritabanından indirilmiştir. Tüm bitki miRNA'ları ve kodlanan fasulye MDH hedef genleri psRNA Target Server (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget>) kullanılarak hizalanmıştır (Şekil 7.14). -34-miRNA'ların hedefleri varsayılan olan gen homologlarının tanımlanması ve validasyonunu sağlamak amacıyla Şekil 7.15 BLASTX ile fasulye EST (NCBI) dizilerine karşı aranmıştır (Zhang 2005).

Şekil 7.14 miRBase v22.0 Veri Tabanı

Şekil 7.15 BLASTX Veri Tabanı

## 7.9 Transkriptom Datası ile *in-siliko* Gen Ekspresyon Analizi



**SRX339933: Transcriptome analysis of common bean leaf (control of salt treatment)**  
1 ILLUMINA (Illumina HiSeq 2000) run: 13M spots, 2.3G bases, 1.6Gb downloads

**Submitted by:** BOGAZICI UNIVERSITY

**Study:** Phaseolus vulgaris strain:Ispir Transcriptome or Gene expression  
[PRJNA216981](#) • [SRP029243](#) • [All experiments](#) • [All runs](#)  
[show Abstract](#)

**Sample:** Salt treated Leaf (Control)  
[SAMN02333806](#) • [SRS473677](#) • [All experiments](#) • [All runs](#)  
**Organism:** [Phaseolus vulgaris](#)

**Library:**  
**Name:** 1LC  
**Instrument:** Illumina HiSeq 2000  
**Strategy:** RNA-Seq  
**Source:** TRANSCRIPTOMIC  
**Selection:** PCR  
**Layout:** PAIRED

**Spot descriptor:**  
1 forward 101 reverse

**Runs:** 1 run, 13M spots, 2.3G bases, 1.6Gb

Run	# of Spots	# of Bases	Size	Published
<a href="#">SRR957667</a>	12,953,666	2.3G	1.6Gb	2015-07-22

ID: 477717

Şekil 7.16 NCBI Sequence Read Archive Veri Tabanı

In siliko gen ekspresyon analizinde Hiz vd. (2014) tarafından NCBI'a yüklenen SRR957667 (kontrol yaprak), SRR958472 (tuz ile muamele edilmiş kök), SRR958469 (kontrol kök) ve SRR957668 (tuz ile muamele edilmiş yaprak) kodlu Illumina ile yapılmış okumalar kullanılmıştır (Hiz vd. 2014). Okumalar öncelikle CLC-Genomics (<https://digitalinsights.qiagen.com>) programı ile normalize edilerek birleştirilmiştir. Bir dizi normalizasyon ve kalite filtreleme algoritmaları uygulandıktan sonra her gen bölgesi için elde edilen baz okumaları FASTA formatında depolanmıştır. Illumina ile üretilen sekans okumalarından adaptör bölgeler ve kaliteli olmayan okumalar FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) programı ile belirlendikten sonra çıkarılmıştır. Geriye kalan kaliteli okumalara ait farklı ekspresyon seviyelerine bakmak için CLC genomics programı kullanılmıştır. Gen ifade değerleri elde edilen gen bölgeleri ile oluşturulan matriks Şekil 7.17 CIMminer (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/home.do>) kullanılarak görsel hale getirilmiştir.



Şekil 7.17 CIMminer Veri Tabanı

## 7.10 Bitki Materyalleri, Büyüme Koşulları ve Stres Muamelesi

Önceki çalışmalarımıza göre ‘Yakutiye’ tuza toleranslı ‘Zülbiye’ tuza duyarlı olarak belirlendiği için cv. ‘Yakutiye’ ve cv. ‘Zülbiye’, "Geçiş Bölgesi Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye’den" tedarik edilmiştir (Guler vd. 2012). Gen ekspresyon analizi için 5 dakika boyunca %5 (v/v) hipoklorit içeren bir çözelti içerisinde yüzey sterilizasyonunun ardından her iki çeşit fasulye tohumları çimlendirilmiştir ve 0.2L modifiye edilmiş 1/10 Hoagland çözeltisi içeren hidrofonic ortamlarda büyütülmüştür. Hoagland çözeltisi, son konsantrasyonu 2 mM Ca,  $10^{-6}$  M Mn, 4 mM NO<sub>3</sub>,  $2.10^{-7}$  M Cu, 1 mM Mg,  $10^{-8}$  M NH<sub>4</sub>, 2 mM K,  $10^{-6}$  M Zn, 0.2 mM P,  $10^{-4}$  M Fe and  $10^{-6}$  M B olan makronütrient (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ve KCl) ve mikronütrientleri (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>Mo, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) içeren bir besin solüsyonudur (Barac vd. 2004). Fasulye fideleri, 25 ° C’de ve %70 bağıl nemde  $250 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fotosentetik foton akışı ile ışık altında kontrollü bir iklimlendirme kabininde inkübe edilmiştir. Tuz stresi, Hoagland çözeltisi ile birlikte, fasulye fidelerinin büyüme odasındaki ilk trifoliat aşamasına ulaşmasından sonra, 9 günlük bir süre boyunca 150 mM NaCl (orta derece tuzluluk stresi için) ile uygulanmıştır. Stres uygulamasının dokuzuncu gününden itibaren iki farklı fasulye çeşidinin kök ve yaprak dokuları qRT-PCR reaksiyonları için üç biyolojik tekrar olarak örneklendirilmiştir.



Şekil 7.18 Fasulye Fideleri. A. Kontrol bitkileri, B. Stres altındaki bitkiler

## 7.11 Total RNA izolasyonu

Real-time PCR için örneklendirilen yaprak ve kök dokuları toplam RNA izolasyonu uygulamasına kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'lik buzdolabında saklanmıştır. Toplam RNA izolasyonu 'SV Total RNA Isolation' kiti (Promega) kullanılarak sağlanmıştır.

### SV Total RNA Isolation System Total RNA İzolasyon Protokolü:

1. Homojenize edilen bitki doku örnekleri bulunan her tüpe 175  $\mu\text{l}$  Lysis Buffer (RLA + BME) eklendikten sonra dikkatlice ters düz edilerek karıştırıldı.
2. 350  $\mu\text{l}$  Dilution Buffer (RDA, blue) eklendi ve 3-4 kere ters düz edilerek karıştırıldı.
3. 12.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve üstte kalan lizat yeni bir tüpe aktarıldı.
4. 200  $\mu\text{l}$  %95 EtOH eklendikten sonra dikkatlice karıştırılarak lizatın temizlenmesi sağlandı.
5. Oluşan karışım membran filtrelili özel tüplere aktarıldı ve 12.000 rpm' de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı.
6. Membran filtresinin üzerine 600  $\mu\text{l}$  RNA Wash Solution (RWA) eklendi ve 12.000 rpm' de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
7. DNase inkübasyon solüsyonu komponentleri

Çizelge 7.1 DNase inkübasyon solüsyonu komponentleri ve hacimleri

Çözelti	Hacim	Yellow Core Buffer
Yellow Core Buffer	40 $\mu\text{l}$	0.0225M Tris (pH 7.5)
MnCl <sub>2</sub> , 0.09 M	5 $\mu\text{l}$	1.125M NaCl
DNase I	5 $\mu\text{l}$	0.0025% yellow dye (w/v)

8. Membran üzerine 50  $\mu\text{l}$  DNase mix eklendi ve oda sıcaklığında, 15 dakika boyunca inkübe edildi.
9. İnkübasyon uygulandıktan sonra üzerine, 200  $\mu\text{l}$  DNase Stop solüsyonu (DSA+EtOH) eklendi.



10. DNase uygulaması sonrasında, 600 µl RNA Wash solüsyonu (RWA) eklendi ve 12.000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
11. 250 µl RNA Wash Solution eklendi ve 12.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
12. Özel membran kolonu yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl Nuclease-Free Water eklenerek 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Son olarak -80°C 'lik buzdolabına kaldırıldı.

İzole edilen RNA'ların kalitesi ve miktarını kantitatif olarak belirlemek için NanoDrop Lite UV-vis spektrofotometre kullanılmıştır. Ayrıca RNA'ların varlığı agaroz jel elektroforezi (%1,5 agaroz) yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır.

### 7.12 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

İzole edilen toplam RNA' lardan cDNA kütüphanesi oluşturulması için cDNA sentez kiti (iScript™ cDNA Synthesis Kit - Bio-Rad ) kullanılmıştır. cDNA sentez reaksiyonunda bulunan bileşenler ve reaksiyon aşamaları aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir.

Çizelge 7.2 cDNA sentez kiti ve bileşenleri

<b>Komponentler</b>	<b>Reaksiyon Başına Hacim</b>
5x iScript Reaksiyon Karışım	4 µl
iScript Ters Transkriptaz	1 µl
Nükleaz olmayan su	12 µl
RNA Kalıbı	3 µl

### 7.13 Primer Dizaynı

Primer dizaynı Primer 3 yazılımı aracılığıyla tez çalışmasında tanımlanan ve karakterize edilen *MDH-3*, *MDH-6*, *MDH-8* genlerine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak ise ACT (Actin) (XM\_007132008.1) geni belirlenmiştir.

