ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTÜTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *YABBY* VE *DOF* GENLERİNİN KURAKLIK STRESİ İLE OLAN İLİŞKİLERİNİN SALİSİLİK ASİT ETKİSİYLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Arzu Gizem KIRICI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Arzu Gizem KIRICI tarafından hazırlanan hazırlanan "**Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Bitkisinde *YABBY* ve *DOF* Genlerinin Kuraklık Stresi ile Olan İlişkilerinin Salisilik Asit Etkisiyle Karşılaştırmalı Olarak Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi**" adlı tez çalışması 19/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Murat KAYA
Aksaray Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

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

Üye : Doç. Dr. İlker BÜYÜK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

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

19/03/2019



Arzu Gizem KIRICI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *YABBY* VE *DOF* GENLERİNİN KURAKLIK STRESİ İLE OLAN İLİŞKİLERİNİN SALİSİLİK ASİT ETKİSİYLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK GEN İFADESİ DÜZEYİNDE İNCELENMESİ

Arzu Gizem KIRICI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stresler dünya genelinde fasulye yetiştiriciliğini sınırlayan faktörlerin başında gelmektedir. Son yıllarda bu problemleri çözmek için moleküler tabanlı uygulamalar geliştirilmektedir. Bu uygulamaların temelini ise, transkripsiyon faktörleri, moleküler, fizyolojik ve morfolojik (örneğin bağıl su içeriği) mekanizmaları aydınlatmaya yarayan gen ifade çalışmaları oluşturmaktadır. Salisilik asit (SA), bitkilerde abiyotik stres toleransını indükleyen endojen bir sinyalleşme molekülü olarak görev yapmaktadır. Transkripsiyon faktörleri (TF) ise bitkilerin strese karşı dirençli salisilik asit gibi çeşitli biyolojik işlemlerin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Bu kapsamda gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında 2 farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşidinde (Yakutiye-98, Zülbiye) *YABBY* ve *DOF* genlerinin ifade seviyeleri, kuraklık stresi koşulları altında araştırılmış, salisilik asit uygulamasının, kuraklık stresi altındaki bitkiler üzerindeki etkileri bu genler için mRNA ifadesi düzeyinde incelenmiştir. Bağıl su içeriği (RWC) ve morfolojik değişiklikler, kuraklık stresi altındaki bitki örneklerine salisilik asit uygulaması yapılarak karşılaştırılarak, transkripsiyon faktörlerinin ifade seviyelerinde gözlenen değişiklikler, stres ve hormon uygulamasının etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma, kuraklık stresine maruz kalan *Phaseolus vulgaris* L.'deki transkripsiyon faktörleri olan *YABBY* ve *DOF* genlerinin ifade modellerini ve salisilik asidin bu modeller üzerindeki etkisi hakkında bilgi vermektedir. Çalışma, transkripsiyon faktörlerine, ayrıca fasülyede gelecekte yapılacak ilgili araştırmalara ışık tutacaktır.

Mart 2019, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kuraklık stresi, fasulye, *YABBY*, *DOF*, gen ifadesi, salisilik asit, Real-Time PCR, *Phaseolus vulgaris* L

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE YABBY AND DOF TRANSCRIPTION FACTORS AT GENE EXPRESSION LEVEL DURING DROUGHT STRESS CONDITIONS IN *Phaseolus vulgaris* L. AND THE EFFECT OF SALICYLIC ACID

Arzu Gizem KIRICI

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

Supervisor: Prof. Dr. E. Sümer ARAS

Abiotic stresses like drought and salinity are one of the most limiting factors for stable crop production worldwide. In recent years, molecular-based applications are being applied to solve these problems. In this regard, the molecular mechanisms of transcription factors have gained attention and gene expression studies have become indispensable to understand the underlying molecular and morphological (such as RWC) mechanisms. Salicylic acid (SA) acts as an endogenous signaling molecule that induces abiotic stress tolerance in plants. Transcription factors (TF) have important roles in regulating a variety of biological processes like salicylic acid dependent resistance of plants to stress. In this study, the expression levels of *YABBY* and *DOF* genes in the 2 different beans (*Phaseolus vulgaris* L.) variety (Yakutiye-98, Zülbiye) were investigated under drought stress conditions and also the effects of salicylic acid application on the plants under drought stress have been studied at gene expression level. Relative water content (RWC) and other morphological variations, as well as the changes observed in expression levels of the transcription factors in comparison with salicylic acid application under drought stress, showed the effect of stress and hormone application and also revealed the importance of the transcription factors. The current study gives information about the expression patterns of the transcription factors *YABBY* and *DOF* in common bean. Exposed to drought stress and the effect of salicylic acid on this pattern. The study will shed light to the future studies about the mechanisms of transcription factors and related future studies about common bean.

March 2019, 56 pages

Key Words: Drought, *YABBY*, *DOF*, *Phaseolus vulgaris* L. gene expression, salicylic acid, Real-Time PCR

TEŞEKKÜR

Yükseklisans tezimin tamamlanması sürecinde, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Emine Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi) teşekkürlerimi sunarım.

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, gece gündüz demeden tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e (Ankara Üniversitesi), sevgili meslektaşım F. Şeyma GÖKDEMİR'e, birçok konuda bana yol gösteren, inanan değerli hocam Prof. Dr. Mahinur S. AKKAYA'a (Orta Doğu Teknik Üniversitesi) ve tüm Ankara Üniversitesi Bitki Biyoteknoloji ve Genetik Laboratuvarına ve ayrıca Wageningen Üniversitesi Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim. Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Arzu Gizem KIRICI
Ankara, Mart 2019

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGE DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) **3**
1.1.1 Tarihçe **3**
1.1.2 Sınıflandırılması **3**
1.1.3 Ekonomik değeri, Dünya'da ve Türkiye'deki üretimi **4**
1.2 Bitkilerde Stres **6**
1.2.1 Kuraklık stresi (Su stresi), zararları ve uyum mekanizmaları **8**
1.3 Bitkilerdeki Transkripsiyon Faktörleri **9**
1.3.2 YABBY proteinleri **9**
1.3.3 DOF proteinleri **12**
1.4 Salisilik Asit (SA) **15**
2. MATERYAL VE YÖNTEM **16**
2.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi **16**
2.1.1 Zülbiye (kuru fasulye) **16**
2.1.2 Yakutiye-98 (kuru fasulye) **16**
2.2 Tohumun Sterilizasyonu ve BitkininYetiştirilmesi **17**
2.3 Hoagland Besi Ortamının Hazırlanması **17**
2.4 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması **20**
2.4.1 Kuraklık stresi (PEG) **20**
2.4.2 Salisilik asit uygulaması **21**
2.5 Bağıl Su İçeriği (Relative Water Content-RWC) Uygulaması **22**
2.6 Total RNA İzolasyonu **23**
2.7 Agaroz Jel Elektroforezi **25**

2.8 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi 25
2.9 Real-Time PCR Reaksiyonu 25
2.10 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz 27
3. ARAŞTIRMA BULGULARI 28
3.1 Fasulye Çeşitlerinde Stres Uygulamaları 28
3.2 RNA İzolasyonu ve Sonuçları 30
3.3 Bağıl Su İçeriği (Relative water content-RWC) analizi ve sonuçları 32
3.4 PEG Stresi Altındaki Fasulye Çeşitlerinde ve Stres Sonrası Salisilik Asit (SA) Uygulamalarında *YABBY* ve *DOF* Gen Ailelerinin mRNA Sonuçları 34
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 42
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°	Derece

Kısaltmalar

µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ACT	Aktin
CO_2	Karbondioksit
CO_3^{2-}	Karbonat
CRC	Crabs Claw
$CuSO_4.5H_2O$	Bakır sülfat pentahidrat
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DOF	DNA Binding With One Finger
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EDTA.2Na	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu
EtOH	Etil Alkol
Fe_3O_4	Demir oksit
FeEDTA	Demir Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FeEDTA	Ferrik EDTA
$FeSO_4.7H_2O$	Demir sülfat heptahidrat
FIL	Fılamentous Flower
H_2O_2	Hidrojen peroksit
H_3BO_3	Borik Asit
INO	Inner No Outer
KBr	Potasyum bromür
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
KNO_3	Potasyum nitrat
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
M	Molar
Mg^{+2}	Magnezyum
$MgSO_4$.7H2O	Magnezyum Sülfat
mM	Milimolar
$MnSO_4$	Mangan Sülfat
mRNA	Haberci RNA
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NH_4Mo	Amonyum Molibdat
NO^-	Nitrik oksit
O_2	Oksijen
OH	Hidroksil
PEG	Polietilen Glikol

qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik Asit
RWC	Bağıl su miktarı
SO_4	Sülfat
TBE	Tris Borik Asit Etta
YABBY	Transkripsiyon faktörü
$ZnSO_4.7H_2O$	Çinko Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Kuru Fasulye'de söz sahibi olan ülkelerin üretim, verim, ithalat ve ihracat grafikleri 5
Şekil 1.2 Türkiye'nin kuru fasulye ithalatı yaptığı ülkeler (2016,%) 6
Şekil 1.3 Strese maruz kalmış (S+) ve strese maruz kalmamış (S-) bitkide strese duyarlı bir genin aktivitesinin karşılaştırmalı olarak gösterimi. 7
Şekil 1.4 *YABBY* gen ailesi. 11
Şekil 2.1 Optimum koşullarda büyütülen bitkilerin görüntüleri. 19
Şekil 2.2 Günlük fasulye çeşitleri olgunlaştıktan sonra stres uygulamaları için ayrı kaplara alınmıştır. 20
Şekil 2.3 Zülbiye çeşidi türü fasulye bitkisinin kontrol grubu 15. gün görüntüsü. 21
Şekil 2.4 RWC için plastik poşetlere konan sırasıyla Arabidopsis, domates ve arpa bitki örnekleri 23
Şekil 2.5 Yeni nesil Real-Time PCR cihazı, Light Cycler Nano (Roche) 26
Şekil 3.1 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinin 12 saat % 5 PEG stresi ve 24 saat salisilik asidi sonrası görüntüleri. 28
Şekil 3.2 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinin 12 saat % 10 PEG stresi ve 24 saat salisilik asidi sonrası görüntüleri. 29
Şekil 3.3 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinin 12 saat % 20 PEG stresi ve 24 saat salisilik asidi sonrası görüntüleri. 30
Şekil 3.4 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri (1. biyolojik tekrar). 31
Şekil 3.5 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri (2. biyolojik tekrar). 31
Şekil 3.6 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri (3. biyolojik tekrar). 31
Şekil 3.7 PEG Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir. 32
Şekil 3.8 SA Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir. 33
Şekil 3.9 PEG+SA Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir. 33
Şekil 3.10 *YABBY-3* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri verilmiştir. 35
Şekil 3.11 *YABBY-4* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri. 36
Şekil 3.12 *YABBY-5* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri. 37
Şekil 3.13 *DOF-17* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri. 38

Şekil 3.14 *DOF-28* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri. 39
Şekil 3.15 *DOF-30* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri. 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Fasulyenin sınıflandırılması 3
Çizelge 1.2 Dünya Kuru Fasulye Verileri (bin ton) 4
Çizelge 1.3 Türkiye'deki Kuru Fasulye Verileri (ton) 6
Çizelge 1.4 Phaseolus vulgaris L.'de bulunan sekiz YABBY proteinin bilgileri 11
Çizelge 1.5 Arabidopsis *YABBY* gen ailesi. 12
Çizelge 1.6 Phaseolus vulgaris L.'de bulunan 36 tane DOF proteinin bilgileri. 13
Çizelge 1.7 Çeşitli bitki türlerinde *DOF* genlerinin sayıları. 14
Çizelge 2.1 Hoagland besi ortamı besin çözeltisi içerikleri 18
Çizelge 2.2 Her biyolojik tekrar için çalışılacak bitki grupları ve zaman tablosu 22
Çizelge 2.3 Çalışmada optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR protokolü 26
Çizelge 2.4 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program 26

1. GİRİŞ

Baklagiller (*Leguminosae*), 40 takım içerisinden 640 cins ile bitkiler aleminin en geniş üçüncü ailesini oluşturur. Ülkemizde de bitkisel ürünlerin üretiminde baklagiller büyük öneme sahiptir (Büyük 2014). Fasulye, baklagiller içerisinde dünyada en fazla ekim alanına sahip üründür. Besin olarak, fasulye ucuz bir protein kaynağıdır. Baklagillerin % 65'ine kadarı proteinden ve yaklaşık % 32'si de enerji veren ve hayati öneme sahip mikro besinlerden oluşur (Welch vd. 2000). Fasulye, düşük gelirli ülkeler için bir protein kaynağı olduğu gibi gelişmiş ülkeler de diyet kullanımlarında önemli derecede tüketilmektedir. Diyabet, koroner kalp hastalıkları, kolon kanseri gibi birçok hastalığı önlemede yararlı bir besin olduğu belirlenmiştir (Thompson vd. 2009).

Fasulyenin yetiştirilmesi sırasında biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin önemi büyüktür. Abiyotik ve biyotik olmak üzere iki grupta incelenenen stres faktörleri ile bitkiler yaşam süreleri boyunca karşılaşmaktadırlar. Abiyotik stres faktörleri; su, radyasyon, sıcaklık ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleridir. Biyotik stres faktörleri ise hayvan saldırıları, fungus, virüs ve bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar sonucu oluşan stres faktörleridir (Lichtenhaler 1996, Büyük vd. 2012). Abiyotik stres faktörlerinin, dokularda bir dizi morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler meydana getirerek bitkinin büyüme ve verimlilik dağılımlarında olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Gündüzer 2015). Bu nedenlerden dolayı abiyotik stres unsurlarından biri olan kuraklık, fasulye yetiştiriciliğinde önemli sınırlayıcı etmenler arasında gösterilmektedir. Birim alana düşen verim miktarının artırılması, ekolojik koşullara uygun çeşitlerin belirlenmesine ve biyoteknolojik çalışmalar sayesinde çeşitlerin dirençli hale getirilmesine bağlıdır. Bu sebeple bitkilerin abiyotik stres koşullarına karşı sahip oldukları savunma mekanizmalarının çalışılması ve belirlenmesi oldukça önemlidir (Büyük ve Aras 2015).

Sıcak iklim bitkisi olan fasulye için en ideal sıcaklık 15-20 ^{o}C'dir. 15 ^{o}C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişim yavaşlamakta ve 35 ^{o}C'de çimlenme neredeyse hiç olmamaktadır. Çimlenme ideal koşullarda meydana gelirse ortalama 7-10 gün içerisinde gerçekleşmektedir. Bölgenin ekolojik koşullarına göre vejetasyon süresi, bitkinin sarılıcı

ve bodur olması, erkenci veya geçci olmasına göre 70-140 gün arasında değişebilir (Kütevin ve Türkeş 1987, Freytag ve Debouck 2002, Özdem 2012).

Transkripsiyon faktörleri, gelişmiş bitkilerde genomun yaklaşık % 7'lik bir kısmı tarafından kodlanır (Udvardi vd. 2007). Transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanma ve transkripsiyonel düzenleme bölgelerini içerir ve birden fazla hedef genin transkripsiyonunu düzenleyebilecek yeteneğe sahiptirler. Daha önce fasulye bitkisinde farklı transkripsiyon faktörü aileleri ile yapılmış genom düzeyinde biyoinformatik çalışmalar mevcuttur (Büyük vd. 2016, İnal vd. 2017). Ancak, *YABBY* ve *DOF* transkripsiyon faktörü ailelerinin, fasulye bitkisinde kuraklık stresi ile ilişkisinin incelendiği bir çalışma bilgimiz dahilinde bulunmamaktadır.

Salisilik asit, 2-Hidroksi benzoik asit olarak da isimlendirilmekle birlikte bitkilerin büyümesinde, termogenesiste, çiçeklenmenin başlamasında ve iyon alınımında önemli rol oynamaktadır. Etilen biyosentezinde görev aldığı gibi, absisik asidin yaprak dökülmesi üzerindeki etkisini de negatif yönde değiştirmektedir. Aynı zamanda, bitkinin strese karşı olan direncini arttırmaktadır (Sevimay 2009, Yusuf vd. 2013). Fasulye bitkisinde strese maruz kalmış bitkilerin salisilik asit etkisiyle dirençlerinin artırılabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır ancak, *YABBY* ve *DOF* gen ifadelerinin kuraklık stresi ile değişimini gösteren bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının amacı, biri dirençli, diğeri dayanıksız olmak üzere iki farklı fasulye çeşidinin kuraklık stresi altında ve kuraklıktan sonra uygulanan salisilik asidin etkisiyle *YABBY* ve *DOF* genlerinde meydana gelen gen ifadesi değişimleri qRT-PCR ile mRNA düzeyinde incelemektir. Bunların yanısıra, kuraklığa maruz kalmış bitkiler ile kuraklıktan sonra salisilik asit uygulanmış bitkilerin, kontrol grupları ile beraber *in vitro* koşullarda karşılaştırmalı olarak morfolojik ve fizyolojik incelemeleri yapılmıştır. Bu çalışma ile Türkiye'de ticari öneme sahip olan ve çalışmada kullanılan kuru fasulye çeşitlerinin dayanıklılık kapasitelerinin karşılaştırılması ve salisilik asidin kuraklık stresinden sonra bitki savunma mekanizması üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.1.1 Tarihçe

P. vulgaris L., Yeni Dünya olarak tarif edilen Amerika'nın bir ürünü olmakla birlikte günümüzde bütün kıtalarda yetiştirilmektedir. Dünya çapında önemli bir besin kaynağı olan fasülyenin üretimi 52 °K ve 32 °G enlemine yakın Avrupa ve Amerika kıtalarında gerçekleşmektedir (Schoonhoven ve Voysest 1991). Hem Latin Amerika hem de Doğu Afrika'da başlıca protein kaynağıdır. Latin Amerika'da fasulyenin kökeni 7000 yıl öncesine dayanmaktadır (Kaplan 1965, Kaplan ve Kaplan 1988, Gepts ve Debouck 1991) Arkeolojik araştırmalar (Kaplan ve Kaplan 1988), morfolojik veriler ve tohum protein yapısının incelenmesiyle fasulyenin iki farklı kökeni, ortaya çıkarılmıştır (Gepts vd. 1986, Gepts ve Bliss 1986). Andean ve mezoamerika orjinli tohumlar farklı rotalara dağılmıştır. Gepts (1988b)'ye göre küçük boyda olan tohumlar yani mezoamerika hattı tohumları sırasıyla; Meksika ve Orta Amerika'dan, Karayipler'den ve Kuzey Amerika'dan Brezilya'ya kadar ulaşmıştır. Mezoamerika hattının aksine Avrupa'da bulunan çeşitler daha büyük tohumludur. Andean tipi ise Avrupa'ya, Amerika'nın keşfinden sonra gelmiştir. Afrika'ya ise köle ticareti ve sömürge dönemlerinde taşınmıştır.

1.1.2 Sınıflandırılması

Çizelge 1.1 Fasulyenin sınıflandırılması (Von Schlechtendal 1840, Freytag ve Debouck 2002)

Domain:	Eukarya (Ökaryotikler)
Alem:	Plantae
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Magnoliopsida
Takım:	Fabales
Aile:	Fabaceae (Baklagiller)
Cins:	*Phaseolus* L.
Tür:	*Phaseolus vulgaris* L.

Fasulye *Fabaceae* (Baklagiller) familyasının Papilionoideae alt familyasından Phaseolea oymağının *Phaseolus* cinsine bağlı bir türdür. Başlıca türleri *Phaseolus P. coccineus* L., *P. lunatus* L. ve *P. vulgaris* L. olup sistematik sınıflandırılması Çizelge 1.1'de sunulmuştur (Von Schlechtendal 1840, Freytag ve Debouck 2002).

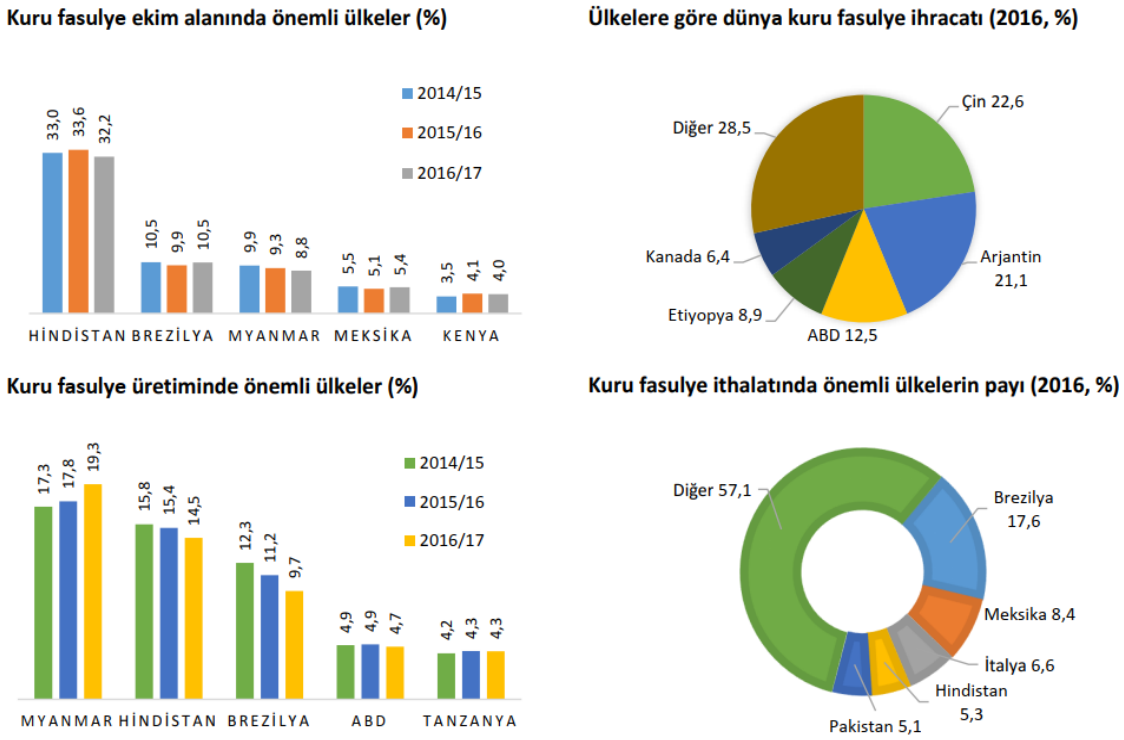
1.1.3 Ekonomik değeri, Dünya'da ve Türkiye'deki üretimi

Kuru fasulye dünyada 126 ülkede yetiştirilmektedir (https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018). 2016 yılından itibaren baklagil ekim alanlarının % 36'sını, baklagil üretiminin ise % 33'ünü oluşturmaktadır. 2016 yılı FAO verilerine göre Dünya'da 29 milyon ha alanda 27 milyon ton kuru fasulye üretilmektedir. 2015-2016 yılları arasında üretim alanı % 2,9 oranında ekim alanları da % 4,3 oranında azalmıştır. Kuru fasulye ekim alanlarında ilk sırada 9,4 milyon ha ile Hindistan gelmektedir. Üretim veriminde ise Myammar 5 milyar ton ile ilk sırada yer almaktadır. Myammar, Hindistan, ve Brezilya üretimde ilk sıralarda yer almalarına rağmen ihracattan önemli ölçüde pay alamamaktadırlar (Şekil 1.1, https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018). Bu ülkelerde nüfusun fazla olması nedeniyle kuru fasulye iç tüketimde kullanılmakta ve artan talep ithalatla karşılanmaktadır. Brezilya, Meksika, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Çin dünyadaki diğer önemli kuru fasulye üreticileridir (Şekil 1.1 ve Çizelge 1.2, https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018).

Çizelge 1.2 Dünya Kuru Fasulye Verileri (bin ton) (https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018)*

	2012	2013	2014	2015	2016	Değişim (%)[1]
Alan (bin ha)	29.126	29.308	30.293	30.701	29.393	-4,3
Verim (ton/ha)	0,84	0,84	0,89	0,9	0,91	1,1
Üretim (bin ton)	24.453	24.617	26.854	27.644	26.833	-2,9
İthalat (bin ton)	1.937	1.818	1.745	1.665	1.948	17,0
İhracat (bin ton)	2.013	1.794	1.860	1.781	1.907	7,1
İhracat Fiyatı ($/ton)	982	1.073	1.091	867	855	-1,4

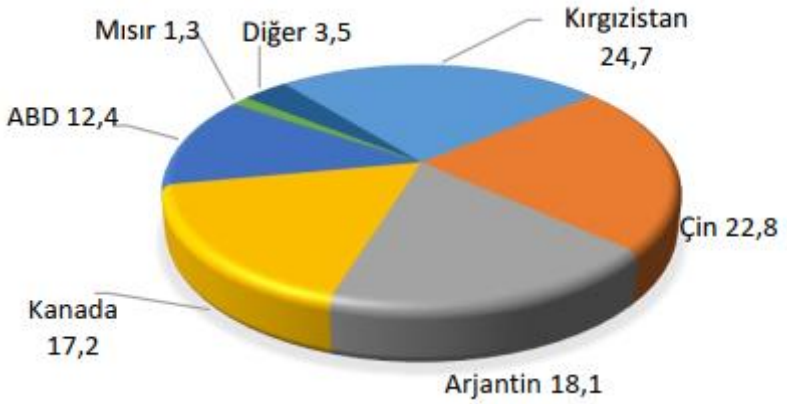
*TUİK (19.01.2018)[1]/ Verisi bulunan son iki pazarlama yılının değişimini göstermektedir.



Şekil 1.1 Kuru Fasulye'de söz sahibi olan ülkelerin üretim, verim, ithalat ve ihracat grafikleri (https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018)

Dünyada kuru fasulye üretiminin % 14'lük kısmı ticari, geri kalan % 84'lük kısmı ise ülkelerin iç taleplerini karşılamaya yöneliktir. Kuru fasulye ihracatında ilk sırayı 431 bin ton ile Çin almaktadır. Arjantin 402 bin ton ve ABD 238 bin ton ile Çin'i takip etmektedirler. İthalatta ise 342 bin ton ile Brezilya ilk sırada yer alırken, Brezilya'yı Meksika 163 bin ton ve İtalya 128 bin ton ile takip etmektedir.

Türkiye'de kuru fasulye nohuttan sonra en çok tüketilen ikinci baklagildir. Ekim alanlarının azalmasına rağmen verimde yaşanan olumlu gelişme üretim miktarını arttırmıştır. Buna rağmen % 86,2 oranında kendine yeterliliği olan Türkiye ithalata sürüklenmektedir (Şekil 1.2). İklim değişikliği, maliyetin yüksek olması, tarım teknolojilerindeki eksiklikler gibi nedenlerle üretim miktarı düşmektedir; böylece diğer ülkelerle rekabette arka sıralara düşmektedir. 2016 yılı itibariyle Türkiye kuru fasulye ithalatında 16. sırada, ihracatında ise 40. sırada yer almıştır (https://arastirma. tarimorman.gov.tr 2018).



Şekil 1.2 Türkiye'nin kuru fasulye ithalatı yaptığı ülkeler (2016, %) (https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018)

Çizelge 1.3 Türkiye'deki Kuru Fasulye Verileri (ton) (https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018)*

	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	Değişim (%)[1]
Alan (ha)	93.174	84.763	91.1103	93.584	89.820	-4,0
Verim (kg/da)	215	230	236	251	262	4,3
Üretim ton)	200.000	195.000	215.000	235.000	235.000	0,0
Yurt içi kullanım	237.817	245.636	246.679	281.435	-	14,1
İthalat (ton)	28.672	24.408	51.701	31.688	31.352	-1,0
İhracat (ton)	1.318	2.465	8.724	4.369	2.624	-39,9

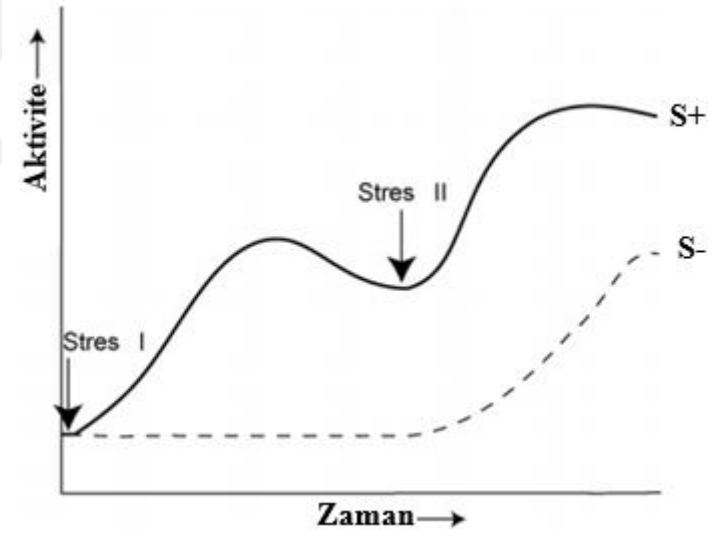
*TUİK (19.01.2018)[1]/ Verisi bulunan son iki pazarlama yılının değişimini göstermektedir.

Türkiye'de kuru fasulye ekimi 2016/17 üretim döneminde 89,8 bin ha alanda gerçekleşmiştir. Yağışların artması, uygulanan tekniklerin geliştirilmesiyle üretim miktarı 2016 yılı öncesine göre artış sağlamış olsa da İç Anadolu Bölgesi'nde % 51, Doğu Anadolu Bölgesi'nde % 7,4'lük alanında ekim gerçekleşmiştir. İç Anadolu Bölgesinde % 65,2'lik pay ile 2016/17 yılları arasında 235 bin ton kuru fasulye üretimi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1.3, https://arastirma.tarimorman.gov.tr 2018)

1.2 Bitkilerde Stres

Dünya çapında sürdürülebilir tarımın devamlılığı ve ürün kalitesinin arttırılabilmesi için, biyotik ve abiyotik streslerle mücadele etmek amacıyla alternatif yollar denenmektedir. Tarih boyunca abiyotik ve biyotik strese maruz kalan bitkiler evrimsel

süreç sırasında kendilerini adapte edecek mekanizmalar geliştirmişlerdir. Çevrenin olumsuz etkileri, bitkilerin büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkileyecek seviyede değiştiği zaman, bitkiler strese girmektedirler. Bu stres mekanizmaları moleküler seviyedeki değişikliklerle kontrol edilmektedir. Strese maruz kalan bitkiler, gen ifade değişiklikleri ile tepki verirler. (Walling 2000, Tardif vd. 2007). Sinyal yolları; jasmonik asit, salisilik asit, etilen, abisik asit hormonları, giberelik asit, nitrik oksit ve oksin gibi bitki hormonlarını içermektedir. Bu hormonlar, tüm bitki stres yollarını birleştirmede ve koordine etmede merkezi rol oynamaktadırlar (Wu vd. 2007, Smith ve Boyko 2007). Bir kez strese maruz kalan bitkinin ileride aynı stresle mücadele de direnç göstermesi biyotik ve abiyotik stresin ortak noktası olarak gösterilmektedir (Şekil 1.3). Strese bağlı genlerin ifadelerindeki değişimlerle gerçekleşen bu koruma önceden abiyotik veya biyotik strese maruz kalmış bitkilerin savunma mekanizması yanıtının daha hızlı ve daha güçlü olmasını sağlamaktadır (Conrath vd. 2006, Ton vd. 2007).



Şekil 1.3 Strese maruz kalmış (S+) ve strese maruz kalmamış (S-) bitkide strese duyarlı bir genin aktivitesinin karşılaştırmalı olarak gösterimi (Bruce vd. 2007)

Şekil 1.3'de görüldüğü gibi S+, stres I ve II'de gen ifade düzeyini arttırarak, strese daha çabuk yanıt vermiştir. S-, ise sadece stres II'ye maruz kalmıştır. Strese cevap veren gen daha önce strese maruz kalmış bitkide daha yüksek gen ekspresyonu seviyesi göstermiştir. Stres I ve stress II'ye maruz kalmış bitkilerde ise gen aktivitesi şekildeki gibi armıştır (Bruce vd. 2007).

Bitkilerin strese karşı göstermiş olduğu tepki mekanizmaları; bitkinin türüne, toleransına, adaptasyon yeteneğine ve stres ile daha önce karşılaşıp karşılaşmadığına göre değişmektedir. Bitkilerin stresle ilişkili tepki mekanizmaları hakkında halen bilinmeyen çok fazla etmen vardır (Bruce vd. 2007). Bunların aydınlatılması, toleranslı tür ve çeşitlerin geliştirilmesi gelecek için oldukça önemlidir.

1.2.1 Kuraklık Stresi (Su stresi), zararları ve uyum mekanizmaları

Kuraklık, fasulye bitkilerinin büyümesini ve üretkenliğini aşırı derecede etkilemektedir. Ayrıca, su stresinin; yaprak azalmasına, stoma iletkenliğine, fotosentez hızının düşmesine, fasulye bitkilerinin büyüme, verim ve kalite parametrelerinin değişmesine neden olduğu belirlenmiştir (El-TohaMy vd. 1999). Kuraklık stresi, yetersiz yağış veya yetersiz toprak neminin bir sonucu olarak, bitkilerde büyümeyi ciddi bir biçimde sınırlayan çeşitli biyokimyasal, fizyolojik ve genetik tepkilere neden olabilen çevresel bir stres faktörüdür (Seki vd. 2007, Vadez vd. 2012). Toprakta suyun azlığı bitkiyi strese sokan en önemli etmenlerden biridir. Toprakta su yeteri kadar bulunmadığında bitkinin tolerans mekanizması çalışmaz ve su kaybı gerçekleşir. Bu durum da bitkiyi strese sokmaktadır. Turgor basıncının her zaman hücre içinde negatif olması durumunda ise bitkide solma meydana gelmektedir (Reddy vd. 2004, Jaleel vd. 2007).

Su kaybının bitkiye verdiği zarar hücresel metobolizmanın bozulmasıyla ortaya çıkar ve bitkide iyon birikimine, membran bozukluğuna ve protein yapılarının bozulmasına neden olur (Büyük ve Aras 2015). Metobolizmanın bozulması fotosentez miktarını azaltacağından dolayı üretilen ürün miktarında ciddi düşüşler yaşanacaktır.

Bitki, verimini tehdit eden strese karşı uyum mekanizmaları geliştirmiştir. Genel olarak, strese karşı toleranslı olmak ya da stresten kaçmak şeklinde iki farklı uyum mekanızması geliştirmişlerdir (Levitt 1980, Laffray ve Louguet 1990, Cruz de Carvalho vd. 1998). Küresel ısınmanın etkisiyle, karşılaşılan bu sorunların çözümü için moleküler tabanlı uygulamalar yapılmaktadır. Özellikle son zamanlarda transkripsiyon faktörleriyle yapılan gen ifadesi çalışmaları önem kazanmıştır. Transkripsiyon faktörleri, bitkilerin, çevresel stres koşullarına cevap olarak geliştirdikleri moleküler

adaptasyon mekanizmalarının temelini oluşturmaktadır (Gonzalez 2015, Büyük vd. 2016).

Bitkilere özgü transkripsiyon faktörleri (TF), çevresel stres uyaranlarına karşı tepki, bitkisel hastalık ve savunma yolları, yaşlanma, büyüme, hücre bölünmesi ve yanıtları da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen önemli rollere sahiptir. Çeşitli stres koşullarında, bitkide meydana gelebilecek fizyolojik ve metabolik tepkiler, sinyal iletimi oluşturarak, strese cevap veren gen/genlerin ifadesini başlatırlar. Transkripsiyon faktörleri stres koşulları altında, transgen kültür bitkilerinin üretiminde rol oynamakla birlikte, stresle başa çıkmada yüksek bir potansiyele sahiptirler (Yamaguchi ve Shinozaki 2006, Tran vd. 2007, Valliyodan ve Nguyen 2006).