Çizelge 7.3 Çalışmada kullanılan primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer	Sekans (5' - 3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)
<i>MDH-3 F</i>	TGC AAC ACA CCC TCA CAA GT	60.03
<i>MDH-3 R</i>	ACC AGG GCA ATT ATC CGC AA	60.03
<i>MDH-6 F</i>	AGG AGT GAT GTT GGG TGC TG	59.96
<i>MDH-6 R</i>	TCC ACC AAC CAT CAC AGC AA	59.82
<i>MDH-8 F</i>	CTG CAA CCT TGT CAA TGG CC	60.04
<i>MDH-8 R</i>	AGC CTC ACC TTG GAA GCA AA	59.81
<i>ACT-F</i>	CCG CAA TAC CAG GGA ACA TG	58.98
<i>ACT-R</i>	TTC CGA TGC CCA GAA GTT CT	59.02

### 7.14 Real-Time PCR Reaksiyonları

Biyoinformatik analizleri yapılan *MDH-3*, *MDH-6*, *MDH-8* genleri hedef gen ve *ACT* (NCBI Entrez Gene ID: CV537379) housekeeping gen olarak kullanılmış ve Real-Time reaksiyonları Roche Diagnostics Light Cycler ® Nano cihazında SYBR Green I boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR reaksiyonlarının optimizasyonu için ön denemeler yapılmıştır. PCR etkinliğini saptamak ve hedeflenen gen bölgesine ait sekansın çoğaltılmasının kontrolü için Erime Eğrisi Analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 7.4 Real-Time PCR protokolü

Bileşenler	Hacim (1 rxn)	Son konsantrasyon
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl	1x
İleri Primer (10 µM)	0.5 µl	500 nM
Geri Primer (10 µM)	0.5 µl	500 nM
cDNA	3 µl	100 ng-100 fg
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl	-

Çizelge 7.5 Real-Time PCR döngüsü

<b>Döngü</b>	<b>°C</b>	<b>Süre (s)</b>
Ön Denaturasyon	95°C	30
Denaturasyon	95°C	5
Bağlanma/Uzama	60°C	30
Melting-Curve	60°C → 95°C	

} 40 Döngü



## 8. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 8.1 Fasulye Genomunda Tanımlanan MDH Genlerinin Özellikleri

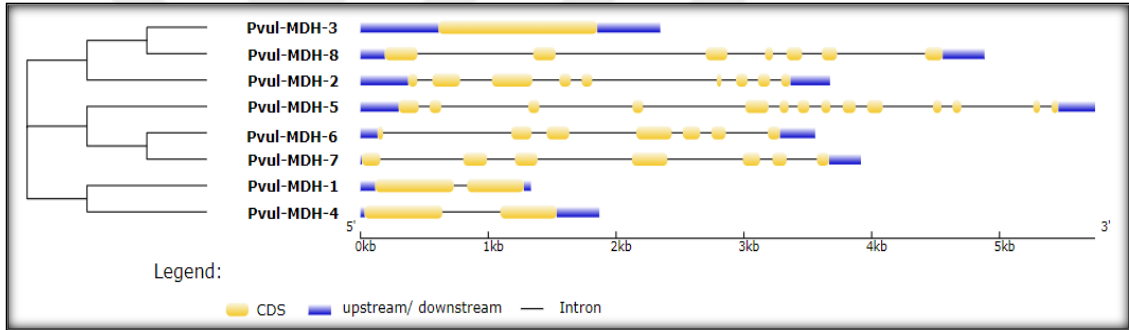
Gerçekleştirilen analizler neticesinde fasulye genomunda 8 adet MDH geni olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan MDH genleri *Pvul-MDH-1*, *Pvul-MDH-2*, *Pvul-MDH-3*, *Pvul-MDH-4*, *Pvul-MDH-5*, *Pvul-MDH-6*, *Pvul-MDH-7*, *Pvul-MDH-8* olarak adlandırılmıştır. Pvul-MDH gen/proteinlerine ilişkin birtakım özellikler tablo haline getirilerek sınıflandırılmıştır. Elde edilen verilere göre MDH proteinleri 332-436 aminoasit uzunluğunda ve atomik ağırlıkları 35,40 - 47,69 kDa arasındadır. Ayrıca tanımlanan MDH proteinlerinin tümünün kararlı yapıda olduğu görülmüştür ve kararsızlık indekslerinin ise 23,24 ile 38,66 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Gen	Transkript	NCBI Lokus No	Kr. No.	Kr. Lokasyonu	Uzunluk (aa)	Mol. Ağı(kDa)	pI	Kararsızlık İndeksi	Stabilite Durumu	Filojeni Grubu
Pvul-MDH-1	Phvul.002G062000 XP_007157340.1	2	2	7,300,276-7,301,609	352	38.35	6.60	35.04	stabil	I
Pvul-MDH-2	Phvul.002G216800 XP_007159190.1	2	2	38,602,298-38,605,881	356	37.49	7.63	23.24	stabil	II
Pvul-MDH-3	Phvul.003G189700 XP_007155306.1	3	3	41,329,429-41,331,774	413	43.46	8.60	38.66	stabil	II
Pvul-MDH-4	Phvul.003G219400 XP_007155646.1	3	3	44,785,985-44,787,853	349	37.57	6.55	33.32	stabil	I
Pvul-MDH-5	Phvul.007G140600 XP_007144250.1	7	7	22,559,144-22,564,891	436	47.69	6.48	32.09	stabil	III
Pvul-MDH-6	Phvul.007G140600 XP_007145851.1	7	7	39,453,823-39,457,380	332	35.40	5.58	30.51	stabil	III
Pvul-MDH-7	Phvul.007G273500 XP_007134537.1	10	10	9,918,395-9,922,310	373	40.91	5.73	26.74	stabil	III
Pvul-MDH-8	Phvul.011G159000 XP_007133189.1	11	11	45,264,195-45,269,077	345	36.02	8.73	38.19	stabil	II

Şekil 8.1 Fasulye MDH gen ailesinin detaylı özellikleri

## 8.2 Fasulye MDH genlerinin yapıları ve kromozomal dağılımları

Pvul-MDH genlerinin ekzon-intron durumu hakkında bilgi edinmek için Gene Structure v2.0 (GSDS, <https://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) veritabanından yararlanılmıştır (Guo vd. 2007). Pvul-MDH genlerinin pozisyon bilgisini ve kromozomal lokasyonlarını belirlemek için ise Phytozome v12.1 veritabanı kullanılmıştır. *Pvul-MDH* genlerinin boyutları (bp) ve intron sayıları tespit edilmiştir. *P. vulgaris*'e ait MDH genlerinin kromozomal dağılımları MapChart ile çizilmiştir (Voorrips 2002) (Şekil. 8.1). Yapılan analizler en az intronu olan genin *Pvul-MDH-1* ve *Pvul-MDH-4*, en çok intron barındıran genin ise *Pvul-MDH-5* olduğunu göstermiştir. *Pvul-MDH-3* geninin ise intron barındırmadığı belirlenmiştir ve sonuçlar Çizelge 8.1'de detaylı olarak sunulmuştur.

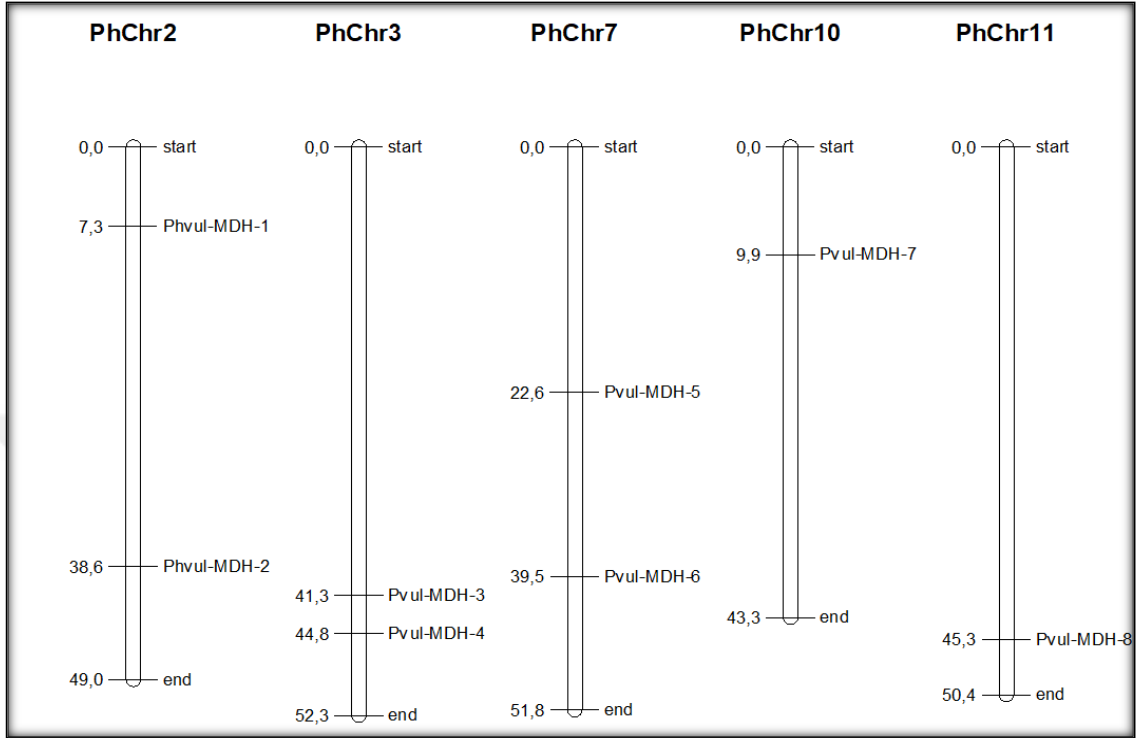


Şekil 8.2 Fasulye MDH genlerinin yapısal organizasyonu

Çizelge 8.1 Fasulye'de bulunan MDH genlerinin CDS ve intron sayıları

Gen Adı	Ekzon	İntron
<i>Pvul-MDH-1</i>	2	1
<i>Pvul-MDH-2</i>	9	8
<i>Pvul-MDH-3</i>	1	0
<i>Pvul-MDH-4</i>	2	1
<i>Pvul-MDH-5</i>	14	13
<i>Pvul-MDH-6</i>	7	6
<i>Pvul-MDH-7</i>	7	6
<i>Pvul-MDH-8</i>	7	6

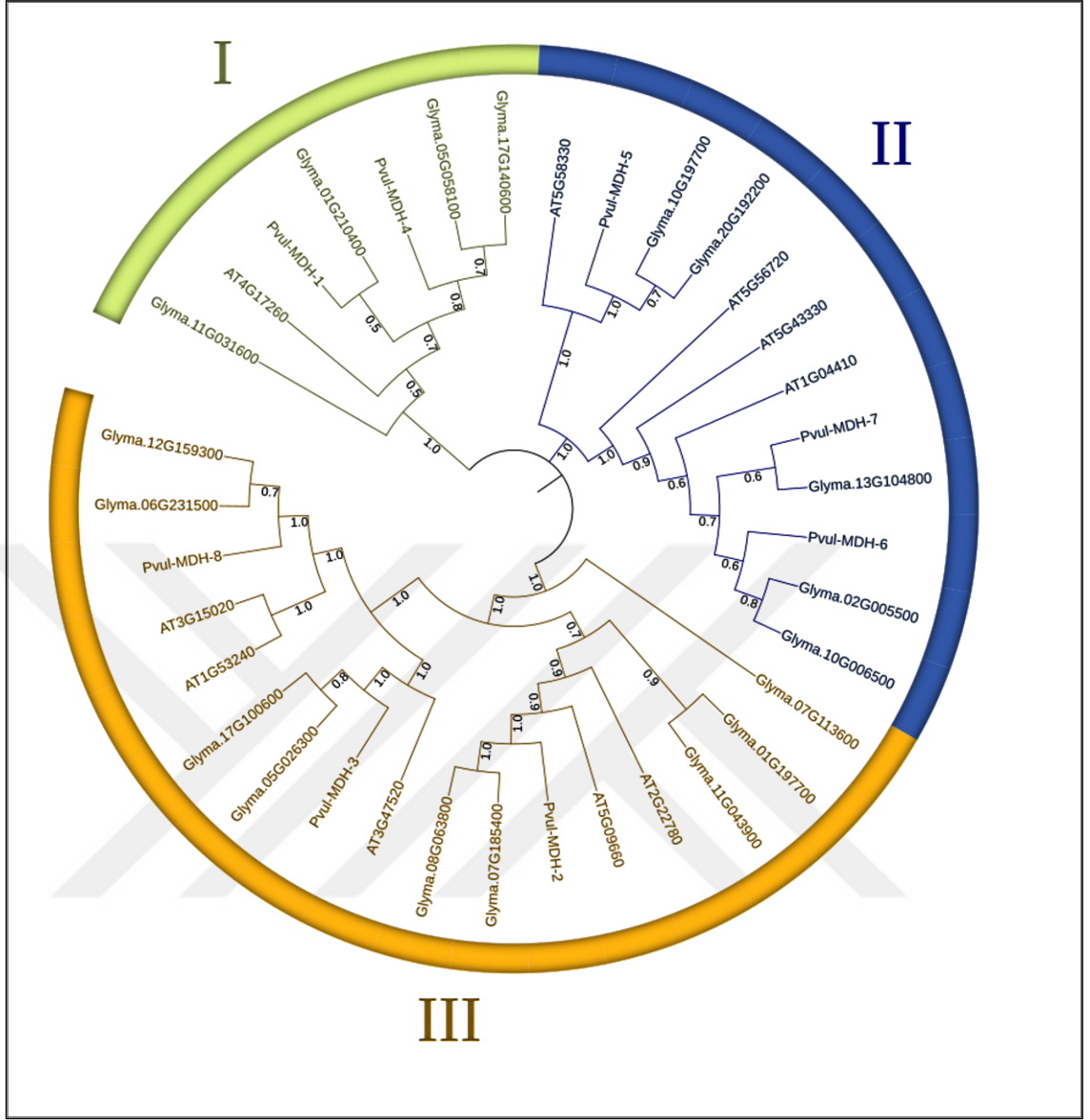
Tanımlanan fasulye MDH genlerinin fasulye genomunda 2, 3, 7, 10 ve 11. kromozomlar üzerinde yerleşik olduğu gözlenmiştir (Şekil 8.3).



Şekil 8.3 Fasulye MDH genlerinin kromozomal dağılımları

### 8.3 Fasulye MDH ve ortolog proteinlerinin filogenetik analizleri

MDH proteinlerinin evrimsel ilişkilerini tanımlamak amacıyla fasulye MDH proteinleri ve ortologları olan *Arabidopsis thaliana* ve *G. max* protein dizileri ClustalW (Tamura vd. 2011) ile hizalandıktan sonra bootstrap değeri 1000 tekrar olacak şekilde Neighbor Joining (NJ) metodu kullanılarak filogenetik ağacı oluşturulmuştur (Letunic ve Bork 2011). Yapılan filogenetik analizler sonucunda fasulye MDH ve ortolog proteinlerinin 3 ana kümeye ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 8.4).

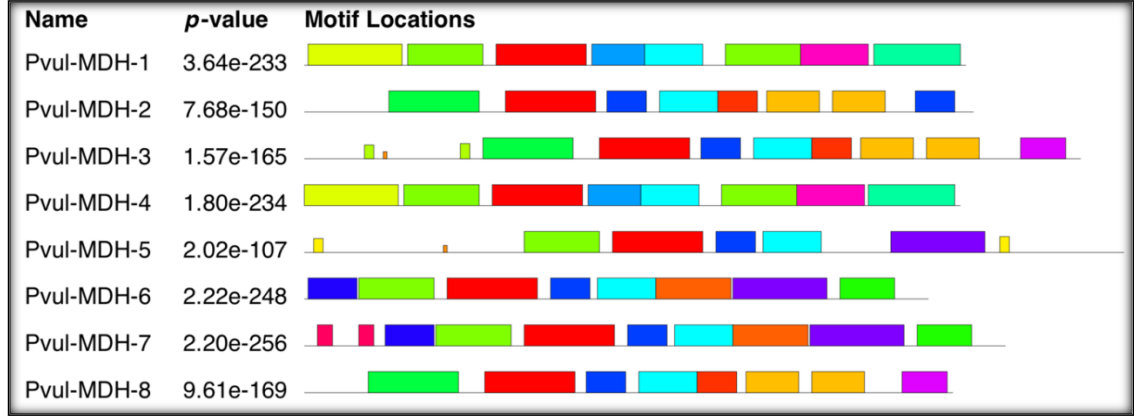


Şekil 8.4 Fasulye MDH ortolog proteinleri

#### 8.4 Fasulye MDH proteinlerinin korunmuş dizi motifleri

Fasulye MDH proteinlerine ait peptid dizilerinde bulunan korunmuş bölgeler yapılan filogenetik analizleri doğrular niteliktedir. Fasulye MDH proteinleri, korunmuş dizi bölgelerine göre filogenetik olarak 3 ana gruba ayrılmıştır. Fasulye MDH proteinlerine ait ortak korunmuş diziler ve bu dizilerin sayısal bilgileri Şekil 8.5 ve Çizelge 8.2’de belirtilmiştir.





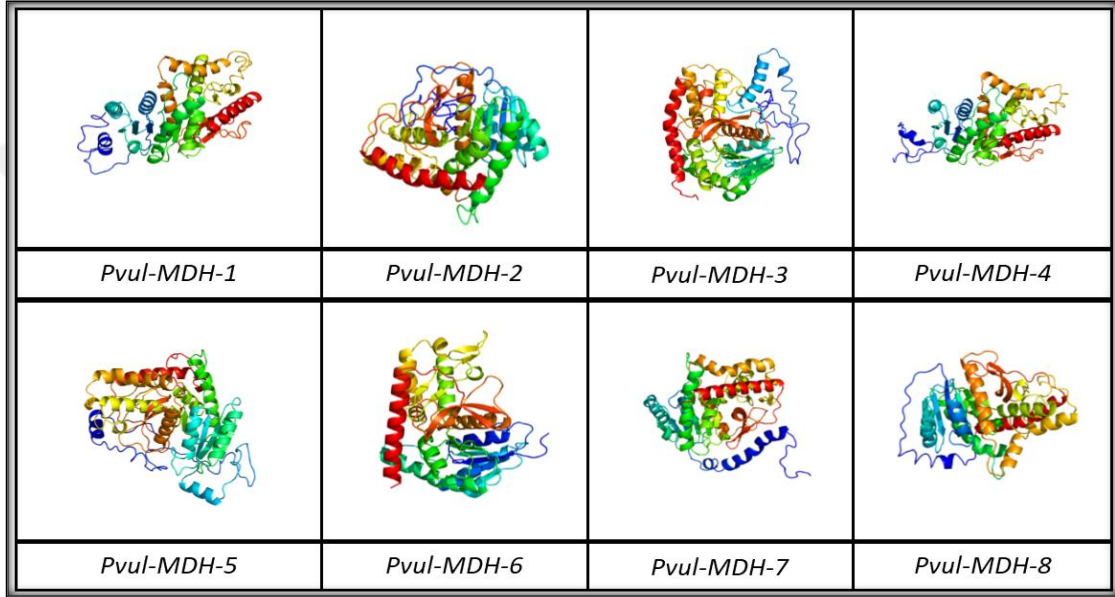
Şekil 8.5 Fasulye MDH proteinleri korunmuş dizi bölgeleri