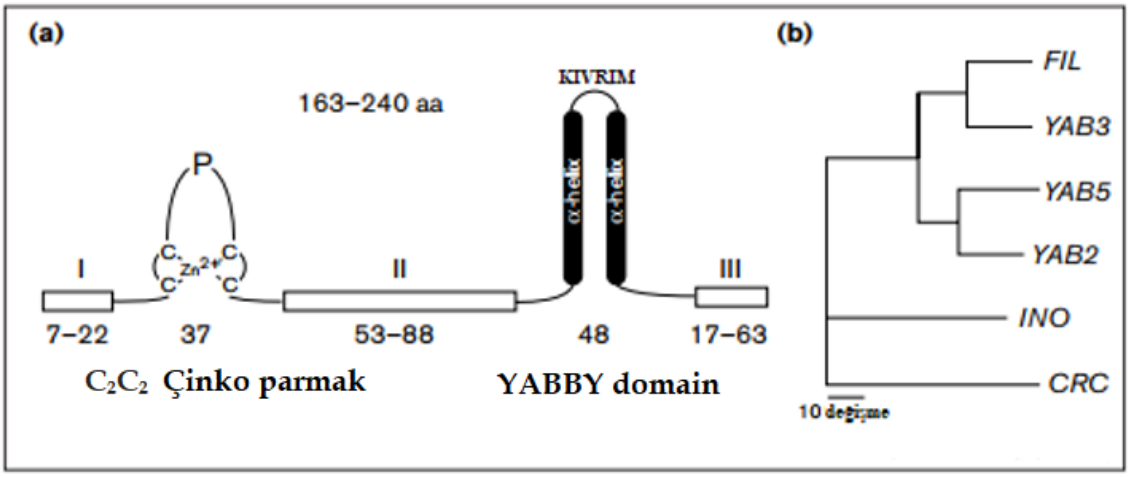
1.3 Bitkilerdeki Transkripsiyon Faktörleri

Tüm canlı organizmalarda olduğu gibi, bitkilerde de gen ifadesinin biyolojik kontrolünün düzenlenmesi esastır. Bitki organlarının planlanması, geliştirilmesi, farklılaşması, stomaların gelişimi, lateral organların oluşması, çiçek oluşumu ve çeşitli çevresel sinyallere verilen cevaplar gibi birçok fonksiyon için transkripsyon faktörleri bitkilerin olmazsa olmazıdır (Yanagisawa, 1998). Bitkilerde gen ifadesini gerçekleştiren mekanizmaları açıklamaya yönelik çalışmalarda, bitki promotorları ile etkileşime giren çok sayıda DNA'ya bağlanan protein tanımlanmış ve bu proteinlere karşılık gelen DNA'lar klonlanmıştır (Katagiri vd. 1989, Tabata vd. 1989). Bu proteinlerin bazıları, hayvanlarda veya maya hücrelerinde karakterize edilmiş transkripsiyon faktörlerine benzerken, diğerleri bitkilere özgüdür. DNA'ya bağlanan AP2/EREBP, DOF ve GT1/GT2 proteinleri gibi bitki proteinleri hayvan ve mayalarla homoloji göstermeyen proteinlerdir (Yanagisawa 1998). Bu tez çalışmasında da kuraklık stresi uygulanmış fasulye örneklerinde YABBY ve DOF proteinlerine ait mRNA düzeyleri incelenmiştir.

1.3.2 YABBY proteinleri

Bitkilerin büyüme ve gelişimlerinde transkripsiyon faktörleri önemli rol oynamaktadır. DNA bağlanma domainlerini kodlayan korunmuş motiflere göre sınıflandırılan ve

günümüzde bilinen 30 transkripsiyon faktörü ailesi bulunmaktadır (İnal vd. 2017). Bitki transkripsiyon faktörlerinden biri olan YABBY tohumlu bitkilere spesifiktir. *YABBY* gen ailesi; sürgün, çiçek, yaprak ve meyve gelişimine katkıda bulunmaktadır. Apikal ve çiçek meristemleriyle üretilen tüm lateral organlarda ifade edilmektedir (Bowman ve Smyth 1999, Siegfried vd. 1999, Bartholmes vd. 2012). Fasulye genomunda ve *Arabidopsis*'te 8 *YABBY* gen ailesi bulunmaktadır. YABBY'nin karakterize yapısı incelendiğinde, proteinin amino ucuna doğru C_2─C_2 çinko parmak benzeri bir domain ve proteinin karboksil ucuna doğru YABBY domaini olarak adlandırılan sarmal-ilmek-sarmal olan iki korunmuş domain ile bulunmaktadır (Şekil 1.4, Bowman 2000). Çinko parmak domainlerine ek olarak, *YAB1*, *YAB2*, *YAB3* ve *YAB5*, YABBY domaininin karboksil ucunda benzerlik göstermektedir (Siegfried vd. 1999, Filyushin vd. 2017). *YABBY* geni yada genleri çiçek organlarının yanı sıra yapraklarda da ifade edilir. *YABBY* gen bölgelerin isimleri aynı zamanda *Filamentous Flower* (*FIL*), *Crabs Claw* (*CRC*), *Inner no Outer* (*INO*), *YABBY2*, *YABBY3* ve *YABBY5* olarak da isimlendirilmektedirler (Bowman ve Smyth 1999). Angiospermlerde, *YABBY* gen ailesi *CRC* ve *YABBY1/YABBY3* ortak bir atadan gelmiştir. *CRC* genleri karpellerin polaritesini düzenlerken, *YABBY1/YABBY3*, genleri gynoecium ve nektarların gelişiminde tüm toprak üstü yanal organların polaritesini düzenler (Filyushin vd. 2017). YABBY proteinleri bitki gelişimini düzenlemek için başka proteinlerle etkileşime girebilir. Örneğin, *Arabidopsis*'deki *Filamentous Flower (FIL)* bölgesi *YABBY3* ve *YABBY5*, bileşenleriyle etkileşebilir (Çizelge 1.5, Bowman 2000). *YABBY* genlerinin ifade seviyeleri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Huang vd. 2013, İnal vd. 2017). Çiçek oluşumunda ve yaprak gelişminde *FIL* ya da *YABBY1* geni görevlidir (Yuan ve Perry 2011). Damarlanmanın gelişiminde ise *FIL* alt ailesine ait olan *YABBY4*, düzenleyici olarak davranır (Liu vd. 2007). *CRC* ise *Arabidopsis*'te karpel ve nektarin gelişimini, haşhaşta ovül oluşumunu, oral meristem sonlanması ve ginezyum farklılaşmasında rol almaktadır (Orashakova vd. 2009). *INO* geni için *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışma ile ovülün dış integümentinin oluşumu ve asimetrik büyümesinde rol aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 1.4, Villanueva vd. 1999, İnan vd. 2017). *YABBY* genlerinin ifade seviyelerinin ovüllerde yüksek çıkması, ovül gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca sıcak, soğuk, tuz ve kuraklık gibi abiyotik stresler altında *YABBY* genlerinin bir kısmında ifade seviyesinin düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 1.4, Yang vd. 2018).



Şekil 1.4 *YABBY* gen ailesi (Bowman 2000)

Şekil 1.4.a ile gösterilen kısımda proteinin amino ucuna doğru C_2─C_2 çinko parmak benzeri bir domain ve proteinin karboksil ucuna doğru *YABBY* domaini olarak adlandırılan sarmal-ilmek-sarmal olan iki korunmuş domain gösterilmektedir. Bölge I, II, III uzunlukları ve amino asit dizileri aile üyeleri arasında değişkendir. Korunan ve değişken alanların her birinin uzunlukları belirtilmiştir. Şekil 1.4.b ile gösterilen kısımda çinko-parmak bölgesinin dizileri üzerinde, *YABBY* domaini ve filogenetik olarak bilgilendirici amino asitler bulunmaktadır. FIL, *YAB2*, *YAB3 ve YAB5*, bölge III'de bazı benzerliklere sahiptir ve *FIL* ve *YAB3*, I ve II bölgelerinde ise az benzerlik göstermektedir (Siegfried vd. 1999, Bowman ve Smyth 1999).

Çizelge 1.4 Phaseolus vulgaris L.'de bulunan sekiz YABBY proteinin bilgileri (İnal vd. 2017)

Genler	**Fitozom tanımı**	**Kromozom lokasyonu**	**Protein uzunluğu**	**Moleküler Ağırlığı (Da)**
PvulYABBY-1	**Phvul.002G069700.1**	**9553549..9556683**	**256**	**28916.8**
PvulYABBY-2	**Phvul.003G039800.1**	**4217179..4219619**	**173**	**18978.4**
PvulYABBY-3	**Phvul.003G061800.1**	**8393693..8395131**	**237**	**26412.2**
PvulYABBY-4	**Phvul.003G166100.1**	**37492965..37496762**	**186**	**20894.8**
PvulYABBY-5	**Phvul.003G217700.1**	**43407696..43410807**	**215**	**23982.3**
PvulYABBY-6	**Phvul.005G117600.1**	**33854923..33864003**	**185**	**20704.5**
PvulYABBY-7	**Phvul.010G079200.1**	**29466002..29468643**	**215**	**23915.2**
PvulYABBY-8	**Phvul.011G100300.1**	**10846106..10852521**	**183**	**20458.2**

Çizelge 1.5 Arabidopsis YABBY gen ailesi (Bowman 2000)

Gen Ailesi	İfade Düzeyi
CRABS CLAW (CRC)	**Karpeller ve nektarinler**
FILAMENTOUS FLOWERS (FIL) (YABBY1, AFO)	**Kotiledonlar, yapraklar, sepaller, petaller, stamenlerde ve karpellerde**
YABBY2 (YAB2)	**Kotiledonlar, yapraklar, sepaller, petaller, stamenlerde ve karpellerde**
YABBY3 (YAB3)	**Kotiledonlar, yapraklar, sepaller, petaller, stamenlerde ve karpellerde**
INNER NO OUTER (INO)(YABBY4)	**Dış integument tabakası**
YABBY5 (YAB5)	**Bilinmiyor**

1.3.3 DOF proteinleri

DOF proteinleri önemli bitki transkripsiyon faktörü üyelerindendir. DOF proteinleri genomda yüksek sayıda olmalarından dolayı aynı DNA'ya bağlanabilirler. Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalarla bitkilerde gen ifadeleri sırasında ışık, fitohormon ve savunma tepkileri (stres tepkileri), gelişme ve çimlenme gibi farklı rollerde de görev aldıkları tespit edilmiştir (Yanagisawa 2002). DOF'un karakteristik yapısına bakıldığında, proteinin amino ucuna doğru C_2─C_2 tipi N-terminalinde 52 amino asit kalıntısından oluşan çinko-parmak benzeri bir motif bulunmaktadır. DOF proteinleri hem monokotlarda hem de dikotlarda bulunmaktadır (Çizelge 1.6, Ito vd. 2017). Fakat bunların biyolojik rollerinin sadece bir kısmı bilinmektedir (Yanagisawa vd. 2002). İlk DOF proteini *ZmDof1* mısır bitkisinde DNA'ya bağlanan protein olarak bulunmuştur. Son yıllarda mısır, *Arabidopsis*, tütün, balkabağı, patates, arpa, buğday ve fasulye bitki türlerinden izole edilen DOF proteininde spesifik domaini kodlayan 20 ve üzeri cDNA vardır (Yanagisawa 1995, Zhang vd. 1995, Gualberti vd. 2002). DOF proteinleri tipik olarak 200-400 amino asittten oluşur. Yüksek oranda korumuş DNA bağlayıcı proteinler olarak tanımlanmaktadırlar. DOF proteininin bitkilere özgü bir protein olduğu *Arabidopsis, Drosophila, Caenorhabditis elegans* yapılan karşılaştırmalı çalışmalarla kanıtlanmıştır (Riechmann vd. 2000). Fosfoenolpiruvat karboksilaz genleri ile bağlantılı promotorleri aktive eden *DOF1* geni, mısır protoplastlarında karbonhidrat metabolizması düzenleyicisidir (Yanagisawa ve Sheen 1998, Yanagisawa 2000, Daniel 2015). Aynı zamanda kök ışık sinyalinde, çimlenmede, stoma gelişiminin

düzenlenmesinde, vasküler sistemde, biyotik ve abiyotik streslerde de görevlidir (Corrales vd. 2014, Cai vd. 2016) ve ifade olur (Noguero 2013, Gabriele 2010, Rueda-Romero vd. 2012, Le Hir ve Bellini 2013, Kang vd. 2016). Sistematik olarak karakterize edilen bütün *DOF* genleri fasulyede de protein korunmuş etki alanları, filogenetik ilişkiler, farklı dokularda gen ifade profilleri gibi açılardan incelenmiştir (Ito vd. 2017). Biyoinformatik analizlerde fasulyede *DOF* geni ile ilişkili 36 gen ortaya çıkarılmıştır (Çizelge 1.6, Ito vd. 2017). Filogenetik analiz yoluyla 7 alt familya (A, B1, B2, C1, C2, D1 ve D2) halinde sınflandırılır (Ito vd. 2017).

Çizelge 1.6 *Phaseolus vulgaris* L.'de bulunan 36 tane DOF proteinin bilgileri (Ito vd. 2017)

Genler	Fitozom tanımı	Kromozom lokasyonu	Nükleotit CDS(bp)	Uzunluk (aa)	pI	MW (kDa)
*PvDof*01	Phvul.001G062100.1	Chr01:7655746..7657228	810	269	8.20	29.99
*PvDof*02	Phvul.001G080800.1	Chr01:13241653..13243692	1068	355	9.22	39.11
*PvDof*03	Phvul.001G196100.1	Chr01:46235911..46236696	786	261	6.19	29.41
*PvDof*04	Phvul.002G022000.1	Chr02:2381355..2382917	1020	339	8.92	35.87
*PvDof*05	Phvul.002G144900.1	Chr02:28149833..28151588	1035	344	8.81	37.05
*PvDof*06	Phvul.002G226100.1	Chr02:39099335..39101145	942	313	8.41	34.17
*PvDof*07	Phvul.002G230100.1	Chr02:39579558..39580512	786	261	9.75	27.96
*PvDof*08	Phvul.002G230200.1	Chr02:39587482..39589579	1044	347	9.06	37.11
*PvDof*09	Phvul.002G238400.1	Chr02:40406454..40408578	552	183	7.71	20.98
*PvDof*10	Phvul.003G182100.1	Chr03:39382825..39384177	864	287	6.52	30.94
*PvDof*11	Phvul.003G200600.1	Chr03:41410491..41412765	987	328	6.82	35.85
*PvDof*12	Phvul.003G247900.1	Chr03:47381617..47383283	1017	338	8.64	36.06
*PvDof*13	Phvul.003G248500.1	Chr03:47458824..47459525	702	233	8.72	24.49
*PvDof*14	Phvul.003G287600.1	Chr03:51349107..51350494	1038	345	8.89	37.12
*PvDof*15	Phvul.005G137700.1	Chr05:36604141..36605891	864	287	8.08	31.55
*PvDof*16	Phvul.005G143100.1	Chr05:37185922..37187662	918	305	9.58	33.38
*PvDof*17	Phvul.005G161200.1	Chr05:38639927..38641622	618	205	9.02	22.04
*PvDof*18	Phvul.006G114900.1	Chr06:23050676..23052519	765	254	8.66	27.74
*PvDof*19	Phvul.006G176400.1	Chr06:28683988..28685016	546	181	9.45	20.76
*PvDof*20	Phvul.006G184000.1	Chr06:29308624..29310821	1038	297	9.26	32.20
*PvDof*21	Phvul.006G184100.1	Chr06:29322500..29324409	894	345	8.68	37.33
*PvDof*22	Phvul.006G188300.1	Chr06:29645412..29647711	843	280	8.12	31.11
*PvDof*23	Phvul.007G267600.1	Chr07:50584990..50585817	828	275	5.25	30.12
*PvDof*24	Phvul.008G012500.1	Chr08:1111164..1112976	1053	350	9.31	37.82
*PvDof*25	Phvul.008G012500.2	Chr08:1111666..1112976	933	310	9.33	33.49
*PvDof*26	Phvul.008G099400.1	Chr08:10664656..10666281	1086	361	9.08	37.64
*PvDof*27	Phvul.009G047500.1	Chr09:9121973..9124052	837	278	8.88	30.49
*PvDof*28	Phvul.009G136400.1	Chr09:20017224..20018880	897	298	5.03	33.10
*PvDof*29	Phvul.009G178300.1	Chr09:26082689..26084869	1011	336	6.58	36.77
*PvDof*30	Phvul.009G204000.1	Chr09:30151578..30153734	957	318	6.49	34.50
*PvDof*31	Phvul.010G013500.1	Chr10:2139058..2140753	1002	333	9.18	35.59
*PvDof*32	Phvul.010G115600.1	Chr10:38220876..38223161	849	282	9.04	30.64

Çizelge 1.6 *Phaseolus vulgaris* L.'de bulunan 36 tane DOF proteinin bilgileri (devam)

PvDofß3	Phvul.010G141400.1	Chr10:41333505..41336027	612	203	8.70	21.94
PvDofß4	Phvul.011G064800.2	Chr11:5628982..5631847	768	255	9.63	27.75
PvDofß5	Phvul.011G064800.1	Chr11:5629789..5631847	930	309	9.53	33.52
PvDofß6	Phvul.011G071900.1	Chr11:6441508..6443452	897	298	7.51	32.87

Çizelge 1.6'da CDS: kodlayan protein; bp: baz çiftleri; aa: aminoasit; MW: moleküler ağırlık (kDa); pl: izoelektrik noktası.) (Ito vd. 2017).

Çizelge 1.7 Çeşitli bitki türlerinde DOF genlerinin sayıları (Daniel 2015).

Türler	*DOF* geni sayısı
DİKOTİL	
A. thaliana	36
Solanum lycopersicum L. (tomato)	34
Glycine max (soybean)	28
Populus trichocarpa (poplar)	41
MONOKOTİL	
O. sativa (Asian rice)	30
O. sativa ssp. *japonica*	30
O. sativa ssp. *indica*	28
O. glaberrima (African rice)	26
O. brachyantha (wild rice)	10
Z. mays (maize)	51
Brachypodium distachyon (purple false brome)	27
Sorghum bicolor (sorghum)	28
Hordeum vulgare (barley)	26
Triticum aestivum L. (wheat)	28
T. aestivum L. (wheat)	31
YOSUN	
P. patens	19
YEŞİL ALG	
C. reinhardtii	1

1.4 Salisilik Asit (SA)

Bitki tarafından üretilen, fizyolojik yapısı farklı ve biyokimyasal olarak bir takım fonksiyonlara sahip, bitki büyüme regülatörü olarak bilinen bir bileşiktir (Raskin 1992). İlk yapılan çalışmalarda, patojen saldırısında (biyotik stres), bitkideki savunma mekanizması çalışması ile SA miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Son zamanlarda yapılan tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık gibi abiyotik stres çalışmalarıyla da salisilik yolakları ve işlevleri aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Strese giren bitkideki stres miktarını azaltmak için dışarıdan uygulanan salisilik asit miktarı uygulanan bitkinin çeşidine, gelişme süresine, uygulanış şekline, konsantrasyona ve bunun gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Horvath vd. 2007, Sevimay 2009). Strese maruz kalmış bitkilerin savunma mekanizması aktif hale geçtikten sonra metabolizma içerisinde farklı tipte organik bileşikler üretmeye başlarlar. Şeker, prolin, glisin betanin, salisilik asit gibi birleşikler, hücre membran bütünlüğünün korunmasında, enzim ve proteinlerin stabilizasyonunda ve bir çok önemli metabolik görevde rol oynarlar (Sevimay 2009). Biyoteknolojik çalışmalar ile bu bileşiklerin bitkilerde fazla üretilmesi sağlandığında, bitkilerin stresle mücadelesini arttırıldığı belirtilmiştir. Ayrıca dış uygulamaların da abiyotik stres toleransına katkı sağladığına dair çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; biberde düşük sıcaklıkta salisilik asitin çimlenmeyi iyileştirdiği (Korkmaz 2005), salatalıkta ise yapraktan uygulama ile ısı toleransını arttırarak verimi yükselttiği (Shi vd. 2006, Yıldırım vd. 2006), tuz stresine maruz kalmış buğdayda ise büyüme ve verimi arttırdığı (Arfan vd. 2007), toprağa uygulandığında ise hem normal hem de tuzlu ortamda mısır bitkisinde gelişimi arttırdığı belirtilmiştir (Güneş vd. 2007). Ayrıca salatalıkta manganez, çeltikte kadminyum gibi ağır metallere karşı toleransı arttırdığı (Guo vd. 2007, Shi ve Zhu 2008), kuraklık etkisindeki fasulye ve domateste de sıcaklık ve soğuga karşı etkili olduğu (Senaratna vd. 2000) ve kavun fidelerinde de kuraklığa karşı toleransı arttırdığı da (Korkmaz vd. 2007) belirtilmiştir. Bu gelişmelerle birlikte bu uygulamaların tarımsal alanda uygulanması için daha fazla pratik yapılması gerektiğini gösteren çalışmalarla, türler arası uygulama farkından dolayı aynı verimin alınamaması, kullanım miktarına göre verimin düşmesi, gelişmelerinin olumsuz etkilendiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Ashraf ve Foolad 2007, Güneş vd. 2007, Horvath vd. 2007).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyalinin Temin Edilmesi

Gerçekleştirilen tez çalışmasında 'Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Karadeniz Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü Müdürlüğü Samsun ve Doğu Anadolu Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü Müdürlüğü Erzurum'dan temin edilen 2 farklı (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşidi kullanılmıştır. Çalışılan bu fasulye çeşitlerinin Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden bildirilen morfolojik özellikleri aşağıda sunulmuştur.

2.1.1 Zülbiye (kuru fasulye)

Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen dik gelişen, makineli tarıma uygun, 40–50 cm boylanan, horoz tane şekilli ve beyaz tane renginde, ortalama 16-34 arasında bakla bağlayan, yaprakları diğer genotiplere göre daha koyu renkli, bin tane ağırlığı 472 – 571 g olan bir genotiptir. 2002 yılında tescil edilmiştir. Çiçeklenme gün sayısı 55-58 gündür. İlk bakla yüksekliği 18-23 cm olan Zülbiye yazlık bir çeşittir. Özellikle Karadeniz geçit ve iç kesimlerinde kolaylıkla yetiştirilebilir. Karadeniz sahil kesimine daha fazla uyum sağlamaktadır. Dekara 10-12 kg tohum hesabıyla ekimi yapılır. Kuvvetli topraklarda fazla bir şekilde dallanır. Elek yüzdesi 8,27'dir. 100 tane ağırlığı ise 49,5-51,5 g'dır. Su alma kapasitesi 0,41-0,43 g/tane ve su alma indeksi 0,950-1,01'dir. Pişirme süresi 25-28 dakikadır.

2.1.2 Yakutiye-98 (kuru fasulye)

Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen koyu yeşil renkli, bodur tipli, bakla boyu 12–13 cm ve uzun yassı bakla şekilli olan, bitki başına ortalama 16 adet bakla bağlayan, baklada ortalama 4 adet beyaz renkli yuvarlak–uzun tane içeren virüs ve bakteri

hastalıklarına karşı toleranslı bir genotiptir. Uzun bir olgunlaşma süresine (yaklaşık 121 gün) ihtiyaç duymaktadır. Yakutiye-98 çeşidi önemli seviyede erkenci ve yüksek verimli olması, bu hatların Erzurum ve benzer ekolojilere mevcut tescilli çeşitlerden çok daha iyi adapte olduğunu ve sonbahar ilk donlarından önce olgunlaşarak üretiminin garanti altına alabileceğini göstermiştir.

2.2 Tohumun Sterilizasyonu ve Bitkinin Yetiştirilmesi

Çalışma kapsamında temin edilen *Phaseolus vulgaris* L. Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşidine ait tohumlar ekilmeden önce sterilizasyon işleminden geçirilmiştir. Bu işlem çeker ocak altında ve bek alevi yakınında gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla; % 5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) ile 3 dakika muamele edilen tohumlar, otoklavlanmış distile su ile (ddH_2O) ile yine 3 dakika süresince yıkanmıştır. İşlembasamakları toplamda beş kez ardarda tekrar edilmiştir. Bu işlem sırasında, manyetik karıştırıcılı ısıtıcı üzerinde, sabit karıştırma hızında ve oda sıcaklığında çalışılmıştır. İşlem bitiminde tohumlar steril edilmiş kabın içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Ekim işlemi yapılacak olan perlitler % 1'lik NaClO ile yıkandıktan sonra ddH_2O ile durulanmış ve 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır. Ardından 3-4 gün boyunca 70 °C'de etüv içerisinde kurumaya bırakılmıştır.

2.3 Hoagland Besi Ortamının Hazırlanması

İki farklı fasülye çeşidine ait tohumlar 15 gün süre ile çizelge 2.1'de içeriği bulunan 1/10 luk Hoagland besi ortamı içerisinde geliştirilmiştir.

Çizelge 2.1 Hoagland besi ortamı besin çözeltisi içerikleri (Hoagland ve Arnon 1950)

<table>
<tr><td rowspan="9">Makro besin çözeltisi</td><td></td><td>KNO_3</td><td>101,1 g</td><td rowspan="9">Mikro besin çözeltisi</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td></td><td>KH_2PO_4</td><td>136,1 g</td><td>H_3BO_3</td><td>2,8 g</td></tr>
<tr><td></td><td>$MgSO_4.7H_2O$</td><td>246,5 g</td><td>$MnCl_2.4H_2O$</td><td>1,8 g</td></tr>
<tr><td></td><td>Ca $(NO_3)_2.4H_2O$</td><td>236,1 g</td><td>$CuSO_4.5H_2O$</td><td>0,100 g</td></tr>
<tr><td></td><td>FeEDTA
EDTA.2Na</td><td>10,4 g</td><td>$NaMoO_4$</td><td>0,025 g</td></tr>
<tr><td></td><td>$FeSO_4.7H_2O$</td><td>7,8 g</td><td>$ZnSO_4.7H_2O$</td><td>0,200 g</td></tr>
<tr><td></td><td>KOH</td><td>56,1 g</td><td colspan="2" rowspan="2">Bütün bileşenler, 1 L saf su içerisinde çözülür.</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2">Her bir bileşen 1 L saf su içerisinde çözülür.</td></tr>
</table>

Hoagland besi ortamını hazırlamak için, çizelge 2.1'de belirtilen miktarlarda kalsiyum nitrat ($Ca(NO_3)_2$), potasyum fosfat (KH_2PO_4), potasyum nitrat (KNO_3), magnezyum sülfat ($MgSO_4$), iz elementler (H_3BO_3, $MnCl_2.4H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $NaMoO_4$, $ZnSO_4.7H_2O$ ve ferrik EDTA (FeEDTA) çözeltisinden eklenip saf su ile 1 L'ye tamamlanır. Çözeltinin homojen olabilmesi için manyetik karıştırıcıda 5-10 dk. boyunca karıştırılır. Bu işlem sırasında dikkat edilmesi gereken ise, eklenen FeEDTA çözeltisinin pH değerinin 5,5 olmasıdır. pH değerinin az ya da çok olması, bitki gelişimi üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Hazırlanan çözeltiler için, FeEDTA'nın ısıl işlemler sonucunda bozunmaya uğraması ve ısıya karşı dayanıksız olması nedeniyle, yüksek sıcaklıkta çalışılmaması önerilmektedir (Hoagland ve Arnon 1950).

Bitkilerin iyon alımını etkileyen olumsuz ortam etkilerini (örn: tuz) ortadan kaldırmak ve bitkileri direkt olarak strese sokmak amacıyla bitkilerin yetiştirilme ve stres uygulamaları hidroponik sistemlerde gerçekleştirildi. Bitkiler ihtiyaç duydukları mineralleri toprak yerine kullanılan hidroponik sistemle oluşturulan bir besin solüsyonuyla alırlar. Kuraklık stresini ve salisilik etkisini aynı anda görebilmek ve

inceleyebilmek amacıyla hidroponik sistemlerde kuraklık stresi uygulamaları ve salilisik asit uygulaması ön değerlendirmelerle gerçekleştirilirken, kuraklık stresini yaratmak amacıyla PEG 6000 (polietilen glikol) kullanıldı.

Tescillenmiş fasülye çeşitleri arasından seçilen, daha önce açıklanan prosedüre uygun olarak steril edilmiş Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşidi tohumlar, hazırlanan steril perlit ortamında, 15 boyunca 22 °C sıcaklık ve % 70 nispi nem içeren Mikrotest iklim kabininde, Hoagland besin çözeltisi ile sulanarak Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü Bitki Moleküler Biyoteknolojisi Laboratuvarında, viyollere ekimi yapılarak büyütüldü. İstenen büyüklüğe ulaşan bitkilerin perlitlerden ayıklanmasının ardından, stres uygulanabilmesi için ayrı kaplara konuldu (Şekil 2.1).

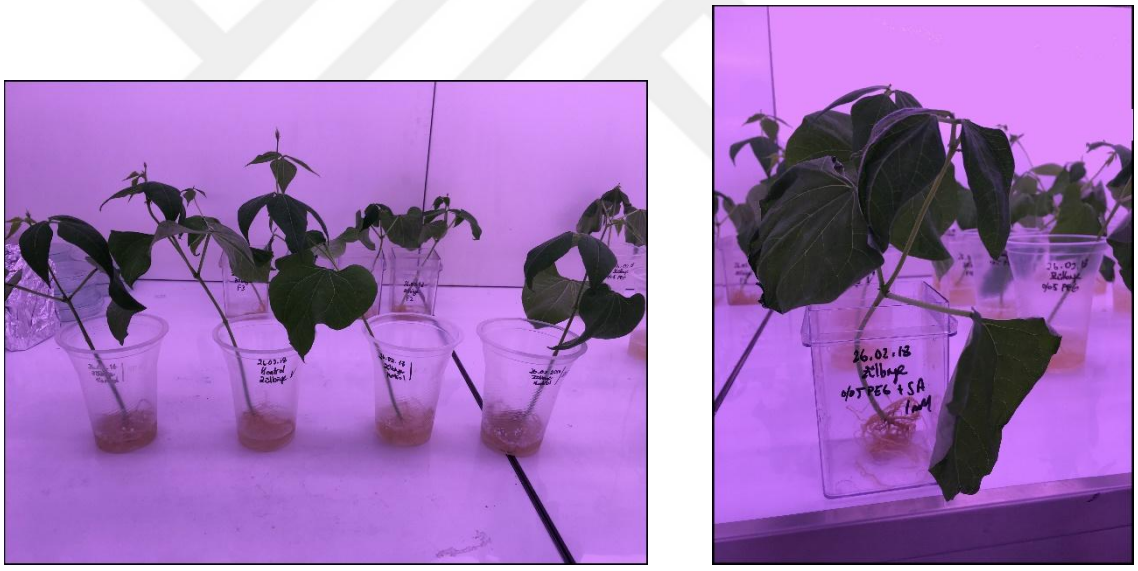


Şekil 2.1 Optimum koşullarda büyütülen bitkilerin görüntüleri

2.4 Bitki Stres Koşullarının Oluşturulması

2.4.1 Kuraklık Stresi (PEG)

Çalışma için yetiştirilen sağlıklı fasulye bitkileri ayrı kaplara konuldu (Şekil 2.2). Yapay kuraklık oluşturmak amacıyla gerekli PEG 6000 miktarları sırasıyla % 5, % 10 ve % 20 olarak tespit edildi. Kontrol grubu dahil her konsantrasyon için 3 biyolojik ve 4 teknik tekrar yapıldı. 1 L Hoagland besi çözeltisi içerisine % 5, % 10 ve % 20 konsantrasyonda olacak şekilde PEG 6000 çözeltisi eklendi. 12 saat süresince PEG 6000 ile oluşturulmuş yapay kuraklığa maruz kalan bitkilerden 12. saatin sonunda yaprak dokusundan örneklem yapıldı (Şekil 2.3). Örnekler sıvı azot ile muamele edilerek RNA izolasyonu aşamasına kadar -80 ^{o}C'de muhafaza edildi.



Şekil 2.2 Günlük fasulye çeşitleri olgunlaştıktan sonra stres uygulamaları için ayrı kaplara alınmıştır



Şekil 2.3 Zülbiye çeşidi türü fasulye bitkisinin kontrol grubu 15. gün görüntüsü

10-15 günlük olgunluğa ulaşan bitkilerin (Şekil 2.3) perlitlerden ayıklanmasının ardından yaprak dokusu koparılıp, sıvı azot ile muamele edildi. Her biyolojik tekrar kendi içinde kontrol grubu ve stres grupları olmak üzere ayrı ayrı, RNA izolasyonu işlemine kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.4.2 Salisilik asit uygulaması

Uygulamalarda, salisilik asit miktarı 1mM olarak ayarlandı. 12 saatlik yapay kuraklık stresine maruz kalmış fasulye bitkilerine 1 mM salisilik asit çözeltisi hazırlandı. Yapraklara püskürtme ve köklere de 1 mM çözelti uygulanarak, 24 saat salisilik asite maruz bırakıldı. 24. saatin sonunda yaprak dokusundan örneklem alınıp, dokular sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra, RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de saklandı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Her biyolojik tekrar için çalışılacak bitki grupları ve zaman tablosu

Grup/Saat	**12. saat**	**24. saat**
Kontrol (Y+Z)	8	8
Kuraklık (PEG 6000) (Y+Z)	96	-
Kuraklık+SA (Y+Z)	-	48

Çizelge 2.2'de 96 bitki strese maruz bırakıldı. 12. saatten sonra yarısı örneklem alımı için toplandı. Geriye kalan 48 bitki salisilik aside maruz bırakıldı. (Y: Yakutiye, Z: Zülbiye)

2.5 Bağıl Su İçeriği (Relative water content-RWC) Uygulaması

Protokol Basamakları

- Kullanılacak plastik poşetlerin (BW) ağırlıkarı ölçülerek işaretlendi.
- Aynı boyutta olacak şekilde toplanan yaprakların ölçümü için belirli bir saat seçildi.
- 1 cm uzunluğunda yaprak sapı olacak şekilde yapraklar ayarlandı.
- Plastik poşetlerin içerisine fazla bekletilmeden yerleştirildi.
- Poşetler iyice kapatıldı ve bu şekilde buharlaşmanın dışarı çıkması engellendi.
- İçinde yaprak bulunan poşetler oda sıcaklığında karanlık bir ortama veya kutuya kondu.
- İçerisindeki taze bitki yaprağı ile plastik poşet ölçüldü (TFW).
- Poşet yavaşca açıldı ve yaprak sapının aşağıya baktığından emin olduktan sonra 2-3 ml 5mM $CaCl_2$ solisyonu konuldu.
- Poşetin ağzı kapatılarak tekrar oda sıcaklığında karanlık bir ortama veya kutuya konuldu.

- 8 saat sonra, yaprak yavaşca çıkartıldı ve iki havlu peçete arasında kurutularak fazla suyu alındı.
- Şişmiş yaprak ölçüldü. (TW).
- Ölçülen yapraklar kağıt bir zarfın içine konulur ve 60 °C'de etüvde 3-4 gün bekletildi.
- Kurumuş yapraklar tartıldı. (DW).
- Aşağıdaki formüle göre değerler hesaplandı.

RWC= [(TFW-BW)-DW/TW-DW] x100



Şekil 2.4 RWC için plastik poşetlere konan sırasıyla Arabidopsis, domates ve arpa bitki örnekleri (Sade vd. 2015)

2.6 Total RNA İzolasyonu

Stres uygulamasından sonra toplanan bitki örnekleri, RNA izolasyonu işlemine kadar -80 ^{o}C'lik buzdolabında muhafaza edildi. Çalışmada kontrol grubu dahil her stres konsantrasyonu için 3 biyolojik tekrar ele alındı. Bitki örneklerinden RNA izolasyonu "Promega SV Total RNA Isolation System" kit protokolüne göre gerçekleştirildi ve RNA miktarı spektrofotometrik ölçümlerle Nanodrop ND-Spectrometer 1000 cihazında belirlendi (Chomczynski ve Mackey 1995).

Promega SV Total RNA Isolation System Protokol basamakları aşağıda anlatıldığı gibi uygulanmıştır;

- Sıvı azotla porselen havan içerisinde ezilmiş örnekler -80 ^{o}C'lik buzdolabından çıkarıldı.
- 2 ml'lik eppendorf tüpe 30mg bitki örneği konulur ve üzerine 175µl RNA Lysis Buffer çözelti eklendi.
- Üzerine 350µl RNA Dilution Buffer eklenir ve karışması için maksimum hızda 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
- 200µl % 95 etanol eklenir, bu karışım 3-4 kez pipetlenerek Spin Column Assembly' e aktarılır. Ardından 12.000-14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin Basket, Spin Column Assembly'nin içerisinden çıkarılarak ependorf tüpünün içine takıldı.
- Üzerine 600µl RNA Wash Solution eklenerek 12.000-14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Ependorf tüpü boşaltılır vee Spin Basket üzerine tekrar yerleştirilir. 40µl Yellow Core Buffer, 5µl 0.09M $MnCl_2$ ve 5µl of DNase I enzimi eklenir. Dikkatlice pipetleme yapıldı.
- 20-25 ^{o}C'de 15 dakika bekletildi.
- 200µl DNase Stop Solution eklenir. 12.000-14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Üstüne 600µl RNA Wash Solution eklenir. 12.000-14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Ependorf tüpü boşaltılır ve üzerine 250µl RNA Wash Solution eklenir. Yüksek hızda 1-2 dakika santrifüj edildi
- Spin basket çıkarılır ve ependorf tüpünün içine 50µl distile su kondu.