Çizelge 8.2 Fasulye MDH proteinlerinin korunmuş motiflerinin özellikleri

Motif	E-value	Sites	Width (aa)
EALKGVBLAIPAGVPRKPGMTRDILLNINA SIYKALASALAKHAPDA	9.5E-062	8	48
TRLDVNRKTFIAERLNVQVSDVKVPIVGGH	4.0E-044	8	31
VLGVDQPVILELLDIEPAEAELEGVKMELVD AAFPLJRTK	2.3E-024	7	40
QQRGAIIKARKLSSALSAASSACDHIRDWV VGTPQGTWVSMGVYSDGSY	2.5E-022	3	50
TLRGLNGGTEVVEAKAGQGSATELPAYA	1.6E-022	6	28
KVAVLGAAGGIGQPLSLLMKJNPLVSDLHLY DIANTPGVAADISHINT	2.3E-019	3	48
NPVNSTAPIAAEVAKKIPAKB	2.1E-016	7	21
GYTSWAIGYSVANLARSILRDQRKIHPVSVL AKGFY	3.3E-009	2	36
HSSTQYPDVNHATVTANGGDKPVRELIGDD NWLNGEFIAT	6.5E-008	2	40
MHKSASGSALGPGGLDTQAFFKPINNAEPS SPPKRHNKISVIGVGNVGM	2.2E-007	2	50
YSFPVTCEKGEWTIVQGLKIDEFSRDKLD	1.5E-006	2	29
DGEVFLSLPAQLGRGGILGVTNVHLNQEELQ RLMDSAKTILQVQNE	2.0E-006	2	46
IVSNPVDILTYVAWKLSGFPSNRVIGSG	2.1E-004	2	28
KEPIRVLTGAAGQIGYALVPMIARG	9.8E-001	2	26
DFEQKGLEALKGELKSSIEKGIKF	9.3E+000	2	24
WDIERYMF	1.1E+001	2	8
AGITILPLLSQVKPPASFTDE	1.4E+001	3	21
FC	6.1E+001	2	2
FSPPC	1.1E+002	2	5
KFNYQ	1.8E+002	2	5

## 8.5 Fasulye MDH proteinlerinin Üç Boyutlu Homoloji Modellemesi

Fasulye MDH proteinlerinin 3 boyutlu yapılarını tespit etmek için Phyre2 programı kullanılmıştır. Blastp tekniği ile bu proteinlerin homoloji yapılarını oluşturmak için Protein Database (PDB) kullanılmıştır. Şekil 8.6 'da fasulye MDH proteinlerinin 3 boyutlu modellemelerinin güvenilirlik oranı %90'ın üzerinde olan protein yapıları gösterilmiştir.



Şekil 8.6 Fasulye MDH proteinlerinin 3 boyutlu modellemeleri

## 8.6 Fasulye Genomunda Bulunan MDH Genlerine Ait Duplikasyonlar

Segmental duplike gen çiftleri, Plant Genome Duplication Database veritabanında (<https://chibba.agtec.uga.edu/duplication/index/locus>) 100 kb'lık bir aralıkta tanımlanmıştır. CLUSTALW ile hizalanan, segmental olarak duplike olmuş Pvul-MDH gen dizilerinin eş anlamlı (Ks) ve eş anlamlı olmayan (Ka) değerleri CODEML bir program olan PAL2NAL (<http://www.bork.embl.de/pal2nal>) (Suyama vd. 2006) ile hesaplanmıştır. Duplikasyon süresi (milyon yıl önce, Mya) ve her Pvul-MDH geninin ayrışması, aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir:

$T = Ks / 2\lambda$  ( $\lambda = 6.56E-9$ ) çizelge 8.3'de detaylı olarak gösterilmiştir (Lynch ve Conery 2003, Yang ve Nielsen 2000).

Çizelge 8.3 Fasulye MDH genlerinin segmental gen duplikasyonları

Gen 1	Gen 2	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ	Duplikasyon türü
Pvul-MDH-1	Pvul-MDH-4	0,0902	1,4251	0,0633	10,96	Segmental
Pvul-MDH-6	Pvul-MDH-7	0,0992	3,7346	0,0266	28,72	Segmental

### 8.7 Pvul-MDH ailesinin hücre içi lokalizasyonu, Promotor Analizi

Promotör bölgeleri gen transkripsiyonun başlangıç bölgesine yakın lokasyonlarda bulunan DNA bölgeleridir. Fasulye malat dehidrogenaz genlerine ait bölgeler çizelge 8.7’de belirtilmiştir. Tüm MDH genlerinin 5’ upstream bölgesinin 2 kb gerisinden elde edilen sekanslar incelenmiştir ve MDH genlerinde bulunan promotör motiflerinin bitkisel gelişimde, değişen çevresel koşullara uyum sağlamada, abiotik ve biyotik strese karşı verilen moleküler cevaplarda etkili olduğu belirlenmiştir. Cis-acting element taraması yapıldıktan sonra elde edilen bulgular Çizelge 8.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 8.4 Fasulye MDH genlerinin hücre içi lokalizasyonu ve promotor analizi

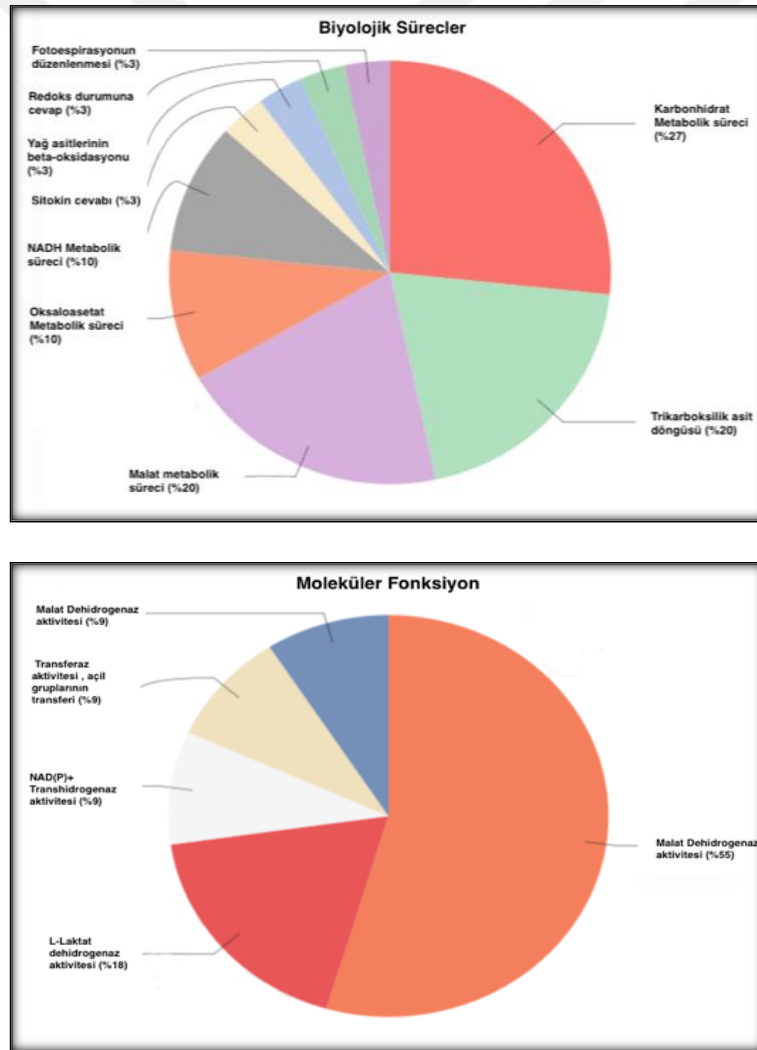
Motif	MDH-1	MDH-2	MDH-3	MDH-4	MDH-5	MDH-6	MDH-7	MDH-8
AAGAA-motif	✓			✓			✓	✓
CCAAT-box	✓			✓				
CAT-box	✓	✓				✓	✓	
O2-site	✓							
Circadian	✓							✓
HD-Zip 3						✓		
RY-element							✓	
CCGTCC motif				✓				
ARE	✓			✓	✓	✓	✓	✓
TC-rich repeats	✓			✓				✓
W box	✓				✓			✓
MBS		✓	✓	✓				
LTR						✓		✓
WUN-motif			✓				✓	
MYC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Myc	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
STRE	✓	✓			✓			✓
AP-1	✓					✓		
DRE core					✓		✓	
ABRE	✓	✓			✓		✓	✓

Çizelge 8.4 Fasulye MDH genlerinin hücre içi lokalizasyonu ve promotor analizi (devam)

<b>Motif</b>	<b>MDH-1</b>	<b>MDH-2</b>	<b>MDH-3</b>	<b>MDH-4</b>	<b>MDH-5</b>	<b>MDH-6</b>	<b>MDH-7</b>	<b>MDH-8</b>
ABRE3a	✓							
ERE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P-box	✓		✓					
TGA-box	✓							
TGACG-motif	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
TGA-element				✓				
CGTCA-motif	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
TCA-element		✓			✓		✓	
TCA						✓		
AE-box	✓				✓			✓
ACE			✓					
AT1-motif	✓	✓						
Box 4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
G-box		✓	✓	✓	✓	✓		✓
G-Box	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓
GATA-motif			✓		✓	✓		
GC-motif				✓				
chs-CMA1a				✓				
I-box					✓	✓		✓
3-AF3 binding site				✓				
LAMP-element	✓							
GT1-motif		✓			✓	✓		
MRE		✓				✓		
TCCC-motif		✓			✓		✓	
TCT-motif		✓		✓		✓	✓	✓
as-1	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
MYB		✓		✓		✓	✓	✓
Myb	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYB recognition site	✓			✓				
WRE3					✓		✓	
Unnamed__4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
F-box							✓	
Unnamed__2							✓	
CARE				✓				
AT~TATA-box	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
CAAT-box	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TATA	✓	✓	✓		✓		✓	✓
TATA-box	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
A-box				✓				
CCGTCC-box				✓				
CCGTCC motif				✓				
Unnamed__1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

## 8.8 Fasulye MDH Genlerinin Ontoloji Analizleri

Blast2Go gen ontoloji analizlerine göre malat dehidrogenaz (MDH) enzimi hücre içerisinde en fazla mitokondrilerde bulunmaktadır (Şekil 8.7). Bunun yanı sıra apoplastlarda, hücre ve kloroplast membranlarında lokalize olduğu görülmüştür. Malat dehidrogenaz enziminin hücre döngüsünde en fazla karbonhidratların metabolik süreçlerinde rol oynadığı görülürken bunun yanı sıra trikarboksilik asit döngüsü, malat ve oksaloasetat metabolik süreçlerde de görev almaktadır. Malat dehidrogenaz enziminin moleküler fonksiyonları incelendiğinde ise malat dehidrogenaz ve L-laktat dehidrogenaz aktivitesi temel metabolik aktivite olarak gözükmektedir.