2.7 Agaroz Jel Elektroforezi

% 1'lik agaroz jel hazırlamak için; 1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Çözelti, yaklaşık 65 °C'ye geldikten sonra 10 mg/ml konsantrasyonundan 4 µl etidyum bromid eklenerek, agaroz jel tankına döküldü ve 30 dk boyunca donması beklendi. Etidyum bromid RNA'nın UV ışık altında görüntülenmesini sağlamaktadır. Daha sonra 1 µl yükleme boyası, 6X loading dye, 3 µl RNA örneği 80-100 voltta, 30 dk boyunca yürütüldü. Jel UV-Transilimünatör'de gözlemlendi.

2.8 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Biorad RNA örneklerinden cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından son hacim 10 µl olacak şekilde her bir örnek için 2 µl alınarak, 4 µl ddH_2O ve 4 µl RNA ile beraber 1 ml'lik ependorf tüpleri içerisine eklendi ve Thermo Termalcycler PCR cihazında reaksiyon koşulları 25 ºC'de 5 dakika, 46 ºC'de 20 dakika ve 95 ºC'de 1 dakika olacak şekilde sentezlendi. Sentelenen cDNA'ların üzerine 90 µl su ddH_2O su eklenerek 1/10 oranında seyreltildi.

2.9 Real-Time PCR Reaksiyonu

cDNA sentezini takiben yapılacak olan Real-Time PCR çalışması için taraması yapılacak hedef genler olan *YABBY-3, YABBY-4, YABBY-5, DOF-17, DOF-28, DOF-30* ve housekeeping olarak seçilmiş ACT genlerinin reaksiyon optimizasyonları ve ön denemeleri yapıldı. Uygulama için kullanılacak olan Real-Time PCR cihazı Light Cycler Nano (Roche) (Şekil 2.5) aracılığıyla Thermo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 2.5 Yeni nesil Real-Time PCR cihazı, Light Cycler Nano (Roche)

Çalışmada oluşturulan RT-PCR protokolü çizelge 2.3-2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Çalışmada optimize edilen ve kullanılan Real-Time PCR protokolü

Bileşen	**Son Konsantrasyon**
Thermo Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	1X
Forward Primer	0,7 µM
Reverse Primer	0,7 µM
cDNA	2 µl
Toplam hacim 12,5 µl'dir.	

Çizelge 2.4 Real Time PCR reaksiyonunun gerçekleştiği program

Program	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü sayısı**
Ön denatürasyon	95 ^{o}C	10dk	1
Denatürasyon	95 ^{o}C	10s	
Bağlama	60 ^{o}C	30s	40
Uzama	72 ^{o}C	15s	

Deneylerde üç *YABBY* ve üç *DOF* geni mRNA seviyeleri,, kontrol grubu da dahil olmak üzere kuraklık stresi ve salisilik asit uygulamalarının farklı zamanlarında toplanmış RT-PCR ile eş zamanlı olarak izlendi ve pik profilleri kaydedildi. Pik profilleri cq değerlerine göre belirlendi ve sonuçta mRNA seviyeleri kantitatif olarak tespit edildi.

2.10 Normalizasyon ve İstatistiksel Analiz

Farklı sürelerde kuraklık stresi ve salisilik asit uygulanmış bitkilerde *YABBY-3, YABBY-4, YABBY-5 ve DOF-17, DOF-28, DOF-30* genlerine ait ifade profilleri ve kontrol profilleri ACT ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilen istatiksel olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak ve Schmittgen 2001) metoduna göre ve One Way ANOVA (Dunnett) ile analiz edildi (Dunnett 1955).

Normalizasyon işlemi cq değerleri ve housekeeping olarak kullanılan ACT gen ekpresyon verileri ile yapıldı. Bu verilere ait istatiksel anlamlılık dereceleri, ortalamaları, standart sapma ve standart hataları Graphpad Prizm 8 ile yapıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 Fasulye Çeşitlerinde Stres Uygulamaları

Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşidine ait tohumlar 15 gün süre ile Hoagland besi ortamı içerisinde yetiştirildi. Yetiştirilen bitkilere sırasıyla % 5, % 10 ve % 20'lik konsantrasyonlarda yapay kuraklık stresi (PEG 6000) ve kuraklığın üzerindeki etkisini araştırmak için salisilik asit uygulandı. Farklı saatlerde (12. ve 24.) alınan örnekler sıvı azot ile muamele edilerek -80 ^{o}C'lik buzdolabında RNA izolasyonuna aşamasına kadar saklandı. 12. ve 24. saatlerdeki fasulye çeşitlerinin görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1- 3.3).



Zülbiye 12. saat % 5 PEG



Yakutiye 12. saat % 5 PEG



Zülbiye 24. saat % 5 PEG+SA



Yakutiye 24. saat % 5 PEG+SA

Şekil 3.1 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinin 12 saat % 5 PEG stresi ve 24 saat salisilik asidi sonrası görüntüleri



Zülbiye 12. saat % 10 PEG



Yakutiye 12. saat % 10 PEG



Zülbiye 24. saat % 10 PEG+SA



Yakutiye 24. saat % 10 PEG+SA

Şekil 3.2 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinin 12 saat % 10 PEG stresi ve 24 saat salisilik asidi sonrası görüntüleri



Zülbiye 12. saat % 20 PEG



Yakutiye 12. saat % 20 PEG



Zülbiye 24. saat % 20 PEG+SA

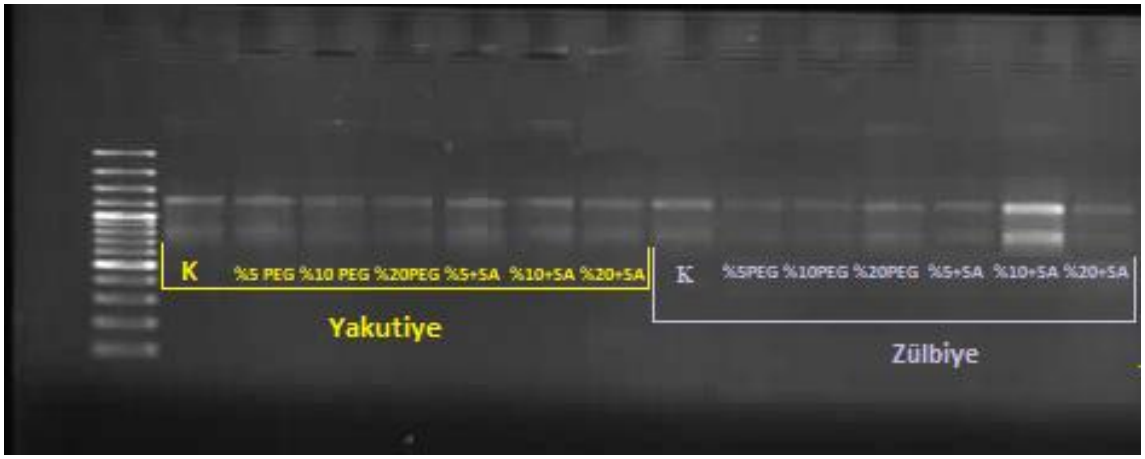


Yakutiye 24.saat % 20 PEG+SA

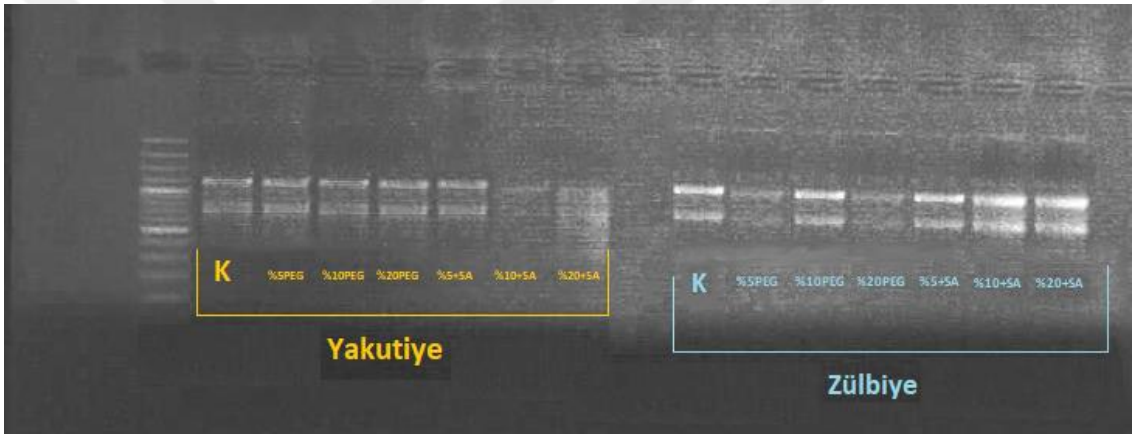
Şekil 3.3 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinin 12 saat % 20 PEG stresi ve 24 saat salisilik asidi sonrası görüntüleri

3.2 RNA İzolasyonu ve Sonuçları

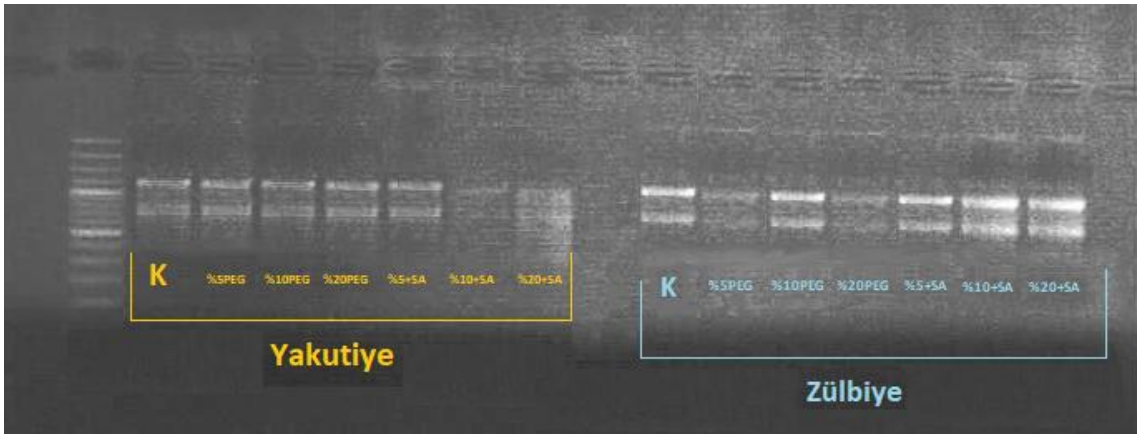
Stres uygulamalarının ardından toplanarak -80 ^{o}C derin dondurucuda saklanan bütün örneklerin RNA izolasyonları Promega SV Total RNA Isolation System Protokolü ile yapıldı. İzolasyonları yapılan RNA'lar % 1' lik agaroz jelde görüntülenip, ND 1000 Spekrofotometre aracılığı ile pürifikasyon için yeterli olan 50–70 µg/volume aralığında olduğu belirlenmiş, miktar ve termo nanodrop lite spektrofotometre ile saflık tayini yapıldı. İzolasyon sonucunda elde edilen görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.4-3.6).



Şekil 3.4 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri (1. biyolojik tekrar)



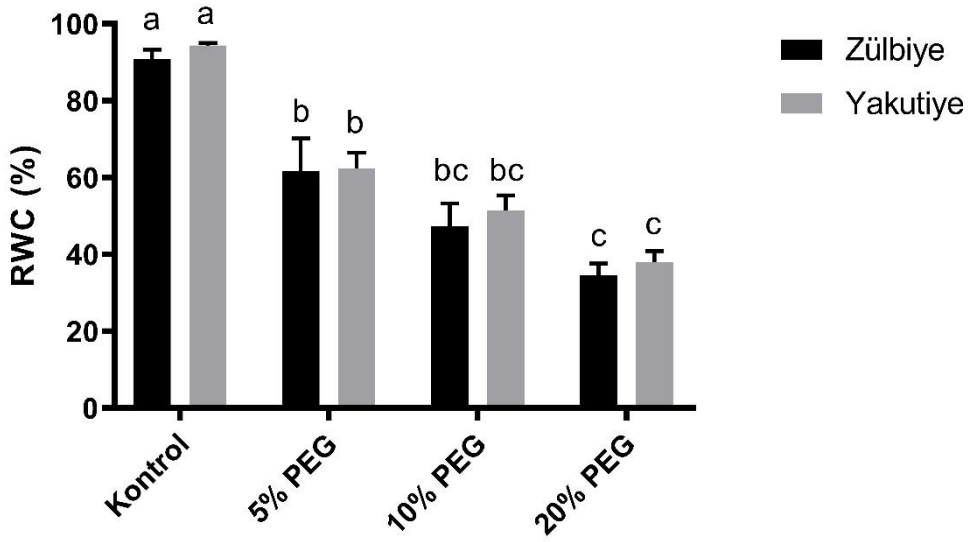
Şekil 3.5 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri (2. biyolojik tekrar)



Şekil 3.6 Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri yaprak örneklerinden izole edilen RNA örnekleri (3. biyolojik tekrar)

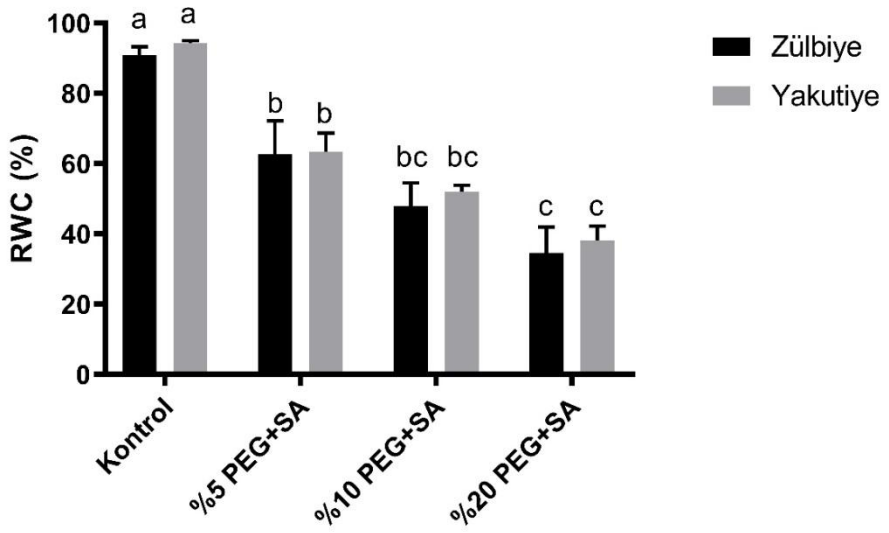
3.3 Bağıl Su İçeriği (Relative Water Content-RWC) Analizi ve Sonuçları

Bağıl su içeriği olarak bilinen RWC'nin ölçülmesi, hücresel su çıkışının fizyolojik sonucu, bitki yaprağındaki su durumunu öğrenmek için en uygun yoldur. Ozmotik ayarlama (OA), kuraklık stresi altında hücresel hidrasyonun korunmasında güçlü bir mekanizmadır ve bağıl su içeriği ozmotik ayarlamayı ifade eder. Bağıl su içeriği analizi, hem yapraktaki su potansiyelini hem de OA'nın olası etkisi altındaki hücresel hidrasyonu açısından uygun bir bitki suyu tahminidir (Barr ve Weatherley, 1962). Aşağıdaki şekillerde kuraklık stresi ve salisilik asit uygulanmış Zülbiye ve Yakutiye-98 bitki örneklerinin bağıl su ölçümleri (RWC) karşılaştırmalı olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.7-3.9).



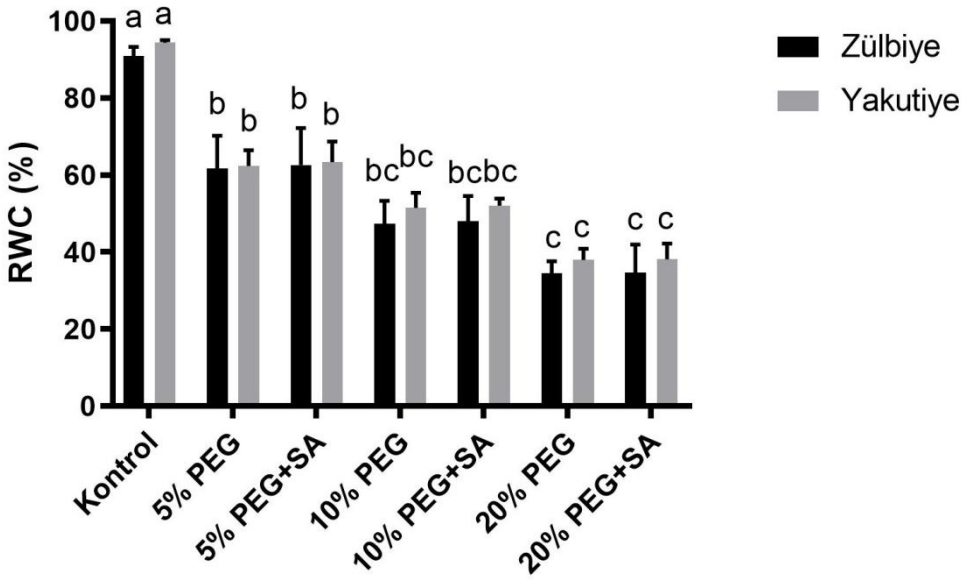
Şekil 3.7 PEG Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir

Şekil 3.7'de değişik konsantrasyonlarda PEG stresi altında fasulye çeşitlerinin birbirleri ve kontrol grubu ile, karşılaştırmalı bağıl su oranlarına ait değerler gösterilmiştir. (Aynı harfleri taşıyanlar istatiksel olarak anlamlı değildir ($P \leq 0.05$)).



Şekil 3.8 SA Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir

Şekil 3.8'de PEG stresi sonrası salisilik asit (SA) uygulaması yapılmış olan iki farklı fasulye çeşidinin birbirleri ve kontrol grupları ile karşılaştırmalı bağıl su oranlarına ait değerler gösterilmiştir. (Aynı harfleri taşıyanlar istatiksel olarak anlamlı değildir ($P \leq 0.05$)).