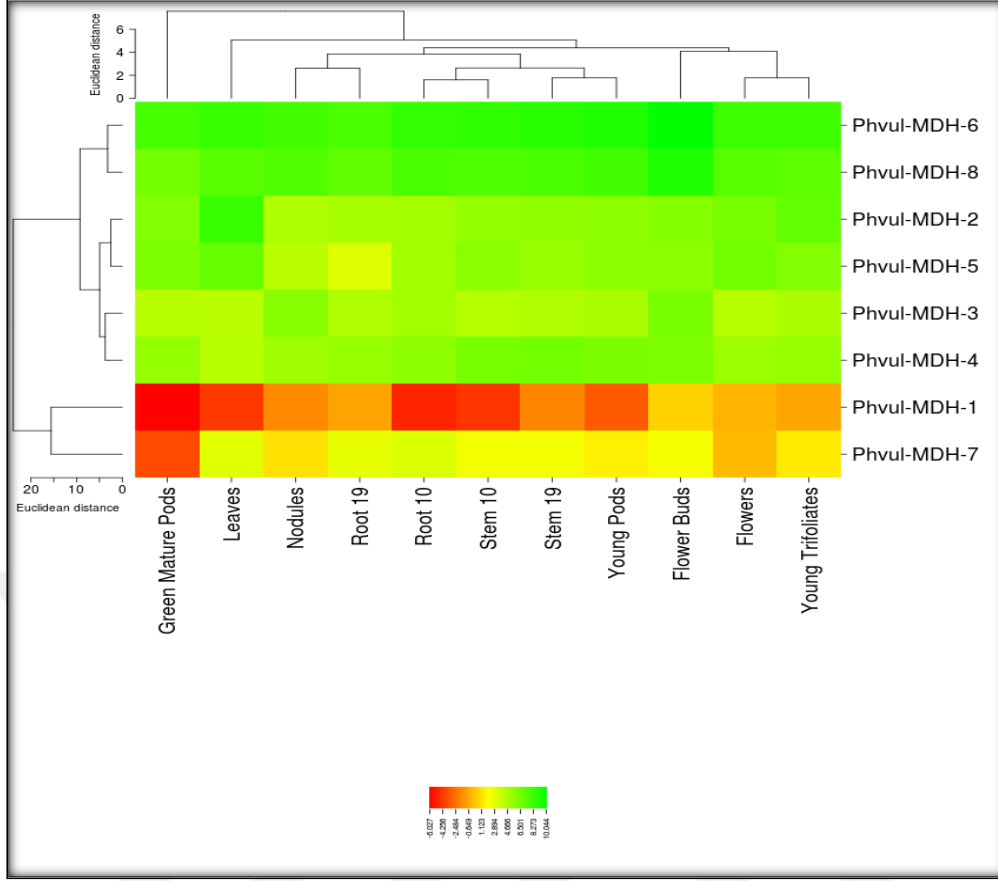
Şekil 8.7 MDH enzimi ontoloji analizi



Şekil 8.7 MDH enzimi ontoloji analizi (devam)

### 8.9 Fasulye MDH Genlerine Ait Doku-Spesifik mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi

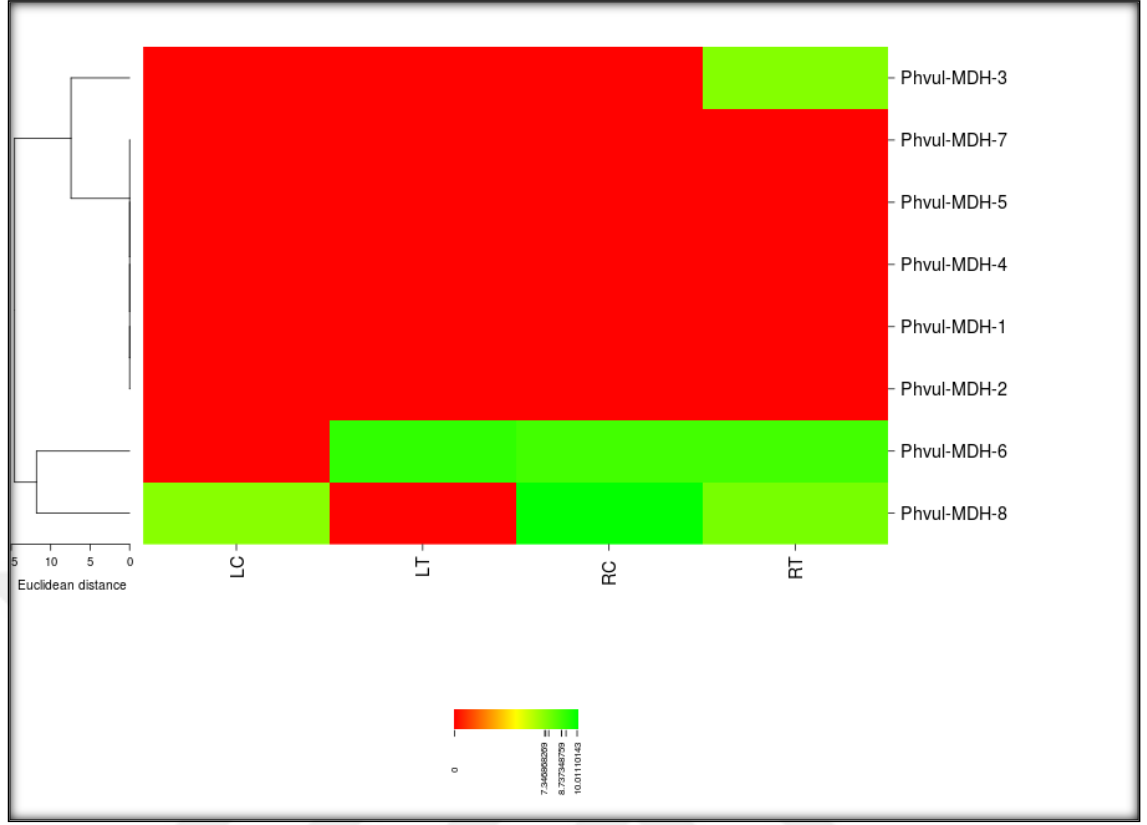
Fasulye MDH gen ailesinin mRNA ifade seviyelerinin analizi için oluşturulan heatmap grafiği Phytozome v12.1 veritabanında bulunan tomurcuk, çiçek, yaprak, kök 10, genç tohum, kök 19, genç trifolyat, kök 10, kök 19, yeşil olgun tohum, nod dokularına ait FPKM (Fragments Per Kilobase Million) verileri kullanılarak elde edilmiştir. Heatmap grafiğine göre *Phvul-MDH-2*, *Phvul-MDH-3*, *Phvul-MDH-4*, *Phvul-MDH-5*, *Phvul-MDH-6*, *Phvul-MDH-8* genlerinin tüm dokularda yüksek seviyede ifade edildiği gözlemlenmiştir. *Phvul-MDH-1* ve *Phvul-MDH-7* genlerinin ise tüm dokularda düşük ifade profili sergilediği görülmüştür ve Şekil 8.8’de gösterilmiştir.



Şekil 8.8 Fasulye MDH genlerinin doku spesifik mRNA seviyeleri

### 8.10 Fasulye MDH genlerinin tuz stresi ile ilişkili *in silico* ifade analizi

Fasulye MDH genlerinin tuz stresine ilişkin mRNA düzeyleri SRA (Sequences Read Archive) veri tabanından elde edilen SRR957667 (yaprak-kontrol), SRR957668 (tuz stresi uygulanmış yaprak), SRR958469 (kontrol-kök), SRR958472 (tuz stresi uygulanmış kök) RNAseq verileri kullanılarak görsel hale getirilmiştir. RNAseq verileri ile oluşturulan heatmap grafiğine göre *Phvul-MDH-1*, *Phvul-MDH-2*, *Phvul-MDH-4*, *Phvul-MDH-5*, *Phvul-MDH-7* genlerinin tuz stresinde rol oynamadığı anlaşılmıştır. Tuz stresi koşullarında *Phvul-MDH-3* geninin sadece kökte ifade düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Bunun yanısıra yaprakta *Phvul-MDH-6* geninin ifade düzeyinin arttığı, *Phvul-MDH-8* geninin ise ifade düzeyinin düştüğü, kökte ise *Phvul-MDH-6* ve *Phvul-MDH-8* genlerinin ifade düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 8.9).