Şekil 3.9 PEG+SA Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir

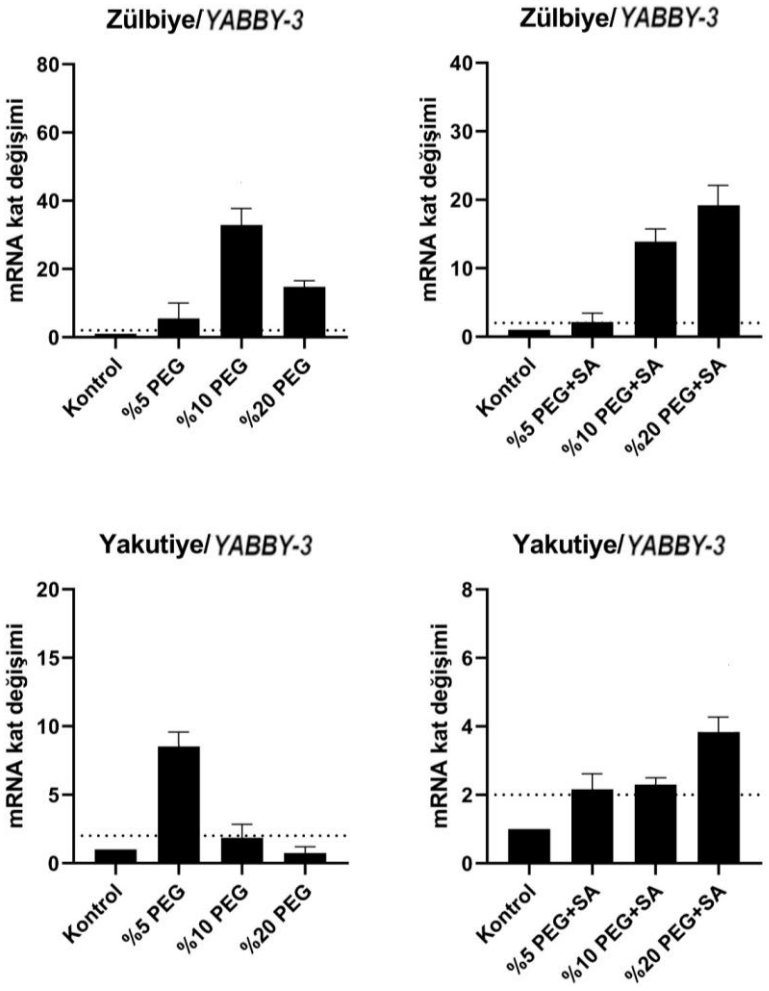
Şekil 3.9'da PEG+SA Bağıl su oranlarının ortalama değerleri verilmiştir. İki farklı fasulye çeşidinin birbirleri arasında ve kontrol gruplarının, PEG stresi ve PEG stresi

sonrası salisilik asit (SA) uygulaması yapılmış gruplarla yapılan karşılaştırılmaların değerleri gösterilmiştir. (Aynı harfleri taşıyanlar istatiksel olarak anlamlı değildir ($P \leq 0.05$)).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında bağıl su oranı (RWC) analizinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, PEG stresine maruz kalan Yakutiye-98 ve Zülbiye fasulye çeşitlerinin kontrol grupları ve stres grupları arasında farklar gözlemlendi (Şekil 3.7). Stres grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılar bulundu. Kuraklık stresinin yaprakta meydana getirdiği su kaybının en fazla olduğu konsantrasyon grubu, her iki bitki çeşidi için de, % 20 PEG konsantrasyonudur (Şekil 3.7). Her iki fasülye çeşidinde de kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en az su kaybı % 5 PEG konsantrasyonunda gözlemlendi (Şekil 3.7). % 5 PEG ve % 20 PEG konsantrayonları fasulye çeşitleri arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenirken % 10 PEG konsantrasyonu anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 3.7). PEG stresinin ardından salisilik asit uygulanan Yakutiye-98 ve Zülbiye fasulye çeşitlerinde kuraklığa karşı istatistiki olarak anlamlı bir iyileşme ve tolerans gözlemlenemedi ve PEG stresi ile benzer sonuçlar elde edildi (Şekil 3.9). Fizyolojik olarak salisilik asit miktarının, uygulanan PEG konsantrasyonlarında etkisinin bulunmadığı sonucu çıkartılmıştır (Şekil 3.8).

3.4 PEG stresi altındaki fasulye çeşitlerinde ve stres sonrası salisilik asit (SA) uygulamalarında *YABBY* ve *DOF* gen ailelerinin mRNA sonuçları

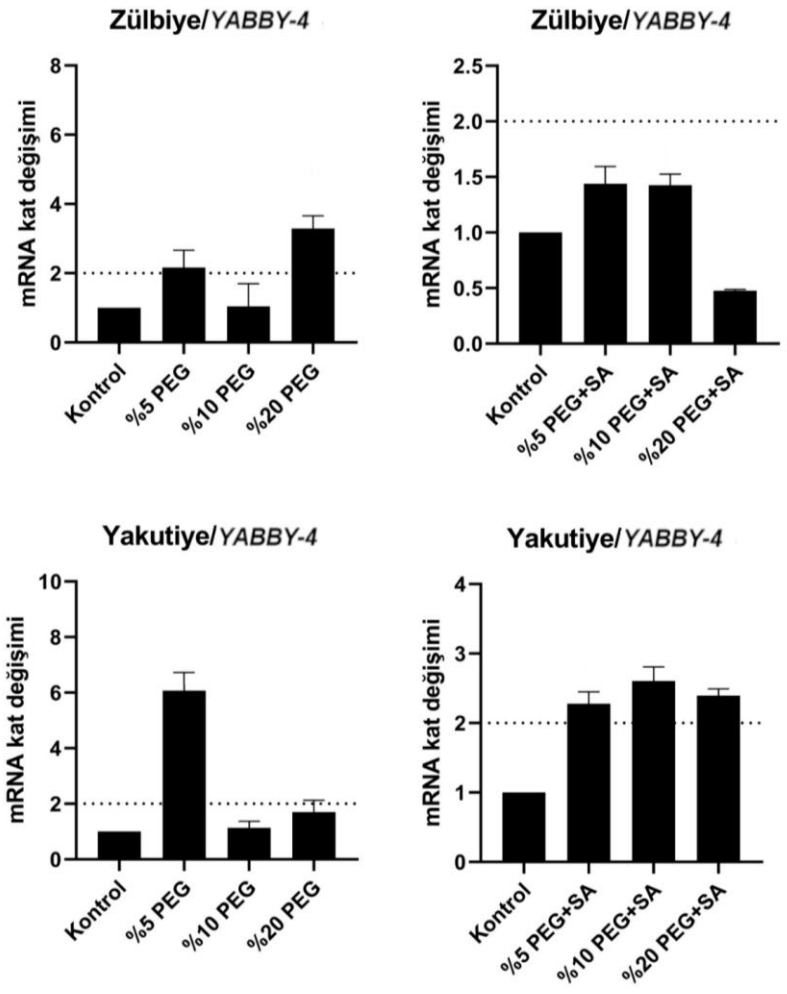
Kuraklık stresi ve salisilik asit uygulamalarına maruz kalan fasulye bitkisinde *YABBY-3, YABBY-4, YABBY-5* ve *DOF-17, DOF-28, DOF-30* gen ekspresyon düzeylerine ait sonuçlar normalize edilerek şekil 3.10-3.15'de verilmiştir. İstatistiki veriler Dunnet testi ile yapıldı. Bir kontrol grubunu birden fazla deney grubu ile karşılaştırmak gerektiğinde Dunnett testinin kullanılması sonuçların sağlıklı yorumlanmasını sağlamaktadır (Dunnet 1955).



Şekil 3.10 *YABBY-3* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri verilmiştir

PEG stresi altında, *YABBY-3* gen ifadesinde en fazla artış kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında Zülbiye çeşidinde, % 10 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 35 kat) olarak tespit edilmiştir. Yakutiye-98 çeşidinde ise % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 8 kat) belirlenmiştir. Yakutiye-98 çeşideki % 10 PEG ve % 20 PEG konsantrasyonlarının ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptanmıştır (Şekil 3.10, Dunnett 1955). *YABBY-3* geninde SA etkisi ile en fazla ifade artışı Zülbiye çeşidinde %20 PEG+SA konsantrasyonunda (yaklaşık 20 kat) belirlenirken, Yakutiye-98 çeşidinde % 20 PEG+SA konsantrasyonunda (yaklaşık 4 kat) saptandı. Ancak, Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinde PEG ve PEG+SA uygulanmış örneklerde *YABBY-3* geni ifadesi karşılaştırıldığında, PEG'deki ifadenin PEG+SA'ya göre Zülbiye çeşidinde

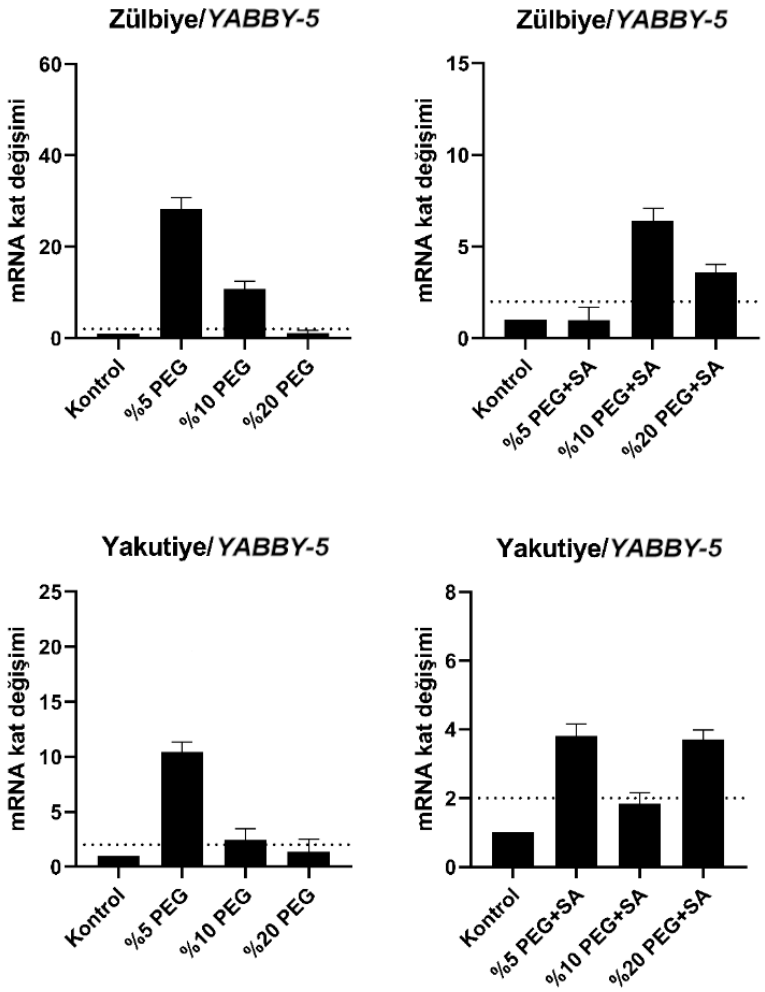
yaklaşık 20 kat, Yakutiye çeşidinde ise yaklaşık iki kat daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 3.11 *YABBY-4* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri

YABBY-4 geninde PEG stresi için en fazla artış kontrol grubuna göre kıyaslandığında, Yakutiye-98 çeşidinde % 5 PEG (yaklaşık 6 kat) ve Zülbiye'de % 20 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 3 kat) olarak tespit edildi. Zülbiye çeşidinde % 10 PEG ve Yakutiye-98 çeşidinde % 10-% 20 PEG konsantrasyonlarındaki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı (Şekil 3.11, Dunnett 1955). *YABBY-4* geninde SA etkisi ile en fazla artış kontrol grubuna göre Yakutiye-98 çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 2.5 kat) olarak belirlenirken, Zülbiye çeşidinin bütün konsantrasyonlarındaki ifade düşüşünün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı

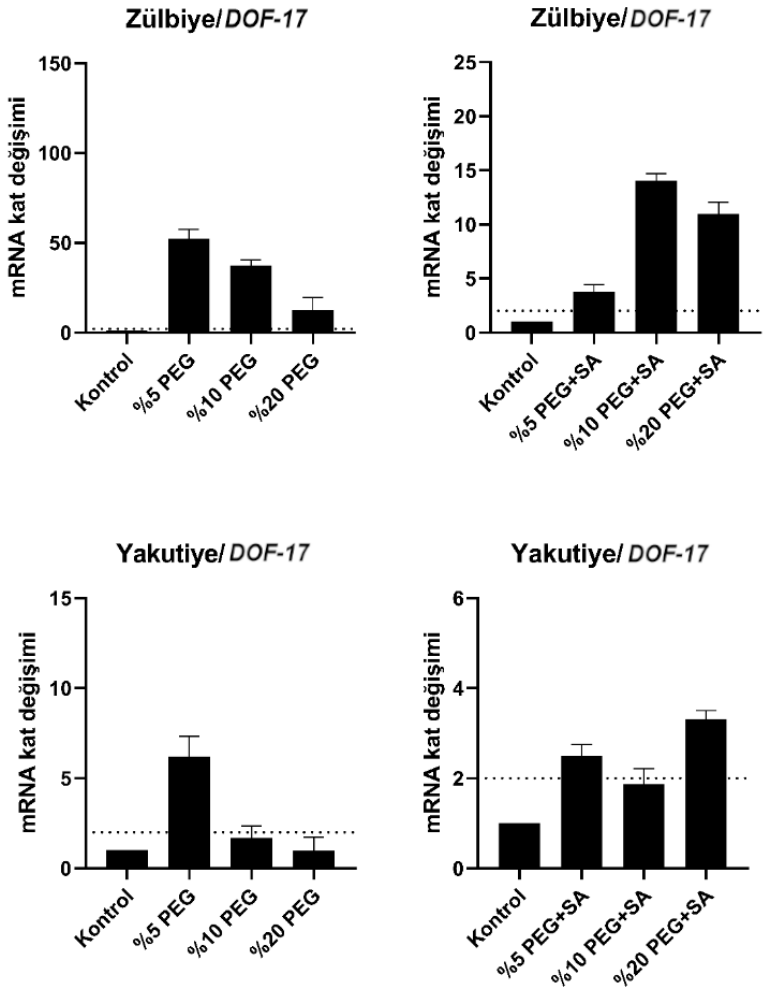
(Şekil 3.11, Dunnett 1955). Ancak *YABBY-4* geninin Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinde PEG ve PEG+SA'daki ifade düzeyleri karşılaştırıldığında PEG'deki ifadenin PEG+SA'ya göre yaklaşık 2 kat olduğu görülmektedir.



Şekil 3.12 *YABBY-5* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri

YABBY-5 geninde PEG stresi en fazla artış kontrol grubuna göre kıyaslandığında Zülbiye çeşidinde % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 30 kat) ve Yakutiye-98'de % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 10 kat) olarak belirlenirken, Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinde % 20 PEG konsantrasyonlarının ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı (Şekil 3.12, Dunnett 1955). *YABBY-5* geninde SA etkisi ile en fazla artış kontrol grubuyla kıyasladığında, Zülbiye çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 7 kat) olarak belirlenirken, Yakutiye-98 çeşidinde % 5

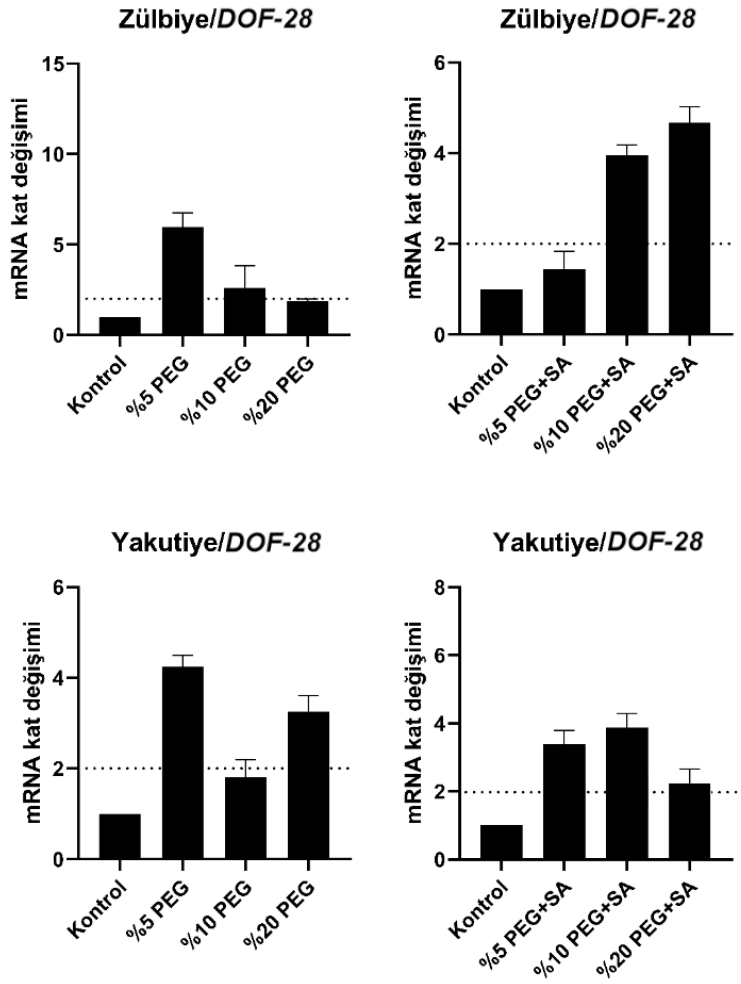
PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 4 kat) olarak belirlendi. Zülbiye çeşidinde % 5 PEG+SA konsantrasyonun ve Yakutiye-98 çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrayonlarının ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı (Şekil 3.12). Ancak *YABBY-5* geninin Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinde PEG ve PEG+SA'daki ifade düzeyleri kıyaslandığında PEG'deki ifadenin PEG+SA'ya göre Zülbiye çeşidinde yaklaşık 5 kat, Yakutiye-98 çeşidinde yaklaşık 3 kat olduğu görülmektedir.



Şekil 3.13 *DOF-17* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri

DOF-17 geninde geninde PEG stresi en fazla artış kontrol grubuna göre kıyaslandığında Yakutiye-98 çeşidinde %5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 6 kat) belirtilirken, Zülbiye çeşidinde % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 50 kat) olarak belirlendi. *DOF-17* geninde

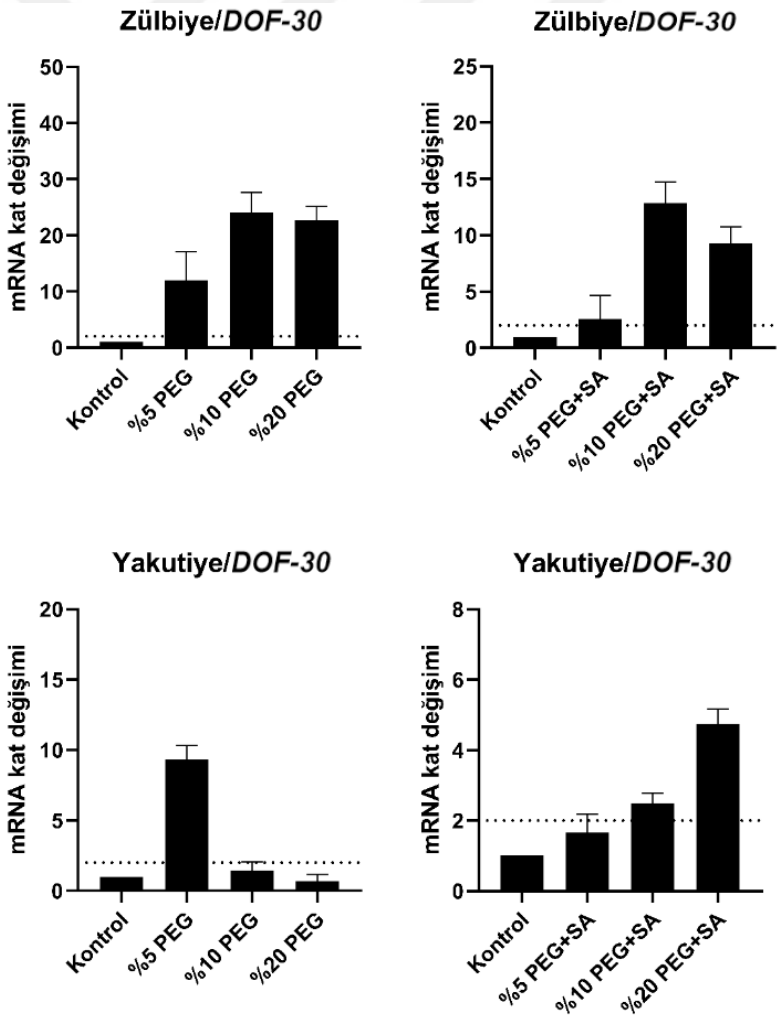
SA etkisi ile en fazla artış kontrol grubuyla kıyasladığında Zülbiye çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 14 kat) olarak belirlenirken, Yakutiye-98 çeşidinde % 20 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 3 kat) olarak belirlendi. Zülbiye çeşidinde % 5 PEG+SA ve Yakutiye çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrasyonlarının ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı (Şekil 3.13, Dunnett 1955). Ancak *DOF-17* geninin Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinde PEG ve PEG+SA'daki ifade düzeyleri kıyaslandığında PEG'deki ifadenin PEG+SA'ya göre Zülbiye çeşidinde yaklaşık 3,5 kat, Yakutiye-98 çeşidinde de yaklaşık 2 kat olduğu görülmektedir.



Şekil 3.14 *DOF-28* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri

DOF-28 geninde PEG stresi en fazla artış kontrol grubuna göre kıyaslandığında Zülbiye çeşidinde % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 6 kat) olarak belirlenirken, Yakutiye-98

çeşidinde % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 5 kat) belirtilmiştir. Zülbiye çeşidinde % 20 PEG ve Yakutiye-98 çeşidinde % 10 PEG konsantrasyonlarının ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı (Şekil 3.14, Dunnett 1955). *DOF-28* geninde SA etkisi ile en fazla artış kontrol grubuyla kıyasladığında Zülbiye bitki çeşidinde % 20 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 5 kat) olarak belirlenirken, Yakutiye-98 çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 4 kat) olarak belirlendi. Zülbiye çeşidinde % 5 PEG+SA konsantrasyonunun ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptandı (Şekil 3.14, Dunnett 1955). Ancak *DOF-28* geninin Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinde PEG ve PEG+SA'daki ifade düzeyleri kıyaslandığında PEG'deki ifadenin PEG+SA'ya göre Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinde aynı kat oranına sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3.15 *DOF-30* geninin 12 saat PEG ve 24 saat salilisik aside maruz kalmış fasulye çeşitlerinin yapraklarındaki mRNA kat değişimleri

DOF-30 geninde PEG stresi en fazla artış kontrol grubuna göre kıyaslandığında Zülbiye çeşidinde % 10 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 25 kat) olarak belirtilirken, Yakutiye-98 çeşidinde % 5 PEG konsantrasyonu (yaklaşık 9 kat) olarak belirtilmiştir. Yakutiye-98 çeşidinde % 10-% 20 PEG konsantrasyonlarının ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptanmıştır (Şekil 3.15, Dunnett 1955). *DOF-28* geninde SA etkisi ile en fazla artış kontrol grubuyla kıyasladığında Zülbiye çeşidinde % 10 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 13 kat) olarak belirlenirken, Yakutiye-98 çeşidinde % 20 PEG+SA konsantrasyonu (yaklaşık 4,5 kat) olarak belirtilmiştir. Yakutiye-98 çeşidinde % 5 PEG+SA konsantrasyonunun ifadesindeki düşüşün istatistiki olarak anlam ifade etmediği saptanmıştır (Şekil 3.15, Dunnett 1955). Ancak *DOF-28* geninin Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitlerinde PEG ve PEG+SA'daki ifade düzeyleri kıyaslandığında PEG'deki ifadenin PEG+SA'ya göre Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinde yaklaşık 2 kat olduğu görülmektedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında; yapraklardaki bağıl su oranları (RWC) tespit edilmiş ve kuraklık stresinin neden olduğu su miktarlarındaki değişimler ölçüldü. Kuraklığa karşı dirençli olduğu bilenen Yakutiye-98 ve kuraklığa karşı hassas olduğu bilinen Zülbiye fasulye çeşitlerinde (İnal vd. 2017) kuraklık stresi ve salisilik asit uygulamaları yapıldı. Farklı sürelerde (12 ve 24. saat) ve farklı konsantrasyonlarda (% 5, % 10 ve % 20) PEG stresi ve 1mM salisilik asit uygulandı. İki farklı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşidinde kuraklık stresinde etkili olduğu düşünülen *YABBY* ve *DOF* gen ailelerinin fasulye yapraklarındaki mRNA seviyeleri belirlendi. *YABBY* ve *DOF* genlerin kuraklık stresine karşı verdikleri cevap mRNA ifadesi düzeyinde araştırıldı.

PEG stresi ile yapılan çalışmada bağıl su oranı (RWC) analizleri sonucunda elde edilen bulgular literatürdeki çalışmalarla ile uyumlu olduğu görülmüştür. Shivakrishna vd. (2018)'de yer fıstığı üzerinde yaptıkları PEG ile kuraklık çalışmasında 24 saat boyunca % 5, % 10, % 15 ve % 20 konsatrasyonlarında strese maruz bırakmışlardır. Strese maruz bırakılan yer fıstığından elde edilen sonuca göre, % 5 konsantrasyonda su miktarı daha fazla iken % 20 konsantrasyonda ise su miktarı en azdır. Bu sonuçlar ile yapılan bu tez çalışması sonucunda benzer veriler elde edilmiştir. Yaprak ve kök dokuları kullanılarak yapılan çalışmada stres yoğunluğu arttıkça bitki de su kayıpları anlamlı bir şekilde artmıştır. Kuraklık stresine giren yer fıstığında su stresinden kaynaklı bir çok metabolik bozulma gerçekleşmiştir. Bunlar; RNA içeriğinin azalması, ribozomların yapısında bozulma (Mason vd. 1988), fotosentez miktarının azalması, ozmotik stresin artıması nedeniyle klorafil a ve klorafil b yapısının bozulması gibi metabolik olayların etkilenmesi bitkide ölümlere neden olmuştur (Shivakrishna vd. 2018).

PEG stresi sonrası salisilik asit (SA) uygulamasından elde edilen bulgular literatür çalışmalarından farklılık göstermektedir. Sadeghipour ve Aghaei (2012) *Phaseolus vulgaris* L. tohumları üzerinde yaptıkları su stresi çalışmasında 0, 0,25, 0,5, 0,75 ve 1mM olarak 5 farklı salisilik asit konsantrasyonunu fasulye bitkisinde 6 saat boyunca denemiştir. Sonuç olarak; elde edilen verilere göre bağıl su oranında (RWC) kuraklık stresine karşı tolerans artışı gözlemlenmiştir. Dışarıdan uygulanan SA'nın ardından,

bitkilerdeki prolin miktarındaki artış karşılaştırılmış ve stres gruplarında prolin miktar artışının fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışın, kuraklığın tohum üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı ifade edilmiştir. Bandurska ve Stroinski (2005) yaptığı çalışmaya göre arpa bitkisi üzerinde uygulanan PEG kuraklık stresinde, bitkinin ürettiği SA miktarının uygulamadan 3 gün sonra kökte, 6 gün sonra yaprakta arttığı saptanmıştır. Sonuç olarak bitkilerde kuraklıkla stresi; konsantrasyon, zaman ve uygulama şekline bağlı olarak, bitkideki stomaları kapatarak terlemenin azalmasına neden olabileceği ve bunun da SA üretimi için gereken metabolik faaliyetleri geçiktirebileceği belirtilmiştir. Tari vd. (2002) domates bitkisinin salisilik ile ön muamelesinden sonra tuz stresine maruz bıraktığı çalışmada, düşük konsantrasyonda (0.01 mM) SA ile muamele edilmiş bitkilerinin 7 gün süren tuz stresine (100 mM NaCl) karşı tolerans gösterdiğini belirtmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışması literatür taramalarıyla kıyaslandığında elde edilen bulgular, PEG stresiyle oluşturulan yapay kuraklığın, fasulye dışında da çalışılan birçok bitkinin yaprağında ve kökünde su kaybına neden olduğunu göstermektedir. PEG konsantrasyon miktarı arttırıldığında bitki de geri dönülemez etkilere ve su kayıplarına neden olmaktadır. RWC analizi ile bitkinin sahip olduğu toplam su miktarının doğru ve güvenilir olarak saptanabildiği çalışmalarla gösterilmiştir. Salisilik asit uygulamasının ise istatistiksel olarak anlamlı olmamasının sebepleri arasında, fasulye çeşitleri üzerinde kullanılan PEG konsantrasyon miktarının çok fazla olması, PEG'in bitki üzerinde toksik etki yaratmasına neden olmuş olabilmesi, PEG konsantrasyon miktarının tohum ve gelişmiş bitki üzerinde farklı etkilere neden olabileceğinden kaynaklı, metabolik faaliyetleri engelleyici etki yaratmış olabilmesi, PEG konsantrasyonu ile uygulanan salisilik asit miktarları birbirlerini dengelememiş ve salisilik asit miktarı strese toleransı arttırmada yetersiz kalmış olabilmesi (Şekil 1.3), SA ile ön muamele görmemesinden kaynaklı fasulye çeşitlerinde strese karşı duyarlılık mekanizmasının gelişmemesi kuraklık sırasında SA üretiminin geç başlamasına neden olmuş olabileceği, PEG stresi, su stresiyle karşılaştırıldığında kimyasal yapısı nedeniyle hücre zarına, stomaların açılıp kapanmasına, elektron taşıma sistemine, karbon döngüsüne, fotosentez üretimine ve buna benzer birçok biyokimyasal metabolik faaliyetlere daha çok zarar vermiş olabilir. Fasulye çeşitleri için kullanılan konstrasyonların SA ile bekletilme sürelerinin az gelmiş

olması, bitkinin kuraklık stresiyle mücadelede kendi ürettiği ve aldığı SA miktarının bitkinin örneklem toplanma süresiyle uyuşmamasından kaynaklı olmuş olabilmesi SA uygulamasının anlamlı ifade vermemesinin sebepleri olabilir. İlerleyen çalışmalarda bu sebepler göz önüne alınarak yapılacak araştırmalar, Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri için daha iyi sonuçlar verecektir.

İki farklı *Phaseolus vulgaris* L. çeşidinde gen ifadesi analizleri için Real-time PCR (Kantitatif gerçek zamanlı PCR) yöntemi kullanıldı. Hedeflenen genlerin stres sırasındaki davranışları RT-PCR yöntemiyle gözlendi. RT-PCR yöntemi genlerin fonksiyonlarının sınanması ve stresle ilişisi olan genlerin saptanmasına olanak tanımaktadır (Büyük 2014).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında RWC analizini takiben, hedef genler olan *YABBY-3*, *YABBY-4*, *YABBY-5* ile *DOF-17*, *DOF-28* ve *DOF-30* ile iki farklı fasulye çeşidindeki yaprak dokularında kuraklık (PEG) stresi ve SA uygulamasının mRNA ifade düzeylerinde meydana getirdiği farklılıklar gözlemlendi (Şekil 3.10-3.15).

Kuraklık (PEG) stresine maruz kalmış fasulye çeşitleri olan Yakutiye-98 ve Zülbiye'de stresin 12. saatlerinde *YABBY* ve *DOF* genlerinin yapraktaki ifadelerinde, genel olarak kontrole göre kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği gözlemlendi. Tüm Real-Time PCR verilerinin birlikte değerlendirilmesi durumunda kuraklık (PEG) stresiyle ilişkili olduğu düşünülen *YABBY* ve *DOF* genlerinin Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinde düşük konsantrasyonda (% 5 PEG) sürekli olarak kontrol seviyesinin üzerinde ifade olduğu gözlemlenmektedir. *YABBY* ve *DOF* genlerini salisilik asit uygulanması sonucu ortaya çıkan ifade düzeylerine bakıldığında Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinde % 20 PEG+SA genellikle kontrol seviyesinin üzerinde ifade olduğu gözlemlenmektedir. PEG stresinde Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinin gen ifadeleri kıyaslandığında ise Zülbiye'deki *YABBY* ve *DOF* genlerinin ifadesi (*YABBY-4* dışında) Yakutiye-98 çeşidinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. PEG+SA uygulamasında Zülbiye ve Yakutiye-98 çeşitlerinin gen ifadeleri kıyaslandığında Zülbiye'deki *YABBY* ve *DOF* genlerinin ifadesi (*YABBY-4*, *DOF-28* dışında) Yakutiye-98 çeşidinden daha fazla olduğu belirlenmiştir.

RT- PCR ve RWC analizi verilerinin birlikte değerlendirilmesi durumunda yüksek PEG konsantrasyonlarında su kayıplarının fazla olmasından dolayı RNA'nın yapısı bozulmaktadır (Shivakrishna vd. 2018). Bu nedenle Zülbiye ve Yakutiye çeşitlerinde kuraklık (PEG) stresi altında kontrole göre kıyaslandığında RWC düzeyi ve gen ifadesi %20 PEG'de genel olarak düşüktür. RWC analizi sonucunda Yakutiye-98 çeşidi ile Zülbiye çeşidi kıyasladığında yapraktaki su kayıp miktarının Yakutiye-98 çeşidinde daha az olduğu belirlenmiş, ifade düzeyinin de daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum Yakutiye çeşidininin kuraklığa Zülbiye çeşidinden daha toleranslı olmasından kaynaklanmaktadır (İnal vd. 2017). % 20 PEG+SA'da ise mRNA ifade düzeyi %20 PEG'e oranla genelde daha yüksektir. Bunun sebepleri ise yüksek konsantrasyonlarda SA'nın kuraklık stresine karşı tolerası daha çok arttırmaya çalışmasından kaynaklı olabilir. Bir diğer yorumla da, bu oranın düşük olduğu durumlarda da bitki yüksek konsantrasyonlarda kuraklık stresine aşırı girdiği için oluşan tahribat SA'nın toleransı arttırmasına yardımcı olamayışından kaynaklı bir sebep olabilir. Literatürde salisilik asidin diğer transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisine dair araştırmalar mevcuttur fakat bilgimiz dahilinde *YABBY* ve *DOF* genlerinin bu fasulye çeşitleriyle ulusal ve uluslararası ölçekte gerçekleştirilmiş salisilik asidin kuraklık stresi üzerine etkisine dair gen ifadesi düzeyinde çalışmalara rastlanmamıştır. Bundan dolayı kıyaslama yapılması mümkün değildir.

Peng vd. (2015) kağıt dutunun yaprağından yapılan çalışmasında, *YABBY* gen ailesi üyelerinin bir çoğunun soğuk stresine maruz kaldığında ifade olduğunu belirlemiş, bu genlerin özellikle soğuk stresinde önemli rolleri olduğunu belirtmişlerdir. İnal vd. (2017) Zülbiye ve Yakutiye-98 fasulye çeşitlerinin yaprakları üzerinde yaptıkları çalışmada *YABBY* genlerinin bir kısmının tuz stresininde ifade olduğu belirtilmiş, genin tuz stresinde de etkili olabileceği düşünülmüştür. Gerçekleştirilen tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmaları destekler niteliktedir. Çalışmada kullandığımız *YABBY-3, YABBY-4, YABBY-5* genleri Yakutiye-98 ve Zülbiye çeşitleri kuraklık (PEG) stresinde kontrol grubuyla kıyaslandığında farklı konsantrasyon düzeylerinde az da olsa etkili olduğu fakat istenilen düzeyde ifade olmadığı belirlenmiştir. Her iki çeşitte de *YABBY-3* ve *YABBY-5* genlerinin ifade düzeyleri *YABBY-4* ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. Bu da *YABBY-4* geninin kuraklıkta *YABBY-3* ve *YABBY-5* kadar ilişkili

olmadığının göstergesi olabilir. İki fasulye çeşidinde de kontrol grubunun altında ifade veren genlerin kuraklıkta etkili olmadığı ya da konsantrasyon miktarlarının strese sokacak kadar yeterli olmadığı düşünülmektedir.

Huang vd. (2015) havuç üzerinde yapılan çalışmasında kullandığı *DOF* genlerinden iki tanesinin kuraklığa maruz bırakıldığında ifade olduğu, iki tanesinin ise ifade olmadığı saptanmıştır. Gerçekleştirilen tez çalışmasında da kullanılan *DOF* genleri bu çalışmayı destekler niteliktedir. Yakutiye-98 ve Zülbiye fasülye çeşitlerinde *DOF* genlerinin ifade düzeyleri kıyaslandığında *DOF-17* ve *DOF-30* genlerinin ifade düzeylerinin oldukça yüksek olduğu, *DOF-28* geninin ise diğer *DOF* genlerine oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu da *DOF-28* geninin kuraklıkta *DOF-17* ve *DOF-30* kadar ilişkili olmadığının göstergesi olabilir. İki fasulye çeşidinde de kontrol grubunun altında ifade veren genlerin kuraklıkta etkili olmadığı ya da konsantrasyon miktarlarının strese sokacak kadar yeterli olmadığı düşünülmektedir.

Ma vd. (2015) çin lahanası üzerinde yaptıkları abiotik stres (kuraklık, tuz,sıcaklık ve soğuk) çalışmasında 9 *DOF* geni kullanılmıştır. Bu 9 genin bir kısmı kuraklık periyodunun başlangıcında en üst seviyelerde ifade olduğu ve ilerleyen saatlerde düşüş yaşadığı ya da periyodun çok daha geç saatlerinde ifade olduğu belirtilmiştir. Bu da gerçekleştirilen tez çalışmasında iki fasulye çeşidinde kontrol grubuyla kıyaslandığında belirli konsantrasyonlarda ifade olmayan, kontrol grubunun altında kalan *DOF* genlerinin periyot süresinin yeterli olmamasından kaynaklı olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasından elde edilen bulgular, *YABBY* ve *DOF* genlerinin fasulye çeşitlerinde kuraklıkta etkili genlerden olduğu belirlenmiştir. 1mM salisilik asit çalışmaları iki fasulye çeşidinde de stres süresince takip edildiğinde kontrol grubu bitkilerine göre daha iyi direnç kazanmışlardır. Ama yapılan analiz sonuçları istatiksel olarak anlamlı bulunmamışlardır. Gen ifadesi düzeyinde ve RWC analizlerinde SA'ın 1 mM dozu ile uygulama şekilleri (püskürtme ve sulama) iki fasulye çeşidinde de stresi azaltmaya etkisi olmamıştır. Yapılan RWC analizi ile PEG kuraklık stresinin etkisi desteklenmiştir. Genetik manipülasyonlarla kuraklık stresine karşı dayanıklı çeşitler

oluşturmada bitki biyoteknolojisinin önemi büyüktür. Bu nedenle bu tez çalışması ile *YABBY* ve *DOF* gen ailelerinden seçilen genlerin fasulye bitkisinde ileri çalışmalar için kuraklık stresinde örnek teşkil edeceği, salisilik uygulaması ile tolerans arttırma çalışmalarına ise katkıda bulunabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Anonim. 2018. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Tarım Ürünleri Piyasaları Kuru fasulye raporu ürün no: 06. https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge. Erişim tarihi: Ocak, 2018.

Arfan, M., Athar, H. B. and Ashraf, M. 2007. Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth an photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress. Journal of Plant Physiology, 164: 685-694.

Ashraf, M., Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Enviromental and Exprimental Botany, 59: 206-216

Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., and Preston, C. A. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions:" talking trees" in the genomics era. Science, 311(5762), 812-815.

Bandurska, H. 2005. The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. Acta Physiologiae Plantarum, 27(3), 379-386.

Barrs, H. D. and Weatherley, P. E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. Australian Journal of Biological Sciences, 15(3), 413-428.Bartholmes,

Bartholmes, C., Hidalgo, O. and Gleissberg, S. 2012. Evolution of the *YABBY* gene family with emphasis on the basal eudicot Eschscholzia californica (Papaveraceae). Plant Biology, 14(1), 11-23.

Bolat, M., Ünüvar, F. İ. and Dellal, İ. 2017. Türkiye'de Yemeklik Baklagillerin Gelecek Eğilimlerinin Belirlenmesi. Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi, 3(2), 7-18.

Bowman, J. L. 2000. The *YABBY* gene family and abaxial cell fate. *Current opinion in plant biology*, *3*(1), 17-22.

Bowman, J. L. and Smyth, D. R. 1999. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. Development, 126(11), 2387-2396.

Bruce, T. J., Matthes, M. C., Napier, J. A. and Pickett, J. A. 2007. Stressful "memories" of plants: evidence and possible mechanisms. Plant Science, 173(6), 603-608.

Büyük, İ. and Aras, S. 2015. Screening of *PvLEA3* gene mRNA expression levels with qRT-PCR in differentbean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.) subjected to salt and drought stress. Turkish Journal of Botany, 39(6), 1014-1020.

Büyük, İ., Inal, B., Ilhan, E., Tanriseven, M., Aras, S. and Erayman, M. 2016. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean. Molecular biology reports, 43(11), 1251-1266.

Büyük, İ., Soydam-Aydin, S. and Aras, S. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji, 69(2).

Cai, X., Zhang, C., Shu, W., Ye, Z., Li, H. and Zhang, Y. 2016. The Transcription Factor SlDof22 Involved in Ascorbate Accumulation and Salinity Stress in Tomato. Biochemical and Biophysical Research Communications, 474, 736-741.

Chomczynski, P. and Mackey, K. 1995. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Biotechniques, 19(6), 942-945.

Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F. and Pugin, A. 2006. Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19(10), 1062-1071.

Corrales, A. R., Nebauer, S. G., Carrillo, L., Fernández-Nohales, P., Marqués, J., Renau-Morata, B. and Medina, J. 2014. Characterization of tomato Cycling Dof Factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses. Journal of experimental botany, 65(4), 995-1012.

De Carvalho, M. H. C., Laffray, D. and Louguet, P. 1998. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. Environmental and Experimental Botany, 40(3), 197-207.

Dunnett, C. W. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Journal of the American Statistical Association, 50(272), 1096-1121.

El-Tohamy, W., Schnitzler, W. H., El-Behairy, U. and Singer, S. M. 1999. Effect of long-term drought stress on growth and yield of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). Angewandte Botanik, 73(5-6), 173-177.

Filyushin, M. A., Slugin, M. A., Dzhos, E. A., Kochieva, E. Z. and Shchennikova, A. V. 2018. Coexpression of *YABBY1* and *YABBY3* Genes in Lateral Organs of Tomato Species (Solanum, Section Lycopersicon). In Doklady Biochemistry and Biophysics, Vol. 478, No. 1, pp. 50-54.

Freytag, G. F. and Debouck, D. G. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae-Papilionodeae) in North America, Mexico and Central America. Taxonomía, distribución y ecología del género Phaseolus (Leguminosae-Papilionodeae) en Norteamérica, México y Centroamérica. SIDA, Botanical Miscellany

Freytag, G. F. and Debouck, D.G. 2002. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus Phaseolus (Leguminosae–Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. Sida Botanical Miscellany, 23, 1–300.

Gabriele, S., Rizza, A., Martone, J., Circelli, P., Costantino, P. and Vittorioso, P. 2010. The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. The Plant Journal, 61(2), 312-323.

Gepts, P. 1988. A Middle American and an Andean common bean gene pool. In Genetic resources of Phaseolus beans, Springer, Dordrecht (pp. 375-390).

Gepts, P. and Bliss, F. A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. Economic Botany, 40(4), 469-478.

Gepts, P. and Debouck, D. 1991. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Common beans: research for crop improvement, 7, 53.

Gepts, P., Osborn, T. C., Rashka, K. and Bliss, F. A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. Economic Botany, 40(4), 451-468.

Gonzalez, D. H. 2015. Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects. Academic Press, 183-194.

Gualberti, G., Papi, M., Bellucci, L., Ricci, I., Bouchez, D., Camilleri, C. and Vittorioso, P. 2002. Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of Arabidopsis seeds. The Plant Cell, 14(6), 1253-1263.

Güneş, A., İnal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bağcı, E. G. and Çiçek, N. 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters sympotic for oxidative stress and mineral nutrion in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. Journal of Plant Physiology, 164, 728-736

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347 (2nd edit).

Horvath, E., Szalai, G., Janda, T. 2007. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. Journal of Plant Growth Regulation, 26: 17-20

Huang, W., Huang, Y., Li, M. Y., Wang, F., Xu, Z. S. and Xiong, A. S. 2015. *Dof* transcription factors in carrot: genome-wide analysis and their response to abiotic stress. Biotechnology Letters, 38(1), 145-155.

Huang, Z., Van Houten, J., Gonzalez, G., Xiao, H. and van der Knaap, E. 2013. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *SUN*, *OFP* and *YABBY* gene family in tomato. Molecular Genetics and Genomics, 288(3-4), 111-129.

İnal, B., Büyük, İ., İlhan, E. and Aras, S. 2017. Genome-wide analysis of *Phaseolus vulgaris* C2C2-YABBY transcription factors under salt stress conditions.3 Biotech, 7(5), 302.

Ito, T. M., Trevizan, C. B., dos Santos, T. B. and de Souza, S. G. H. 2017. Genome-Wide Identification and Characterization of the Dof Transcription Factor Gene Family in Phaseolus vulgaris L. American Journal of Plant Sciences, 8(12), 3233.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in Catharanthus roseus: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 60(1), 110-116.

Kang, W. H., Kim, S., Lee, H. A., Choi, D. and Yeom, S.-I. 2016. Genome-wide Analysis of Dof Transcription Factors Reveals Functional Characteristics during Development and Response to Biotic Stresses in Pepper. Scientific Reports, 6, 33332.

Kaplan, L. 1965. Archeology and domestication in American Phaseolus (beans). Economic Botany, 19(4), 358-368.

Kaplan, L. and Kaplan, L. N. 1988. Phaseolus in archaeology. In Genetic resources of Phaseolus beans. Springer, Dordrecht, 125-142.

Katagiri, F., Lam, E. and Chua, N. H. 1989. Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. Nature, 340(6236), 727.

Korkmaz, A. 2005. Inclusion of acetyl salicylic acid and metyl jasmonate into the priming solution improves love-tempature germination and emergence of sweet pepper. Hort Science, 40(1): 197-200.

Korkmaz, A., Uzunlu, M. and Demirkıran, A. R. 2007. Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedling against drougth stress. Acta Physiology. Plant, 29, 503- 508.

Kütevin, Z. ve Türkeş, T. 1987. Sebzecilik ve Genel Sebze Tarımı Prensipleri ve Pratik Sebzecilik Yöntemleri, İnkilap Kitabevi, İstanbul.

Laffray, D. and Louguet, P. 1990. Stomatal responses and drought resistance. Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 137(1), 47-60.

Le Hir, R. and Bellini, C. 2013 The Plant-Specific Dof Transcription Factors Family: New Players Involved in Vascular System Development and Functioning in Arabidopsis. Frontiers in Plant Science, 29, 164.

Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses (Physiological Ecology): Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Pr. ISBN, 124455018.

Lichtenthaler, H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. Journal of plant physiology, 148(1-2), 4-14.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method methods, 25(4), 402-408.

Ma, J., Li, M. Y., Wang, F., Tang, J. and Xiong, A. S. 2015. Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage. *BMC genomics*, *16*(1), 33.

Mason, H. S., Mullet, J. E. and Boyer, J. S. 1988. Polysomes, messenger RNA, and growth in soybean stems during development and water deficit. Plant physiology, 86(3), 725-733.

Noguero, M., Atif, R.M., Ochatt, S. and Thompson, R.D. 2013 The Role of the DNA-Binding One Zinc Finger (DOF) Transcription Factor Family in Plants. Plant Science, 209, 32-45.

Orashakova, S., Lange, M., Lange, S., Wege, S. and Becker, A. 2009. The *CRABS CLAW* ortholog from California poppy (Eschscholzia californica, Papaveraceae), EcCRC, is involved in floral meristem termination, gynoecium differentiation and ovule initiation. The Plant Journal, 58(4), 682-693.

Özdem, M. A. 2012. Dünya ve Türkiye'de Kuru Baklagiller. TEPGE Bakış, 1303-8346, Ankara.

Peng, X., Wu, Q., Teng, L., Tang, F., Pi, Z. and Shen, S. 2015. Transcriptional regulation of the paper mulberry under cold stress as revealed by a comprehensive analysis of transcription factors. BMC plant biology, 15(1), 108.

Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology Plant and Plant Molecular Biology, 43: 439-463.

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., Jutur, P. P. and Sumithra, K. 2004. Differential antioxidative responses to water stress among five mulberry (Morus alba L.) cultivars. Environmental and experimental botany, 52(1), 33-42.

Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J. and Creelman, R. 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science, 290(5499), 2105-2110.

Rueda-Romero, P., Barrero-Sicilia, C., Gómez-Cadenas, A., Carbonero, P. and Oñate-Sánchez, L. 2012. Arabidopsis thaliana *DOF6* Negatively Affects Germination in Non-after-Ripened Seeds and Interacts with *TCP14*. Journal of Experimental Botany, 63, 1937-1949.

Sade, N., Galkin, E. and Moshelion, M. 2015. Measuring arabidopsis, tomato and barley leaf relative water content (RWC). Bio-Protocols, 5, 1-4.

Sade, N., Gebremedhin, A. and Moshelion, M. 2012. Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. Plant Signal Behav 7(7): 767-770.

Sade, N., Vinocur, B. J., Diber, A., Shatil, A., Ronen, G., Nissan, H., Wallach, R., Karchi, H. and Moshelion, M. 2009. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SlTIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? New Phytol 181(3): 651-661

Sadeghipour, O. and Aghaei, P. 2012. Response of common bean (Phaseolus vulgaris L.) to exogenous application of salicylic acid (SA) under water stress conditions. Advances in Environmental Biology, 6(3), 1160-1168.

Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. Curr Opin Plant Bio. ; 10:296–302.

Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E. and Dixon, K. 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerans in bean and tomato plants. Plant Growth Regulation, 30: 157-161.

Sevimay, N. 2009. Kuraklık steresi altındaki marul bitkilerinde salisilik asidin etkileri (Master thesis, Namık Kemal Üniversitesi).

Shi, Q. and Zhu, Z. 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. Enviromental and Experimental Botany, 63: 317-326

Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q. and Qian, Q. 2006. Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activity in seedlings of Cucumis sativa L. Plant Growth Regulation, 48: 127-135.

Shivakrishna, P., Reddy, K. A. and Rao, D. M. 2018. Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. Saudi journal of biological sciences, 25(2), 285-289.

Siegfried, K. R., Eshed, Y., Baum, S. F., Otsuga, D., Drews, G. N. and Bowman, J. L. 1999. Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. *Development*, *126*(18), 4117-4128.

Smith, C. M. and Boyko, E. V. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. Entomologia experimentalis et applicata, 122(1), 1-16.

Tabata, T., Takase, H., Takayama, S., Mikami, K., Nakatsuka, A., Kawata, T. and Iwabuchi, M. 1989. A protein that binds to a cis-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. Science, 245(4921), 965-967.

Tardif, G., Kane, N. A., Adam, H., Labrie, L., Major, G., Gulick, P. and Laliberté, J. F. 2007. Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat. Plant Molecular Biology, 63(5), 703-718.

Tari, I., Csiszár, J., Szalai, G., Horváth, F., Pécsváradi, A., Kiss, G. and Erdei, L. 2002. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. Acta Biologica Szegediensis, 46(3-4), 55-56.

Thompson, M. D., Brick, M. A., McGinley, J. N. and Thompson, H. J. 2009. Chemical composition and mammary cancer inhibitory activity of dry bean. Crop Science, 49(1), 179-186.

Ton, J., D'alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M. and Turlings, T. C. 2007. Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. The Plant Journal, 49(1), 16-26.

Vadez, V., Berger, J. D., Warkentin, T., Asseng, S., Ratnakumar, P., Rao, K. P. C. and Sharma, H. C. 2012. Adaptation of grain legumes to climate change: a review. Agronomy for Sustainable Development, 32(1), 31-44.

Van Hulten, M., Pelser, M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. and Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(14), 5602-5607.

Van Schoonhoven, A. and Voysest, O. 1991. Common beans: research for crop improvement. CIAT, 1-927.

Villanueva, J. M., Broadhvest, J., Hauser, B. A., Meister, R. J., Schneitz, K. and Gasser, C. S. 1999. *INNER NO OUTER* regulates abaxial–adaxial patterning in Arabidopsis ovules. Genes & Development, 13(23), 3160-3169.

Von Schlechtendal, F. L. 1840. Linnea: ein Journal für die Botanik in ihrem ganzen Unfange. Schwetske, Vol. 14, 1-777.

Walling, L. L., 2000. The myriad plant responses to herbivores, J. Plant Growth Regul. 19 195–216

Welch, R. M., House, W. A., Beebe, S. and Cheng, Z. 2000. Genetic selection for enhanced bioavailable levels of iron in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8), 3576-3580.

Wu, G., Shao, H. B., Chu, L. Y. and Cai, J. W. 2007. Insights into molecular mechanisms of mutual effect between plants and the environment. A review. Agronomy for Sustainable development, 27(1), 69-78.

Yanagisawa, S. 1995. A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif. Nucleic acids research, *23*(17), 3403-3410.

Yanagisawa, S. 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. The Plant Journal, 21(3), 281-288.

Yanagisawa, S. 2002. The Dof family of plant transcription factors. Trends in Plant Science, 7(12), 555-560.

Yanagisawa, S. and Sheen, J. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. The Plant Cell, 10(1), 75-89.

Yang, Z., Gong, Q., Wang, L., Jin, Y., Xi, J., Li, Z. and Li, F. 2018. Genome-Wide Study of *YABBY* Genes in Upland Cotton and Their Expression Patterns under Different Stresses. Frontiers in Genetics, 9, 33.

Yıldırım, E., Güvenç, İ. ve Karataş, A., 2006. Yapraktan farklı salisilik asit uygulamalarının hıyarda bitki büyümesi ve verimi üzerine etkisi. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, s: 90- 95, 19-22 Eylül 2006, Kahramanmaraş.

Yuan, L. and Perry, S. E. 2011. Plant transcription factors. New York: Humana Press, 9-10.

Yusuf, M., Hayat, S., Alyemeni, M. N., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. 2013. Salicylic acid: physiological roles in plants. Springer, Dordrecht, 15-30.

Zhang, B., Chen, W., Foley, R. C., Büttner, M. and Singh, K. B. 1995. Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. The Plant Cell, 7(12), 2241-2252.

ÖZGEÇMİŞ

İsim : Arzu Gizem KIRICI
Doğum Tarihi : 09 Mayıs 1992
Doğduğu Yer : Ankara, Turkey
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dil : İngilizce, İtalyanca

Eğitim Durumu

Lise : Özel Kardelen Fen Lisesi (2010)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji (2015)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (Haziran 2015–Mart 2019)

Uluslararası Kongre Sunum

Kırıcı A. G., Gökdemir Ş., Büyük İ., Aras S. Investigation of the YABBY and DOF transcription factors at gene expression level during drought stress conditions in Phaseolus vulgaris L. and the effect of salicylic acid. Journal of Plant Physiology & Pathology, Volume: 6, 2018