Şekil 8.9 Fasulye MDH genlerinin tuz stresi altında ifadesi

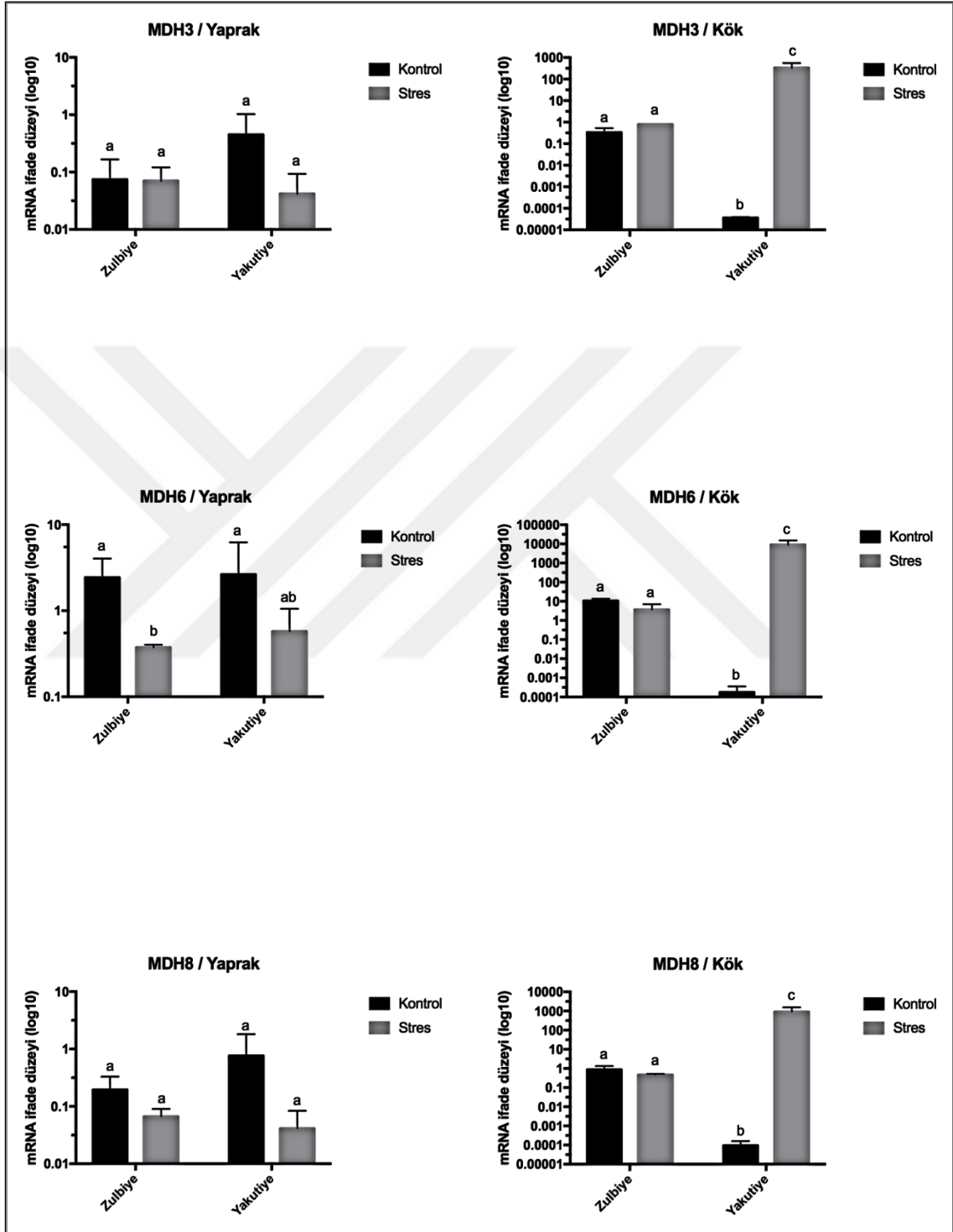
### 8.11 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılmış Fasulye Çeşitlerinde MDH Genlerinin mRNA düzeyleri

*MDH-3*, *MDH-6*, *MDH-8* genlerinin Zülbiye ve Yakutiye çeşitlerine ait yaprak ve kök dokularındaki mRNA ifade seviyeleri Şekil 8.9’da belirtilmiştir.

*MDH-3*, *MDH-6* ve *MDH-8* genlerinin 150 mM NaCl stresinde kontrole göre yapraktaki gen ifade seviyesinde meydana gelen farklılaşmalar iki bitki grubu içinde istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. *MDH-3*, *MDH-6* ve *MDH-8* genlerinin Zülbiye çeşidinin yaprak dokusundaki gen ifade seviyesine benzer olarak, kök dokusundaki gen ifade seviyelerinde meydana gelen farklılaşmalar da anlamlı değildir. Buna karşın Yakutiye çeşidinde *MDH-3*, *MDH-6* ve *MDH-8* genlerinin gen ifade seviyelerinin kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Birisi dayanıklı diğeri hassas olan iki fasulye çeşidi ile gerçekleştirilen çalışmada elde edilen bu qRT-PCR bulguları, çeşitlerin tuz stresine karşı olan stres cevabında MDH gen ailesi üyelerinin rol oynadığını gösterir niteliktedir. Zülbiye ve Yakutiye çeşitlerinin Real-Time PCR verileri



her iki çeşitnin ACT (housekeeping) ve kendi kontrollerine göre normalize edilmiştir ve sonuçlar şekil 8.10'da gösterilmiştir.



Şekil 8.10 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılmış Fasulye Çeşitlerinde MDH Genlerinin mRNA düzeyleri

## 9. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarımı yapılan yemeklik tane baklagiller arasında bulunan fasulye bitkisi insan ve hayvan beslenmesinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle artan dünya nüfusuyla beraber fasulye bitkisi, yüksek protein barındırması ve neredeyse her coğrafyada yetiştirilmesi gibi nedenlerden dolayı insan beslenmesinde kritik bir öneme sahiptir. Bitkiler yaşamları boyunca birçok stres etmenine maruz kalmaktadırlar. Bu stres etmenleri abiyotik veya biyotik olarak değişmektedir. Abiyotik ve biyotik olan bu olumsuz koşullara bitkiler fizyolojik ya da biyokimyasal olarak tepkiler vererek bitkiden alınan ürünün kalitesini düşürebilmektedir (Büyük vd. 2012).

Bitkiler hayat döngüleri boyunca çeşitli stres unsurlarıyla karşılaşır. Canlılığın devamı için hayati önem taşıyan bu stres etmenlerinden biri olan tuz stresine maruz kalınması durumunda, potasyum ( $K^+$ ) ve sodyum ( $Na^+$ ) iyon konsantrasyon dengesinin korunması son derece önem arz etmektedir (Büyük vd. 2012). Dolayısıyla, bitkilerde tuz stresi ile ilgili mekanizmaların ve bu mekanizmalarda rol oynayan gen/proteinlerin aydınlatılması bitki biyoteknolojisi sahası açısından değerlidir. Bu nedenle gerçekleştirilen tez çalışmasında *P. vulgaris* genomundaki MDH genlerinin biyolojik fonksiyonları ve genomik yapıları hakkında bilgi edinmek için; bioinformatik, genom veritabanları ve qRT-PCR kullanılarak çeşitli analizler yapılmıştır.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında *P. vulgaris* 'de bulunan MDH genlerinin genom boyutunda bioinformatik olarak tanımlanması hedeflenmiştir. Sonuç olarak fasulye genomunda toplam 8 adet MDH geni tespit edilmiş ve bu genler *Pvul-MDH-1*'den *Pvul-MDH-8*'e kadar adlandırılmıştır. Daha önce farklı bitkilerde genom düzeyinde yapılan çalışmalarda bugüne dek pamukta 25 (Imran vd., 2016), elmada 20 (Ma vd., 2018) ve kavakta 16 (Chen vd., 2019) adet MDH gen/proteini tespit edilmiştir. Fasulyede tespit edilen MDH geni sayısının diğer bitkilerdekine kıyasla göreceli olarak daha az sayıda olduğu belirlenmiştir.

Fasulye bitkisinde tanımlanan ve karakterize edilen MDH genlerinin ekzon-intron yapıları incelendiğinde *Pvul-MDH-1* geninin intron içermediği gözlenmiştir. Imran vd.,

(2016) pamuktaki çalışmasında da benzer şekilde bazı MDH genlerinin intron içermediği tespit edilmiştir.

Gen duplikasyonları bitkilerde evrimsel süreçte fenotipik yeniliklerin kazanımında oldukça önemlidir. Bu sebeple fasulyede tanımlanan *Pvul-MDH* genlerinin duplikasyon durumları incelenmiş olup iki adet segmental duplikasyon olayı gözlenmiştir. Benzer şekilde Imran vd, (2016) çalışmasında da pamuk bitkisi MDH genleri arasında segmental duplikasyon olayları saptanmış olup hiç tandem duplikasyon gözlenmemiştir.

Tanımlanmış olan *Pvul-MDH* genlerinin tuz stresi altındaki ifade durumları öncelikle RNAseq verisine bakılarak değerlendirilmiştir ve buna göre *Pvul-MDH-3*, *Pvul-MDH-6* ve *Pvul-MDH-8* genlerinin ifade düzeylerinin tuz stresi ile ilişkili olarak farklılaştığı görülmüştür. Buradan yola çıkılarak söz konusu üç gene ilişkin primerler tasarlanmış ve ilgili genlerin tuz stresine karşı olan cevapları qRT-PCR kullanılarak Zülbiye cv. ve Yakutiye cv. fasulye alt türlerinde karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Normalizasyon sonucu elde edilen qRT-PCR verilerine bakıldığında özellikle Yakutiye bitkisinin kök dokusunda her üç genin ifadesinin de tuz stresi altında kontrole kıyasla ciddi düzeyde ve istatistiki olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Zülbiye bitkisinde ise bu genlerinin ifadesinin kontrole kıyasla istatistiki bir değişiklik göstermediği anlaşılmıştır. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalar Yakutiye cv.'nin Zülbiye cv.' e göre tuz stresine karşı daha dayanıklı bir bitki olduğunu ortaya çıkarmıştır (Büyük vd., 2019). Bu bilgiye dayanarak ve elde edilen qRT-PCR sonuçlarından yola çıkılarak, *Pvul-MDH-3*, *Pvul-MDH-6* ve *Pvul-MDH-8* genlerinin Yakutiye bitkisinde kök dokusunda tuz stresine karşı olan dayanıklılıkta rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Diğer taraftan Yakutiye cv. alt türünde *Phvul-MDH-3*, *Pvul-MDH-6*, *Pvul-MDH-8* genlerinin yaprak dokusundaki mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre azalışlar meydana geldiği ancak bu değişimlerin istatistiki olarak anlam ifade etmediği görülmüştür. Zülbiye cv. alt türünde de benzeri durumun *Phvul-MDH-3* ve *Phvul-MDH-8* genleri için geçerli olduğu, tuz stresi ile birlikte sadece *Phvul-MDH-6* gen ifadesinde meydana gelen düşüşün istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu verilerden elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmesi durumunda fasulyede

tanımlanan MDH ailesi üyelerinden qRT-PCR ile sınanan *Phvul-MDH-3*, *Pvul-MDH-6*, *Pvul-MDH-8* genlerinin özellikle kök dokusunda tuz stresine dayanıklılıkta rol oynadığı tespit edilmiştir. Literatürde daha önce tütün (Chiraz vd, 2012), elma (Wang vd., 2016), pamuk (Imran vd., 2016), *Arabidopsis thaliana* (Kandoi vd., 2017), pirinç (Nan vd., 2019) ve kavakta (Chen vd, 2019) yapılan çalışmalarda MDH ailesi üyelerinin tuz stresine karşı olan cevapta rol oynadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında fasulye bitkisinden elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında

tespit edilen bir diğer bulgu ise qRT-PCR ile çalışılan *Phvul-MDH-3*, *Phvul-MDH-6* ve *Phvul-MDH-8* genlerinin her iki bitki türünde de hem kök hemde yaprak dokularında ifade olduğuudur. Yapılan biyoinformatik analizlerde MDH'ların lokasyon olarak bitkinin birçok organelinde bulunduğu ve buna ek olarak karbonhidrat ve enerji metabolizması, transkripsiyon, protein metabolizması, hücre duvarı ve hücre iskeleti metabolizması, membran ve taşınması, sinyal iletimi ve stres ve savunmanın biyolojik süreçlerinde yer aldığını göstermektedir. Bu bulgular Selinski vd., (2014) ve Imran ve vd., (2016)'nin çalışmalarını ile uyumludur.

Yine benzer bir şekilde Yao vd. (2011)'nin elmada gerçekleştirdiği çalışmada sitozolik NAD-bağımlı MDH geninin ifadesinin, bitki büyümesi/gelişmesi ve metabolik aktivitesiyle pozitif korelasyon gösterdiğini belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında MDH genlerinin Yakutiye cv. alt türünde Zulbiye cv. alt ürüne kıyasla stres altında daha çok ifade edildiği görülmüştür ve bu durum stresle başa çıkabilmek için metabolik aktivitenin artışı olarak değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak bitki biyoteknolojisi sahasında stresle ilgili olan gen ve mekanizmaların aydınlatılmasının önemi gün geçtikçe daha da artmaktadır. İlerleyen yıllarda üretimlerine ihtiyaç duyulacak stresle başa çıkabilecek transgenik bitkilerin eldesi için öncelikli olarak stresten sorumlu genlerin belirlenmesi ve detaylı şekilde karakterize edilmesi gerekmektedir. Buradan yola çıkarak gerçekleştirilen tez çalışmasında hücre için oldukça önemli bir gen ailesi olan MDH gen ailesi biyoinformatik olarak detaylı bir şekilde çalışılmış olup, üyelerinin tuz stresine karşı olan cevapları değerlendirilmiştir.

Literatür için fasulye bitkisinde ilk niteliğinde olan bu çalışma bulgularının ilerleyen yıllarda bitki biyoteknolojisi alanında çalışan araştırmacılar için önemli bir kaynak oluşturabileceği kanaatindeyiz.



## KAYNAKLAR

- Anonymus. <https://isparta.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Faydalı%20Bilgiler/%E2%80%8BBitkisel%20Yetiştiricilik/Tarla%20Bitkileri%20Yetiştiriciliği/Kuru%20Fasulye%20Tarımı.pdf> Erişim Tarihi 30.07.2019
- Anonymus. [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/70336/mod\\_resource/content/1/10%20FASULYE%20%28Phaseolus%20vulgaris%20L.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/70336/mod_resource/content/1/10%20FASULYE%20%28Phaseolus%20vulgaris%20L.pdf) Erişim Tarihi: 15.06.2019
- Anonymus. 2001-2020. <https://www.biologyonline.com/dictionary/abiotic-stress> Erişim Tarihi 13.07.2019
- Anonymus. 2009. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/10/20091010-9.htm> Erişim Tarihi 25.07.2019
- Anonymus. 2015. [https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/yemeklik\\_baklagil\\_kitabi.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/yemeklik_baklagil_kitabi.pdf), Erişim Tarihi: 10.08.2019
- Anonymus. 2018. <http://www.ubk.org.tr/yemeklikbaklagiller.pdf> Erişim Tarihi: 13.08.2019
- Anonymus. 2018. <http://www.fao.org/home/en/>, Erişim Tarihi: 12.02.2020
- Anonymus. 2019. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tarım%20Ürünleri%20Piyasaları/2019-Ocak%20Tarım%20Ürünleri%20Raporu/2019-Ocak%20Kurufasulye.pdf> Erişim Tarihi: 04.05.2019
- Arulsekhar, S., Parfitt, D.E., Beres, W. and Hansche, P.E., 1986. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in the peach. *Journal of Heredity*, 77, 49-51.
- Aydoğan M., Demiryürek K., Abacı İlkay N., 2015. Türkiye’de kuru fasulye üretiminin mevcut durumu ve gelecek dönemler üretiminin tahmin edilmesi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(12): 962-968.
- Backhausen, J.E, Emmerlich, A., Holtgreffe, S., Horton, P., Nast, G., Rogers, J.J.M., Muller-Rober, B., Scheibe R., 1998. Transgenic potato plants with altered expression levels of chloroplast 318 NADP-malate dehydrogenase: interactions between photosynthetic electron transport and 319 malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts. *Planta* 207:105-11.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., Li, W.W., 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 34:W369–W373.
- Banaszak, L.J., Bradshaw, R.A., 1975. Malata Dehydrogenase. In: *The Enzymes*. Academic Press, 369-396, New York.
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J.V., Vangronsveld J. van der Lelie, D., 2004. Engineered endophytic bacteria improve

- phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol* 22:583–588
- Beeler, S., Liu, H.C., Stadler, M., Schreier, T., Eicke, S., Lue, W.L., et al., 2014. Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 164(3):1175–90.
- Bilgen, G., Erdoğan, M., Özdemir, N., Yavuzylmaz, E., 1995. Melez mısır ticari varyetelerinde izoenzim elektroforez yöntemiyle genetik saflık kontrolü üzerine bir araştırma. Workshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Bildirileri. 17-19 Nisan 1995, Gebze/Kocaeli, s119-125.
- Biruk, A. and Kazlovskya, Z., 2008. Prospects for using of isozymes markers in identification of apple cultivars. *Sodiinkyste ir darzininkyste. Mokslo Darbai*, 27, 359- 364.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J., 2003. Beans (*Phaseolus* spp.), Model food legumes. *Plant Soil* 252: 55-128.
- Brussaard, L., de Ruiter, P.C., Brown, G.G., 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 121 (3): 233–244.
- Büyük, İ., İlhan, E., Şener, D., Özsoy, A.U., Aras S., 2019. Genome-wide identification of CAMTA gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. *Molecular Biology Reports*, 46:2721–2732.
- Büyük İ., Soydam-Aydın S., Aras S., 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk hijyen ve biyoloji dergisi*, 97-110, 2012.
- Büyükgüzel, K., 2000. Ökaryotlardaki Transkripsiyonu Düzenleyici Proteinler. *Turk J Biol*, 24, 521-531.
- Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccai G., Eisenberg,H., Mevarech, M., 1993. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*. 32 (16): 4308–13.
- Chen X., Zhang J., Zhang C., Wang S., Yang M., May 2019. Genome-wide investigation of malate dehydrogenase 2 gene family in poplar (*Populus trichocarpa*) and their 3 expression analysis under salt stress. *PeerJ Preprints*.
- Chiraz H.C., Alef N.H., Ali H., Elisa C., Habib M.G., Houda G., 2012. Long-term salt stress responsive growth, carbohydrate metabolism, proline and anti-stress enzymes in *Nicotiana tabaccum*. *African Journal of Biotechnology*, Vol.11(32), 8117-8126.

- Collins, F.S., Morgan, M., Patrinos A., 2003. The Human Genome Project: Lessons from Large-Scale Biology, *Science*,300,286-290.
- Çulha, Ş., Çakırlar, H., 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları. *AKU J. Sci* 021002, 11-34.
- De Candolle, A., 1886. *Origin of Cultivated Plants*. Cambridge University Press, 272, Cambridge.
- Ding Y., Ma Q.H., 2004. Characterization of a cytosolic malate dehydrogenase cDNA which encodes an isozyme toward oxaloacetate reduction in wheat. *Biochimie*. 86(8):509–18.
- Dubey, R.S., 1994. *Handbook of Plant and Crop Stress*. New York: Marcel Dekker, 227, New York.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953–971.
- Fairall L., Rhodes, D., Klug, A., 1986. Mapping of the sites of Protection on a 5 S RNA Gene by the *Xenopus* Transcription Factor IIIA, A model for the Interaction. *J. Mol. Biol.* 192, 577–591.
- Gao, J.P., Chao D.Y., Lin H.X., 2007. Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. 49 (6): 742–750.
- Gentry, S.H., 1969. Origin of the Common Bean, *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany*, 23, 55-69.
- Gietl, C., 1992. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et biophysica acta*. 1100(3):217–34.
- Goodstein, D.M., Shu, S.Q., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., et al., 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 40:D1178–D1186.
- Goward, C.R., Nicholls, D.J., 1994. *Protein Science, Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution and catalysis*. Cambridge University Press, 3:1883-1888, USA.
- Guo A.Y, Zhu Q.H, Chen X., Luo J.C., 2007. GSDS: a gene structure display server. *Yi Chuan* 29:1023–1026
- Güler, N.S., Sağlam, A., Demiralay, M., Kadioglu, A., 2012. Apoplastic and symplastic solute concentrations contribute to osmotic adjustment in bean genotypes during drought stress. *Turk J Biol* 36:151–160.
- Gülümser, A., 2016. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25.



- Günay, A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği. Meta yayın evi, cilt 2, 345, İzmir.
- Hiz, M.C., Canher, B., Niron, H., Turet, M., 2014. Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. PLoS ONE 9:e92598.
- Horto, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams- Collier, C.J., Nakai, K., 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Res 35:W585–W587.
- Iannetta, P.P.M, Escobar N.M, Ross, H.A, Souleyre, E.J, Hancock, R.D, Witte, C.P, Davies, H.V., 2004. 345 Identification, cloning and expression analysis of strawberry (*Fragaria × ananassa*) 346 mitochondrial citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase. Plant Physiology 347 121(1):15-26.
- Imran, M., Tang, K., and Liu., J.Y., 2016. Comparative Genome-Wide Analysis of the Malate Dehydrogenase Gene Families in Cotton. PLoS One. 11(11): e0166341.
- İpek M., 2015. In vitro şartlarda Garnem ve Myrobolan 29C anaçlarının kurak stresiye karşı tepkilerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Konya.
- Karataş A., Büyükdiñ D.T., İpek A., Yağcıoğlu M., Sönmez K., Ellialtıoğlu Ş.Ş., 2017. Türkiye’de Fasulyede Yapılan Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 10 (1):16-27.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, İ., 1993. Biyokimya. Derya Kitapevi Yay. Trabzon, s. 90-134.
- Kim, D.J, Smith, S.M., 1994. Expression of a single gene encoding microbody NAD-malate 354 dehydrogenase during glyoxysome and peroxisome development in cucumber. Plant 355 Molecular Biology 26:1833-1841.
- Kömürcü-Bayrak, E., Erginel-Ünaltuna, N., 2011. Gen Anlatımı Analiz Yöntemlerine Genel Bakış. Deneysel Tıp Dergisi 1 (2):28-35.
- Lei, G., Shen, M., Li, Z.G., Zhang, B., Duan, K.X., Wang, N., Cao, Y.R., Zhang, W.K., Ma, B., 2011. EIN2 regulates salt stress response and interacts with a MA3 domain-containing protein ECIP1 in Arabidopsis. Plant, Cell & Environment. 34 (10): 1678–1692.
- Letunic, I., Bork, P., 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. Nucleic Acids Res 39:W475–W478.
- Levitt, J., 1972. Responses of plants to environmental Stresses. Academic Press, 697, London, New York.
- Lichtenhaler, H.K., 1996. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. J Plant Physiol, 148: 4-14.

- Longo, G.P., Scandalios, J.G., 1969. Nuclear gene control of mitochondrial malic dehydrogenase in maize. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 62(1):104–11.
- Lynch, M., Conery, J.S., 2003. The evolutionary demography of duplicate genes. *J Struct Funct Genomics* 3:35–44
- Lu, C., Vonshak, A., 2002. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiol. Plant*, 114: 405-413.
- Ma, B., Yuan, Y., Gao, M., Xing, L., Li, C., Li, M., Ma, F., 2018. Genome-wide identification, classification, molecular evolution and expression analysis of malate dehydrogenases in apple. *Internal Journal of Molecular Sciences*, 19, 3312.
- Markert, C.L., Moller, F., 1959. Multiple forms of enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45:753-763.
- Martinez-Beltran J., Manzur C.L., 2005. Overview of salinity problems in the world and FAO strategies to address the problem. *Proceedings of the international salinity forum*, April 2005, 311–313, Riverside California.
- McAlister-Henn, L., 1988. Evolutionary relationships among the malate dehydrogenases. *Trends in Biochemical Sciences*. 13 (5): 178–81.
- Menckhoff, L., Mielke-Ehret, N., Buck F., Vuletic, M., Luthje, S., 2013. Plasma membrane-associated malate dehydrogenase of maize (*Zea mays* L.) roots: native versus recombinant protein. *Journal of proteomics*. 80:66–77.
- Mittler, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 11 (1): 15-19.
- Musrati, R.A, Kollarova, M., Mernik N., Mikulasova, D., 1998. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *General physiology and biophysics*. 17(3):193–210.
- Myers, J.R., Baggett, J.R., 1999. Improvement of snap beans. In: S. P. Singh (ed.) *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century*, Kluwer Academic Publishers, 289-330 Dordrecht, The Netherlands.
- Nan, N., Wang, J., Shi, Y., Qian, Y., Jiang, L., Huang, S., Liu, Y., Wu, Y., Liu, B., Xu, Y.Z, 2020. Rice plastidial NAD- dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B6 content. *Plant Biotechnology Journal*, 18, 172-184.
- Neto Azevedo de, D.A., Prisco, T.J., Eneas-Filho, J., Lacerda de, F.C., Silva V.J., Costa da, A.H.P., Gomes-Filho, E., 2004. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 16(1): 31–38.

- Pabo, C.O.,1992. Transcription factors:Structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 1053–95.
- Rodwell, V.W., 1993. Enzimler: Genel Özellikleri (Çeviren: G. Menteş). Harper'ın Biyokimyası (E.D: R. K. Murrey, P. A. Mayes, D. K. Granner, V. W. Rodwell; Çeviren: G. Menteş, B. Ersöz) Barış Kitapevi, s73-86.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Pare P.W., Bais, H.P., 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*. 148(3):1547–56.
- Salinas, J., Benito, C., 1984. Chromosomal Location of peroxidase structural genes in Rye (*Secale cereale* L.). *Z.Pflanzenzüchtg*. 93, 291-308.
- Selinski, J., König, N., Wellmeyer, B., Hanke, G.T., Linke, V., Neuhaus, H.E., Scheibe, R., 2014. The plastid-localized NAD-dependent malate dehydrogenase is crucial for energy homeostasis in developing *Arabidopsis thaliana* seeds. *Molecular Plant* 7(1):170-186.
- Scheibe, R., 2004. Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiologia plantarum*. 120(1):21–6.
- Suyama, M., Torrents, D., Bork P., 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res* 34:W609–W612.
- Tamura. K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Tao, J.J., Chen, H.W., Ma, B., Zhang, W.K., Chen S.Y., Zhang J.S., 2015. The Role of Ethylene in Plants Under Salinity Stress *Front Plant Sci.*, 6: 1059.
- Taşpınar, M., 1996. Diploid ve tetraploid *Secale montanum* Guss. Ve *Secale cereale*'da bazı izoenzimlerin elektroforetik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniv. Fen Bilimleri Enst., Erzurum.
- Taşpınar, M.S, Tosun, M., 2002. İzoenzim Elektroforez Tekniğinin Bitki Islahında Kullanımı. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 33 (4), 451-456.
- Tomaz T., Bagard M., Pracharoenwattana I., Linden P., Lee C.P., Carroll A.J., et al., 2010. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 154(3):1143–57.
- Uysal, F., 2002. Kalite Fonksiyonunun Türkiye'de Baklagil Dis Satimina Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, 114.

- Vavilov, N.I., 1935. Origin, variation, immunity, and breeding of cultivated plants. The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., and Stechert-Hafner, Inc. Newyork 195, 364, Newyork.
- Voorrips, R.E, 2002 MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. J Hered 93:77–78
- Yao Y.X, Dong Q.L, Zhai H., You C.X, Hao Y.J., 2011. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. Plant physiology and biochemistry. 49(3):257–64.
- Yang, Z., Nielsen, R., 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. Mol Biol Evol 17:32–43.
- Yılmaz, E., Tuna, L.A., Bürün, B., 2011.Bitkilerin tuz stresine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri. Celal Bayer Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 7(1):47-66.
- Yueh, A.Y., Chung, C.S., Lai, Y.K., 1989. Purification and molecular properties of malate dehydrogenase from the marine diatom *Nitzschia alba*. Biochemical journal. 258(1):221–8.
- Yudina Sergeevna, R., 2012. Malate dehydrogenase in plants: Its genetics, structure, localization and use as a marker. Advances in Bioscience and Biotechnology Vol.3 No.4, Article ID:21844,8 pages.
- Wang, Z.A, Li, Q., Ge, X.Y., Yang, C.L., Luo, X.L., Zhang, A.H., et al. 2015. The mitochondrial malate dehydrogenase 1 gene GhmMDH1 is involved in plant and root growth under phosphorus deficiency conditions in cotton. Scientific Reports. 5:10343 10.1038/srep10343.
- Zhang, Y.J., 2005. miRU: an automated plant miRNA target prediction server. Nucleic Acids Res 33:W701–W704.
- Zhu, J.K., 2001. Plant Salt Stress. eLS, 1-3.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Serenay Yıldız

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 10.04.1994

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Anıttepe Lisesi (2012)

Lisans : Ankara Üniversitesi-Biyoloji Bölümü (2016)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı