

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇİNKO EKSİKLİĞİ DURUMUNDA FARKLI ANLATIM YAPAN ARPA
GENLERİNİN İZOLASYONU İÇİN BASKILAYICI ÇIKARIM HİBRİDİZASYON
KÜTÜPHANELERİNİN KURULMASI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

BAŞAK ÇELİK ALTINIŞIK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT**

İSTANBUL, 2011

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO EKSİKLİĞİ DURUMUNDA FARKLI ANLATIM YAPAN ARPA
GENLERİNİN İZOLASYONU İÇİN BASKILAYICI ÇIKARIM HİBRİDİZASYON
KÜTÜPHANELERİNİN KURULMASI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

Başak ÇELİK ALTINIŞIK tarafından hazırlanan tez çalışması 01/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doc. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

.....

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doc. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doc. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

İstanbul Teknik Üniversitesi

Doc. Dr. Dilek BALIK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün **27- 01- 07- 03** ve **YULAP- 29- 01- 07- YL01** numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmam boyunca beni her konuda yönlendiren, tecrübe ve sevgilerini eksik etmeyerek bana sürekli destek olan başta danışman hocam, Sayın **Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT'** a,

Biyoinformatik konusunda bilgisini, sabrını ve emeğini esirgemeyen Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Sayın **Doç. Dr. Uğur SEZERMAN'**a,

Biyoinformatik analizler konusunda kullanılan programların kurulması ve kullanımı konularında yardımcı olan Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Araştırma Görevlisi Sayın **Cem MEYDAN'**a,

Biyoloji bölümünde bana sağladığı çalışma olanağından ve yardımlarından dolayı Sayın **Prof. Dr. Nezhun GÖREN'** e,

Tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini yanımda hissettiğim Biyoloji bölümündeki değerli bilim insanlarına,

Beni bugünlere getiren en büyük destekçilerim biricik annem **Senem ÇELİK** ve biricik babam **Ali ÇELİK** ve ablalarım **Billur ÇELİK**, **Gönül ÇELİK** ve de kardeşim **Songül ÇELİK'** e,

Çalışmalarım boyunca bana destek olan yol arkadaşım **İbrahim ALTINIŞIK'** a ve her yere canımla gelen kuzum **DURU'** ya,

Buraya isimlerini yazamasam da hayatımın her anında bana inanan ve destek veren tüm herkese,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2011

Başak ÇELİK ALTINIŞIK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
ARPA VE ÇİNKO	5
2.1 Arpa	5
2.1.1 Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Tarihi	5
2.2 Çinko	6
2.2.1 Bir Mikrobesein Olarak Çinko	6
2.2.2 Topraktaki Çinko	7
2.2.3 Topraktaki Çinkonun Bitkilerce Alınması	9
2.2.4 Çinkonun Bitkilerdeki Etkisi	10
2.2.5 Çinko Alımı, Taşınması ve Depolanmasının Moleküler Biyolojisi	12
2.3 Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH).....	14
2.4 cDNA Kütüphaneleri	17
2.5 Biyoinformatik Analizlerle EST Oluşturulması	17

2.6 GenBank	18
-------------------	----

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD	19
3.1 Bitki Materyali	19
3.2 Besiyerler	19
3.2.1 Bitki Büyütme Besiyeri	19
3.2.2 <i>E.coli</i> Büyütme Besiyeri	21
3.3 Tamponlar ve Solüsyonlar	21
3.4 Moleküler Markırlar	22
3.5 Enzimler ve Kimyasallar	23
3.5.1 Enzimler	23
3.5.2 Kimyasallar	23
3.6 Kitler	23
3.7 Vektör ve Bakteri Suşları	23
3.8 Oligonükleotitler	23
3.9 Programlar	24
3.9.1 Phred ve Phrap	24
3.9.2 Chromas	24
3.9.3 CAP3	25
3.9.4 Beap	25
3.9.5 VecScreen	25
3.10 Bitki Büyütme Koşulları	25
3.10.1 Tohumların Çimlendirilmesi	25
3.10.2 Çimlenen Tohumların Çözeltiye Aktarılması ve Bitkilerin Büyütülmesi	26
3.11 Bitki Örneklerinin Toplanması	26
3.12 Bitkilerin Ağır Metal Analizi	26
3.13 RNA İzolasyonu	27
3.13.1 Bitkilerden Total RNA İzolasyonu	27
3.13.2 Total RNA Miktarının Belirlenmesi	28
3.13.3 RNA' nın Formaldehit Jel Üzerinde Analizi	28
3.13.3.1 Jelin Hazırlanması	28
3.13.3.2 RNA Örneklerinin Hazırlanması	28
3.14 Total RNA' dan mRNA İzolasyonu	28
3.14.1 mRNA Spot Testi	29
3.15 cDNA Sentezi	29
3.15.1 cDNA Sentez Primerinin Bağlanması	29
3.15.2 Birinci Zincir cDNA Sentezi	30
3.15.3 İkinci Zincir cDNA Sentezi	31
3.15.4 cDNA uçlarının kütleştirilmesi	31
3.15.5 <i>RsaI</i> Kesimi	32
3.15.6 <i>Rsa I</i> Kesim Ürünlerini Jel Üzerinde Analiz	33
3.16 Adaptör Ligasyonu	33

3.16.1	Adaptör Ligasyonunun PCR' da Kontrolü	34
3.16.2	Ligasyon PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz	35
3.17	Birinci Hibridizasyon	35
3.18	İkinci Hibridizasyon	36
3.19	1. PCR Amplifikasyonu	37
3.19.1	1. PCR Amplifikasyonu PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz	38
3.20	2. PCR Amplifikasyonu	38
3.20.1	2. PCR Amplifikasyonu PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz	39
3.21	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	40
3.21.1	Saflaştırılmış PCR Ürünlerinden Agaroz Jel Üzerinde Analiz.....	40
3.22	cDNA' ların pGEM®-T Easy Vektörüne Ligasyonu	40
3.23	<i>E.coli'</i> ye Transformasyon	42
3.24	Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması	42
3.25	Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi	42
3.26	Biyoinformatik Analizler	43

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	44
4.1 Bitki Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Çözeltilere Aktarılması	44
4.2 Bitkilerin Büyütülmesi	44
4.3 Çinko Miktar Analizi.....	46
4.4 Total RNA' ların Spektrofotometrede Ölçümü	46
4.5 Total RNA Analizi	47
4.6 mRNA Analizi	48
4.7 Ligasyon PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz.....	49
4.8 1. PCR Amplifikasyonu PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz	52
4.9 2. PCR Amplifikasyonu PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz	54
4.10 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinden Agaroz Jel Üzerinde Analiz	56
4.11 Rekombinant Hücrelerin Belirlenmesi	57
4.12 Beyaz Kolonilerin Seçilmesi ve Kolonilerin Analize Gönderilmesi.....	58
4.13 Yaprak Kütüphanesinin Biyoinformatik Analizleri.....	58
4.13.1 EST' lerin Hazırlanması ve Kontik – Singlet Oluşturulması	58
4.13.2 Blast Analizleri	59
4.13.2.1 Yaprak Kontik Blast Analizleri.....	62
4.13.2.2 Yaprak Singlet Blast Analizleri	65
4.13.3 Yaprak Kontik ve Singlet Blast Sonuçlarının Değerlendirilmesi	82
4.14 Kök Kütüphanesinin Biyoinformatik Analizleri	84
4.14.1 EST' lerin Hazırlanması ve Kontik – Singlet Oluşturulması	84
4.14.2 Blast Analizleri	85
4.14.2.1 Kök Kontik Blast Analizleri.....	85
4.14.2.2 Kök Singlet Blast Analizleri	89
4.14.3 Kök Kontik ve Singlet Blast Sonuçlarının Değerlendirilmesi	92
4.15 Öneriler.....	94
KAYNAKLAR.....	96

EK A	
RNA ÖRNEKLERİ İÇİN HAZIRLANAN MOPS JELİNDEKİ KARIŞIMLARIN MİKTARLARI	102
EK B	
ARPA BİTKİSİNDE BULUNAN GLİSERALDEHİT DEHİDROGENAZ ENZİMİNE AİT mRNA DİZİNİ	103
EK C	
ARPA BİTKİSİNİN YAPRAK DOKUSUNA AİT 29 KONTİK' İN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	104
EK D	
ARPA BİTKİSİNİN YAPRAK DOKUSUNA AİT 126 SİNGLETİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	113
EK E	
ARPA BİTKİSİNİN KÖK DOKUSUNA AİT 26 KONTİK' İN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	148
EK F	
ARPA BİTKİSİNİN KÖK DOKUSUNA AİT 37 SİNGLETİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	159
ÖZGEÇMİŞ	167

SİMGE LİSTESİ

ds	Çift zincirli
ha	Hektar alan
g	Gram
kb	Kilobaz
Lt	Litre
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
U	Unit
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/ hacim
Zn	Çinko
Zn(OH) ₂	Çinko Hidrooksit
ZnCO ₃	Çinko Karbonat
ZnSO ₄	Çinko Sülfat
µl	Mikrolitre
w/v	Ağırlık/ hacim

KISALTMA LİSTESİ

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre
BLAST	Dizi homolojisi arama motoru
°C	Sentigrat derece
CAP3	EST birleştirme programı
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
EST	Anlatımı yapılan dizi işaretleri (Expressed Sequences Tags)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
IAA	İndol Asetik Asit
IPTG	İzopropil β -D- tiogalaktozit
LB	Luria Broth
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Ortam Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika
RT	Revers Transkriptaz enzimi
SSH	Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D- galaktozit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Dünyadaki çinko eksik topraklar 8
Şekil 2. 2	Fe, Zn ve Cu elementlerinin buğday bitkisinin tohumuna kadar taşınmasında görev alan taşıyıcılar 9
Şekil 2. 3	Bitkide Çinko eksikliğinde meydana gelen büyük fizyolojik değişimler . 12
Şekil 2. 4	ZIP üyelerinin topolojisi..... 13
Şekil 2. 5	Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu 16
Şekil 3. 1	pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi..... 41
Şekil 4. 1	Bitki büyütme kabinde yetiştirilen bitkiler..... 44
Şekil 4. 2	Gelişen bitkilerin gövde kısımlarında kahverengileşme, yapraklarında sararma ve kıvrılma 45
Şekil 4. 3	Kontrol grubu ve deney grubunda gözlemlenen farklılıklar..... 45
Şekil 4. 4	Arpa bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarından izole edilen total RNA örnekleri 47
Şekil 4. 5	Arpa bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarından izole edilen mRNA örnekleri 48
Şekil 4. 6	Arpa bitkisinin yaprak örneklerinin adaptör ligasyonunun kontrolü..... 49
Şekil 4. 7	Arpa bitkisinin gövde örneklerinin adaptör ligasyonunun kontrolü 50
Şekil 4. 8	Arpa bitkisinin kök örneklerinin adaptör ligasyonunun kontrolü 51
Şekil 4. 9	Arpa bitkisinin yaprak, gövde örneklerinden 1. PCR amplifikasyonun jel görünümü 52
Şekil 4. 10	Arpa bitkisinin kök örneklerinden 1. PCR amplifikasyonun jel görünümü 53
Şekil 4. 11	Arpa bitkisinin yaprak ve gövde örneklerinden 2. PCR amplifikasyonun jel görünümü 54
Şekil 4. 12	Arpa bitkisinin kök örneklerinden 2. PCR amplifikasyonun jel görünümü 55
Şekil 4. 13	Arpa bitkisinin saflaştırılmış yaprak ve gövde PCR ürünlerinin jel görünümü..... 56
Şekil 4. 14	Arpa bitkisinin saflaştırılmış kök PCR ürünlerinin jel görünümü 57
Şekil 4. 15	Yaprak, gövde ve köke ait koloniler 57
Şekil 4. 16	BEAP programında 17. kontik' i meydana getiren EST dizileri ve bu dizilerin örtüşme biçimi 59
Şekil 4. 17	Arpa bitkisinin yaprak bölgesine ait kontik 1'in BLASTN analiz sonucunun NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü 61

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Arpa bitkisine ait sınıflandırma..... 5
Çizelge 3. 1	Yaprak, gövde ve kök mRNA örneklerine cDNA sentez primerinin bağlanması..... 30
Çizelge 3. 2	Yaprak, gövde ve kök mRNA örneklerinin birinci zincir cDNA sentezi 30
Çizelge 3. 3	Yaprak, gövde ve kök mRNA örneklerinin ikinci zincir cDNA sentezi .. 31
Çizelge 3. 4	Yaprak, gövde ve kök cDNA örneklerinin uçlarının kütleştirilmesi..... 31
Çizelge 3. 5	Yaprak, gövde ve kök cDNA örneklerinin <i>Rsa I</i> enzimi ile kesimi 32
Çizelge 3. 6	Yaprak, gövde ve kök cDNA örneklerinin adaptör ligasyonu 33
Çizelge 3. 7	Ligasyon örneklerinden PCR yapımı 35
Çizelge 3. 8	Yaprak, gövde ve kök örneklerinden birinci hibridizasyon yapımı 36
Çizelge 3. 9	Yaprak, gövde ve kök örneklerinden ikinci hibridizasyon yapımı..... 37
Çizelge 3. 10	Yaprak, gövde ve kök örneklerinden 1. PCR amplifikasyon yapımı ... 38
Çizelge 3. 11	Yaprak, gövde ve kök örneklerinden 2. PCR amplifikasyon yapımı ... 39
Çizelge 3. 12	Yaprak, gövde ve kök örneklerine ligasyon reaksiyonu kurulmasında kullanılanlar ve miktarları 41
Çizelge 4. 1	Bitki kısımlarının yaş ağırlıkları ve çinko içerikleri 46
Çizelge 4. 2	Bitki kısımlarının DEPC' li sudaki RNA miktarları 46
Çizelge 4. 3	CAP programı ile elde edilen değerler..... 58
Çizelge 4. 4	Yaprak dokusuna ait kontik' lerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri 62
Çizelge 4. 5	Yaprak dokusuna ait singletlerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri 65
Çizelge 4. 6	CAP3 programı ile elde edilen değerler..... 85
Çizelge 4. 7	Kök dokusuna ait kontik' lerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri 86
Çizelge 4. 8	Kök dokusuna ait singletlerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri..... 89

**ÇİNKO EKSİKLİĞİ DURUMUNDA FARKLI ANLATIM YAPAN ARPA
GENLERİNİN İZOLASYONU İÇİN BASKILAYICI ÇIKARIM HİBRİDİZASYON
KÜTÜPHANELERİNİN KURULMASI VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

Başak ÇELİK ALTINIŞIK

Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Çinko elementi, tüm canlılar için temel bir mikrobeseindir. Bu element 400’ den fazla enzimin yapısında kofaktör olarak bulunur ve birçok protein için kritik yapısal role sahiptir. Çinko çeşitli transkripsiyon faktörleri için yapısal bileşen olduğundan gen anlatımında da önemlidir. Çinko eksikliği tüm Dünya’da yaygın bir sağlık problemidir. Bu sorunun giderilmesi için, Çinko eksikliği olduğu bilinen bölgelerde bulunan tarım alanlarında, bu eksikliğe dayanıklı bitkiler yetiştirilmelidir. Tahıllarda ve diğer bitki türlerinde çinkonun alımından, taşınımından ve depolanmasından sorumlu proteinleri kodlayan genlerin farklı anlatımından kaynaklanan genotipik varyasyonlar vardır. Bu nedenle bitkilerde çinko etkinliğinin belirleyicisi olan genler izole ve karakterize edilmelidir. Ayrıca bu genlerin hücre içindeki fonksiyonları ve anlatımlarının kontrol mekanizmaları belirlenmelidir. Bu şekilde tarımsal bitkilerde biyoteknolojik yöntemlerle çinko etkinliği özelliği geliştirilebilecektir.

Bu çalışmada yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) bitkisinin çinko eksikliği durumunda farklı anlatım yapan genlerinin izolasyonu yapılmıştır. Baskılayıcı çıkarım hibridizasyon yöntemi kullanılarak, *Hordeum spontaneum* yaprak, kök ve gövdesinden üç ayrı cDNA çıkarımlı cDNA kütüphanesi kurulmuştur. Yaprak kütüphanesinden 960 klon, kök kütüphanesinden 384 klon için dizin analizi yaptırılmıştır. cDNA dizinlerinin EST dizinleri olarak değerlendirilmesi için biyoinformatik analizler yapılmıştır. Dizinler NCBI’ a (National Center for Biotechnology Information) ait GenBank veritabanıyla BlastN ve

BlastP uygulaması kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Blast sonuçları incelendiğinde elde edilen cDNA dizinlerinin Rubisco, Ferredoxin- NADP reduktaz, Lipid Transfer Protenleri, Karbonik Anhidraz, Klorofil A- B binding, Translasyon Uzatici Faktör, Glutasyon- S- transferaz, Katalaz ve ZIP protein kodlayıcı genlere önemli derecede benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Çinko, *Hordeum spontaneum*, Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyon Yöntemi, Çinko eksikliği, EST, Biyoinformatik, Phred/ Phrap, CAP3

**CONSTRUCTION OF SUPPRESSION SUBTRACTION LIBRARIES FOR
CLONING OF BARLEY GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED UNDER ZINC-
DEFICIENT CONDITIONS AND THEIR BIOINFORMATIC ANALYSIS**

Başak ÇELİK ALTINIŞIK

Department of Biology

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Zinc (Zn) is essential for all organisms as a micronutrient. Zinc is required as a cofactor for more than 400 enzymes and plays critical structural roles for many proteins. It also plays a significant role in gene expression as a structural component in a large number of Zn- dependent transcription factors. Zinc deficiency is considered as a widespread health problem throughout the world. Therefore there is a need for growing more zinc efficient plants in regions where zinc deficiency is common. Genotypic variations for zinc uptake efficiency have been found for crops and other plant species. These variations are due to the differential expression of many genes encoding proteins that functions in absorption, translocation and storage of zinc. The genes which determine zinc efficiency must be isolated and characterized. In addition their in vivo functions and control of expressions must be analyzed. This can lead to improvement of zinc efficiency treat using biotechnological methods.

In this study wild barley (*Hordeum spontaneum*) genes which are expressed differentially in response to zinc deficiency were isolated . Three separate subtracted cDNA libraries were constructed from leaves, roots and stems of *Hordeum spontaneum* using Suppressive Subtracted Hybridization (SSH) method. 960 clones from leaf library and 384 clones from root library were sequenced. Bioinformatic Analysis were performed to convert raw sequence data to EST data . The sequences were compared to the GenBank database of NCBI using BlastN and BlastP tool.

Blast results indicated that cDNA sequences showed significant similarity to Rubisco, Ferredoxin- NADP reductase, Lipid Transfer Protein, Carbonic anhydrase, Chlorophyll A- B binding proteins, Translation Elongation Factor, Glutathione- S- transferase, Catalase ve ZIP protein encoding coding genes.

Key words: Zinc, *Hordeum spontaneum*, Suppressive Subtractive Hybridization, Zinc deficiency, EST, Bioinformatic, Phred/ Phrap, CAP3

1.1 Literatür Özeti

İnsan vücudundaki metabolik reaksiyonların düzgün bir şekilde işleyişi için vücuda alınması gerekli olan su, karbonhidrat, 10 çeşit temel aminoasit, linoleik asit, linolenik asit, yedi çeşit makro element ve 17 çeşit mikro element (Fe, Zn, Cu, Mn, I, Fl, B, Se, Mo, Ni, Cr, V, Si, As, Li, Sn, Co) olmak üzere toplam 49 çeşit besin belirlenmiştir [1], [2]. Bitkiler için sadece yedi çeşit mikro element (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, Cl) belirlenmiştir [3]. Bu besin çeşitlerinden çinko, demirden sonra canlılar için hayati önemi olan ikinci mikroelementtir [4]. Çinko; mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda 400' den fazla metal bağlı enzim ve proteinin yapısında bulunur [5]. Çinko, biyolojik sistemlerde görevli olan transkripsiyon faktörlerinin çalışması ve çok sayıda proteinin yapısal kararlılığını korumak için gerekli bir eser element olduğundan gen regülasyonu için önemlidir. Hücrede genlerin farklı anlatımının gerçekleştiği strese bağlı durumlarda organizmaların stresin zararlı etkilerinden korunmasını sağlar [3]. Ayrıca DNA' nın onarımında ve programlı hücre ölümünde görev alır [6]. Çinkonun enzimlerin çalışmasında katalitik rolü bulunur [7]. Bunlara bağlı olarak çinko eksikliği hücrenin yaşamını ve hücredeki tüm metabolik aktiviteleri etkiler. Ayrıca hücrede çinkonun miktarının eksikliği kadar fazlalığı da hücrenin metabolik fonksiyonları için zararlı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır hatta toksik etkiler oluşturabilmektedir. Bu nedenle tüm canlılarda çinkonun alımının, taşınmasının ve depolanmasının kontrollü bir şekilde düzenlenmesi gereklidir.

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çinko eksikliği önemli bir beslenme ve sağlık sorunudur. Kopenhag Konsensus' una göre (2008) küresel değişimde çinko ve A

vitamini yetersizliği en önemli sorunlardan ikisidir [8]. WHO' nun 2002 yılında yayınlanan raporunda ise gelişmekte olan ülkelerde, çinko eksikliğinden kaynaklanan sağlık sorunları beşinci sırada yer almaktadır. Tüm ülkeler incelendiğinde de demir ve A vitamini yetersizliği kadar önemli kabul edilip, 11. sıraya konmuştur [9]. Dünya nüfusunu oluşturan 6 milyar insanın yaklaşık % 60' ında demir eksikliği, % 30' unda çinko eksikliği, % 30' unda iyot eksikliği ve % 15' inde selenyum eksikliği olduğu tahmin edilmektedir [2].

Çinko eksikliğinin insanda büyümenin gerilemesi, anemi, infeksiyonlara duyarlılık, algılama eksikliği, mental olarak gerileme, yaralanan dokuların geç iyileşmesi ve üreme bozukluklarını da kapsayan pek çok problemin ortaya çıkmasına neden olduğu gözlenmiştir [4], [8], [10], [11], [12], [14], [15]. Çeşitli araştırmalarla çinkonun canlıların metabolik fizyolojik olaylarında, büyüme ve gelişmelerinde görev aldığı belirlenmiştir [13], [16], [17]. Çinkonun bitki gelişimindeki önemi, ilk defa mısır bitkisinde Maze (1915) tarafından daha sonra da Sommer ve Lipman (1926) tarafından Arpa ve ayçiçeği bitkilerinde yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. 1934 yılında fare ve sıçanlarda, 1969 yılında da *Aspergillus niger*' de büyüme ve gelişmede önemi olduğu belirlenmiştir [14], [18]. Bitkilerin sağlıklı beslenebilmeleri için ihtiyaç duydukları Çinko miktarı oldukça azdır. Bir kg kuru maddesinde 20 mg Çinko olan bitkilerin verimlerinde herhangi bir azalma olmadığı halde bu oranın 10 mg' ın altına düşmesi halinde verimde anormal azalmaların olduğu tespit edilmiştir [19].

Farklı bitki türlerine bakıldığında tahıllar arasında çinko eksikliğine duyarlılık ve dayanıklılık bakımından çeşitlilik gözlenmiştir. En duyarlı olan bitki türleri pirinç, mısır ve darı; daha az duyarlı olan bitki türleri ise buğday, arpa, yulaf, çavdardır. Hatta aynı bitkinin farklı genotipleri arasında da farklılıklar vardır [11], [20].

Çinko eksikliği bitkilerde gelişimsel bozukluklar, yapraklarda rengin açılması ve lekeler, yaprak boyutunda küçülme, bitki gövdesinde incelme ve kılma gibi fizyolojik belirtilerle ve kökte mantar enfeksiyonlarına duyarlılık olarak kendini gösterir [12], [21].

25 ülkeden alınan toprak örneklerinin incelenmesi sonucu bunların yaklaşık olarak % 50' sinde minerale bağlı abiyotik stres türü olan çinko yetersizliği görülmüştür. Özellikle kireçli, kurak, yarı- kurak, pH değeri, kum oranı ve fosfat oranı yüksek olan topraklarda

önemli bir stres faktörüdür [11], [12], [21], [22], [23]. Pek çok araştırmacı tarafından Hindistan, Avustralya, Pakistan, Çin, İran ve Türkiye gibi ülkelerde çinko yetersizliğinin buğday bitkisinde oluşturduğu olumsuz fizyolojik değişimler deneysel olarak tespit edilmiştir [11], [21], [22], [24], [25]. Çinkolu gübrenin buğday bitkisindeki verim artışına ilişkin çalışma Çakmak ve arkadaşları [12] tarafından yapılmıştır. Çinko bakımından zengin buğdayın tüketimi de çinko yetersizliği görülen bölgelerdeki insanların sağlığı için olumlu bir gelişme olmaktadır [11], [20].

Çinko yetersizliği; gelişmekte olan ülkelerdeki tarımsal, ekonomik ve sağlık bakımından önemli sorunlardan biridir [22]. Çinko yetersizliği Türkiye’ de beslenme biçimine bağlı olarak kadın ve çocuklarda daha yaygındır [11]. Çakmak ve arkadaşları tarafından NATO projesi olarak Şanlıurfa’ da 2000 öğrenci incelenmiş ve ailelerin sosyo- ekonomik koşulları ile vücutlarında bulunan çinko oranları arasında ilişki olduğu belirlenmiştir [12].

Çinko eksikliğinin olduğu bölgelerde bu stres faktörünün öncelikle insan sağlığı bakımından etkilerini azaltmak için daha dayanıklı bitkiler yetiştirilmesi gerekmektedir. Bitkilerde çinko etkinliğini belirleyen genler izole ve karakterize edilmeli, bunların hücre içindeki fonksiyonları ve anlatımlarının kontrol mekanizmaları belirlenmelidir. Bu genlerin biyoteknolojik yöntemlerle dayanıklı bitki genotipleri oluşturulmasında kullanımı ancak bu şekilde mümkün olacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Bu araştırmada yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) bitkisinin yaprak, gövde ve kök, dokularında çinko eksikliği durumunda anlatımı artan genlerin baskılayıcı çıkarım hibridizasyon yöntemiyle klonlanması hedeflenmiştir. Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu yönteminin kullanılmasının nedeni, arpada çinko eksik koşullarda anlatımı artan genler bakımından zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kurulmasıdır. Kütüphanelerde bulunan klonların dizin analizi yaptırılacak ve bunların EST dizinleri olarak değerlendirilebilmesi için biyoinformatik analizler gerçekleştirilecektir.

1.3 Hipotez

Günümüzde bir çok organizma için tüm genlerinin dizin analizinin yapıldığı genom

projeleri tamamlanmıştır. Bu aşamada genlerin işlevlerinin bulunabilmesi, biyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının açığa kavuşması için işlevsel genom projeleri başlatılmıştır. Bunların kapsamında bir organizmada belirli bir koşulda anlatımı artan tüm genlerin analizini transkriptom ve proteom düzeyinde analizleri yapılmaktadır.

Çinko, biyolojik sistemlerde yapıya katılma, transkripsiyon faktörünün çalışmasında görev alma, enzimin çalışmasında katalitik görev alma gibi oldukça önemli görevlere sahip eser elementlerden biridir. Buna bağlı olarak ta çinko eksikliği biyolojik sistemlerin çalışmasını önemli derecede etkiler.

Tahıllarda ve diğer bitki türlerinde çinko alım etkinliği bakımından genotipik varyasyonlar bulunmuştur. Bu varyasyonlar çinkonun alımından, taşınımından ve depolanmasından sorumlu proteinleri kodlayan genlerin farklı anlatımından kaynaklanır. Bunun için bitkilerde çinko etkinliğinin belirleyicisi olan genler izole ve karakterize edilmelidir. Ayrıca bu genlerin hücre içindeki fonksiyonları ve anlatımlarının kontrol mekanizmaları belirlenmelidir. Bu şekilde tarımsal bitkilerde biyoteknolojik yöntemlerle çinko etkinliği özelliği geliştirilebilecektir.

Türkiye' nin çinko eksik topraklarına iyi uyum sağlamış arpanın kök, gövde ve yaprak dokularından çinko eksikliği stresi ile aynı anda anlatımı artan tüm genler klonlanacaktır. Bunun için işlevsel genomik yöntemlerden biri olan Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu kullanılacaktır.

BÖLÜM 2

ARPA VE ÇİNKO

2. 1 Arpa

2.1.1 Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Tarihi

Arkeolojik çalışmalarda tohumları bulunan arpa, buğdayla birlikte Dünyanın en eski kültür bitkileri arasında yer almaktadır. Bitkiler alemine ait Poaceae (buğdaygiller) familyasına dahil olan *Hordeum L.* cinsinde yaklaşık 115 türü bulunan bir bitkidir. Arpa bitkisine ait sınıflandırma Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Arpa bitkisine ait sınıflandırma

Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Liliopsida (Tek çenekliler)
Takım	Graminales
Familya	Poaceae
Cins	<i>Hordeum L.</i>

Bitkiler aleminde yer alan çimenler, yaklaşık 60 milyon yıl önce ortaya çıkmış olup, Poaceae familyası da yaklaşık 12 milyon yıl önce bu koldan ayrılmıştır. *Hordeum spontaneum*, yaklaşık 10.000 yıl önce Orta Asyada günümüzde kullanılan *Hordeum vulgare* türünün evcilleştirilmesinde kullanılan bitki türüdür [26]. Her iki türde de o zamandan bu yana çok fazla değişim saptanmamıştır. 317 yabani ve 57 kültivar bitkisi üzerine yapılan çalışmalarda İsrail ve Ürdün populasyonlarının diğerlerine oranla evrimsel olarak daha yakın oldukları gözlenmiştir [27]. Tek gen çalışmaları da bunu

destekler niteliktedir. Sınıflandırma yapıldığında her iki türde de morfolojik olarak benzerlikler olduğu bilinmektedir. Ancak coğrafik değişimlerin sonucundaki doğal seleksiyon ve tarımsal uygulamalarla gerçekleşen yapay seleksiyon ile farklı bölgelerde yetişen arpa türlerinde farklı özellikler görülmektedir [27], [28].

Hordeum, *Triticum*, *Secale* cinslerinin hepsi ortak atadan gelir, bundan dolayı genetik olarak ortak yapıları vardır. *Hordeum* cinsi 32 tür ve 45 taxa içermektedir. Tek biyolojik türe ait olduğu için bu bitkinin alt türleri için bariyer yoktur. Yabani tipinden kültür yapılabilir.

Arpa bitkisinin yaşam döngüsünün kısa olması, genomunun küçük ve diploit olması ($2n= 14$), genetik haritasının biliniyor olması, fizyolojik, morfolojik ve genetik olarak geniş çeşitlilik içermesi bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kolaylaştıran faktörlerdir [28].

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisi pirinç, buğday, çeltik ve mısırdan sonra gelen önemli tahıl bitkisidir [28], [29]. Ülkemiz de dahil tüm dünya tarımında önemli bir yere sahip olan arpa, başta hayvan beslenmesi olmak üzere, endüstride bira ve malt, tatlandırıcı ve viski yapımında ve tıpta ilaç üretiminde kullanılmaktadır [28]. Ayrıca besin olarak kullanıldığı durumlar da vardır [29].

Dünya’ da arpa ekim alanı 55,3 milyon hektar, üretimi 139,4 milyon ton ve dekara verimi 251,9 kg’ dır. Türkiye’ de, arpa ekim alanı ise 3,4 milyon hektar, üretimi 8 milyon ton ve dekara verimi 232,0 kg ile tahıllar içerisinde buğdaydan sonra 2. sırada yer almaktadır [29].

2.2 Çinko

2.2.1 Bir Mikrobesein Olarak Çinko

Tüm canlılar için temel bir mikrobesein olan çinko, periyodik cetvelde ikinci grup bir element olup, ağır metaller arasında yer alır [16]. Dünyada bulunma sırası bakımından 23. sırada olan geçiş metalidir. ^{64}Zn (48.63%), ^{66}Zn (27.90%), ^{67}Zn (4.90%), ^{68}Zn (18.75%) ve ^{70}Zn (0.62%) olmak üzere 5 tane izotopu bulunmaktadır. Bitki kök ve gövdesinde ağır ve hafif izotoplar yönüyle zengin olduğu rapor edilmiştir [18]. Formları çoğunlukla çözünebilir tuz ve çözünebilir- çözünebilir organik kompleks moleküller

şeklindedir. Katyon halinde olup, S, N ve O atomları ile güçlü kovalent bağlar yapar [11], [18].

Temel mikrobesein türü olarak belirlenmesinden bu zamana kadar yapılan çalışmalarla çinkonun oldukça fazla sayıda ve çeşitte biyokimyasal olayda görev aldığı belirlenmiştir [14]. Anhidraz, transferaz, hidrolaz, izomeraz, ligaz, RNA polimeraz , dehidrogenaz, oksidoredüktaz ve peroksidaz gibi enzim gruplarına dahil enzimler için yapısal ve işlevsel önemi vardır [1], [30], [31]. Bunlara bağlı olarak ta nükleik asit, protein ve yağ metabolizmasında, apoptosiste, biyomembran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde, fotosentetik Karbon metabolizmasında ve klorofil biosentezinde, Indol Asetik Asit (IAA, oksin) metabolizmasında kritik rolleri vardır [21], [32]. Ayrıca 1000' den fazla transkripsiyon faktöründe düzenleyici kofaktör veya yapısal bileşen olarak bulunur. Bu şekilde gen anlatımının kontrolünde ve kromatin yapısının stabilitesinin sürdürülmesinde işlevi vardır [1], [9], [16], [21], [23], [30], [32], [33], [34], [35], [36], [37].

Cu/ Zn süperoksit Dismütaz (SOD) enziminin yapısına katılır ve reaktif oksijen moleküllerinin bitkideki oksidatif zararlarını engeller. Karbonik anhidraz enziminin çalışması ile bitkide bulunan çinkonun miktarı arasında bağlantı bulunmaktadır [35].

2.2.2 Topraktaki Çinko

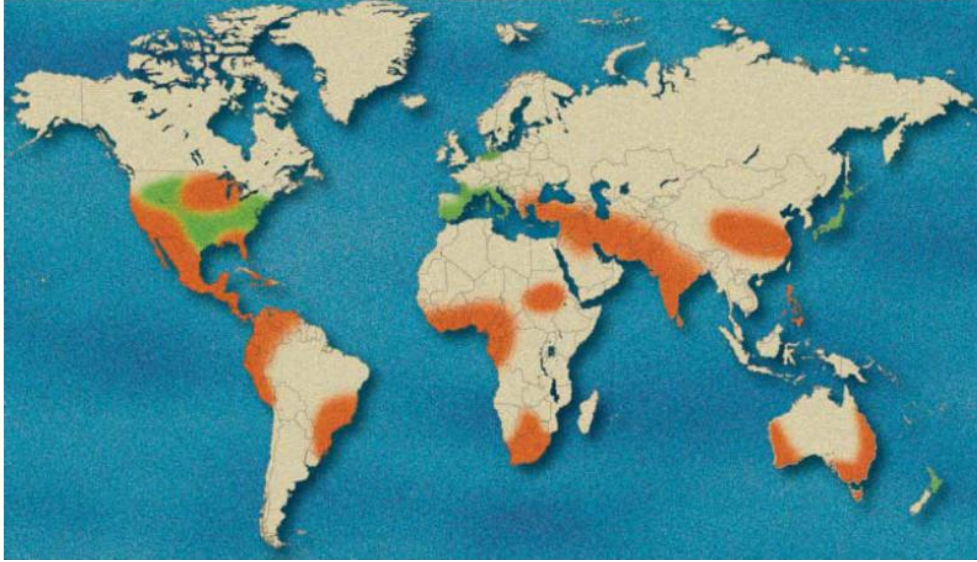
Toprakta bulunan çinko mineralinin miktarını belirleyen en temel faktör, toprağın yapısıdır. Çinko, farklı toprak tiplerinde farklı formlarda bulunur [38]. Atmosferden, evsel atıklardan ve endüstriyel atıklardan da toprağa çinko karışmaktadır.

Alloway [38]' a göre, toprakta bulunan çinko, 5 farklı biçimde bulunur.

Bunlar:

1. Toprak çözeltisinde ve suda çözünür, serbest (Zn^{+2} , $ZnOH^+$),
2. Toprak çözeltisine elektriksel yüklerle bağlanmış,
3. Topraktaki organik bileşiklere, şelatlarla adsorbe olmuş,
4. Birincil minerallerin ayrışması ve parçalanmasıyla oluşmuş,
5. Çözünmez metaloksit mineralleri üzerinde değişmez biçimlerde.

FAO tarafından yapılan çalışmada Dünya’ da tarım yapılan toprakların yaklaşık % 30’ unda çinko noksanlığının olduğu belirlenmiştir. Alloway [39] tarafından Çinko eksik topraklar Şekil 2.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1 Dünyadaki Çinko eksik topraklar, kırmızı bölgeler eksik, yeşil bölgeler orta derecede eksik olarak tespit edilmiştir (Alloway [38])

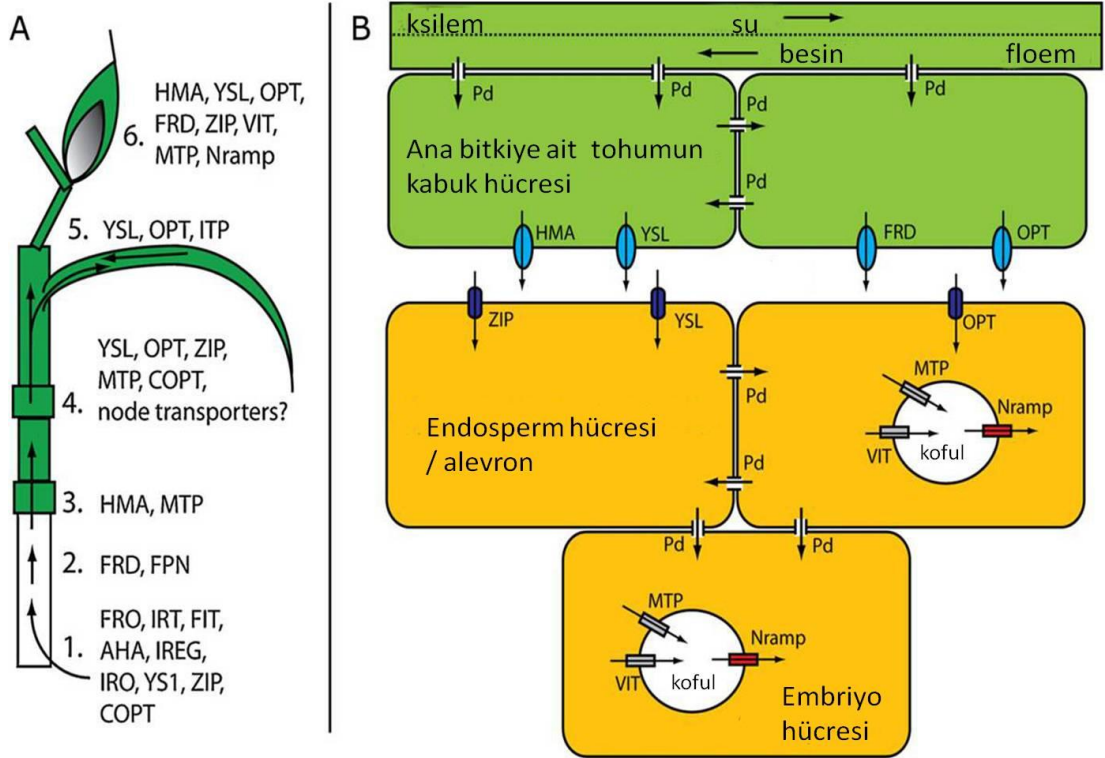
Eyüboğlu tarafından (1996) Türkiye’ de 14 milyon hektarlık alandan alınan toplam 1511 toprak örneğinde yapılmış olan çalışmalarda çinko eksikliği (< 0.5 ppm) tespit edilmiştir [11], [38], [40]. Bu çalışmalarda çinko eksikliği ile yüksek pH, kireç ve metal oksitlerle düşük organik madde içeren topraklar arasında bağlantı bulunduğu belirlenmiştir [11], [12], [35], [38], [40]. Çinko eksikliğinin Türkiye’ de özellikle Anadolu’ da yaygın olduğu 1993 yılında NATO – bilim stabilite programı tarafından yapılmış olan araştırmalarla da ortaya konmuştur. Orta Anadolu’da yapılan çalışmada kullanılan toprak örneklerinin % 92’ sinde kullanılabilir çinko miktarı kritik seviye olarak kabul edilen $0,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KM}$ ’ ın altında bulunmuştur. Aynı çalışmada bölgeden toplanan buğday bitkisinin yaprak örneklerinin % 80’ inin sağlıklı bir bitkide olması gereken $15-20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KM}$ altında (10 mg dolayında) çinko içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir [11], [12]. Buğdayda Çinko yetersizliğinden dolayı bir takım değişimlerin olduğu Hindistan, Avusturalya ve Türkiye’ de yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir [22].

1994 yılından sonra çinko eksik toprakların bulunduğu bölgeler için çinko içeren gübre üretimi başlamıştır. 1995’ te 2000 ton üretilirken bu rakam 2000’ de 189 000 tonluk bir üretim miktarına ulaşmıştır [41].

2.2.3 Topraktaki Çinkonun Bitkilerce Alınması

Çinkonun formu ve miktarı bitkinin yetiştiği toprağın yapısına göre değişmektedir [38]. Bitki köklerinden çinkonun alınımı; toprağın kireç içeriğine, pH değerine, kil mineraline, organik madde miktarına, toprağın fosfor içeriğine, toprakta kullanılan azotlu gübre oranına ve toprağın sıcaklığına bağlı olarak değişir [11], [12], [24], [35], [40].

Türkiye topraklarının % 81,2' sinde pH' nın 7,0' nin üzerinde olduğu bildirilmektedir [11], [42]. Toprak pH' sı artarken çözünürlükleri çok az olan $Zn(OH)_2$ ve $ZnCO_3$ bileşikleri oluşur ve bu çinkonun bitkiler tarafından alınmasını zorlaştırır. Gübre kullanımıyla organik madde oranı arttırılmış topraklarda ise bu çinkonun bitkiler tarafından alınması kolaylaşır [40].



Şekil 2. 2 Fe, Zn ve Cu elementlerinin buğday bitkisinin tohumuna kadar taşınmasında görev alan taşıyıcılar, A; translokasyon basamakları, 1. Rizosferden alınma, 2. ksilemde taşınma, 3. kök ve gövde arasında taşınma, 4. yapraklara ve tohumu ait dokulara taşınma, 5. floemle tohumu gönderilme, 6. tohumda depolanma, B; Tohumdaki depolanmanın detayları, ana bitkiye ait kısım yeşil renkte gösterilmiştir. Tohum sarı renkte gösterilmiştir. Açık mavi renkte gösterilen taşıyıcılar tohumu akışı sağlayan taşıyıcılardır. Koyu mavi renkte olan taşıyıcılar plazma zarında bulunan taşıyıcılardır. Gri renkte olan taşıyıcılar koful içine taşıyan proteinlerdir. Kırmızı renkte olan taşıyıcılar kofuldan sitoplazmaya taşıyan proteinlerdir. Pd: Hücrelerarası mineral taşıyıcısı (Waters ve Sankaran [52])

Çinkonun bitkilerdeki taşınımı topraktan çinkonun alınması ile başlar. Ksilem ve floem ile bitkinin hücrelerine taşınmasına kadar devam eder. Kökten alınmasında epidermis membranında bulunan H^+ ATPaz ile Metal pompalayıcı ATPaz görev alır. H^+ iyonu kökten dışarı atılırken metaller epidermisten içeri alınır. Kök hücrelerinden hücre zarından alınmasında Zn^{+2} veya Zn bağlı fitosideroforlar aracılığı ile gerçekleşir [2]. Bazı Ca^{+2} kanalları da çinkoya geçirgenlik gösterir. Çinko metalinin kökten dokulara ve hücrelere taşınmasında taşıyıcı proteinler (ZIP), sitosolik şelatörler ve kanal proteinleri görev alır.

Ksilem içinde bulunan çinko; katyon şeklinde, organik aside, histidin aminoasidine veya nikotinamide bağlı olarak taşınır [2]. Alınan çinko, yaprakta mezofil hücrelerinde ve tanede endodermis hücrelerinde kullanılır. Hücrenin çekirdeğine ve organellerine zarlarında bulunan taşıyıcı proteinlerle taşınır. Çinko hücrelerde sitosolde metal bağlı proteinlerle, metal şelatörlerle, hücrelerarası metal tampon olarak veya serbest metal konsantrasyonunda bulunabilir. Metal şelatörleri olarak bitkide üç tip molekül bulunur. Bunlar; fitoşelathinler (PC), Nikotinaminler (NA), Metalloitiyoneinler (MT) dir [9], [43].

Çinko ve demir minerali eksik toprakta yetiştirilen buğday türleri ile kökte bulunan fitosiderofor molekülleri arasındaki ilişki Tolay ve arkadaşları tarafından [9]' da araştırılmıştır. Çinko ve demir eksikliğinde, proteinlerin yapısında bulunmayan aminoasit olarak adlandırılan fitosideroforların köklerden salgılanmasında artış gözlenmiştir. Fitosideroforlar, kireçli topraklarda çinkonun çözünürlüğünü ve hareketliliğini arttırır.

2.2.4 Çinkonun Bitkilerdeki Etkisi

Ağır metaller arasında yer alan çinko, bitki bünyesinde oluşan metabolik aktiviteyi düzenleyen enzim sistemlerinin gerekli bileşenlerinden biridir. Normal konsantrasyonu bitki büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynar.

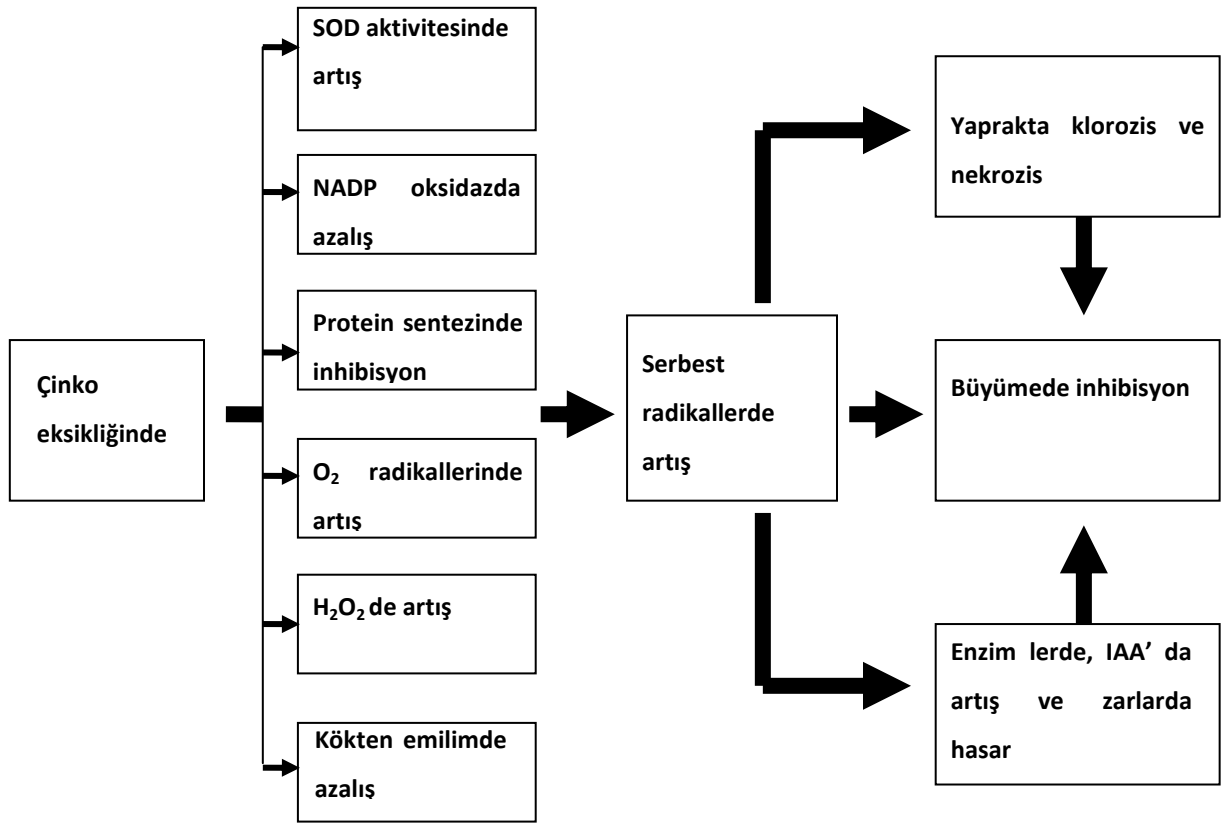
Dokuda fazla biriktiği zaman canlılıkla ilgili mineral beslenme, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi, nükleik asit yapısı, klorofil biyosentezi ve çimlenme gibi büyüme ile ilgili çeşitli olayların aksamasına neden olur, ayrıca membranlarda hasar, hormon dengesinde bozukluk gibi fizyolojik bozukluklara neden olduğu araştırmalarla

belirlenmiştir [16], [32], [43], [44].

Elma ile ilgili bir çalışmada (*Malus sylvestris* Miller cv. Golden) fazla miktarda çinko alınması polen çimlenmesini ve polen tüpü gelişimini olumsuz etkilemiştir. Bu çalışmaya göre çinko fazlalığı enzim aktivitesini düşürmekte ve solunumu yavaşlatmaktadır [45]. Fasulye, domates, pamuk, pirinç ve *Arabidopsis* gibi pek çok bitki türünde yapılan çalışmalarda çinko eksikliğinin karakteristik semptomları genç yapraklarda klorozis, yaprak kütlesinde azalma, zayıf ve dik olmayan gövde yapısı, yaprakta eğilme şeklinde olduğu bulunmuştur [35], [42]. Domates bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise çinko eksikliğinin protein ve şeker metabolizma hızının azalmasına neden olduğu bulunmuştur [18].

Çinko eksikliği bulunan toprakta yetişen bitkilerin türüne göre değişimleri de farklı olmaktadır [35]. Çakmak ve arkadaşlarının yaptığı araştırmalarda çinko eksikliğinin hububatlardaki morfolojik ve fizyolojik etkileri gözlenmiş ve arpaya ait Yesevi, Tokak ve Hamidiye ırklarının Çinko eksikliğine diğer hububatlara göre daha az değişimi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Triticale familyasındaki hububat gelişimi ile çinko eksikliğine duyarlılık bakımından en duyarlı olandan az duyarlı olana doğru sırası ile makarnalık buğday, yulaf, ekmeklik buğday, arpa, tritikale ve çavdar şeklindedir. Çinko eksikliğine ilişkin semptomlar, yulaf ve makarnalık buğdayda hızlı ve ciddi hasarlı gerçekleşir. Çinko eksikliğine duyarlılık ekmeklik buğday türlerinde büyük genotipik farklılıklar gösterir. Tiritikale ve çavdarda gözle görülebilir semptomlara çok az rastlanır [11].

Çinko eksikliğinde Şekil 2.3' te verildiği gibi hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı , kökte demir mineralinin birikimi, çinkonun bağlandığı zardaki proteinlerin yerini demir aldığı için yapısal ve fonksiyonel biyomembran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde hasarlar, fotosentezde azalma, yaprakta klorozis ve nekrozis, büyüme hormonu olan indol asetik asitte artış, DNA' da hasar ve gen ekspresyonunda değişim gözlenmiştir [18], [21].



Şekil 2. 3 Bitkide Çinko eksikliğinde meydana gelen fizyolojik değişimler (Çakmak [18])

2.2.5 Çinko Alımı, Taşınması ve Depolanmasının Moleküler Biyolojisi

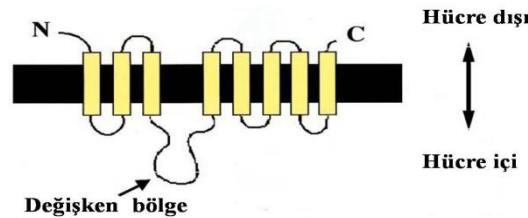
Son yıllarda yapılan çalışmalarda da çinkonun depolanabilir olduğu ve hücre içi vesiküler kısımlardan yayılabildiği gösterilmiştir. Canlılarda çinkonun homeostazisinde görev alan çok fazla sayıda gen belirlenmiştir. Bu genlerin kodladığı proteinler, çinkonun alınmasında, taşınmasında ve depolanmasında görev alır. Çinko taşıyıcılarının çoğunlukla dokuya özgün bir şekilde anlatımının yapıldığı ve hücrede belirli bölgelerde lokalize olduğu bulunmuştur. Çinko taşıyıcılarını kodlayan genlerin çinko eksikliğinde veya fazlalığında hücre içindeki yerleşimlerinde ve kararlılıklarında değişimler gözlemlenmiştir [46]. Son yapılan çalışmalarda çinko ve diğer metaller için kofullarda önemli ve güçlü detoksifikasyon mekanizmasının olduğu gösterilmiştir [7].

Memelilerde çinkonun homeostazisini sağlayan çinko transporter genleri, ZnTs ve ZIPs olmak üzere iki süperfamilyada toplanmaktadır. ZnTs taşıyıcıları çinkonun yayılmasında görevli katyon difüzyon proteinleridir. ZIP taşıyıcıları da çinko ve diğer metallerin alınmasında görev alırlar [47], [48]. Çinko parmak proteinleri de diğer transkripsiyon faktörleri kadar önemli olup, hücre uzamasının kontrolü, hücre farklılaşması,

apoptosisle ilgili genlerin anlatımı ve DNA' nın onarım mekanizmalarında görev alır [6].

Çinkonun bitkilerde alınmasında görevli olan metal taşıyıcılar ZIP (ZRT, IRT bağımlı protein) ailesine dahildirler [9]. ZIP kelimesi, ZRT, IRT-like Protein kelimelerinden üretilmiştir. Pedas vd.,' ye göre [8]' de 100 çeşit ZIP proteini tanımlanmış ve ZIP ailesine katılmıştır. ZIP taşıyıcıları Zn^{+2} dışında Cd^{+2} , Fe^{+3}/Fe^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} ve Cu^{+2} metallerinin taşınmasında da görevlidir. ZIP proteinlerinin aminoasit dizilimi maya, bitki ve memelilerle homologtur. Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinin köklerinde çinko homeostazisinde görevli HvZIP3, HvZIP5 ve HvZIP8 taşıyıcıları belirlenmiştir [8].

ZIP proteinlerinin topolojisi benzer özellik gösterir [49]. Değişken bölge histidin aminoasiti bakımından zengindir. Çinkonun bağlandığı bölge olan bu kısım, sitoplazma bölgesine bakan kısımda bulunur (Şekil 2.4), [7], [49], [50].



Şekil 2. 4 ZIP üyelerinin topolojisi (Gueriot [50])

Zn, Mn, Fe, Ni, Cd ve Co metallerinin hücre dışına veya koful içinde alınmasında görevli taşıyıcı protein çeşitleri belirlenmiştir. Bunlar; ZIP (ZRT, IRT-like protein), MTP (metal tolerans protein), HMA (ağır metal ATPaz) ve ZIF (zinc induced facilitator) ailesi olarak belirli başlıklar altında toplanmıştır [51]. MTP taşıyıcı proteini CDF ailesine ait olup bakteri, mantar , bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadır.

Kasyon taşıyıcıları P1B-tip ATPaz (HMA), ZIP, CDF, NRAMP ve YSL olmak üzere pek çok taşıyıcı ailesi bulunmaktadır. Bunlardan ZIP ve CDF ailesi çinkonun alımı, taşınımı ve depolanmasında önemli görevleri vardır [1]. YSL (yellow stripe like) proteinleri oligopeptit taşıyıcılara (OPT) dahildir [52]. NRAMPs taşıyıcıları çinkonun kofulda akışında etkiler [2].

A.thaliana ve diğer bitkilerde, çinkonun hücre içine alınmasında ZIP taşıyıcı ailesi görev alır. Çinkonun koful içinde taşınmasında CDF (kasyon difüzyon ailesi) taşıyıcılardan AtMTP1 (kök ve gövdede) ve AtMTP3 (kökte) görev alır. AtZIF1, tonoplastta bulunan ve çinkonun organik maddeye bağlanıp kofulların içine taşınmasını kolaylaştıran

protein molekülüdür. AtMTP3, AtMTP1 ve AtZIF1 taşıyıcıları çinkonun hücredeki miktarlarına ilişkin tampon görev alır. AtHMA2 ve AtHMA4 taşıyıcıları çinkonun hücreden hücreye taşınmasında görev alır. Ayrıca çinko minerali nikotinamide bağlı olabilir ve YSL taşıyıcı ailesi ile demir, bakır ve çinkonun bitkisel dokularda yeniden taşınmasında görev alabilir [46]. ZIP, MTP, NRAMP, HMA, FRD3 ve YSL proteinleri ve NAS moleküllerinin miktarı yüksek toplayıcılarda normal bitkilere göre daha fazladır [2].

2.3 Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu (SSH)

Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu (SSH) Diatchenko vd., tarafından geliştirilmiş olup, iki örnek arasında farklı anlatım yapan genlerin belirlenmesi için kullanılan PCR' a dayalı bir yöntemdir [53]. SSH, geliştirilmesinden bu yana Moleküler Biyoloji' nin çeşitli alanlarındaki bir çok araştırma grubu tarafından farklı anlatım yapan genler bakımından zenginleştirilmiş cDNA kütüphaneleri kurularak, bu genlerin izolasyonları için kullanılmıştır. Örneğin, MCF7 meme kanser doku hücrelerinde BRC1 geni tarafından indüklenen tüm genlerin klonlaması amacıyla kullanılmıştır [54]. Yine kanserle ilgili başka bir araştırmada SSH yöntemiyle, kolon adenomalarında normal kolon hücrelerine göre farklı anlatım yapan genler izole edilmiştir [55]. Bitkilerde ise özellikle farklı gelişim safhalarında ve çeşitli biyotik ve abiyotik streslerle anlatımı uyarılan genlerin belirlenmesinde SSH yönteminin uygulandığı çalışmalar vardır [56], [57], [58].

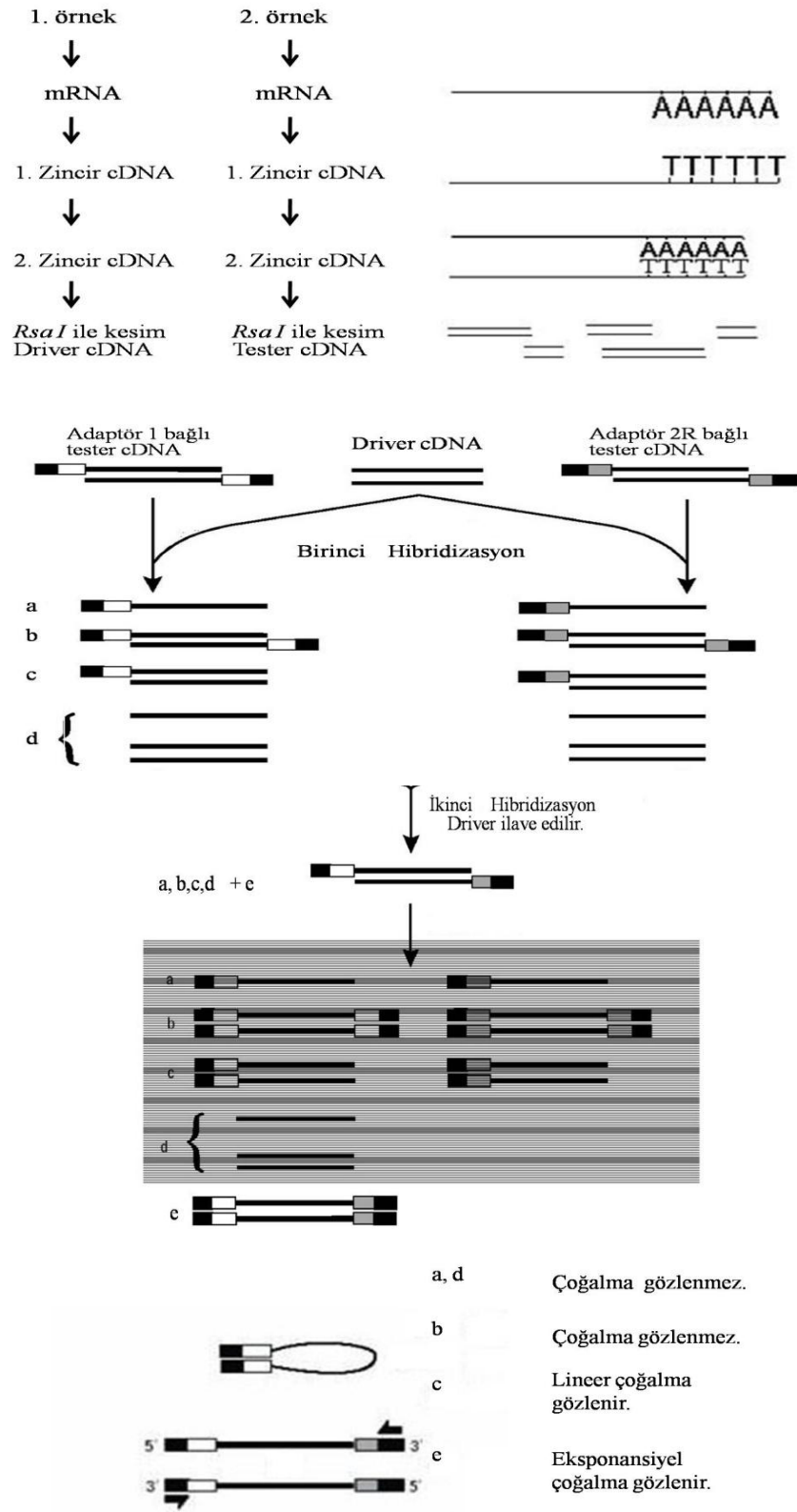
SSH işleminde iki hücre popülasyonunda nadir ve yaygın olarak anlatımı yapılan genlerin düzeyi normalize edilmektedir. Belirli bir koşulda tester olarak adlandırılan örnekte driver olarak adlandırılan örneğe göre fazla anlatım yapan genler, birbirini takip eden iki hibridizasyon ve iki PCR yoluyla belirlenir. Bu yöntemde karşılaştırılması istenen iki hücre popülasyonundan çıkarılan mRNA' lar ayrı ayrı cDNA' ya dönüştürülür. cDNA' lar dar bir boyut aralığı oluşturmak için seyrek kesen *Rsa1* enzimi ile kesilir. Tester olarak adlandırılan örnek iki gruba ayrılır ve her grubun 5' ucuna adaptör1 ve adaptör 2R olmak üzere iki ayrı adaptör takılır.

İlk hibridizasyonda driver örneğinin aşırı bir miktarı ayrı ayrı iki tester grubuna da katılmasıyla aynı koşullarda hibridizasyon sağlanır. Testerde aynı konsantrasyonda bulunan cDNA' larla driverde eşit miktarda veya daha fazla bulunan cDNA' larla driverde daha az bulunan cDNA' lara göre hızlı bir biçimde hibridizasyon gerçekleşir. Bu

da testerda daha yüksek oranda bulunan tek zincirli türlerin zenginleşmesine yol açar. Tek zincirli türlerin konsantrasyonunun normalizasyonu ayrıca yaygın olarak bulunan cDNA' ların nadir bulunanlara göre daha hızlı dubleks oluşturması ile de sağlanır.

İkinci hibridizasyonda ise ilk hibridizasyonun ürünleri karıştırılarak yeni bir çıkarım için yine aşırı miktarda driver DNA katılır. İki hibridizasyonda da çıkarıma uğramamış biri adaptor1 diğeri adaptör 2R içeren cDNAlar çoğaltılabilir dubleksler oluşturur (Şekil 2. 5' te bunlar e hibritleri olarak gösterilmiştir). Hibridizasyon reaksiyonlarından sonra küt uçlu cDNA' lar oluşturmak için adaptor çıkıntıları DNA polimeraz enziminin uçları doldurma aktivitesinden faydalanılarak tamamlanır. e hibritleri farklı olarak ekspres edilen cDNA' lardır ve uç doldurma işleminden sonra yalnız bunlar nested primerler için bağlanma bölgeleri içerir.

Hibridizasyondan sonra dubleksler adaptörlerin içerisinde dizini bulunan primer1 kullanılarak PCR' la çoğaltılır. Bu, dubleksin yapısına bağlı olarak farklı amplifikasyona neden olur. Şekilde a ve b olarak gösterilen moleküller primer dizinini taşımadıklarından çoğaltılamazlar. İki zincirinde de aynı adaptörün taşındığı b molekülleri adaptörlerin kendi arasında komplementer olması nedeniyle çoğaltılamazlar. c molekülleri yalnız bir adaptör taşıdığından bir primer için bağlanma bölgesi vardır ve linear olarak çoğaltılabilir. Bu durumda yalnız ucunda iki farklı adaptör olan e molekülleri eksponansiyel olarak çoğaltılabilir. Sekonder PCR ise farklı ekspres anlatım yapan genleri daha da zenginleştirmek amacıyla iki adaptörde de dizinleri bulunan nested primerler kullanılarak gerçekleştirilir.



Şekil 2. 5 Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu (Diatchenko vd., [53])

Reaksiyon sonunda PCR ürünleri T/ A vektörlerine ya da adaptörlerde bulunan kesim bölgelerinin yardımıyla uygun vektörlere konularak *E. coli'* ye aktarılır ve bir çıkarımlı cDNA kütüphanesi oluşturulur. Bu safhadan sonra iki farklı strateji izlenebilir. Birinci yaklaşımda kütüphanenin çıkarım yapılmamış tester ve driver çıkarım yapılmış tester ve driver olmak üzere dört ayrı cDNA grubundan hazırlanan proplarla taranması ile pozitif klonlar seçilir. İkincisi kütüphanedeki tüm cDNA' ların dizin analizi yaptırılarak EST dizinleri oluşturulmak için biyoinformatik analizlerin yapılmasıdır. Bu çalışmada ikinci strateji izlenmiştir.

2.4 cDNA Kütüphaneleri

Karşılaştırmalı genom çalışmalarında gen dizilerini çözmek, genlerin fonksiyonlarını bulmak için önemli bir adımdır. Büyük bir genomda sadece genlerin kodlandığı bölgelere ulaşmak için cDNA sentezinin yapılması araştırmacıların hedefe ulaşmasını kolaylaştırıcı bir yöntemdir.

Farklı yöntemlerle oluşturulan bu cDNA' lardan kütüphaneler kurulur ve buradaki cDNA ların nükleotit dizi bilgisinin çözülmesi ile EST' ler oluşturulur. EST oluşturulmasının amacı tüm bir organizma ya da organizmaların istenilen hücre, doku veya organları için özgün olarak anlatımı yapılan genlerin belirlenmesidir [59].

2.5 Biyoinformatik Analizlerle EST (Expressed Sequences Tags) Oluşturulması

EST (ekspres olmuş dizi işaretleri) dizin analizi sonucu elde edilen genom parçalarıdır [60]. EST' ler bilinmeyen genlerin tanımlanması ve yerlerinin tespit edilmesinde, gen ekspresyonu ve regülasyonu hakkında veri toplanması ve genom haritalarının oluşturulması konusunda kısa süreli ve ekonomik bir yol sağlar.

Gen tespit edilmesi işleminde, EST koleksiyonları için başlangıç materyalinin cDNA olması, genomik dizilere üstünlük sağlar. Genomun büyük bir kısmı gen kodlamayan bölgelerden oluştuğu için genomik dizilerden genlerin tespit edilmesi zordur. İşlevsel genomik çalışmalarda elde edilen cDNA dizinlerinin EST olarak değerlendirilebilmesi için ham dizinlerin işlenmesi ve birleştirilmesi gereklidir. İşlenme, ham EST dizilerinin içerdiği vektör, adaptör ve düşük değerli dizilerin uzaklaştırılması ve verilerin daha iyi incelenmesi için temizlenmesidir. Temizlenme için internetten ulaşılan PHRED, Phill

Green' in CROSS- MATCH, TIGR' den Lucy ve SeqClean, NCBI tarafından sağlanan VecScreen gibi çevirim içi olmayan programlar bulunmaktadır [51]. Bu programın dışında CHROMAS programı da dizilerden vektör dizilerinin temizlenmesi için kullanılır. Birleştirmede önemli sorun kontik olarak bilinen dizilerin kalitesinin yüksekliğidir. Fragment birleştirmede PHRAP ve CAP3 programları kullanılır. CAP3 programı ile elde edilen sonuçların GenBank veritabanında BLASTN ve BLASTP analizleri yapılır.

2.6 GenBank

GenBank, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH National Institutes of Health) kampüsünde bulunan, Ulusal Tıp Kütüphanesi (NLM National Library of Medicine) bünyesinde çalışan, Ulusal Biyoteknoloji Merkezi (NCBI National Center for Biotechnology Information) tarafından oluşturulup dağıtımı yapılan, biyolojik ve bibliyografik veri desteği sağlayan, nükleotit ve protein dizilerinin toplandığı kamuya açık bir veri tabanıdır.

NCBI; GenBank araştırmacılarının doğrudan gönderdikleri dizi bilgileri ile oluşturulmaktadır. Diğer veri kaynakları ise, EST dizilerinin ve diğer dizileme merkezlerinin gönderdiği dizilerle oluşturulmaktadır.

NCBI, Ensembl (European Molecular Biology Laboratory), UCSC (University of California Santa Cruz), GO (Gen Ontology), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanları yaygın olarak kullanılmaktadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Bitki Materyali

Hordeum spontaneum (TR 62199) tohumları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

3.2 Besiyerler

3.2.1 Bitki Büyütme Besiyeri

Hoagland Besiyeri

Makro Besin Çözeltisi

Besin çeşidi	Miktarı	Stok (M)	Element kaynağı
KNO ₃	10,1 g	1.00	N/ K
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	23,615 g	1.00	Ca
KH ₂ PO ₄	13,61 g	1.00	P
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65 g	1.00	Mg/S

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek, 100' er ml ye tamamlandı. Çözeltiler oda sıcaklığında bekletildi.

Mikro Besin Çözeltisi I

Besin çeşidi	Miktarı	Stok (M)	Element kaynağı
KCl	0,075 g	1.00	Cl
H ₃ BO ₃	1,546 g	25.00	B
MnSO ₄ . H ₂ O	0,338 g	2.00	Mn
CuSO ₄	0,016 g	0.10	Cu
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ . 4H ₂ O	0.018 g	0.10	Mo

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 1lt' ye tamamlandı. Çözeltiler oda sıcaklığında bekletildi.

Mikro Besin Çözeltisi II

Besin çeşidi	Miktarı	Stok	Element
Fe(Na)EDTA	7.342 g	20.00 M	Fe/Na

Fe ve Na kaynağı olarak 200mL Fe(Na)EDTA karışımı hazırlandı.

Hoagland Besin Çözeltisi

Çözelti	0.10 X	0.25 X	0.50 X	1.00 X
KNO ₃	0.6	1.5	3.0	6.0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.4	1.0	2.0	4.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.2	0.5	1.0	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1	0.25	0.5	1.0
Fe(Na)EDTA	0.2	0.5	1.0	2.0
1 X mikro besin çözeltisi	0.2	0.5	1.0	2.0

Çinko Kaynağı

10 µM Zn₂SO₄ kullanıldı.

Hazırlanan çözeltilerden Huang vd. makalesi [61] referans alınarak 0.25 X oranında 1L karışım hazırlandı.

3.2.2 *E.coli* Büyütme Besiyeri

Luria Broth (LB)

Besin çeşidi	Miktarı
Trypton	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 1lt' ye tamamlandı. pH 7' ye ayarlandıktan sonra 121 °C' de 30 dakika otoklavlandı.

Katı LB için sıvı 1l LB ye 15 g Agar ilave edildikten sonra 121 °C' de 30 dakika otoklavlandı.

SOB (500 ml)

Besin çeşidi	Miktarı
Trypton	10 g
Yeast extract	2,5 g
NaCl	0,292 g
MgCl ₂	1,015 g
KCl	0,093 g

Hazırlanan SOB, 121 °C' de 30 dakika otoklavlandı.

SOC için 98 g SOB' ye 2 ml glikoz ilave edildi.

3.3 Tamponlar ve Solüsyonlar

Tampon veya çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
Ampisillin stok solüsyonu	100 mg/ ml ddSu ilave edildi. Filtreden geçirildi. – 20 °C' de bekletildi.
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1' lik solusyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
Etanol	% 75- 80 stok solüsyonu hazırlandı.

dNTP karışımı	20 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.
Etidyum bromid stok solüsyonu (EtBr)	5 mg/ ml EtBr' e steril deiyonize su ilave edildi.
Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (25: 24: 1)	25 ml Fenol, 24 ml Kloroform ve 1 ml Izoamil alkol karıştırıldı.
IPTG stok solüsyonu	1 M (240 mg/ml) izopropanol β -D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20 °C' de saklandı.
Kloroform/ Izoamil alkol (24: 1)	24 ml Kloroform ve 1 ml Izoamil alkol karıştırıldı.
MOPS (5 X)	0.2 MOPS pH 7, 50 mM NaOAc, 50 mM EDTA ve DEPC' li su bir gece inkübe edildikten sonra otoklavlandı.
TBE çözeltisi (5 X)	54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1 L saf suya tamamlandı.
X- Gal stok solüsyonu	50 mg 5-bromo-4- kloro-3-indol β - D- galaktozidaz 1ml DMF(di metil formamid) de çözüldü. Alümiyum folyo ile sarılarak -20 °C' ye kaldırıldı.
TE çözeltisi (1 X), pH 8.0	10 mM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
EDTA solüsyonu	250 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl karışımı hazırlandı. pH 8.0' e ayarlandı.
DNA loading çözeltisi	250 mM Tris-HCl pH 7.5, % 0.2 bromfenol mavisi, % 0.2 ksilen siyanol ve % 40 gliserol karışımı
RNA loading çözeltisi	1mM EDTA, pH 8.0, % 0.4 bromfenol mavisi ve % 50 gliserol karışımı, DEPC' li su ilave edildi.

3.4 Moleküler Markırlar

RiboRuler high range RNA Ladder (n/ 2 μ l)	6000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 500 bp ve 200 bp bantları gözlenir.
GeneRuler 100 bD plus DNA ladder	1 X' lik TBE' de 3000 bp ile 100 bp arasında toplam 14 bant gözlenir.
Pst1' le kesilmiş Lambda DNA/ EcoRI + HindIII	%1' lik agarozda 21226 bp ile 564 bp arasında toplam 11 bant gözlenir.

3.5 Enzimler ve Kimyasallar

3.5.1 Enzimler

Taq polimeraz	Promega Corporation
50 X adv. cDNA polimeraz	Clontech

3.5.2 Kimyasallar

Fe(Na)EDTA, KNO₃ , Ca(NO₃)₂.4H₂O, KH₂PO₄, NH₄H₂PO₄, KCl, MgSO₄.7H₂O, H₃BO₃ , MnSO₄.H₂O, CuSO₄, (NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O, Zn₂SO₄ kimyasalları Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

Trizol Reagent (Invitrogen) den alındı.

3.6 Kitler

mRNA izolasyon kiti	Oligotex mRNA Spin- Column
SSH kiti	Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kiti (Clontech, 2002)
PCR pürifikasyon, (sıfırlama) kiti	İnvitrogen

3.7 Vektör ve Bakteri Suşları

pGEM®-T Easy, JM 109	Ampisillinde mavi- beyaz seçilim gözlenir (Promega).
----------------------	---

3.8 Oligonükleotitler

Larsson ve ark. [62]' deki makalesinden GADPH F1 ve GADPH R1 primerleri Alfa DNA firmasına sentezlettirildi. Adaptör 1 ve adaptör 2R primerleri SSH kitinde

bulunmaktadır.

Primer adı	Primer dizini
GADPHF1	5' –TTC ACT GAC AAG GAC AAG GC -3'
GADPH R1	5'-CCA CCT CTC CAG TCC TTG CT - 3'
cDNA sentez primeri, pr16	5'-TTTT GTACAAGCTT - 3'
Adaptör 1	5' GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGG CAGGT -3' , 3'-CCCGTCCA-5'
Adaptör 2R	5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGG GCGGT -3' , 3'-GCCTCCCGCCA-5'
PCR primerleri	P1 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC - 3' P2 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA - 3' PN1 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT - 3' PN2 5'-AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT - 3'

3.9 Programlar

3.9.1 Phred ve Phrap

Analizden sonucu elde edilen dizilerden vektör dizilerinin uzaklaştırılması için PHRED ve örtüşen dizilerin birleştirilmesi işlemleri için PHRAP unix paket programları kullanılmıştır. Washington Üniversite'sinden Phil Green ve grubunun oluşturduğu bu programlar bu gruptan akademik kullanıcı olarak istenmiştir [63]. Programlar CYGWIN programı kullanılarak çalıştırılmıştır.

Bu çalışmada PHRAP programı yerine CAP3 programı kullanılmıştır.

3.9.2 Chromas

Vektör dizilerinin çıkartılması için kullanılan ve internetten indirilebilen bir programdır.

Dizinlerin kromatogram dosyalarını açar ve programa girilmiş olan vektör dizinlerini uzaklaştırır.

3.9.3 CAP3

Örtüşen dizilerin birleştirilmesi için kullanılan PHRAP programına alternatif bir programdır.

PHRED programının oluşturduğu baz quality değerlerini kullanır. Dizinlerdeki kalitesiz bölgeleri keser, örtüşen dizileri değerlendirir, hesaplar ve consensus dizileri oluşturur. PHRAP programına göre daha güvenilir olması sebebiyle çalışmada bu program tercih edilmiştir.

3.9.4 Beap

Koltes ve arkadaşları (2009) tarafından geliştirilen bu program phrap ve CAP3 programları ile oluşturulan consensus (kontik) dizilerinin kontrolünde kullanılır. CAP3 programı ile oluşturulan “ .ace” uzantılı dosyayı input olarak kullanır. Kontiklerdeki örtüşen dizileri örtüştükleri yerleri ile birlikte gösterir.

3.9.5 VecScreen

EST dizisinde bulunması istenmeyen vektör ve adaptör dizinlerinin uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığını kontrol etmek için kullanılan ve internet üzerinden çalışılan programdır. [64]’ teki internet adresinden yararlanılmıştır.

3.10 Bitki Büyütme Koşulları

Çimlendirilmiş olan arpa tohumlarının gelişimi için makro besin, mikro besin, ZnSO₄ ve Fe-EDTA çözeltileri hazırlandı [13], [61].

3.10.1 Tohumların Çimlendirilmesi

Hordeum spontaneum tohumları alkollü su ile yıkandıktan sonra saf suda, arada karıştırılarak 1 saat bekletildi. Alkollü sudan çıkartıldıktan sonra çimlenmenin daha kolay gerçekleşmesi için tohumların kabukları soyuldu. Tohumlar, nemli hale getirilmiş

perlitte kabın 2 cm altında olacak şekilde eşit aralıklarla yerleştirildi. Üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 5 gün çimlenmeye bırakıldı.

3.10.2 Çimlenen Tohumların Çözeltiye Aktarılması ve Bitkilerin Büyütülmesi

Çimlenen tohumlar saf su ile perlitlerinden temizlendikten sonra Hoagland Besin Çözeltisine ekildi. Hoagland besin çözeltisinden iki grup hazırlandı. Birinci gruba çinko kaynağı ilave edilmedi. İkinci gruba bitkilerin gelişmesi için yeterli olan 10 µM çinko kaynağı ilave edildi [65].. Besiyerleri hazırlanırken için çift distile su kullanıldı.

Yetiştirilen arpa fideleri sünger kapaklar yardımıyla çözeltilere yerleştirildi. Ekim, her bir kaba 13 adet çimlenmiş tohum gelecek şekilde planlandı. Kaplar 42 gün boyunca sera koşullarına alınarak fideler büyümeye bırakıldı. Çözeltiler, ortalama 15 günde bir olmak üzere iki defa yenilendi. Sera koşulları, sıcaklık; gündüz 21 °C, gece 16 °C, fotoperiyot; 14 saat ışık, 10 saat karanlık ve nem % 65 olacak biçimde hazırlandı.

3.11 Bitki Örneklerinin Toplanması

42 gün boyunca büyütülen bitkiler, büyüme ortamından bitkiye zarar verilmeden besi yerinden çıkartıldı. Arpa bitkileri çift distile su ile yıkandı ve kâğıt havlu üzerinde kurutuldu. Temiz bir pensle kök, gövde ve yapraklar birbirinden ayrıldı. Her bir dokunun yaş kütleleri ölçüldü. Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre' de ölçümü yaptırılacak örnekler ayrı olarak saklandı. Ölçümden sonra, hazırlanmış eksplantlar RNA analizi yapılana kadar sıvı azot içerisinde dondurularak, -80 °C' de saklandı.

3.12 Bitkilerin Ağır Metal Analizi

Çinko verilmeyen ve 10 µM konsantrasyonunda çinko verilen 42 günlük arpa bitkilerinin çinko miktarlarının tespiti için Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) yöntemi kullanıldı. AAS ölçümü, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi' nde yaptırıldı.

AAS için ayrılmış olan arpa bitkileri, köklerine bulaşan çözeltilerden arındırılmak için distile su ile yıkandı. Kâğıt havlu üzerinde kurutuldu. Temiz bir pensle bitkilerin kök, gövde ve yaprak dokuları birbirlerinden ayrıldı. Her bir kısmın yaş kütleleri ölçüldükten

sonra kağıt zarflar içine yerleştirildi ve etiketlendi. Hasat işleminden sonra eksplantlar, 60 °C' de 3 gün boyunca kurutuldu. Kurutulmuş bitki parçalarının kuru kütleleri ölçüldü. Elde edilen kuru bitkiler AAS ölçümüne hazırlandı.

3.13 RNA İzolasyonu

RNA molekülleri nükleotitlerindeki riboz molekülünün OH grubu nedeniyle biyolojik ortamlarda fazlaca bulunan ribonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır. Bu nedenle RNA izolasyonundan önce ortamdaki RNAz kontaminasyonunun oluşmaması için Applichem DEPC solüsyonu kullanıldı.

RNA izolasyonundan önce kullanılacak havan ve havanelleri, tüm cam ve plastik malzemeler % 0,1' lik DEPC' li su içerisinde bir gece bekletildi, daha sonra 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Yine benzer şekilde, izolasyonda kullanılacak Tris dışındaki tüm solüsyonlara ve saf suya % 0,1 oranında DEPC ilave edildi. Bir gece boyunca bekletilip 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Tris, önceden DEPC ile muamele edilip otoklavlanmış çift distile suda hazırlandı.

3.13.1 Bitkilerden Total RNA İzolasyonu

Kontrol grubu olan kök, gövde ve yaprak kısımları ile Çinko içermeyen kök, gövde ve yaprak kısımlarından total RNA izolasyonu Trizol Reagent (Invitrogen) kullanılarak yapıldı.

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örnekleri, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde toz haline getirilerek, 2 ml' lik mikro merkezkaç tüpüne alındı. Her 100 mg örnek için 1 ml Trizol Reagent (bitki ağırlığının % 10' u olacak şekilde) ilave edildi. Nükleoprotein komplekslerinin ayrışması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler kabaca vortekslendi. 1 ml Trizol Reagent için 0,2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2- 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra 12000 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda tüpün içindeki karışım, alt kırmızı faz, interfaz ve renksiz üst faz olmak üzere üçe ayrıldı. RNA üst fazdaydı. Üstteki faz ayrı bir tüpe alınarak 1 ml Trizol Reagent için 0,5 ml olacak şekilde izopropanol eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üst faz alınarak, 12000 xg hızda 4 °C' de 20

dakika santrifüjlendi.

RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml Trizol Reagent için 1 ml %75' lik etanol eklenip, 7500 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dökülüp pellet şeffaf görününceye kadar kurutuldu. Kuruyan pellet 100 µl DEPC' li su içerisinde çözülerek, 65 °C' de 10 dakika inkübe edildi. Inkübe edilen örnekler -80 °C' de saklandı.

3.13.2 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Trizolle çıkartılmış RNA' ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbanşı ölçüldü. RNA' ların konsantrasyonları $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times$ sulandırma faktörü formülüyle hesaplandı.

3.13.3 RNA' nın Formaldehit Jel Üzerinde Analizi

3.13.3.1 Jelin Hazırlanması

Tüm elektroforez aparatları DEPC' li su ile yıkanarak temizlendi. % 1' lik jel hazırlamak için, 1 g Agaroz (Applichem), 20 ml 5 X MOPS çözeltisi, 62,5 ml DEPC' li su ile çözüldü, 60 °C' ye soğutuldu. İçerisine 60 °C' ye ısıtılmış 17,5 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü.

3.13.3.2 RNA Örneklerinin Hazırlanması

Her bir RNA örneğinden Ek A' da verilen miktarlarda, 2 µl 5 X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 0,5 µl Etidyum Bromid ilave edilerek, 55 °C' de 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma 4 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Total RNA' lar MOPS tamponuyla hazırlanmış % 1' lik Agaroz jel üzerinde 75 V' ta 20 dakika ve 60 V' da 1 saat 15 dakika yürütüldü.

3.14 Total RNA' dan mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu Oligotex mRNA Spin- Column Protokolü kullanılarak yapıldı. Bitki örneklerinden çıkarılan total RNAlar, toplam miktar 0,25- 0,50 mg ve son hacim 500 µl

olacak şekilde 500 µl RNaz free water, 30 µl Oligotex süspansiyonu ve 500 µl OBB tamponu ile karıştırılarak mRNA izolasyonunda kullanıldı.

Sekonder yapıların yok edilmesi için RNA çözeltisi, 70 °C' de 5 dakika ve 25 °C' de 10 dakika inkübe edildikten sonra 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra pellet 2 defa 500 µl OW 2 tamponu ile yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika Small spin columnda santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra kolonda kalan mRNA' lar, 70 °C' de bekletilen 10 µl OEB tamponu ile 2 defa yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 1 dakika santrifüjlenerek 1. ve 2. elüsyonlar oluşturuldu. Oluşturulan mRNA elüsyonları -80 °C' de saklandı.

3.14.1 mRNA Spot Testi

mRNA miktarını belirlemek amacıyla, 0.25 g Agaroz, 20 ml DEPCli su ile çözüldü, 60 °C' ye soğutuldu. İçerisine 3 µl Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine döküldü.

Kontrol RNA' sı (1µg/ 1µl) 2,5, 5, 25 ve 50 kez sulandırılarak, sırası ile 100 ng, 50 ng, 25 ng ve 12,5 ng' lık sulandırma serileri oluşturuldu. Jele 1 µl spotlandı. İzole edilen 1. ve 2. elüsyon mRNA' larda jele 1µl spotlandı. Örnekler jel üzerine damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Elde edilen fotoğraf üzerinde kontrol RNA' sı göz önüne alınarak miktar hesabı yapıldı.

3.15 cDNA Sentezi

Normal ve Çinko eksik koşullarda yetiştirilen *Hordeum spontaneum* kök, gövde ve yapraklarından cDNA sentezi Clontech PCR-select cDNA Substraction Kiti kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde 2 µg mRNA kullanılarak yapıldı. Çinko eksik ortamda yetiştirilmiş yabani arpadan hazırlanan mRNA' lardan (polyA⁺RNA) tester cDNA ve yine Çinko normal ortamda yetiştirilmiş yabani arpadan hazırlanan mRNA' lardan da driver cDNA hazırlandı.

3.15.1 cDNA Sentez Primerinin Bağlanması

cDNA sentezi için bitkinin yaprak, gövde ve kök mRNA' larına sentez primeri bağlandı. Çizelgede verilen miktarlar doğrultusunda örnekler tüplere ilave edildi. 70 °C' de 5- 8 dakika thermal cyclerda (Ependorf) ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.

Çizelge 3. 1 Yaprak, gövde ve kök mRNA örneklerine cDNA sentez primerinin bağlanması

	Yaprak kontrol driver	Yaprak çinkosuz tester	Gövde kontrol driver	Gövde çinkosuz tester	Kök kontrol driver	Kök çinkosuz tester
polyA⁺ RNA	20 µl	20 µl	16 µl	20 µl	20 µl	20 µl
cDNA sentez primeri (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
dH₂O (µl)	-	-	4 µl	-	-	-
Toplam	21 µl	21 µl	17 µl	21 µl	21 µl	21 µl

3.15.2 Birinci Zincir cDNA Sentezi

Primer bağlanmış reaksiyonların üzerine, tampon çözeltiler kitteki miktarlar doğrultusunda çizelgedeki gibi ilave edildi. Tüpler 42 °C’ de thermal cycler’ da 2 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 2 Yaprak, gövde ve kök mRNA örneklerinin birinci zincir cDNA sentezi

	Yaprak kontrol driver	Yaprak çinkosuz tester	Gövde kontrol driver	Gövde çinkosuz tester	Kök kontrol driver	Kök çinkosuz tester
Primer bağlanmış rxn	21 µl	21 µl	17 µl		21 µl	21 µl
5 X birinci zincir tamponu	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Steril H₂O	-	-	4 µl	-	-	-
RT enzim(AMV 20 u/µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Toplam	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

3.15.3 İkinci Zincir cDNA Sentezi

Birinci zincir reaksiyonunun üzerine tampon çözelti kitteki miktarlar doğrultusunda çizelgedeki gibi ilave edildi. Tüpler 16 °C’ de thermal cycler’ da 2.5 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 3 Yaprak, gövde ve kök mRNA örneklerinin ikinci zincir cDNA sentezi

	Yaprak kontrol driver	Yaprak çinkosuz tester	Gövde kontrol driver	Gövde çinkosuz tester	Kök kontrol driver	Kök çinkosuz tester
Birinci zincir cDNA	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
5X ikinci zincir tamponu	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
20X ikinci zincir enzim kokteyli	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Steril H₂O	44 µl	44 µl	44 µl	44 µl	44 µl	44 µl
Toplam	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

3.15.4 cDNA Uçlarının Kütleştirilmesi

İnkübe edilen cDNA moleküllerinin uçlarının kütleştirilmesi için tüplere aşağıdaki işlemler uygulandı.

Çizelge 3. 4 Yaprak, gövde ve kök cDNA örneklerinin uçlarının kütleştirilmesi

ds cDNA	100 µl	İnkübasyon
T ₄ DNA polimeraz (3 u/ µl)	2 µl	16 °C 30 dakika

cDNA uçlarının kütleştirilmesinden sonra tüplere 4 µl EDTA/ Glikojen katılarak

reaksiyonlar durduruldu.

Tüplere 100 µl Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (25: 24: 1) ilave edilerek, tüpler 14000 rpm hızda 10 dakika 23 °C' de santrifüjlendi. Üst fazlar ayrı tüplerde toplanarak aynı santrifüj koşullarında 100 µl Kloroform/ Izoamil alkol (24: 1) ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Üst fazlar toplandı ve tüplere 40 µl 4M NH₄OAc ve 300 µl % 100 etanol katılarak 1 gece bekletildi.

Bir gece bekletilen tüpler, 14000 rpm' de 40 dakika 4 °C' de santrifüjlendi. Üst faz ayrı bir tüpte toplanarak saklandı. Çökelti üzerine 500 µl % 80 Etanol katılarak, 14000 rpm hızda 10 dakika 4 °C' de santrifüjlendi. Üst faz ayrı bir tüpte toplanarak saklandı. Çökelti üzerine 500 µl % 80 Etanol katılarak, 14000 rpm hızda 15 dakika 4 °C' de santrifüjlendi. Pellet, Etanolün uçması için 20 dakika bekletildi. Tüplerin üzerine 50 µl dI H₂O ilave edilerek DNA' ların çözünmeleri sağlandı. 50 µl cDNA' dan 6.5 µl agaroz jelde kesim reaksiyonunun kontrolü için ayrıldı ve kalan 43.5 µl kesim için kullanıldı.

3.15.5 *RsaI* Kesimi

Belirli bir uzunluk aralığında küt uçlu cDNA' lar oluşturmak için dört bazda kesim yapan *RsaI* enzimiyle kitteki miktarlar doğrultusunda ve çizelgede verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. Tüpler 37 °C' de thermal cycler' da 1.5 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 5 Yaprak, gövde ve kök cDNA örneklerinin *RsaI* enzimi ile kesimi

	Yaprak kontrol driver	Yaprak çinkosuz tester	Gövde kontrol driver	Gövde çinkosuz tester	Kök kontrol driver	Kök çinkosuz tester
ds cDNA	44 µl	44 µl	43.5 µl	43.5 µl	44 µl	44 µl
10 X <i>RsaI</i> kesim tamponu	7.5 µl	7.5 µl	5 µl	5 µl	7.5 µl	7.5 µl
<i>RsaI</i> enzimi	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Su	47 µl	47 µl	50 µl	50 µl	47 µl	47 µl
Toplam	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Kesim reaksiyonundan sonra tüplerden jel yapımı için 5' er µl alındı ve 3,5 µl 20 X EDTA/ Glikojen katılarak reaksiyon durduruldu.

50 µl Fenol/ Kloroform/ Izoamil alkol (25: 24: 1) katılarak, 14000 rpm hızda 10 dakika 23 °C' de santrifüj yapıldı. Üst faz ayrı bir tüpte toplanarak aynı santrifüj koşullarında 100 µl Kloroform/ Izoamil alkol (24: 1) ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Üst faz toplandı. Bu faza toplanan örneğin yarısı miktarında 4 M NH₄OAc ve toplanan örneğin iki buçuk katı kadar % 100 etanol katıldı. Örnekler 4 °C' de 1 gece inkübe edildi. Bir gece bekletilen tüpler, 14000 rpmde 40 dakika 4 °C' de santrifüjlendi.

Üst faz ayrı bir tüpte toplanarak saklandı. Çökelti üzerine 200 µl % 80 Etanol katılarak, 14000 rpm hızda 5 dakika 4 °C' de santrifüj yapıldı. Üst faz ayrı bir tüpte toplanarak saklandı. Çökelti üzerine 200 µl % 80 Etanol katılarak, 14000 rpm hızda 5 dakika 4 °C' de santrifüj yapıldı. Pelletler, Etanolün uçması için 20 dakika bekletildi.

Tüplerin üzerine kontrol gruplarına 5,5 µl dl H₂O, çinkosuz gruplara 2,5 µl dl H₂O ilave edilerek DNA' ların çözölmeleri sağlandı.

3.15.6 *RsaI* Kesim Ürünlerini Jel Üzerinde Analiz

RsaI enzimi ile kesilmiş driver ve tester cDNA' lar jel üzerinde analiz edildi. % 1' lik jel hazırlamak için 0,5 g Agaroz, 50 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözöldü. 60 °C' ye soğutulup içerisine 2 µl (mg/ ml) Etidyum Bromid eklenerek jel tepsisine dököldü. 70 V' ta 5 dakika ve 60 V' ta 45 dakika yürütöldü.

3.16 Adaptör Ligasyonu

RsaI enzimi ile kesilmiş cDNA' lardan 1 µl alınarak 5 µl dl H₂O seyreltildi. Geriye kalan cDNA' lardan 3 µl' si birinci hibridizasyon için, 1 µl' si ikinci hibridizasyon için kullanıldı. Yaprak, gövde ve kök örnekleri için ayrı ayrı adaptör ligasyonları kuruldu.

RsaI' le kesilmiş olan cDNA örneklerine adaptörler (Adaptör 1 ve Adaptör 2) eklendi. Reaksiyonların üzerine, kitte bulunan 5 X ligasyon tamponu (250 mM tris-HCl- pH 7.8, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.25 mg/ ml BSA), 4 µl T4 DNA ligaz enzimi (400 unit/ µl, 3 mM ATP) ilave edildi.

Master karışımı için 12 µl steril su, 8 µl 5 X ligasyon tamponu ve 4 µl T4 DNA ligazdan oluşan bir reaksiyon karışımı yapıldı.

Çizelge 3. 6 Yaprak, gövde ve kök örneklerinin adaptör ligasyonu

	Çinkosuz 1	Çinkosuz 2R	Kontrol 1	Kontrol 2R
Seyreltilmiş tester cDNA	2 µl	2 µl	-	-
Seyreltilmiş driver cDNA	-	-	2 µl	2 µl
Adaptör 1 (10 µM)	2 µl	-	2 µl	-
Adaptör 2 (10 µM)	-	2 µl	-	2 µl
Master karışımı	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Hazırlanmış 10 µl' lik örneklerden; Çıkarılmamış tester çinkosuz cDNA' sı için yeni bir tüp içerisine 1 µl Çinkosuz- 1 ve 1 µl Çinkosuz- 2R reaksiyonlarından birleştirildi. Çıkarılmamış driver kontrol cDNA sı için ise başka bir tüp içerisine 1 µl kontrol- 1 ve 1 µl kontrol- 2R reaksiyonlarından alındı.

Örnekler karıştırıldıktan sonra 16 °C' de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1 µl EDTA/ Glikojenle reaksiyon durduruldu. Ligaz enziminin inaktivasyonu için 72 °C' de 5 dakika inkübe edildi.

3.16.1 Adaptör Ligasyonunun PCR' da Kontrolü

Tüm ligasyon reaksiyonlarının PCR' la kontrolü için, adaptor içinde dizini bulunan ve *Hordeum vulgare* bitkisinin hücrelerinde sabit olarak anlatım yaptığı kabul edilen Gliseraldehid Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) enziminin gen primerleri kullanıldı. Önceden tasarlanmış olan GAPDH primerleri (GADPHF1 ve GAPDH R1 primeri için) Larsson ve ark.' ın [62]' deki makalesinden alındı ve blast analizinde primerlerin yerleri ve *RsaI* kesim bölgeleri belirlendi. GAPDH' nin *RsaI* kesim bölgeleri internette bulunan program [66] üzerinden belirlendi. *RsaI* kesim bölgelerinin primerlerin arasında olmadığı görüldü. GAPDH geni, primer bölgeleri ve enzim kesim bölgeleri Ek B' de verilmiştir.

Primerlerin çözünmesi için gerekli olan TE hazırlandı. Suyun pH değerinden DNA' nın depürinasyona (A- G arasında) uğramaması için su kullanılmadı.

Çinkosuz ve kontrol grubunun cDNA' larının PCR reaksiyonu yapıldı. Ligasyon reaksiyonlarından 1 µl (0.5 µl) alınıp 200 (99.5 µl) kez seyreltilerek PCR reaksiyonunda 2 µl kullanıldı.

500 µl' lik PCR tüpü içerisine, 2 µl kalıp cDNA, 18.6 µl dH₂O, 2.5 µl 10 X PCR tamponu, 0.5 µl 10 µM lık dNTP ve 0.4 µl 50 X Advantage cDNA polimeraz enzimi, 1 µl PCR primer, 1 µl GAPDH forward primer (20 mM) ve 1 µl GAPDH reverse primer (20 mM), 25 µl' ye tamamlandı. Karışım kök, gövde ve yaprak için ayrı olarak hazırlandı.

PCR döngüsü şöyledir ; 75 °C' de 5 dakika primer uzaması, 94 °C' de 4 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C 30 saniye denatürasyon, 56 °C 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C 60 saniye uzatma aşamaları 30 kez tekrarlandı. 72 °C' de 10 dakika son uzatma yapılarak, örnekler 4 °C' de 5 dakika bekletildi. Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

Çizelge 3. 7 Ligasyon örneklerinden PCR yapımı

	1	2	3	4	5	6	7	8
Çinkosuz 1- 1	2	2	-	-	-	-	-	-
Çinkosuz 1- 2	-	-	2	2	-	-	-	-
Kontrol 1- 1	-	-	-	-	2	2	-	-
Kontrol 1- 2	-	-	-	-	-	-	2	2
PCR Primer 1	1	-	1	-	1	-	1	-
GAPDH F 1 primer (10 µM)	1	1	1	1	1	1	1	1
GAPDH R 1 primer (10 µM)	-	1	-	1	-	1	-	1
Master karışımı	21	21	21	21	21	21	21	21
Toplam	25	25	25	25	25	25	25	25

3.16.2 Ligasyon PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz

PCR'la çoğaltılan yaprak, gövde ve köke ait cDNA' lardan 10 µl kullanılarak karışım hazırlandı. % 1' lik Agaroz jelinin hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi 3.15.6' da anlatılan şekilde yapıldı.

3.17 Birinci Hibridizasyon

Kök, gövde ve yaprak kısımlarının birinci hibridizasyon örnekleri kuruldu. Kök için 2 µl kullanıldı. 4 X Hibridizasyon Tamponu hibridizasyon öncesi oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Mineral yağ, örnek hacminin iki katı kadar ilave edildi. Örnekler 98 °C' de 1,5 dakika, 68 °C' de 8 saat, 68 °C' de bekletme olarak inkübe edildi.

Çizelge 3. 8 Yaprak, gövde ve kök örneklerinden birinci hibridizasyon yapımı

	1 Forward subs. çinkosuz 1-1	2 Forward subs. çinkosuz 1-2R	3 Revers subs. kontrol 2-1	4 Revers subs. kontrol 2-2R
<i>RsaI</i> kesimli driver (kontrol) cDNA	1,5 µl	1,5 µl	-	-
<i>RsaI</i> kesimli tester (çinkosuz) cDNA	-	-	1,5 µl	1,5 µl
Adaptör 1 bağlı tester 1-1 (çinkosuz 1-1 adaptörü takılmış)	1,5 µl	-	-	-
Adaptör 2R bağlı tester 1-2 (çinkosuz 1-2R adaptörü takılmış)	-	1,5 µl	-	-
Adaptör 1 bağlı driver 2-1 (kontrol 2-1 adaptörü takılmış)	-	-	1,5 µl	-
Adaptör 2R bağlı driver 2-2 (kontrol 2-2 adaptörü takılmış)	-	-	-	1,5 µl
4 X hibridizasyon tamponu	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Mineral yağ	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl
Toplam	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl

3.18 İkinci Hibridizasyon

Kök, gövde ve yaprak örneklerinin ikinci hibridizasyonları için deney düzenekleri kuruldu. 4 X Hibridizasyon tamponu, hibridizasyon öncesi oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. Forward için kontrol cDNA, Reverse için çinkosuz cDNA kullanıldı. Örnekler çizelgedeki gibi ilave edildi.

Çizelge 3. 9 Yaprak, gövde ve kök örneklerinden ikinci hibridizasyon yapımı

Örnekler/ Forward	Miktar		Örnekler/ Reverse	Miktar
Driver, kontrol cDNA	1 µl		Tester, çinkosuz cDNA	1 µl
4 X hibridizasyon tamponu	1 µl		4 X hibridizasyon tamponu	1 µl
Steril H ₂ O	2 µl		Steril H ₂ O	2 µl
Toplam	4 µl		Toplam	4 µl

Hazırlanan örneklerin her birinin 2 µl' si ayrı tüplere alındı. Tüplerin üzerlerine 8 µl mineral yağ ilave edildi. Örnekler 98 °C' de 1.5 dakika inkübe edildi. Geriye kalan 2 µl' lik örnekler -20 °C' ye kaldırıldı.

Forward tüpü thermal cyclerda bulunan birinci hibridizasyon forward tüpleri ile aynı anda karıştırıldı. Reverse tüpü thermal cyclerda bulunan birinci hibridizasyon reverse tüpleri ile aynı anda karıştırıldı. Tüm tüpler 1 gece 68 °C' de inkübe edildikten sonra 200 µl dilüsyon tamponu (20 mM HEPES, pH 8.3, 20 mM NaCl, pH 6.6, 0.2 mM EDTA, pH 8.0) ilave edildi. Örnekler 68 °C' de 7 dakika inkübe edildikten sonra – 20 °C' ye kaldırıldı.

3.19 1. PCR Amplifikasyonu

Yaprak, gövde ve köke ait ikinci hibridizasyon örnekleri ile bunların 100 defa sulandırma yapılmış olan çıkarılmamış örneklerinden 1 µl kullanılarak PCR kuruldu. PCR tüpü içerisine; 19.5 µl PCR su, 2.5 µl 10 X PCR rxn Tamponu, 0.5 µl dNTP karışımı (10 mM), 1 µl PCR primer 1(10 µM), 0.5 µl 50 X adv. cDNA polimeraz enzimi ilave edilerek toplam 24 µl' ye tamamlandı. Tüplerin üzerine 50 µl mineral yağ ilave edildi.

Çizelge 3. 10 Yaprak, gövde ve kök örneklerinden 1. PCR amplifikasyon yapımı

Karışım	Rxn başına
PCR su	19.5 µl
10 X PCR rxn tamponu	2.5 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0.5 µl
PCR primer 1 (10 µM)	1 µl
50 X adv. cDNA pol.	0.5 µl
Toplam	24 µl

PCR döngüsü ise şöyledir; 75 °C' de 5 dakika, 94 °C' de 25 saniye denatüre edildikten sonra, 94 °C 10 saniye denatürasyon, 66 °C 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C 90 saniye uzatma aşamaları 30 kez tekrarlandı. Örnekler 4 °C' de bekletildi.

Hibridizasyon sonuçları ve çıkarılmamış örneklerine ait PCR sonuçlarının karşılaştırılması jel üzerinde kontrol edildi.

3.19.1 1. PCR Amplifikasyonu PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz

PCR' la çoğaltılan yaprak, gövde ve köke ait saflaştırılmış 1. PCR ürünleri ve çıkarımı yapılmamış örneklerden 2' şer µl kullanılarak final hacim 10 µl olacak ve 1 X yükleme tamponu içerecek şekilde karışım hazırlandı ve kuyucuklara yüklendi. % 1' lik Agaroz jelinin hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi 3.15.6' da anlatılan şekilde yapıldı.

3.20 2. PCR Amplifikasyonu

Yaprak, gövde ve köke ait 1. PCR örneklerinden 1' er µl kullanılarak nested PCR kuruldu. Nested PCR ile iki primer çifti kullanıldı ve tek bir hedef dizi çoğaltıldı. İlk primer çifti klasik PCR'da olduğu gibi bir hedef diziyi çoğaltır. İkinci primer çifti (nested primerler) ise ilk PCR ürünü DNA parçasına bağlanarak daha kısa boydaki ikinci bir DNA parçasının çoğaltılmasını sağlar.

Yanlış bir DNA parçasının çoğaltılması durumunda, nested primerler tarafından o

parçanın ikinci kez çoğaltılma olasılığı çok düşüktür. Bu nedenle, Nested PCR ile oldukça spesifik çoğaltım sağlanmaktadır.

PCR tüpü içerisine; 18.5 µl PCR su, 2.5 µl 10 X PCR tamponu, 0.5 µl dNTP mix (10 mM), 1 µl Nested primer 1(10 µM), 1 µl Nested primer 2R (10 µM), 0.5 µl 50 X adv. cDNA polimeraz enzimi ilave edilerek toplam 24 µl' ye tamamlandı. Tüplerin üzerine 50 µl mineral yağ ilave edildi.

Çizelge 3. 11 Yaprak, gövde ve kök örneklerinden 2. PCR amplifikasyon yapımı

Karışım	Rxn başına
PCR su	18.5 µl
10 X PCR rxn tamponu	2.5 µl
Nested primer 1(10 µM)	1 µl
Nested primer 2R (10 µM)	1 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0.5 µl
50 X adv. cDNA pol.	0.5 µl
Toplam	24 µl

PCR döngüsü şöyledir; 94 °C' de 30 saniye denatürasyon, 68 °C' de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C' de 90 saniye uzatma aşamaları 12 kez tekrarlandı. Örnekler 4 °C' de bekletildi. 2. PCR sonuçlarının karşılaştırılması jel üzerinde kontrol edildi.

3.20.1 2. PCR Amplifikasyonu PCR' larından Agaroz Jel Üzerinde Analiz

% 1' lik Agaroz jelinin hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi 3.15.6' de anlatılan şekilde yapıldı. PCR' la çoğaltılan yaprak, gövde ve köke ait 2. PCR ürünlerinden 8' er µl kullanılarak karışım hazırlandı ve jele yüklendi. Final hacim 10 µl olacak ve 1 X yükleme tamponu içerecek şekilde karışım hazırlandı ve kuyucuklara yüklendi.

3.21 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Yaprak, gövde ve köke ait yapılmış olan tüm PCR 2 örnekleri 38 µl idi. 5 µl' si jel için ayrıldı. PCR saflaştırma İnvitrogen kiti ile yapıldı.

Tüplere örneklerin miktarının dört katı kadar Binding Tamponu ilave edildi ve sıvılar kolon tüplerine alındı. 1dk, 10.000 RCF ve oda sıcaklığında santrifüj edildi. Dipteki sıvı döküldü.

Kolon içine 650 µl Wash Tamponu ilave edildi. 1dk, 10.000 RCF ve oda sıcaklığında santrifüj edildi. Dipteki sıvı döküldü. Kolonda sıvı kalmasın diye 2 dakika, 10.000 RCF ve oda sıcaklığında tekrar santrifüj edildi. Kolonun alt tüpleri yenilendi. 25 µl PCR su ilave edildi. 60 °C sıcaklıkta 2 dakika bekletildi. 3 dakika, 10.000 RCF ve oda sıcaklığında santrifüj edildi ve 1. elüsyon hazırlandı. 25 µl PCR su ilave edilerek 3 dakika, 10.000 RCF ve oda sıcaklığında santrifüj edildi ve 2. elüsyon hazırlandı. Örnekler - 20 °C' ye kaldırıldı. Örneklerden 1 µl alınarak jel yapıldı.

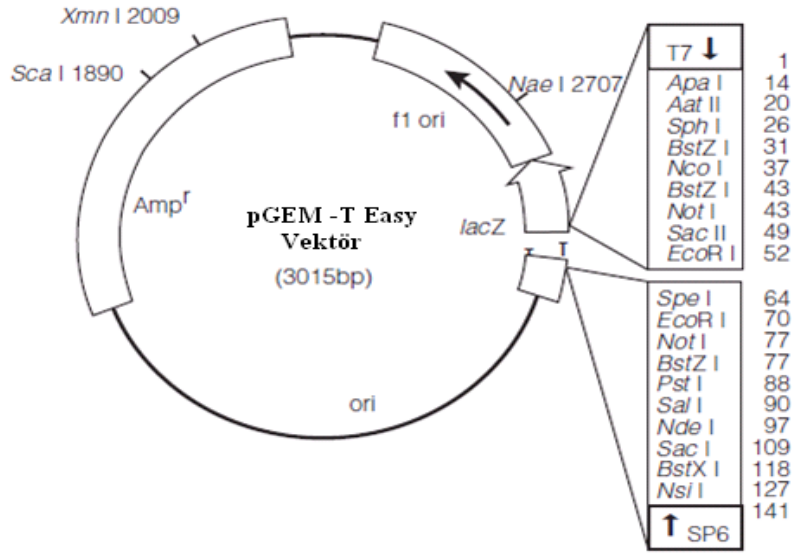
3.21.1 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinden Agaroz Jel Üzerinde Analiz

% 1' lik Agaroz jelin hazırlanması ve örneklerin yürütülmesi 3.15.6' da anlatılan şekilde yapıldı. PCR' la çoğaltılan yaprak, gövde ve köke ait saflaştırılmış 2. PCR örneklerinden 1' er µl kullanılarak karışım hazırlandı. Final hacim 10 µl olacak ve 1 X yükleme tamponu içerecek şekilde karışım hazırlandı ve kuyucuklara yüklendi.

3.22 cDNA' ların pGEM®-T Easy Vektörüne Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM®-T Easy vektörü kullanıldı. pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi Şekil 3.1' de verilmiştir (Promega Vektör Kullanım Kılavuzu).

Yaprak, gövde ve köke ait çinko içermeyen örneklerin 1. elüsyonlarından 3 µl alındı. Vektör takıldı.



Şekil 3. 1 pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi

Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği şekilde hazırlandı. Yaprak, gövde ve kök için üç reaksiyon hazırlanarak 4 °C’ de 48 saat inkübe edildi.

Çizelge 3. 12 Yaprak, gövde ve kök örneklerine ligasyon reaksiyonu kurulmasında kullanılanlar ve miktarları

Örnekler	Miktar	Miktar	Miktar
2 X Rapid ligasyon tamponu 0020	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy vektör (50 ng/ µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Yaprak çinkosuz 1. elüsyon	3 µl	-	-
Gövde çinkosuz 1. elüsyon	-	3 µl	-
Kök çinkosuz 1. elüsyon	-	-	3 µl
T4 DNA ligaz (3 u/ µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Toplam	10 µl	10 µl	10 µl

3.23 *E.coli'* ye Transformasyon

Transformasyon için pGEM®-T Easy Vector System kitinde bulunan hazır kompetan JM109 hücreleri kullanıldı. Eppendorf içine alınan 100 µl kompetan hücre üzerine 5-10 µl ligasyon reaksiyon karışımı eklendi. 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 42 °C' de 1 dakika ısı şoku verildi. Buz üzerinde 2 dakika soğutulduktan sonra total hacim 1000 µl olacak şekilde SOC eklendi. 37 °C' de bir saat inkübe edildi. İlk transformasyonda, transformasyon etkinliğini görmek için 50 µl alınarak 200 µl' lik SOC besiyerlerinde örneklerin 100 X, 20 X ve 4 X dilüsyonları hazırlandı ve Ampisillin içeren katı besi yeri üzerine yayıldı. 37 °C ' de bir gece inkübe edildi. Kolonilerin çok sıkışık büyümediği görüldüğünden sonraki transformasyonlarda katı besiyeri üzerine her petri kabına 100 ml transformasyon karışımı olacak şekilde sulandırılmadan yayıldı. 37 °C' de bir gece inkübasyon yapıldı. Katı besi yerleri içine plazmid almış kolonilerin seçimi için 100 µg / µl Ampisillinle ve rekombinant plazmidlerin seçimi için 30 µg / ml IPTG ve 0.5 mM X- GAL içermekteydi.

Mavi renkte gözlemlenen koloniler içlerine cDNA almadan kapanmış plazmidleri bulunan hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise arpa cDNA' ları olarak kapanmış plazmidleri bulunan hücrelerden oluşmaktaydı.

3.24 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol

Stoklarının Hazırlanması

Katı LB petrilerinde büyümüş olan beyaz koloniler steril kürdanlar ile 96' lık Greiner kaplarına ekildi ve 37 °C' de bir gece büyütüldü. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğun replikası yapıldı ve 75 µl % 60' lık gliserol ilave edilerek -80 °C' de saklandı. Replikalarda; örneklerden 50 µl, 150 µl LB ve 75 µl % 60' lık gliserol kullanıldı. Örnekler -80 °C' de saklandı. 29 Gövdeden, 27 Yapraktan ve 5 Kökten olmak üzere toplam 5734 koloni ekildi.

3.25 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi

Stok kültürlerinden yaprağa ait 960 koloni içeren 10 kap ve köke ait 384 koloni içeren 4 kap dizin analizi için Arizona State Üniversitesi Biodesign Enstitüsü' ne gönderildi.

3.26 Biyoinformatik Analizler

Yaprak çinkосуа ait 960 klon ve kök çinkосуа ait 384 dizinin analiz sonuçlarında “. fasta”, “. phd”, “. qual”, “. pscf”, “. seq” ve “. trace” uzantılı sonuçlar bulunmaktaydı.

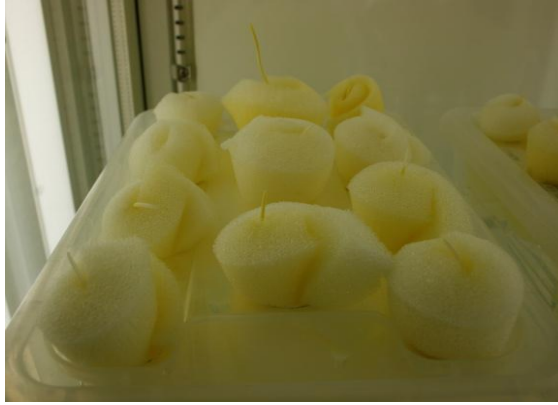
Yaprak örnekleri için trace uzantılı (ABI) olan dosyaların vektör dizinleri CHROMAS programı ile uzaklaştırıldı. Programda oluşan diziler text dosyası biçiminde idi, bu diziler fasta formatına çevrildi. Kök örnekleri için fasta uzantılı olan dosyaların vektör ve adaptör dizinleri phrap programı içindeki “ CROSS- MATCH” ile uzaklaştırıldı. Her iki bitki kısmı içinde oluşturulan fasta dosyaları CYGWIN programında tek bir fasta dosyası biçimine dönüştürüldü. Oluşturulan EST dizilerinden CAP3 programı ile örtüşen diziler belirlendi ve düşük kaliteli diziler kırpıldı. CAP3 ile elde edilen consensus (kontik) dizileri BEAP programı ile kontrol edildi. CAP3’ te oluşturulan consensus olan ve consensus olmayan (singlet) diziler, [67]’ deki web sitesinden BLASTN ve BLASTP programları kullanılarak GenBank veritabanıyla karşılaştırıldı. BLASTP analizi için kontik ve singletlerin [68]’ deki web sitesinden frame 1, 2 ve 3 protein bilgileri oluşturuldu. Bu bilgiler BLASTP analizlerinde kullanıldı. Kayıtlı dizilerle karşılaştırmaları yapılarak fonksiyonları tahmin edildi.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Bitki Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Çözeltilere Aktarılması

Arpa tohumları, bölüm 3.10.1’ de belirtilen koşullar altında çimlendirildi ve Hoagland çözeltilerine aktarıldı.



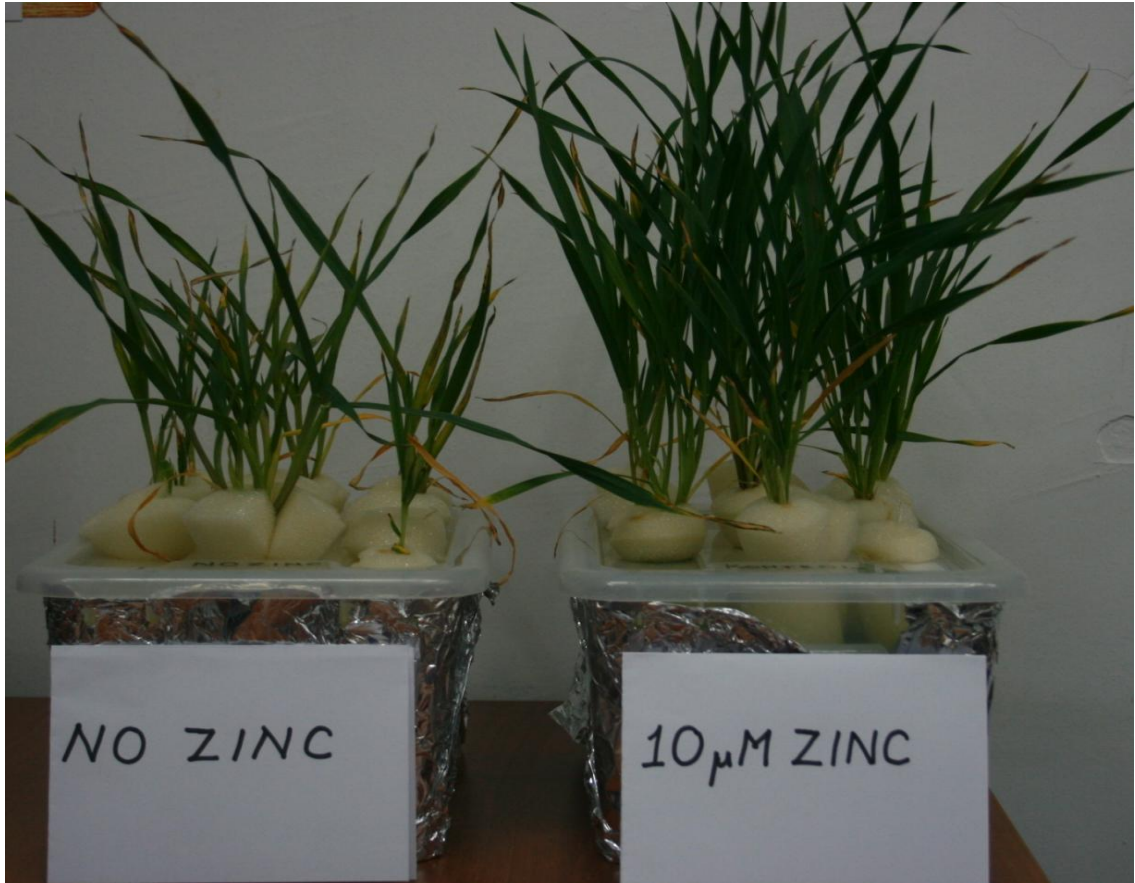
Şekil 4. 1 Bitki büyütme kabininde yetiştirilen bitkiler

4.2 Bitkilerin Büyütülmesi

Bitkiler 42 gün büyütüldü. Çinko içermeyen çözeltide gelişen bitkilerde; genç yapraklarda kıvrılma, sararma ve köklerde uzama ve gövde- sap bölgesinde kahverengileşme ve büyüme- gelişmede gerileme biçiminde fizyolojik değişimler gözlemlendi.



Şekil 4. 2 Gelişen bitkilerin gövde kısımlarında kahverengileşme, yapraklarında sararma ve kıvrılma 1. fotoğraf: 40 günlük arpa bitkinin gövde kısmı, 2. fotoğraf: 12 günlük arpa bitkisi



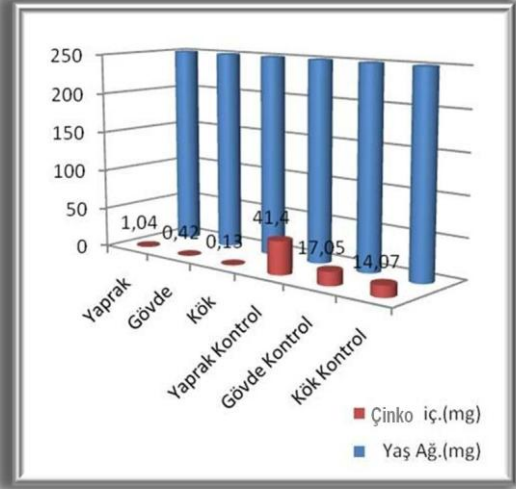
Şekil 4. 3 Kontrol grubu ve deney grubunda gözlemlenen farklılıklar , kontrol grubu 10 μ M çinko içeren Hoagland besiyerinde büyütüldü, deney grubu çinko içermeyen Hoagland besiyerinde büyütüldü

4.3 Çinko Miktar Analizi

Tübitak Marmara Araştırma Merkezi tarafından ölçümler sonucunda deney grubunun çinko oranı ile kontrol grubunun çinko oranları arasında farklılıklar gözlemlendi (Çizelge 4.1). Sonuçlar deney grubundaki bitki kısımlarının çinko metali bakımından daha eksik olduğunu göstermekte idi. Ayrıca çinkonun en fazla miktarda yapraklarda toplandığı görüldü.

Çizelge 4. 1 Bitki kısımlarının yaş ağırlıkları ve çinko içerikleri

Örnek tipi	Yaş ağırlık (mg)	Çinko içeriği (mg)
Yaprak çinkosuz	250	1,04
Gövde çinkosuz	250	0,42
Kök çinkosuz	250	0,13
Yaprak kontrol	250	41,4
Gövde kontrol	250	17,05
Kök kontrol	250	14,07



4.4 Total RNA' ların Spektrofotometrede Ölçümü

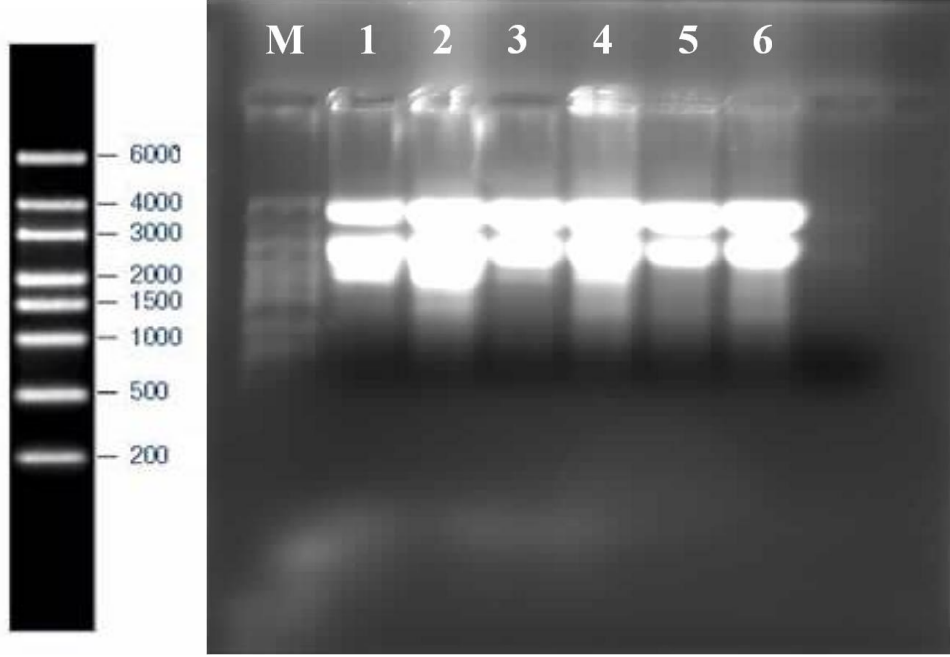
RNA' ların konsantrasyonları $OD_{260} \times 40 \mu g / ml \times$ sulandırma faktörü formülüyle hesaplandı. Kontrollerde elde edilen RNA miktarlarının fazlalığı çinko stresinin ekspresyonu etkilediğini de göstermekte idi.

Çizelge 4. 2 Bitki kısımlarının DEPC' li sudaki RNA miktarları

Örnekler	RNA miktarları ($\mu g / \mu l$)
Yaprak kontrol	6,452
Yaprak çinkosuz	4,838
Gövde kontrol	7,550
Gövde çinkosuz	2,197
Kök kontrol	2,882
Kök çinkosuz	2,250

4.5 Total RNA Analizi

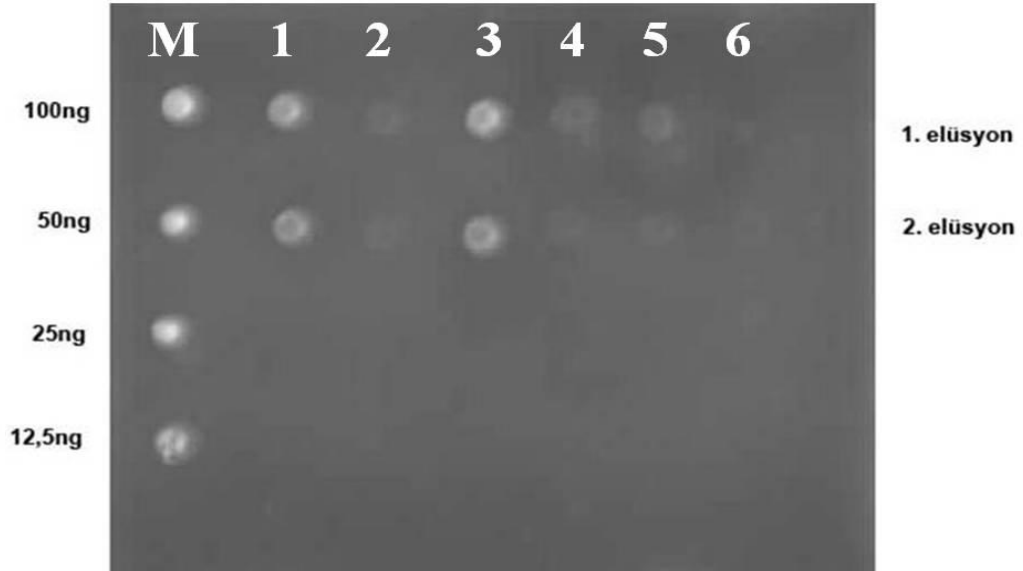
Yaprak, gövde ve köklerden RNA izolasyonu 3.13' de anlatıldığı biçimde yapıldı. % 1' lik MOPS jeline yüklenerek analiz edilen RNA'larda ribozomal RNA bandlarına bakılarak herhangi bir parçalanma olmadığı tespit edildi.



Şekil 4. 4 Arpa bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarından izole edilen total RNA örnekleri M: high range RNA ladder, 1. yaprak kontrole ait RNA örneği, 2. yaprak çinkосуza ait RNA örneği, 3. gövde kontrole ait RNA örneği, 4. gövde çinkосуza ait RNA örneği, 5. kök kontrole ait RNA örneği, 6. kök çinkосуza ait RNA örneği

4.6 mRNA Analizi

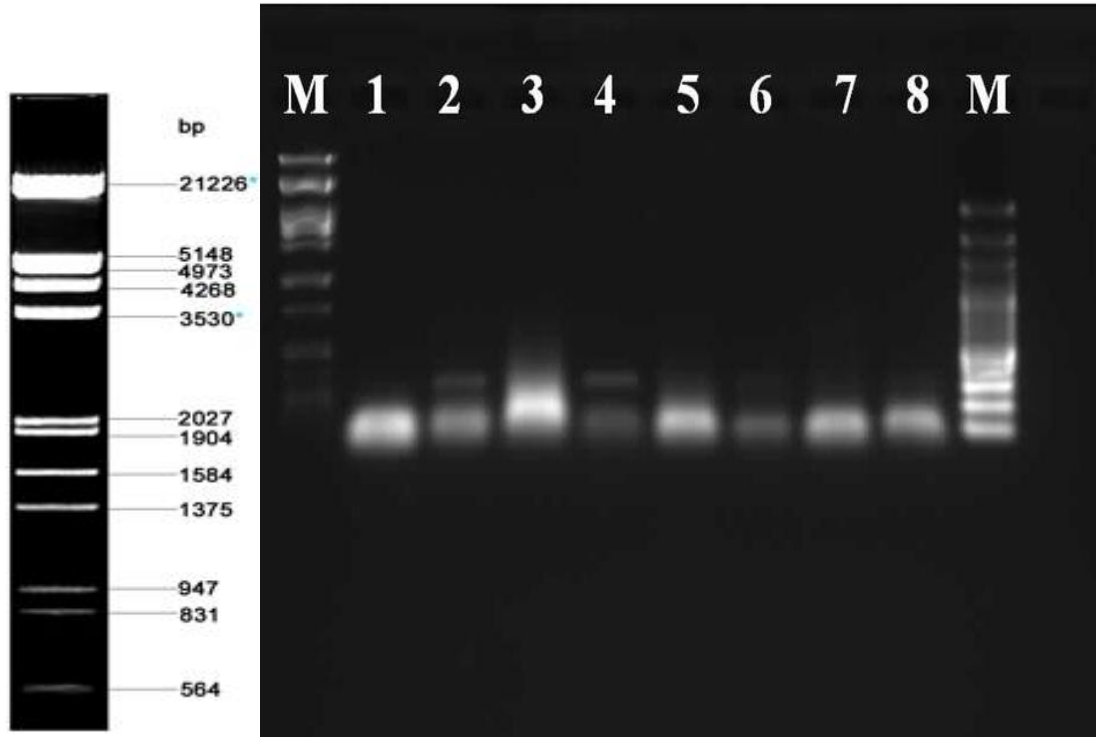
Yaprak, gövde ve köklerden mRNA izolasyonu 3.14' te anlatıldığı biçimde yapıldı. mRNA' lardan 1 µl EtBr içeren %1' lik Agaroz jeline yüklendi. mRNA spotlarının UV ışığı altında görüntüsü konsantrasyonu bilinen bir mRNA' nın görüntüsü ile karşılaştırılarak mRNA miktarları belirlendi.



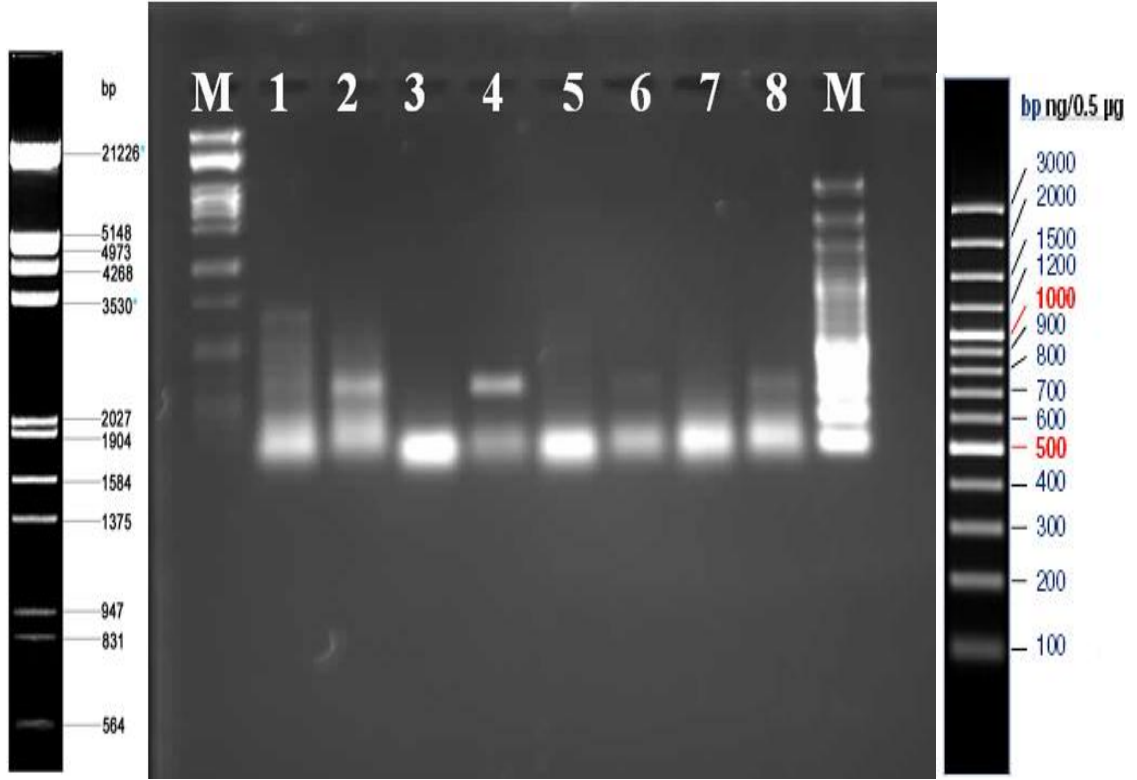
Şekil 4. 5 Arpa bitkisinin yaprak, gövde ve kök kısımlarından izole edilen mRNA örnekleri M. standart RNAlar, 1.yaprak kontrole ait mRNA 1. elüsyon ve 2. elüsyon örnekleri, 2. yaprak çinkосуza ait mRNA 1. elüsyon ve 2. elüsyon örnekleri, 3. gövde kontrole ait mRNA 1. elüsyon ve 2. elüsyon örnekleri, 4. gövde çinkосуza ait mRNA 1. elüsyon ve 2. elüsyon örnekleri, 5. kök kontrole ait mRNA 1. elüsyon ve 2. elüsyon örnekleri, 6. kök çinkосуza ait mRNA 1. elüsyon ve 2. elüsyon örnekleri

4.7 Ligasyon PCR' larından AgaroZ Jel Üzerinde Analiz

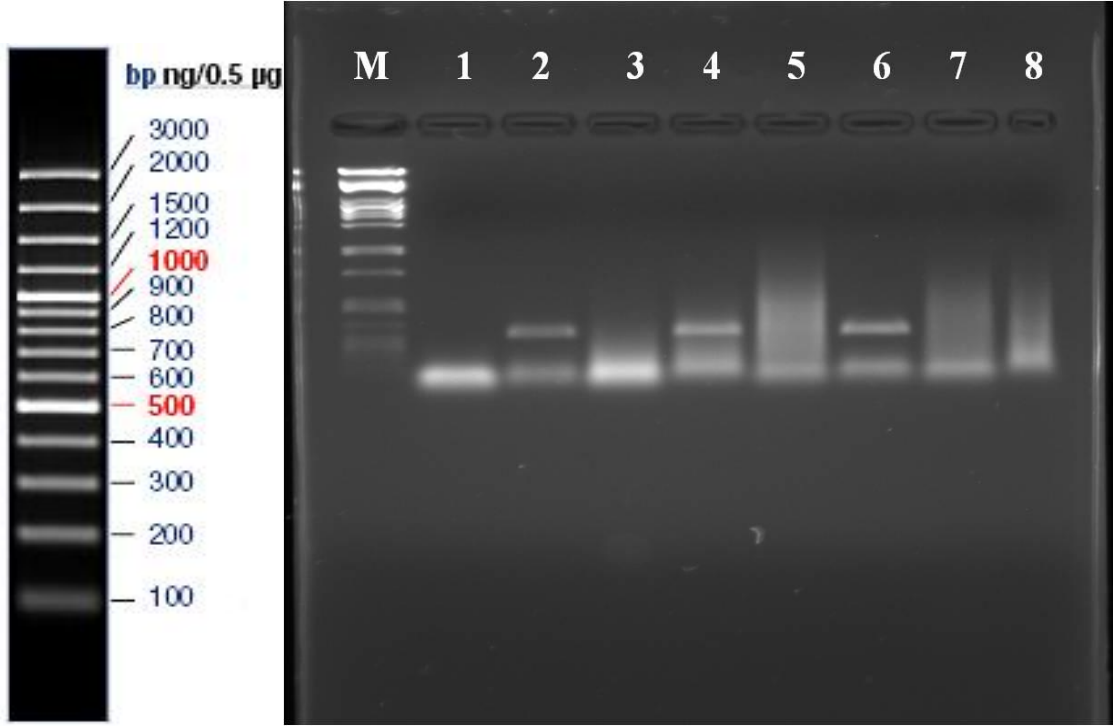
3.16, 3.16.1 ve 3.16.2' de anlatıldığı biçimde yapılan adaptör ligasyonunun PCR' la kontrol ürünleri % 1' lik AgaroZ jele yüklenerek kontrol edildi. Jel görüntüleri yaprak ve gövde görüntülerine göre daha netti ve kesimin gerçekleştiğini göstermekteydi.



Şekil 4. 6 Arpa bitkisinin yaprak örneklerinin adaptör ligasyonunun kontrolü, M. marker Lambda, 1. çinkosuz 1-1 PCR primer, 2. çinkosuz 1-1 GADPH R primer, 3. çinkosuz 1-2 PCR primer, 4. çinkosuz 1-2 GADPH R primer, 5. kontrol 1-1 PCR primer, 6. kontrol 1-1 GADPH R primer, 7. kontrol 1-2 PCR primer, 8. kontrol 1-2 GADPH R primer, M. marker 100bD



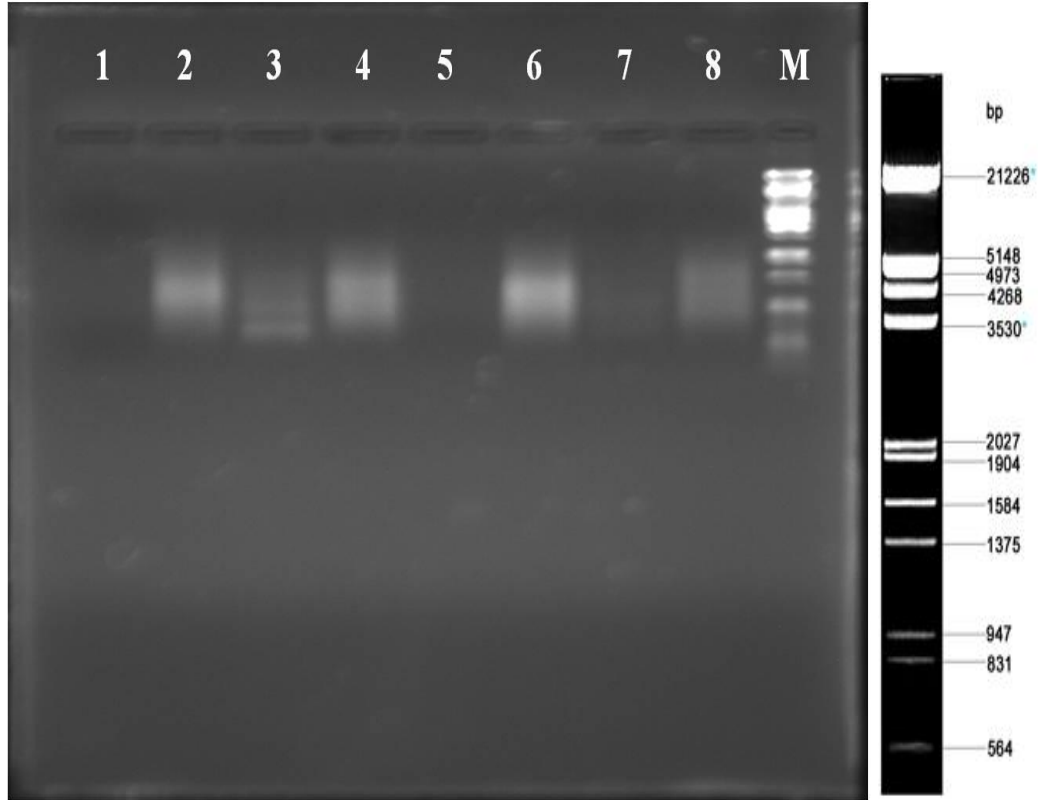
Şekil 4. 7 Arpa bitkisinin gövde örneklerinin adaptör ligasyonunun kontrolü, M. marker Lambda, 1. çinkosuz 1-1 PCR primer, 2. çinkosuz 1-1 GADPH R primer, 3. çinkosuz 1-2 PCR primer, 4. çinkosuz 1-2 GADPH R primer, 5. kontrol 1-1 PCR primer, 6. kontrol 1-1 GADPH R primer, 7. kontrol 1-2 PCR primer, 8. kontrol 1-2 GADPH R primer, M. marker 100bD



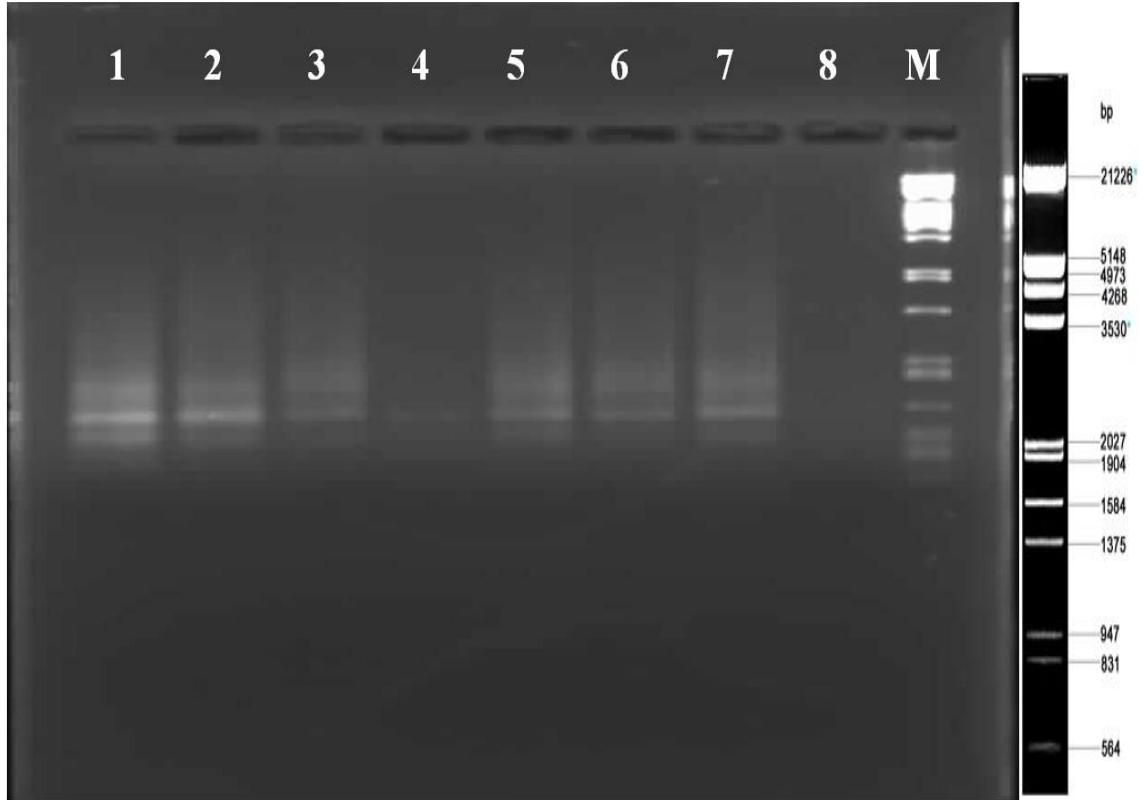
Şekil 4. 8 Arpa bitkisinin kök örneklerinin adaptör ligasyonunun kontrolü, M. marker 100bD, 1. çinkosuz 1-1 PCR primer, 2. çinkosuz 1-1 GADPH R primer, 3. çinkosuz 1-2 PCR primer, 4. çinkosuz 1-2 GADPH R primer, 5. kontrol 1-1 PCR primer, 6. kontrol 1-1 GADPH R primer, 7. kontrol 1-2 PCR primer, 8. kontrol 1-2 GADPH R primer

4.8 1. PCR Amplifikasyonu PCR' larından AgaroZ Jel Üzerinde Analiz

3.19 ve 3.19.1' de anlatıldığı biçimde yapılan 1. PCR amplifikasyonu ve çıkarımı yapılmamış örneklerden hazırlanan PCR' ların ürünleri % 1' lik AgaroZ jele yüklenerek kontrol edildi.



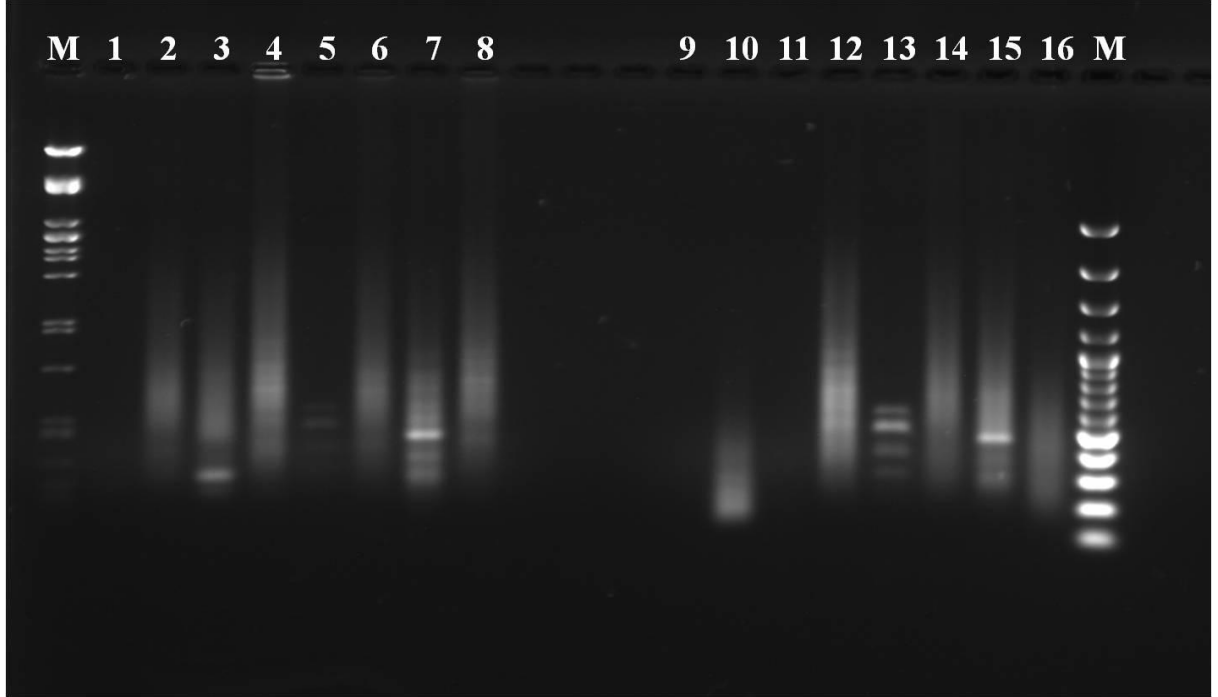
Şekil 4. 9 Arpa bitkisinin yaprak, gövde örneklerinden 1. PCR amplifikasyonun jel görünümü, 1. yaprak çinkosuz çıkarım yapılmış, 2. yaprak çinkosuz çıkarım yapılmamış, 3. yaprak kontrol çıkarım yapılmış, 4. yaprak kontrol çıkarım yapılmamış , 5. gövde çinkosuz çıkarım yapılmış , 6. gövde çinkosuz çıkarım yapılmamış , 7. gövde kontrol çıkarım yapılmış , 8. gövde kontrol çıkarım yapılmamış, M. marker Lambda



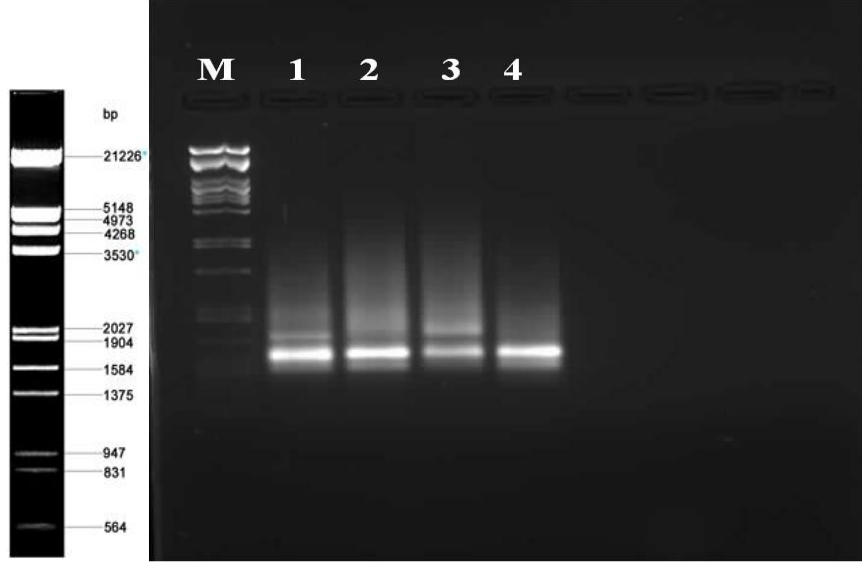
Şekil 4. 10 Arpa bitkisinin kök örneklerinden 1. PCR amplifikasyonun jel görünümü, 1. kök kontrol çıkarım yapılmış 10 X, 2. kök kontrol çıkarım yapılmış 1 X, 3. kök kontrol çıkarım yapılmamış 100 X, 4. kök kontrol çıkarım yapılmamış 1000 X, 5. kök çinkosuz çıkarım yapılmış 10 X, 6. kök çinkosuz çıkarım yapılmış 1 X, 7. kök çinkosuz çıkarım yapılmamış 100 X, 8. kök çinkosuz çıkarım yapılmamış 1000 X, M. marker lambda

4.9 2. PCR Amplifikasyonu PCR' larından AgaroZ Jel Üzerinde Analiz

3.20 ve 3.20.1' de anlatıldığı biçimde yapılan 2. PCR ürünleri % 1' lik AgaroZ jele yüklenerek kontrol edildi.



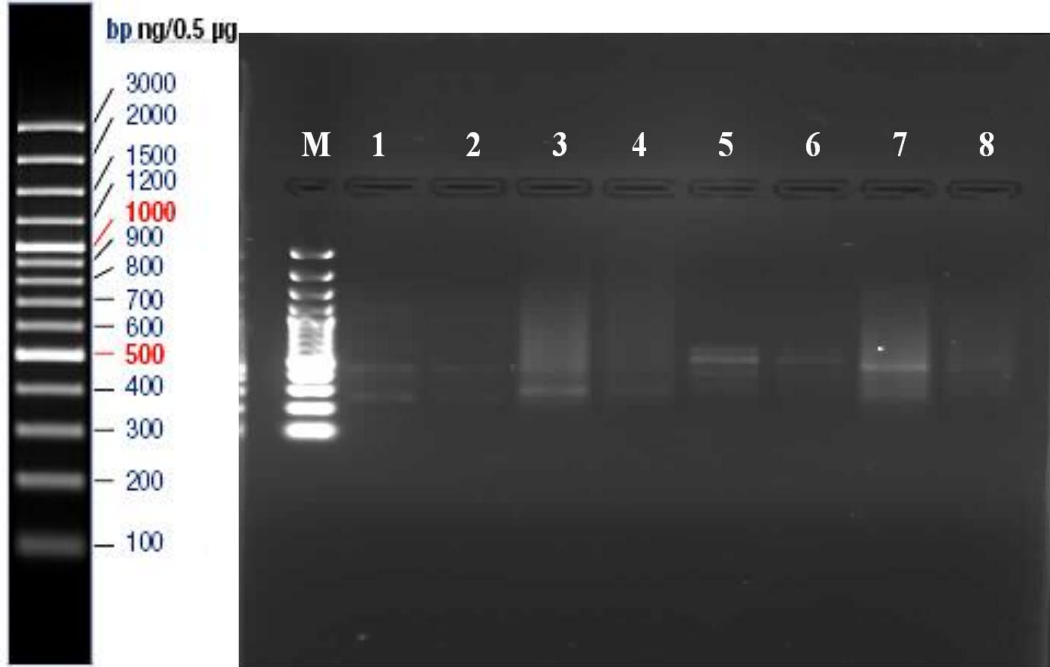
Şekil 4. 11 Arpa bitkisinin yaprak ve gövde örneklerinden 2. PCR amplifikasyonun jel görünümü, M marker Lambda, 1. yaprak çinkosuz çıkarım yapılmış seyreltilmiş, 2. yaprak çinkosuz çıkarım yapılmamış seyreltilmiş, 3. yaprak kontrol çıkarım yapılmış seyreltilmiş, 4. yaprak kontrol çıkarım yapılmamış seyreltilmiş, 5. gövde çinkosuz çıkarım yapılmış seyreltilmiş, 6. gövde çinkosuz çıkarım yapılmamış seyreltilmiş, 7. gövde kontrol çıkarım yapılmış seyreltilmiş, 8. gövde kontrol çıkarım yapılmamış seyreltilmiş, 9. yaprak çinkosuz çıkarım yapılmış, 10. yaprak çinkosuz çıkarım yapılmamış, 11. yaprak kontrol çıkarım yapılmış, 12. yaprak kontrol çıkarım yapılmamış, 13. gövde çinkosuz çıkarım yapılmış, 14. gövde çinkosuz çıkarım yapılmamış, 15. gövde kontrol çıkarım yapılmış, 16. gövde kontrol çıkarım yapılmamış, Marker



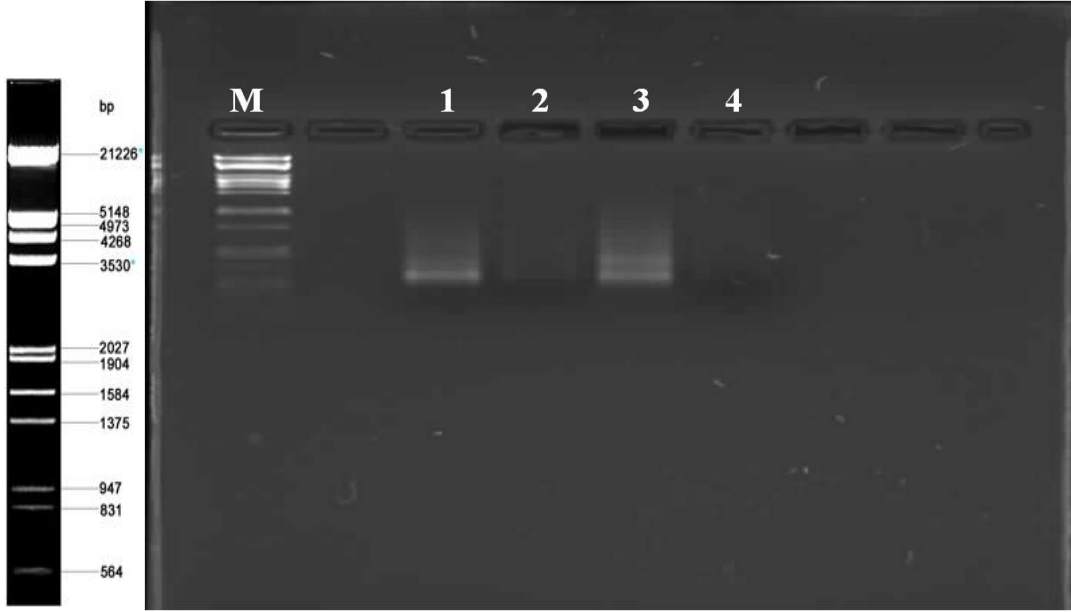
Şekil 4. 12 Arpa bitkisinin kök örneklerinden 2. PCR amplifikasyonun jel görünümü, M marker Lambda, 1. kök kontrol çıkarım yapılmış, 2. kök kontrol çıkarım yapılmamış, 3. kök çinkosuz çıkarım yapılmamış, 4. kök çinkosuz çıkarım yapılmamış

4.10 Saflaştırılmış PCR Ürünlerinden AgaroZ Jel Üzerinde Analiz

3.21 ve 3.21.1' de anlatıldığı biçimde yapılan saflaştırılmış PCR ürünleri, % 1' lik AgaroZ jele yüklenerek kontrol edildi.



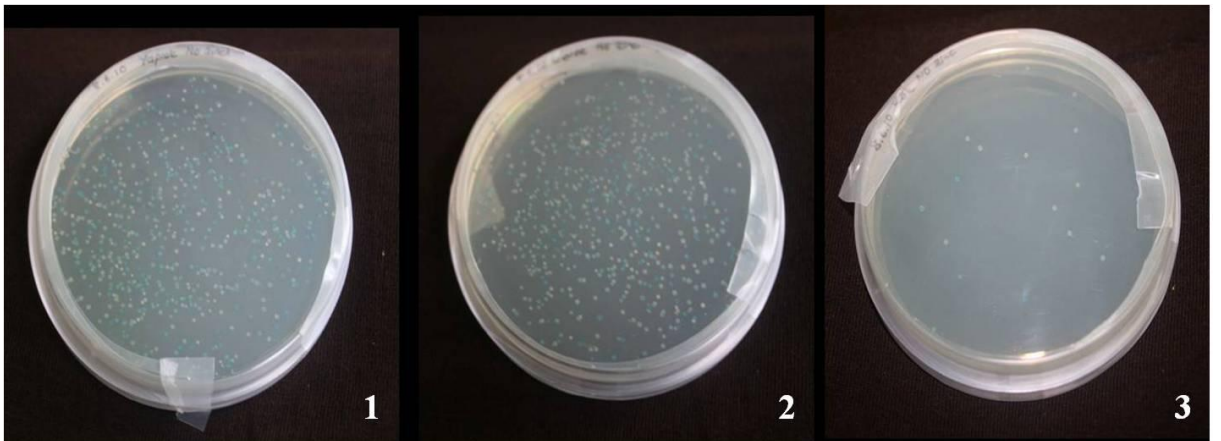
şekil 4. 13 Arpa bitkisinin saflaştırılmış yaprak ve gövde PCR ürünlerinin jel görünümü, Marker 100bd, 1. yaprak çinkosuz 1. elüsyon, 2. yaprak çinkosuz 2. elüsyon, 3. yaprak kontrol 1. elüsyon, 4. yaprak kontrol 2. elüsyon, 5. gövde çinkosuz 1. elüsyon, 6. gövde çinkosuz 2. elüsyon, 7. gövde kontrol 1. elüsyon, 8. gövde kontrol 2. elüsyon



Şekil 4. 14 Arpa bitkisinin saflaştırılmış kök PCR ürünlerinin jel görünümü, marker lambda, 1. kök kontrol 1. elüsyon, 2. kök kontrol 2. elüsyon, 3. kök çinkosuz 1. elüsyon, 4. kök çinkosuz 2. elüsyon

4.11 Rekombinant Hücrelerin Belirlenmesi

3.23' de anlatıldığı biçimde hazırlanan katı LB petrilerinde mavi- beyaz seçilimi yapıldı. Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için β - galaktosidaz testi kullanıldığından mavi ve beyaz olmak üzere iki çeşit koloni gözlemlendi. Beyaz koloniler transformasyona uğramış ve cDNA' yı almış olanlardı. Kök kütüphanesinde, diğer deneylerde olduğu gibi koloni sayısı yaprak ve gövdeden daha azdı.



Şekil 4. 15 Yaprak, gövde ve köke ait koloniler, 1: yaprak, 2: gövde ve 3: kök kolonilerini göstermektedir

4.12 Beyaz Kolonilerin Seçilmesi ve Kolonilerin Analize Gönderilmesi

29 Gövdeden, 27 Yapraktan ve 5 kökten olmak üzere 61 kültür kabı üzerinde toplam 5734 rekombinant koloninin stok kültürleri hazırlandı. Bunlardan yaprağa ait 960 koloni ve köke ait 384 koloni dizin analizi için Arizona State Üniversitesi' ne gönderildi. Analiz sonuçlarının biyoinformatik analizleri yapıldı.

4.13 Yaprak Kütüphanesinin Biyoinformatik Analizleri

4.13.1 EST' lerin Hazırlanması ve Kontik- Singlet Oluşturulması

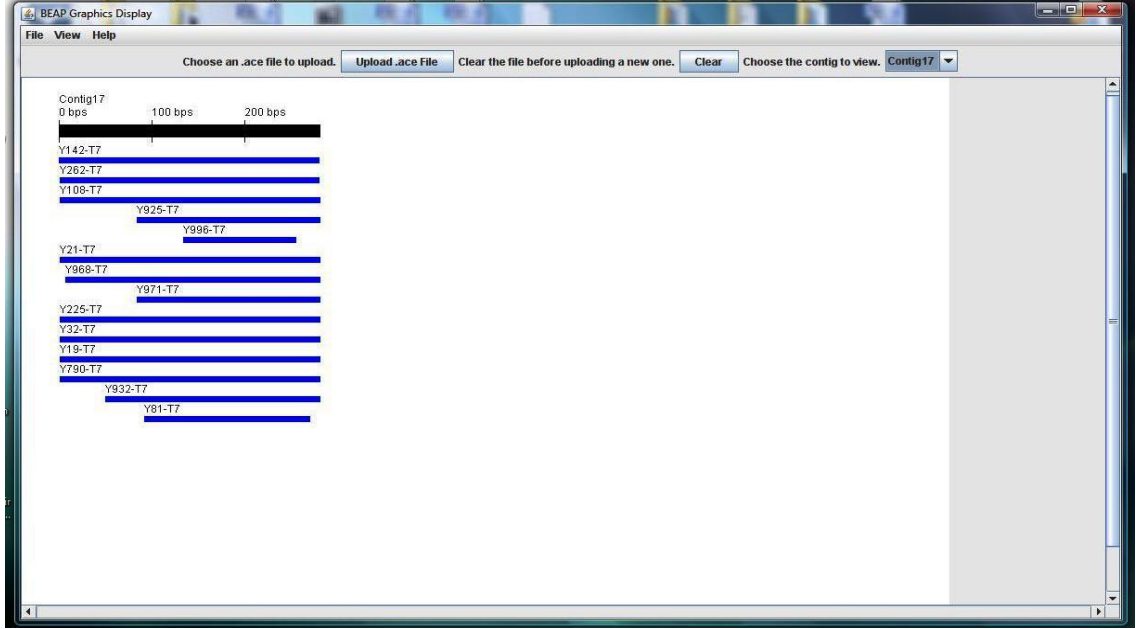
Arizona State Üniversitesi' nden gönderilen dosyalardaki dizin analizi sonuçlarından fasta formatlı olanların TRIM değerleri incelendi. Bu değerler sıfırdan büyük olduğu için düşük kaliteli EST dizilerine rastlanmadı. Arpanın yaprak kısmına ait fasta formatındaki 960 EST dizisinden öncelikle vektör ve adaptör dizileri CHROMAS programı ile uzaklaştırıldı. Ardından VECSCREEN programı ile vektör ve adaptör dizilerinin kalıntısı kontrol edildi ve herhangi bir vektör ve adaptör dizisine rastlanmadı.

Vektör ve adaptör uzaklaştırma işleminden sonra EST fragmentlerinin eşleştirme işlemi CAP3 programı ile yapıldı. CAP3 programı birbirleriyle örtüşen dizileri belirleyip birleştirerek kontik (birleşmiş diziler) oluşturdu. Bu programla kontik oluşturmayan ve tek kalan diziler de (singleton, singlet) belirlendi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3 CAP3 programı ile elde edilen değerler

	Yaprak EST dizinleri
EST sayısı	960
Kontik sayısı	29
Singlet sayısı	126
En uzun kontik	2043
En kısa kontik	87

CAP3 programı ile oluşturulan kontiklerde hangi EST dizilerinin bulunduğunu ortaya çıkarmak için BEAP programı kullanıldı. BEAP programı ile EST dizilerinin örtüşme biçimi de tespit edildi (Şekil 4. 16).



Şekil 4. 16 BEAP programında 17. kontik' i meydana getiren EST dizileri ve bu dizilerin örtüşme biçimi

Kontik oluşturma işlemi CAP3 programı dışında bu programa alternatif olan PHRAP programı ile de yapıldı. PHRAP programında 25 kontik oluşturuldu. CAP3 programının PHRAP programına göre daha güvenilir olması sebebiyle (Huang vd., 1999) çalışmalarımızda CAP3 programına ait kontik dizileri kullanıldı.

4.13.2 Blast Analizleri

EST ve kontik dizilerinin GenBank veritabanında kaydedilmiş dizilere benzerliklerinin ve olası fonksiyonlarının belirlenmesinde BLAST programı [67]' deki web sitesinden kullanıldı. BLAST programı yaygın olarak kullanılan dizi benzerlik sorgulaması programıdır.

CAP3 programı ile elde edilen kontikler ve singletler BLASTN (nükleotit veritabanlı benzerlik araştırması) ve BLASTP analizi ile tek tek yapıldı. Ayrıca CHROMAS programı ile vektör ve adaptör dizileri çıkarılan EST' lerin analizleri de tek tek yapıldı.

BLASTN analizlerinin sonuçları üç bölüm halindedir. Birinci bölüm, EST dizisinin özelliği hakkında bilgi verir. İkinci bölüm, incelenen dizi ile benzerlik gösteren sekansları ve bu sekansların analiz sonuçlarını verir.

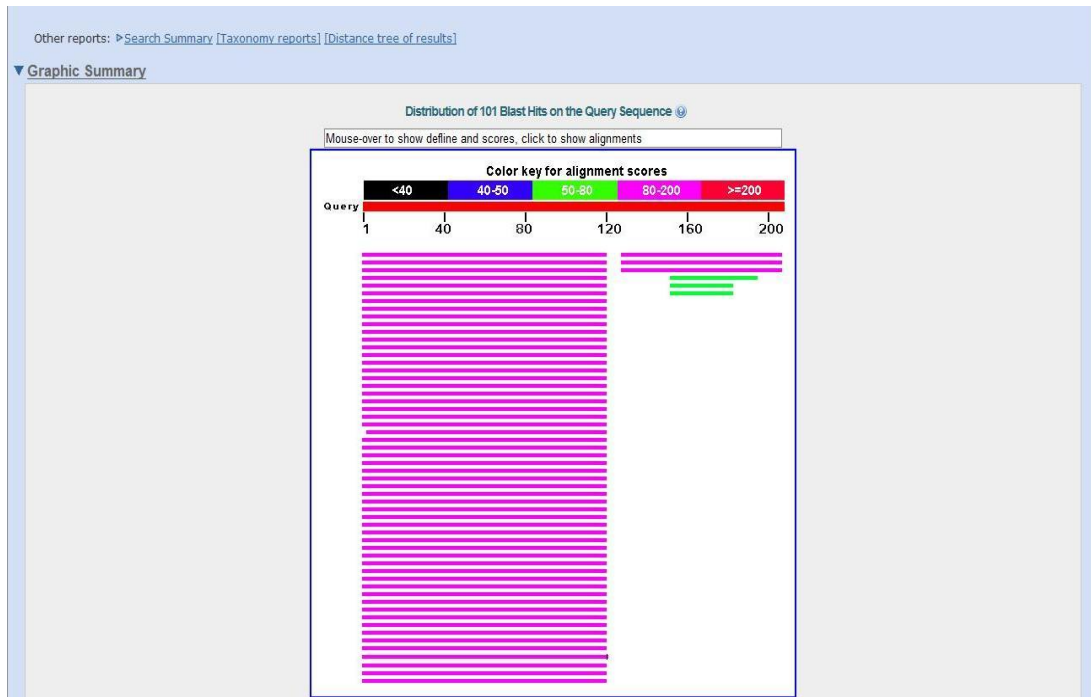
Analiz sonuçlarında; veritabanındaki dizilerin tanınmasını sağlayan numaralar (Accession number), benzerlik gösteren dizinin fonksiyonuna ve ait olduğu organizmaya ait bilgi (Description), karşılaştırılan dizilerin uzunluk anlamında ne derece birbirlerini kapsadıkları (Query Coverage), karşılaştırılan dizilerin bir pozisyonda aynı nükleotide sahip olmasının rastlantısal olabilme durumu (E-value terimi), birbirleri arasında benzerlik tespit edilen diziler arasındaki homolojinin derecesi (Maximum Identity) belirtilir.

Üçüncü bölüm ise benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotit düzeyinde benzerliklerini verir (Şekil 4. 17).

A



B



C

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AK372280.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complet	193	193	57%	4e-46	95%	U E G S M P
AK355220.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complet	193	193	57%	4e-46	95%	
AK367476.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complet	193	193	57%	4e-46	95%	
AK358991.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complet	193	193	57%	4e-46	95%	
AK249454.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf26j06, mRNA sequ	193	193	57%	4e-46	95%	
AK252711.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf164a01, mRNA sei	193	193	57%	4e-46	95%	
AK250863.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf100b05, mRNA sei	193	193	57%	4e-46	95%	
AK249868.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf55b12, mRNA sequ	193	193	57%	4e-46	95%	
AB020943.1	Hordeum vulgare rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylas	193	193	57%	4e-46	95%	
AK355912.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complet	187	187	57%	2e-44	95%	
AK354809.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complet	187	187	57%	2e-44	95%	U E G S M P
AK252627.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf170o14, mRNA sei	187	187	57%	2e-44	95%	
AK252245.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf144p08, mRNA sei	187	187	57%	2e-44	95%	
DQ245093.1	Zea mays clone 12935 mRNA sequence	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020955.1	Triticum timopheevii subsp. armeniacum rbcS gene for ribulose-1,5-b	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020952.1	Aegilops searsii rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020950.1	Aegilops sharonensis rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carbox	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020949.1	Aegilops longissima rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxy	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020947.1	Aegilops speltoides rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxy	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020944.1	Thinopyrum intermedium rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate cai	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020938.1	Aegilops tauschii rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylas	187	187	57%	2e-44	95%	U E G S M P
AB020935.1	Aegilops sharonensis rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carbox	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020928.1	Aegilops speltoides rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxy	187	187	57%	2e-44	95%	
AB020954.1	Triticum urartu rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase,	183	183	57%	3e-43	94%	
AK335141.1	Triticum aestivum cDNA, clone: WT012_C16, cultivar: Chinese Spring	182	182	57%	1e-42	94%	
AJ635206.1	Triticum durum ssp. durum partial mRNA for putative rubisco small su	182	182	57%	1e-42	94%	
AB020958.1	Triticum aestivum rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxyla	182	182	57%	1e-42	94%	
AB020956.1	Triticum turgidum subsp. dicoccoides rbcS gene for ribulose-1,5-bisp	182	182	57%	1e-42	94%	
AB020953.1	Aegilops tauschii rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylas	182	182	57%	1e-42	94%	
AB020946.1	Aegilops speltoides rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxy	182	182	57%	1e-42	94%	
AB020939.1	Triticum timopheevii subsp. armeniacum rbcS gene for ribulose-1,5-b	182	182	57%	1e-42	94%	U
AB020937.1	Aegilops searsii rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	182	182	57%	1e-42	94%	

Şekil 4. 17 Arpa bitkisinin yaprak bölgesine ait kontik 1'in BLASTN analiz sonucunun NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü; A: birinci bölüm, B: ikinci bölüm, C: üçüncü bölüm

BLASTP analizleri için dizinlerin protein bilgisi kullanıldı. Klonlama yönlü olmadığından doğru protein kodlayan dizinin vektöre yerleşme şansı 1 /6' dır. Ayrıca dizin okumalarındaki olası yanlışlıklar frame kaymalarına neden olabilir. Bu nedenlerle [68]'deki internet programında kontik ve singletlere ait proteinlerin 1., 2. ve 3. framelerde aminoasit dizin bilgisi oluşturuldu. Her üç frame için BLASTP analizleri yapıldı.

Benzerlikleri bulunan 29 kontik' in blast analizi sonuçları Ek C' de verilmiştir. 126 singletin blast analizi sonuçları Ek D' de verilmiştir.

4.13.2.1 Yaprak Kontik Blast Analizleri

Yaprak dokusuna ait EST' lerin CAP3 programı ile oluşturulan 29 kontik' in 27 tanesi için DNA ve protein düzeyinde anlamlı blast sonuçları elde edildi. Kontiklerden iki tanesinin GenBank veritabanında benzeştiği herhangi bir nükleotit ve protein dizisi olmadı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4 Yaprak dokusuna ait kontik' lerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri

Kontik no	DNA çeşidi	Protein çeşidi
Kontik 1	RuBisCo_small	RuBisCO_small
Kontik 2	Ferredoxin- NADP(+) reductase	-
Kontik 3	-	-
Kontik 4	TRX_family, thioredoxin reductase (TR)	TRX_family
Kontik 5	Photosystem II subunit S (PsbS)	LIM-kinase1, isoform(<i>Drosophila melanogaster</i>)
Kontik 6	LHC II type I protein, Chlorophyll A- B binding protein	Large polymerase protein
Kontik 7	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	Ribulose-bisphosphate carboxylase small subunit
Kontik 8	Translation elongation factor G	Translation elongation factor G
Kontik 9	Cultivar Morex chloroplast, complete Genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	

	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; rbcL-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast	
Kontik10	Helix-loop-helix domain, found in specific DNA- binding proteins that act as transcription factors	-
Kontik11	Non-specific lipid-transfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily	Conserved hypothetical protein Atypical protein kinase C lambda
	Cw-21 mRNA	
	Ltp4.2 gene	
	Lipid transfer protein (blt4.9) gene	
	Ltp4.3 gene	
Kontik12	-	-
Kontik13	Translation elongation factor	Translation elongation factor EF-G
	Azumamugi translation elongation factor EF-G gene	
Kontik14	Plant protein of unknown function (DUF827) Rubredoxin_ like, a small electron transfer protein iron binding site	Hypothetical protein Bxe_B1626 (<i>Burkholderia xenovorans</i>)
Kontik15	F-box domain	-
	Carbonic anhydrase mRNA	
Kontik16	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily,TPP- binding module	Transketolase
Kontik17	cDNA clone	Putative senescence-associated protein (<i>Pisum sativum</i>)

Kontik18	GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanyltransferase	Os12g0190000GDP-L-galactose Hexose-1-phosphate guanyltransferase
Kontik19	Protein of unknown function (DUF1230	-
Kontik20	Heme-dependent peroxidases similar to plant peroxidases	Heme dependent peroxidases similar to plant peroxidases
Kontik21	CP29 precursor for corechlorophyll a/b binding (CAB) protein of photosystem II (PSII)	Precursor of CP29, core chlorophyll a/b binding (CAB) protein of photosystem II (PSII)
	Chlorophyll A-B binding protein	
Kontik22	Predicted protein	-
Kontik23	Predicted protein	-
Kontik24	Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1	Hypothetical protein (<i>Vitis vinifera</i>)
Kontik24	Chlorophyll A-B binding protein	
Kontik25	Manganese-stabilising protein / photosystem II polypeptide	-
Kontik26	Predicted protein	-
Kontik27	Carbonic anhydrase mRNA	-
Kontik28	Translation elongation factor Azumamugi translation elongation factor EF-G gene	Translation elongation factor EF-G
Kontik29	PAP_fibrillin	PAP_fibrillin

4.13.2.2 Yaprak Singlet Blast Analizleri

Kontiklere uygulanan tüm analizler singletlere de uygulandı. 126 singletten 76 tanesi için DNA ve protein düzeyinde anlamlı blast sonuçları elde edildi. Singletlerden 50 tanesinin GenkBank veritabanında benzeştiği herhangi bir nükleotit ve protein dizisi olmadı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4. 5 Yaprak dokusuna ait singletlerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri

Singlet no	DNA çeşidi	Protein çeşidi
Singlet 1	-	-
Singlet 2	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (<i>Rauhia decora</i>)	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
Singlet 3	-	-
Singlet 4	PAP_fibrillin (plastid lipid-associated proteins)	PAP_fibrillin
Singlet 5	Helix-loop-helix domain, found in specific DNA- binding proteins that act as transcription factors	
Singlet 6	-	-
Singlet 7	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
Singlet 7	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	

Singlet 8	-	-
Singlet 9	-	-
Singlet 10	Glutathione S-transferase	Glutathione S-transferase
Singlet 11	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 12	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 13	-	-
Singlet 14	Cultivar Morex chloroplast,	Ribulose-1,5-bisphosphate

	complete genome	carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 15	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 16	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	

	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 17	-	-
Singlet 18	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 19	-	-
Singlet 20	GDP-L-galactose-hexose-1phosphate	GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanyltransferase
Singlet 21	GDP-L-galactose-hexose-1phosphate guanyltransferase;	-
Singlet 22	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product Os12g0207600 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>] RuBisCO_large

	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 23	-	-
Singlet 24	-	-
Singlet 25	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product Os12g0207600 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>] RuBisCO_large
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 26	-	-
Singlet 27	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product

		Os12g0207600 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>] RuBisCO_large
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 28	-	-
Singlet 29	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 30	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene,	

	complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 31	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Unnamed protein product
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 32	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Os12g0207600 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>] RuBisCO_large
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	

	Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i>	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene	
Singlet 33	ICMT"Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT)	Lysine 2,3-aminomutase YodO family protein [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT)
Singlet 34	-	-
Singlet 35	-	-
Singlet 36	-	-
Singlet 37	<i>Triticum aestivum</i> clone wlsu2.pk0001.h3:fis, full insert mRNA sequence	
Singlet 38	-	-
Singlet 39	-	-
Singlet 40	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	ORF101 [<i>Pinus koraiensis</i>] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i>	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene	
Singlet 41	-	-
Singlet 42	F –Box	gb EEA93694.1 peptidase M23B [<i>Pseudovibrio</i> sp.

		JE062] EMB1441 [<i>Arabidopsis lyrata</i> <i>subsp. lyrata</i>]
	Carbonic anhydrase Mrna	
Singlet 43	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	ORF101 [<i>Pinus koraiensis</i>] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 44	Hydroxypyruvate reductase Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins	Hydroxypyruvate reductase
	Carbonic anhydrase mRNA	
Singlet 45	-	-
Singlet 46	-	-
Singlet 47	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	

	Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i>	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene	
Singlet 48	Non-specific lipidtransfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily	-
	Cw-21 mRNA	-
	Ltp4.2 gene	-
	Lipid transfer protein (blt4.9) gene	-
Singlet 49	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i>	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene	
Singlet 50	<i>Cherax quadricarinatus</i> clone cherax_216 mRNA sequence	
	<i>Maylandia emmiltos</i> isolate Psemill_28_3 MHC class II beta chain	
Singlet 51	-	-
Singlet 52	-	-
Singlet 53	ProteinThiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase(TK) subfamily, TPP-binding module	Transketolase
Singlet 54	<i>Cherax quadricarinatus</i> clone cherax_216 mRNA sequence	
Singlet 55	-	-

Singlet 56	Cloning vector pGBT-R16, complete sequence	Conserved protein [hypothetical <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672] Putative reverse transcriptase [<i>Zingiber officinale</i>] Conserved protein [hypothetical <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672]
Singlet 57	<i>Lithognathus mormyrus</i> clone lmos9p10d12 mRNA sequence	
Singlet 58	-	-
Singlet 59	pWE15A cosmid vector DNA	Translation elongation factor G
Singlet 60	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily, TPP-binding module	Transketolase
Singlet 61	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily, TPP-binding module	Transketolase
Singlet 62	-	-
Singlet 63	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	-
Singlet 64	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	

Singlet 65	-	-
Singlet 66	Cw-21 mRNA	-
	Ltp4.2 gene	-
	Lipid transfer protein (blt4.9) gene	-
Singlet 67	Cw-21 mRNA	-
	Ltp4.2 gene	-
	Lipid transfer protein (blt4.9) gene	-
Singlet 68	-	-
Singlet 69	Transketolase	
Singlet 70	-	-
Singlet 71	Cw-21 mRNA	Hypothetical protein MCP_0783 [<i>Methanocella paludicola</i> SANAÉ]
	Ltp4.2 gene	
	mRNA for lipid transfer protein precursor	
Singlet 72	GDP-L-galactose-hexose-1- phosphate guanylttransferase	GDP-L-galactose-hexose-1- phosphate Guanylttransferase
Singlet 73	-	-
Singlet 74	-	-
Singlet 75	Predicted protein GDP-L-galactose- hexose1-phosphate guanylttransferase	
Singlet 76	Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1	Hypothetical protein [<i>Vitis vinifera</i>] Os04g0457100 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>]
Singlet 77	-	-
Singlet 78	-	-
Singlet 79	-	-
Singlet 80	-	-
Singlet 81	-	-

Singlet 82	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 83	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-3	-
Singlet 84	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 85	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	

	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 86	-	-
Singlet 87	-	-
Singlet 88	-	-
Singlet 89	-	-
Singlet 90	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	
Singlet 91	ATP synthase B/B' CF(0)	
Singlet 92	-	-
Singlet 93	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large	

	subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet 94	SNARE associated Golgi protein	SNARE associated Golgi protein; cl00429
Singlet 95	-	-
Singlet 96	LHC II type I protein	Unknown [<i>Zea mays</i>]
Singlet 97	<i>Pennisetum glaucum</i> AFLP fragment RQVTLCD2-3	-
Singlet 98	-	-
Singlet 99	-	-
Singlet100	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Os12g0207600 [<i>Oryza sativa</i> <i>Japonica Group</i>] Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet101	<i>Cherax quadricarinatus</i> clone cherax_216 mRNA	-

Singlet102	-	-
Singlet103	-	-
Singlet104	-	-
Singlet105	-	-
Singlet106	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK)	Transketolase
Singlet107	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet108	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily	Transketolase
Singlet109	GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanyltransferase;	-
Singlet110	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily	Transketolase
Singlet111	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large	

	subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet112	Cloning vector psiLentGene Basic, complete sequence	Conserved hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i> <i>H591</i>]
Singlet113	Papain-like cysteine proteinase (pap-16 gene)	-
Singlet114	-	-
Singlet115	Expression vector pLoxGentrc, complete sequence	Conserved hypothetical protein [<i>Escherichia coli</i> <i>H591</i>]
Singlet116	-	-
Singlet117	-	-
Singlet118	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcl and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene	
Singlet119	-	-
Singlet120	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK)	Transketolase

Singlet121	Cultivar Morex chloroplast, complete genome	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcL and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene	
Singlet122	Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily	Transketolase
Singlet123	Elongation factor G (EF-G)	Os04g0538100 [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>] Translation elongation factor EF-G
Singlet124	-	-
Singlet125	-	-
Singlet126	Cloning vector psiLentGene Basic, complete sequence	Conserved hypothetical protein [<i>Escherichia coli H591</i>]

4.13.3 Yaprak Kontik ve Singlet Blast Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Özellikle yaprak kütüphanesinde önemli 3 kontik ve 29 singlet RubisCo (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase) enziminin küçük ve büyük alt ünitelerine benzerlik göstermiştir. Yaprakta gerçekleşen fotosentez tepkimelerinde katalitik görevi olan RubisCo mRNA' sının bitki hücrelerinde yaygın olarak ekspresyonu görüldüğünden uygulanan işlevsel genomik yöntemden özgün sonuçlar elde edilmesini engelleyebilir. Aynı durum fotosentezde Calvin döngüsünde görev alan Transketolaz enzimi için de

geçerli olabilir.

Analizlerde görülen genlerden bir tanesi de Ferredoksin- NADP(+) redüktaz enzimini kodlayan genidir. Ferredoksin- NADP(+) redüktaz enzimi fotosentez tepkimelerinde görev alır ve ferredoksin ve flavodoksin gibi elektron taşıyıcı proteinler arasında tersinir elektron transferini katalize eder.

Yaygın olarak görülen diğer bir gen de klorofil A- B binding genidir. Her ne kadar bunların az görüldüğü ya da hiç görülmediği çıkarım çalışmaları etkin çalışmış denilse de bu çalışmada elde edilen bazı klonlar düşük çinko konsantrasyonu ile başa çıkmak için metabolik aktivitelerini arttırmaları sonucu olabilir. Bu nedenle klonların önemli kısmı için çinko eksiklik stresiyle bir bağlantı kurulabilir.

Diğer bir gen de S12 ailesine ait kloroplast ve mitokondride bulunan ribosomal protein S12 geninin ürünü olan ribosomal protein, protein sentezi sırasında tRNA ve ribozom alt üniteleri arasındaki etkileşimde rol oynar.

Yaprakta meydana gelen protein sentezinde görev alan Translasyon uzatıcı faktör G analizler de benzerlik gösterir. Bu genin ürünü, protein sentezi sırasında ribozomda meydana gelen kayma hareketinde görevlidir.

Enerji metabolizması, fotosentez ve protein sentezi ile ilgili proteinleri kodlayan genlerin anlatımının artması bitkinin stress durumunda hayatta kalma mücadelesi sonucu olabilir.

Biyotik ve abiyotik streslerde DNA ve protein düzeyinde anlatımı artan genlere benzerlik göstermiştir. Örneğin, lipit transfer protein genlerinden (Lpt 4.2, Lpt 4.3) le benzerlik gösteren 1 kontik ve 4 singlet olmak üzere çok sayıda klon vardır. Lipit transfer proteinlerinin gerçekten de çinko eksikliğinde ekspresyonu artması beklenir. Çinko eksikliğinden hücre membranlarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün etkilendiği bilinmektedir [69]. Çinko hücre membranlarındaki fosfolipit gruplarına ve sülfhidril molekülüne bağlanır ve hücre zarının bütünlüğünü sağlar. Membranları oksidatif zararlardan korur. Çinko eksikliğinde membranlarda bulunan bu moleküllerde oksidatif zararlar oluşacağından membran bütünlüğü de bozulur [33], [70], [71]. Bütünlüğü bozulan zarlar, membranlara lipit taşıyıcı proteinler yardımıyla onarılır. Özellikle nsLTP1 geninin bulunması da membranda meydana gelen hasarlara karşı

hücreye girebilecek patojenlere karşı hücrenin kendini savunma mekanizmalarının çalıştığı bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Analizde bulunan Thioredoxin redüktaz enzimi de hücrede meydana gelecek oksidatif hasarlara karşı korumada görevlidir.

Bölüm 2.1' de anlatıldığı gibi bitki, çinko eksikliğinde fizyolojik ve morfolojik olarak strese girmekte ve hücrelerinde stresle başa çıkmak için kullanacağı genlerin aktifleşmesini ve strese görevli enzimlerin üretimini sağlamaktadır. Bu enzimlerden biri olan Karbonik Anhidraz enzimi aktif bölgesinde çinko metali içeren yedi farklı formu olan bir enzimdir. Çinko aracılığı ile karboksilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarında, fotosentezde, solunumda proton transfer mekanizmasında, pH dengesinde- hücre içi asit baz dengesinde ve iyon taşınmasında görev alır [72]. DNA ve protein benzerliklerinde bu gene rastlanması yaprağın çinko stresinden etkilendiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu enzimin yapısında çinkonun olması tohumda endospermde depo edilmiş olan çinkonun bitkide tekrar tekrar kullanıldığına işaret eder [24].

Demir bağlı peroksidaz benzeri bitki peroksidaz enzimleri de bu analizde bulunmuştur. Bu enzim, elektron alıcısı olarak hidrojen peroksit içeren çok adımlı oksidatif reaksiyonları katalize eder. Bu durum stres koşullarında oluşan oksidantların ve peroksitlerin canlıda oluşturacağı olumsuz hasarları önlemek içindir [21].

4.14 Kök Kütüphanesinin Biyoinformatik Analizleri

4.14.1 EST' lerin Hazırlanması ve Kontik- Singlet Oluşturulması

Arpanın kök kısmına ait fasta formatındaki 384 EST dizisinden öncelikle vektör ve adaptör dizileri CYGWİN- CROSS- MATCH programı ile uzaklaştırıldı. Ardından VECSCREEN programı ile vektör ve adaptör dizilerinin kalıntısı kontrol edildi. EST fragmentlerinin eşleştirme işlemi CAP3 programı ile yapıldı. Bu programla kontikler ve singletler belirlendi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6 CAP3 programı ile elde edilen değerler

	Kök EST dizinleri
EST sayısı	384
Kontik sayısı	26
Singlet sayısı	37
En uzun kontik	503
En kısa kontik	137

BEAP programı ile EST dizilerinin örtüşme biçimi de tespit edildi .

4.14.2 Blast Analizleri

BLASTN ve BLAST P analizleri bölüm 4.13.2' de anlatılan şekilde yapıldı.

Arpa bitkisinin kök bölümüne ait EST' lerin BLASTN sonuçlarına göre 384 dizinin tanesi % 80 ve üzerinde GenBank' ta bilinen organizmaların sekanslarıyla homoloji gösterdi. 10 tanesinin ise veritabanında benzeştiği herhangi bir nükleotit dizisi bulunamadı.

Benzerlikleri bulunan 26 kontik' in blast analiz sonuçları Ek E' de, 37 singletin blast analiz sonuçları Ek F' de verilmiştir.

4.14.2.1 Kök Kontik Blast Analizleri

Kök dokusuna ait EST' lerin CAP3 programı ile oluşturulan 26 kontik' in 25 tanesi için DNA ve protein düzeyinde anlamlı blast sonuçları elde edildi. Kontiklerden bir tanesinin GenBank veritabanında benzeştiği herhangi bir nükleotit ve protein dizisi olmadı (Çizelge 4.7).

Çizelge 4. 7 Kök dokusuna ait kontik' lerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri

Kontik no	DNA çeşidi	Protein çeşidi
Kontik 1	Double-stranded RNA binding motif	Acetyl-CoA acetyltransferase [<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1]
Kontik 2	RNA-binding protein	RNA-binding protein
Kontik 3	HvPIP1;3 mRNA, complete cds	-
Kontik 4	Aspartate aminotransferase family	Type III restriction enzyme [Bacteroides sp. 4_1_36] Polyadenylate-binding protein 2-A [<i>Xenopus laevis</i>]
Kontik 5	P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases	-
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase small isoform, complete cds Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase Small subunit	
	Rubisco activase	
Kontik 6	-	-
Kontik 7	Oxygen evolving enhancer protein 3	CIP111 [<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>]The AAA+ (ATPases Associated with a wide variety of cellular Activities) superfamily represents an ancient group of ATPases belonging to the ASCE (for additional strand, catalytic E) division of the P-loop NTPase fold.
Kontik 8	Elongation factor G (EF-G) subfamily	Hypothetical protein LOC100384846 [<i>Zea mays</i>]
	Azumamugi translation elongation factor EF-G gene	
	Partial mRNA	
Kontik 9	Glutathione S-transferase	Glutathione S-transferase [<i>Zea mays</i>] Glutathione S-transferase <i>H. Vul.</i>
Kontik 10	Ribulose-1,5-bisphosphate	Ribulose-1,5-bisphosphate

	carboxylase small subunit	carboxylase/oxygenase small subunit
Kontik 11	Photosystem I reaction center subunit N (PsaN)	-
Kontik 12	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain	Chloroplast ferredoxin 1 precursor [<i>Zea mays</i>] 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain
Kontik 13	Tyrosine kinase	Receptor kinase LRK9 [<i>Avena sativa</i>] Tyrosine kinase, catalytic domain TyrKc
Kontik 14	Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1, complete cds	-
	Chlorophyll A-B binding protein; cl02879"	
Kontik 15	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase small isoform, complete cds ribulose-1,5bisphosphatecarboxylase Small subunit	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit
Kontik 16	P-loop NTPase	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	Hypothetical protein (<i>Secale cereale</i>) P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases;; P-loop NTPase RT_like: Reverse transcriptase P-loop NTPase (<i>H. Vulg</i>)
	P-loop NTPase	
	Rubisco activase (RcaA2) mRNA	
	Rubisco activase (RcaA1) mRNA	
	RuBisCO activase, partial cds	

Kontik 17	FBP_aldolase_I_a	Ribulose biphosphate carboxylase activase (<i>Linum usitatissimum</i>)
Kontik 18	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	Peptide methionine sulfoxide reductase; cl00366
	P-loop NTPase	
	Rubisco activase (RcaA2) mRNA	
	Rubisco activase (RcaA1) mRNA	
Kontik 19	Peptide methionine sulfoxide reductase; cl00366	Multidrug resistance-associated protein 4 (<i>Canis lupus</i>) Hypothetical protein (<i>Plasmodium vivax</i>)
Kontik 20	-	-
Kontik 21	Lipid transfer protein	-
	Cw- 18 mRNA	
	Non-specific lipid-transfer protein type 1(nsLTP1) subfamily	
Kontik 22	Glutamine synthetase, beta-Grasp domain	Glutamine synthetase(<i>Oryza sativa</i>)
Kontik 23	Chlorophyll A- B binding protein	-
Kontik 24	Hypothetical protein	-
	Gene encoding jasmonate-induced protein	
Kontik 25	Putative cysteine proteinase precursor (sf42 gene)	-
	Partial mRNA for putative cysteine proteinase	

	Peptidase C1A subfamily	
Kontik 26	Hypothetical protein	-

4.14.2.2 Kök Singlet Blast Analizleri

Kontiklere uygulanan analizler singletlere de uygulandı. 37 singletten 35 tanesi için DNA ve protein düzeyinde anlamlı blast sonuçları elde edildi. Singletlerden 2 tanesinin Genbank veritabanında benzeştiği herhangi bir nükleotit ve protein dizisi olmadı (Çizelge 4.8).

Çizelge 4. 8 Kök dokusuna ait singletlerin BlastN ve BlastP analizi sonuçlarına göre benzerlikleri bulunan DNA ve protein çeşitleri

Singlet no	DNA çeşidi	Protein çeşidi
Singlet 1	Ribosomal protein S6	-
Singlet 2	Chaperone protein DnaJ	-
Singlet 3	P-loop NTPase	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family (<i>Methylophaga thiooxidans</i>)
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	P-loop NTPase
		Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase small isoform
Singlet 4	Glutathione S-transferase	Glutathione S-transferase
Singlet 5	-	Adenosylmethionine decarboxylase precursor [<i>Triticum aestivum</i>]
Singlet 6	Cloning vector psiLentGene Basic,	Conserved hypothetical protein (<i>Escherichia coli</i>)

	complete sequence	
Singlet 7	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	-
	Rubisco activase	
Singlet 8	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	
Singlet 9	Triticum aestivum cDNA, clone: WT013_E02, cultivar	Glycine decarboxylase P subunit [x Tritordeum sp.]
Singlet 10	Glycine rich protein	-
Singlet 11	Methyltransf_2	Flavonoid 7-O-methyltransferaseMethyltransf_2
Singlet 12	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	-
Singlet 13	Glutathione S-transferase	Maturase K [<i>Lanaria lanata</i>]
Singlet 14	Chromosome segregation protein SMC, primarily archaeal type;	-
Singlet 15	Cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic domain; cl11412	-
Singlet 16	-	Os04g0490800 [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group] hypothetical protein
Singlet 17	-	Os07g0141400 [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group] hypothetical protein
Singlet 18	E1-E2 ATPase; pfam00122	-
Singlet 19	Glutamine amidotransferases class-II (GATase)	Amidotransferases/ Unknown [<i>Zea mays</i>] Hypothetical protein [<i>Zea mays</i>]
Singlet 20	Tryptophan synthase beta II	O-acetylserine sulfhydrylase
Singlet 21	OTU-like cysteine protease; cl14910	GG12409 <i>Drosophila erecta</i>

Singlet 22	HvPIP1;3 mRNA, complete cds	Protein kinase, putative (<i>Aspergillus clavatus</i>)
Singlet 23	Ferredoxin--NADP(+) reductase	NADP(H) oxidoreductase
Singlet 24	ZIP Zinc transporter; pfam02535 Triticum aestivum putative zinc transporter (ZIP5) mRNA	Predicted divalent heavy-metal cations transporter
Singlet 25	-	-
Singlet 26	-	S,Adenosylmethionine decarboxylase precursor [<i>Triticum aestivum</i>]
Singlet 27	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain Unknown (<i>Zea mays</i>)
Singlet 28	-	Putative calcineurin B subunit [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>] Ca2+-binding protein
Singlet 29	-	Putative calcineurin B subunit (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)
Singlet 30	Plant Basic Secretory Protein; pfam04450	Plant Basic Secretory Protein; pfam04450
Singlet 31	Aspartate aminotransferase family	Alanine transaminase (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)
Singlet 32	ZnF_GATA	Binding-protein-dependent transporter inner membrane component family protein 62 [<i>Achromobacter xylosoxidans</i> A8] EmrB/QacA family albicidin efflux pump [<i>Rothia dentocariosa</i> ATCC 17931] Drug transporter [<i>Rothia dentocariosa</i> M567]
Singlet 33	Catalase_clade_1 Clade 1 of the heme-binding enzyme catalase	Hypothetical protein Cphamn1_2156 [<i>Chlorobium phaeobacteroides</i> BS1]
Singlet 34	-	-
Singlet 35	Partial mRNA	GG15605 [<i>Drosophila erecta</i>] Phosphoethanolamine methyltransferase [<i>Triticum aestivum</i>]

		[<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>] Predicted protein S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases (SAM or AdoMet-MTase)
Singlet 36	-	-
Singlet 37	Cultivar Morex chloroplast, complete Genome	Photosystem II protein D1
	Cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast	
	Voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast	
	Barley chloroplast genes rbcL and atpB	
	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; rbcL-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast	

4.14.3 Kök Kontik ve Singlet Blast Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.3' te anlatıldığı gibi topraktaki çinkonun alınmasında, taşınmasında ve depolanmasında oldukça fazla sayıda ve çeşitte enzim görev alır. Bu çalışmada çinko eksik koşullar oluşturulduğundan bitki köklerinden alınan minerallerin içinde çinko elementi bulunmamaktaydı. Bu durum, kökte mineral alımında görev alan taşıyıcı

proteinlerin ve enzimlerin çalışma biçimini ve miktarını etkiler. Çakmak [24]' teki makalesine göre kökten emilimde azalış gerçekleşmektedir. Çakmak [24] ve Broadley vd. [18]' e göre çinko eksikliğinde DNA' da hasar ve gen ekspresyonunda değişim gözlenir. Bitkide stres koşullarında solum ve mineral taşınması etkilenir. Singlet 24 'te bulunan ZIP (zinc transporter) ve bu benzerlikte referans olarak gösterilen Grotz vd.' nin [73]' deki makalesi, çinko eksik koşullarda köklerden ZIP familyasına ait genlerin taşındığını belirtmektedir. Grotz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, zinc transporter genleri (ZIP1 ve ZIP3) 10 gün boyunca çinko eksik koşullarda geliştirilmiş *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin kök ve gövde dokularında saptanmıştır. Çinko transporter genlerinin karakterizasyon ve izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Analizlerde bu genin bulunması çinko eksik koşullarda kök dokusu etkilenmekte ve ZIP3 genlerinin homologunun anlatımında artış olmaktadır.

Kontik 3' te DNA benzerliğinde bulunan HvPIP dizisi, Major intrinsic protein(MIP) ailesine aittir. Bu familyaya ait gen ürünleri, hücreler arası membran kanalları boyunca suyun, küçük nötral moleküllerin ve iyonların geçişinde görev alır. Kontik 9, singlet 4, 13' te DNA ve protein benzerliği bulunan Glutasyon-S-transferaz enzimi oksidatif stres, çevresel toksinlerin ve ilaçların glutatyona bağlanmasını sağlar ve detoksifikasyona yardımcı olur. Kontik 19' da DNA benzerliği gösteren Peptit methionin sülfoksit redüktaz enzimi, zarar görmüş proteinleri tamir eder. Singlet 30' da DNA ve protein benzerliği bulunan Plant basic secretory proteininin bitkiyi patojenlere karşı koruduğu düşünülmektedir. Singlet 33' te ise demir bağlı katalaz enzimi bulunmuş olup, bu enzim de peroksitin toksik etkilerinden hücreyi korur. Hidrojen peroksiti, su ve oksijene parçalar. Tüm bu bulunan enzimler yaprakta olduğu gibi kökte de hücrelerin çinko stresi sonucu meydana gelen membran hasarlarına karşı korumada görevlidirler. Ve bu hasarlardan dolayı hücrelerin çevresel patojenlere, hücresel oksidan ajanlara karşı hassasiyeti artar, kendini bu zararlardan korumak için bazı genlerin ürünlerini (katalaz, peroksidaz, Glutasyon-S-transferaz) oluşturur [11], [18], [21].

4.15 Öneriler

Bu çalışmada *Hordeum vulgare*' nin yabancı akrabası olan ve Türkiye' nin çinko eksik topraklarına iyi uyum sağlamış *Hordeum spontaneum*' un kök, gövde ve yaprak dokularından çinko eksikliği stresi ile anlatımı artan genler bakımından zenginleştirilmiş SSH kütüphaneleri kurulmuştur.

Yaprak dokularından kurulan kütüphanelerin temsili bir kısmının ve kök kütüphanesinin tüm klonlarının dizin analizi yaptırılmıştır. Ham DNA dizinlerinin sistematik bir biçimde değerlendirilerek EST klonları oluşturulabilmesi için biyoinformatik analizler yapılmıştır. SSH, PCR' a dayalı bir yöntem olduğu için aynı kalıptan çoğaltılarak klonlanmış cDNA' ların bulunması beklenmekteydi. Kontiklerin ve singletlerin belirlenerek blast analizi yapılması çalışmanın sistematik bir biçimde değerlendirilmesini sağlamıştır. Ayrıca yapılan bu çalışma ile çinko stresine dayanıklılıkla ilgili gelecek araştırmalarımız için hedef genlerin belirlenmesi mümkün olmuştur. Daha sonraki çalışmalarda belirlenen genlerin tam uzunluktaki cDNA' ları elde edilecek ve çinko eksikliği durumunda anlatımlarının arttığı Northern blot ya da Real Time PCR gibi yöntemlerle belirlenecektir.

Bitkinin morfolojik yapısı incelendiğinde çinko eksikliği ile çeşitli abiyotik ve biyotik streslerde görülen etkiler ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.3). Çinko eksik koşullarda yetiştirilen bitkide fizyolojik değişimler olarak, yaprakta kıvrılma, klorozis, bitki büyümesinde gerileme görülür [12], [21].

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde de çinko eksikliğin bitki hücresinde diğer abiyotik streslerde ve biyotik streslerde anlatımda artış olduğu belirlenen genleri indüklediği görülmüştür. Hem yaprakta hem de kökte yapılan analizler sonucunda bu genlerden örneğin lipid transfer, karbonik anhidraz ve ZIP genlerinin transkriptlerinin oldukça fazla bulunması bitkinin çinko stresi ile diğer abiyotik ve biyotik streslerle baş etme mekanizmalarını harekete geçirerek başa çıkmaya çalıştığının göstergesi olabilir.

Çalışmalarda bulunan genler çinko eksik koşullarda ekspres olduğu için bu bitki gen kaynağı olarak kullanılabilir.

Dünya nüfusunun 2050 yılında 10 milyar olacağı düşünülmektedir [41]. Bu artışın özellikle Afrika, Latin Amerika ve Asya' da gerçekleşeceği düşünülürse gelecekteki

problemlerin besin kaynağının yetersizliği, su kaynağının yetersizliği ve düzensiz beslenme olacağı öngörülebilir.

Bitkiler protein ve mineraller bakımından önemli besin kaynağıdır. Özellikle gelişen ülkelerde bitkisel besinler, diyetin büyük oranını içermektedir. Özellikle demir, çinko, iyot ve selenyum minerallerinin miktarı bitkisel besinlerde hayvansal besinlerden daha azdır. Sonuç olarak, Dünya çapında 3 milyardan fazla insan mineral beslenme bakımından sorun yaşamaktadır. Bu nedenle pirinç, buğday türleri, arpa, baklagiller ve mısır gibi tarım ürünlerinin mineral bakımından zenginleştirilmesi gerekmektedir. Bunun içinde metallerin taşınmasında, depolanmasında ve iletilmesinde görevli olan genler analiz edilerek, bunların kullanımıyla özellikle demir ve çinko yönünden zengin bitkiler yetiştirilebilir. Bu çalışmada klonlanan genlerin ileri moleküler analizleri tamamlandıktan sonra biyoteknolojik anlamda kullanımları araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Pedersen, H. B., Borg, S., Tauris, B. ve Holm, B. P., (2007). "Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals", *Journal of Cereal Science*, 46:308–326.
- [2] White, P. J. ve Broadley, M. R., (2009). "Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine", *New Phytologist*, 182: 49–84.
- [3] Prasad, R., (2010). "Zinc biofortification of food grains in relation to food security and alleviation of zinc malnutrition", *Current Science*, 98: 10.
- [4] Welch, R. M. ve Graham, R. D., (2004). "Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective", *Journal of Experimental Botany*, 55: 353- 364.
- [5] Chen, M., Shen, X., Li, D., Dong, J. ve Wang, J., (2009). "Identification and characterization of MtMTP1, a Zn transporter of CDF family, in the *Medicago truncatula*", *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1089–1094.
- [6] Dreosti, I. E., (2001). "Zinc and the gene Review", *Mutation Research*, 475; 161–167.
- [7] Kramer, U., (2005). "MTP1 mops up excess zinc in *Arabidopsis* cells", *Trends in Plant Science*, 10.
- [8] Pedas, P., Jan, K. S. ve Husted, S., (2009). "Identification and characterization of zinc-starvation induced ZIP transporters from barley roots", *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:377–383.
- [9] Palmgren, M. G., Clemens, S., Williams, L. E., Kramer, U., Borg, S., Schjorring, J. K., ve Sanders, D., (2008). "Zinc biofortification of cereals : problems and solutions", *Review, Trends in Plants Science*, 608.
- [10] Prasad, A.S., (1996). "Zinc: the biology and therapeutics of an Ion. *Annals of International Medicine*", 125: 142- 143.
- [11] Çakmak, İ., Torun, B., Erenoğlu, B., Öztürk, L., Marschner, H., Kalaycı, M., Ekiz, H. ve Yılmaz, A., (1998). "Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency", *Euphytica*, 100: 349-357.

- [12] Cakmak, İ., Kalayci, M., Ekiz, H., Braun, H.J., Kilinc, Y. ve Yilmaz, A., (1999). "Zinc deficiency as a practical problem in plant and human nutrition in Turkey: A NATO-science for stability Project", *Field Crops Research*, 60:175-188.
- [13] Ramesh, A., Choimes, S. ve Schachtman, D. P., (2004). "Over-expression of an *Arabidopsis* zinc transporter in *Hordeum vulgare* increases short-term zinc deprivation and seed zinc content", *Plant Molecular Biology*, 54:373-385.
- [14] Ackland, M. L. ve Michalczyk, A., (2006). "Zinc deficiency and its inherited disorders - review", *Genes & Nutrition* 1 (1): 41-50.
- [15] Brown, K.H., (2007). The Public Health Importance of Zinc Nutrition, and Strategies for the Control of Zinc Deficiency.
- [16] Rout, G. R. ve Das, P., (2003). "Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc", *Agronomie* 23, 3–11.
- [17] Zengin, K. F ve Munzuroğlu, Ö., (2005b). "Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *Strike*) Klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2})", *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1): 164-172.
- [18] Broadley, R. M., White, P. J., Hammond, P. J., Zelko, I. ve Lux, A., (2006). " Zinc in plants", *Transley Review, New Phytologist*, 173: 677–702.
- [19] Gıda Sanayi , <http://www.gidasanayii.com>, 15 Aralık 2010.
- [20] Cakmak, İ., Ekiz, H., Yilmaz, A., Torun, B., Köleli, N., Gültekin, N., Alkan, A. ve Eker, S., (1997). "Differential response of rye, triticale, bread and durum wheats to zinc deficiency in calcareous soils", *Plant and Soil*, 188: 1–10.
- [21] Çakmak İ., (2000). "Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species", *Transley review No: 111, New Phytol.*, 146, 185-205.
- [22] Kalaycı, M., Torun, B., Eker, S., Aydın, M., Ozturk, L. ve Çakmak, İ., (1999). "Grain yield, zinc efficiency and zinc concentration of wheat cultivars grown in a zinc-deficient calcareous soil in field and greenhouse", *Field Crops Research*, 63, 87- 98.
- [23] Hacısalıhoğlu, G. ve Kochian, L.V., (2003). "How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants", *New Phytologist*, 159: 341-350.
- [24] Çakmak, İ., (2008). "Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification", *Plant Soil*, 302:1– 17.
- [25] Tolay, I., Erenoğlu, B., Römheld, V., Braun, H. J., ve Çakmak, İ., (2001). " Phytosiderophore release in *Aegilops tauschii* and triticum species under zinc and iron deficiencies", *journal of Experimental Botany*, 52: 358, pp. 1093-1099.
- [26] Pourkheirandish, M. ve Komatsuda, T., (2007). "The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective", *Annals of Botany* 100: 999-1008.

- [27] Badr, A., Müller, K., Pregl, S., Rabey, E. H., Effgen, S., İbrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde W. ve Salamani F., (2000). "On the origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*), Molecular Biology Evolution, 17(4): 499-510.
- [28] Forster, P. B., Ellis, P. R., Thomas, W. T. B., Newton, A. C., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R. A., Bahri, M. H. ve Salem, B. M., (2000). "The development and application of molecular markers for abiotic stres tolerance in barley", Journal of Experimental Botany, 51: 342.
- [29] Sirat, A. ve Sezer, i., (2005). "Samsun ekolojik koşullarında uygun Arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşitlerinin belirlenmesi", OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(3): 72-81.
- [30] Vallee, B. ve Auld, D. S., (1989). "Active- site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 220-224.
- [31] Coleman, J., (1998). "Zinc enzymes", Current opinion Chemical Biology, 2: 222-234.
- [32] Stoyanova, Z . ve Doncheva, S. , (2002). "The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant", Braz. J. Plant Physiol., 14(2):111-116, 2002.
- [33] Marschner, H., (1995). "Mineral nutrition of higher plants". Press Academic Boston, 2nd Edition.
- [34] Milon, B., Dhermy, D., Pountney, D., Bourgeois, M., Beaumont, C., (2001). "Differential subcellular localization of hZip1 in adherent and non-adherent cells", Federation of European Biochemical Societies, Letters 507, 241-246.
- [35] Hacısalıhoğlu, G., Hart, J. J., Wang, Y. H., Çakmak, İ. ve Kochian, V. L., (2003). "Zinc Efficiency Is Correlated with Enhanced Expression and Activity of Zinc- Requiring Enzymes in Wheat", Plant Physiology, 131: 595-602.
- [36] Hacısalıhoğlu, G., Öztürk, L., Cakmak, İ., Welch, R.M. ve Kochian, L., (2004). "Genotypic variation in common bean in response to zinc deficiency in calcareous soil", Plant and Soil, 259: 71-83.
- [37] Haydon, M .ve Cobbett, C H, (2007). "A Novel Major Facilitator Superfamily Protein at the Tonoplast Influences Zinc Tolerance and Accumulation in Arabidopsis", Plant Physiology, 143: 1705–1719.
- [38] Alloway, B.J., (2004). "Zinc in soils and crop ", Springer Science Business Media B.V. Nutrition, Book.
- [39] Alloway, B.J., (2009). "Soil factor associated with zinc deficiency in crops and humans", Springer Science Business Media B. V.
- [40] Özgüven, N. ve Katkat, V. A., (2002). "Bursa ili Topraklarının Bitkiye Yararlı Çinko Yönünden Genel Durumu", Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16: 235-244.
- [41] Çakmak, İ., (2002). "Plant nutrition research: Priorities to meet human needs for food in sustainable ways", Plant and soil, 247: 3-24.

- [42] Ören, Y. ve Başal, H., (2006). “ Humik asit ve çinko uygulamalarının pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) verim, verim komponentleri ve lif kalite özelliklerine etkisi”, Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi; 3(2) : 77 – 83.
- [43] Clemens, S., Palmgren, MG. ve Kramer, U., (2002). “Understanding and Engineering plant metal accumulation”, Trends Plant Sci, 7: 309-315.
- [44] Zengin, K. F ve Munzuroğlu, Ö., (2005). “ Kobalt ve Çinkonun Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *Strike*) Kök, Gövde ve Yaprak Büyümesi Üzerine Etkileri”, F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17 (1), 97-106.
- [45] Munzuroğlu, Ö. ve Gür, N., (2000). “Ağır Metallerin Elma (*Malus sylvestris* Miller cv. Golden) da Polen Tüpü ve Gelişimi Üzerine Etkileri”, Turk J. Biol., 24, 677-684.
- [46] Pilon, M., Cohu, C. M., Ravet, K., Abdel-Ghany, S. E. ve Gaymard, F., (2009). “ Essential transition metal homeostasis in plants”, Current Opinion in Plant Biology, 12:347–357.
- [47] Kambe, T., Weaver P. B. ve Andrews K. G., (2008). “The Genetics of Essential Metal Homeostasis During Development”, Genesis 46:214–228.
- [48] Takeda A. ve Tamano H., (2009). “ Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency”, Brain Research Review, 3 3 – 4 4.
- [49] Hiromura, M. ve Sakurai, H., (2001). Review, “ Intracellular metal transport proteins”, Focused on new Trends in Bio- Trace Elements Research.
- [50] Guerinot L. M., (2000). “ The ZIP family of metal transporters”, Biochimica et Biophysica Acta, 1465, 190-198.
- [51] Chen, Y., Lin, C.C., Wang, C.D., Wu, H.B. ve Hwang, P., (2007). “ An optimized procedure greatly improves EST vector contamination removal”, BMC Genomics, 8:416.
- [52] Waters, M.B. ve Sankaran, R.P., (2011). “Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from biofortification perspective”, Plant Science xxx xxx–xxx.
- [53] Diatchenko, L., Lau, Y-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. ve Siebert, P., (1996). “Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, pp.6025-6030.
- [54] Atalay, A., Crook, T., Ozturk, M. ve Yuluga, I. G., (2002). “Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 299; 839– 846.
- [55] Lü a, B., Xu a, J., Zhu b, Y., Zhang c, H. ve Lai a, M., (2007). “ Systemic analysis of the differential gene expression profile in a colonic adenoma–normal SSH library”, Clinica Chimica Acta, 378:42–47.
- [56] Way, H., Chapman, S., McIntyre, L., Casu, R., Xue, P. G., Manners, J. ve Shorter, R., (2005). “Identification of differentially expressed genes in wheat

undergoing gradual water deficit stress using a subtractive hybridisation approach”, *Plant Science*, 168: 661–670.

- [57] Nguyen, H. T., Leipner, J., Stamp, P. ve Guerra-Peraza, O., (2009). “Low temperature stress in maize (*Zea mays* L.) induces genes involved in photosynthesis and signal transduction as studied by suppression subtractive hybridization”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47 : 116–122.
- [58] Godoy, A., Cordenunsi, C. B. ve Lajolo, F. M., (2010). “Differential display and suppression subtractive hybridization analysis of the pulp of ripening banana, João Roberto Oliveira do Nascimento, *Scientia Horticulturae*, 124: 51–56.
- [59] Primrose, S.B. ve Twyman, R.M., (2006). “ Principles of Gene Manipulation and genomics”, Blackwell Publishing, Oxford.
- [60] Adams, M.D. , Kelley, J.M. ve Gocayne, J.D., (1991). “ Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome Project”, *Science*, 252: 1651- 1656.
- [61] Hoagland, D.R. ve Arnon. D.I., (1950). “The water-culture method for growing plants without soil”, *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.
- [62] Larsson, K. A. E., Zetterlund, I., Delp, G. ve Jonsson, L. M. V., (2006). “ N-methyltransferases involved in gramine biosynthesis in barley: Cloning and characterization”, *Phytochemistry* 67, 2002- 2008.
- [63] Laboratory of Phill Green, <http://www.phrap.org/>, 09.02.2011.
- [64] Vecscreen, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>, 16.05.2011.
- [65] Genc, Y., Shepherd, K.W., McDonald, K. ve Graham, R.D., (2003). “Inheritance of tolerance to zinc deficiency in barley”, *Plant Breeding*, 122: 283-284.
- [66] Restrictionmapper, <http://www.restrictionmapper.org/>, 19.01.2010.
- [67] Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 06.01.2011.
- [68] Emboss transeq, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>, 01.06.2011.
- [69] Welch, R. W., Webb, M. J. ve Loneragan, J. F., (1982). “ Zinc in membrane function and its role in phosphorus toxicity” *In* A Scaife, ed, *Plant Nutrition, Proceedings of the Ninth International Plant Nutrition Colloquium*, Warwick University, UK.
- [70] Welch, R. W. ve Norvell, W. A., (1993). “Growth and nutrient uptake by barley (*Hordeum vulgare* L. cv Herta): studies using an N-(2-hydroxyethyl) ethylenedinitrilotriaceticacid-buffered nutrient solution technique”, *Plant Physiol* 101: 627–631.
- [71] Rengel, Z. ve Graham, D. R., (1996). “Uptake of zinc from chelate-buffered nutrient solutions by wheat genotypes differing in zinc efficiency”, *Department of Plant Science, Waite Agricultural Research Institute of Adelaide, Glen*

Osmond, SA 5064, Australia, Journal of Experimental Botany, 47: 295, pp. 217-226.

- [72] Kaul, T., Reddy, S. P., Mahanty, S., Thirulogachandar, V., Reddy, A. R., Kumar, B., Spory, K. S. ve Reddy, K. M., (2010). " Biochemical and molecular characterization of stress- induced β - carbonic anhydrase from a C4 plant, *Pennisetum glaucum*", Journal of Plant physiology, 168, 601-610.
- [73] Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L. ve Eide, D.,(1998). " Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency", Proc Natl Acad Sci U S A., 95(12): 7220–7224.

**RNA ÖRNEKLERİ İÇİN HAZIRLANAN MOPS JELİNDEKİ KARIŞIMLARIN
MİKTARLARI**

Örnekler	DEPC' li su	MOPS	Formaldehid	Formamid	EtBr
Marker 1,5 µl	1,5 µl	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl
Yaprak kontrol 3 µl	1,5 µl	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl
Yaprak Çinkosuz 2 µl	2,5 µl	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl
Gövde kontrol 1,3 µl	2,7 µl	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl
Gövde Çinkosuz 5 µl	-	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl
Kök kontrol 3,3 µl	1,3 µl	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl
Kök Çinkosuz 3 µl	1,2 µl	2 µl	3.5 µl	10 µl	0.5 µl

ARPA BİTKİSİNDE BULUNAN GLİSERALDEHİT DEHİDROGENAZ ENZİMİNE AİT mRNA DİZİNİ

GenBank: M36650.1

Barley glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA

M36650.1 | BLYGAPDH Barley glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA, 3'
end

GTCAACGACCCGTTTCATCACCACCGACTACATGACCTACATGTTCAAGTATGACACTGTCCACG
GACAGTGGAAGCACCATGAAGTTAAGGTGAAGGACTCCAAGACCCTTCTCTTCGGTGAGAAG
GAGGTTGCTGTGTTTGGTTGCAGAAACCCGAGGAGATTCCATGGGCCGCTGCTGGTGCTGA
GTACGTTGTGGAGTCCACCGGTGTTTTCCTGACAAGGACAAGGCTGCAGCTCACATTAAGG
GTGGTGCCAAGAAGGTCATCATTTCTGCTCCCAGCAAGGACGCTCCCATGTTTGTCTGTGGTG
TCAACGAGAAGGAATACAAGTCAGACATCGACATTGTCTCCAATGCTAGCTGCACCACCAACT
GTCCTGCTCCTCTTGCTAAGGTTATCAATGACAGGTTTGGCATTGTTGAGGGTTTGATGACCAC
TGTCATGCCATGACTGCTACCCAGAAGACTGTTGATGGTCCTTCAAGCAAGGACTGGAGAG
GTGGAAAGGGCTGCTAGCTTCAACATCATTCCAAGCAGCACTGGTGCTGCAAAGGCCGTTGGC
AAGGTGCTCCAGAACTTAACGAAAGTTGACTGGAATGGCCTTCCGTGTTCCCACTGTTGAT
GTTTCTGTTGTTGATCTGACTGTTAGACTTGCCAAGCCAGCCACCTATGAGCAGATTAAGGCTG
CTATCAAGGAGGAGTCTGAGGGAAACCTCAAGGGCATTGTTGGGTTATGTCGATGAGGACCTT
GTTTCCACTGACTTCCA
GGGTGACAGCAGGTCCAGCATCTTTGATGCCAAGGCCGGGATTGCTCTGAACGACAACCTTTGT
CAAGCTTGTCTCATGTACGACAACGAGTGGGGATACAGCACCCGTGTGGTTCGACCTCATCCG
CCACATGCACAGCACCAAGTAAATGAGCCAAAGCATGAAGATACAGGGAGTGTGGTTTGCCC
CAGAGAAGAGAAGAGTGTACAACCTCTCCGAGAATAAATTTTTGTATGGAATTATGGCAACT
AAAAAAAACCTTTTATTGGATGATCCTGATGGTTGGTTGAGCTTAGCGGCTCACATTTTGGTG
GTATTATGTACTTGCTTGAATAATCATGAGTTATTTTCACTCATCGTCATGGGTT

**ARPA BİTKİSİNİN YAPRAK DOKUSUNA AİT 29 KONTİK' İN BLASTN VE
BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ**

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (blastN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (blastP)		
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri
Kontik 1	207	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein RuBisCO_small AK372280.1	193	4e-46	95	Frame 2 Predicted protein (RuBisCO_small) XP_001785309.1	69	5e-05
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249454.1	193	4e-46	95	Predicted protein (RuBisCO_small) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ90440.1	50.1	1e-04
		Hordeum vulgare rbcS gene for ribulose-1,5- bisphosphate AB020943.1	193	4e-46	95	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain PW9, chloroplastic; Short=RuBisCO small subunit PW9 P26667.1	50.1	1e-04
						Frame 3 Predicted protein (RuBisC) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ90550.1	47	0,001
						Ribulose bisphosphate carboxylase small chain PW9,	46.6	0,001

						chloroplastic; Short=RubisCO small subunit PW9 Q40004.1		
Kontik 2	230	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein ferredoxin-- NADP(+) reductase AK368450.1	396	4e-107	98	-	-	-
Kontik 3	87	-	-	-	-	-	-	-
Kontik 4	386	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein TRX_family AK361821.1	671	0	98	Predicted protein (TRX_family) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ94307.1 Predicted protein (TRX_family) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93025.1	73,6 73,6	9e-12 9e-12
Kontik 5	909	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Photosystem II subunit S (PsbS); AK365791.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248693.1	1576 1576	0 0	98 98	LIM-kinase1, isoform F [Drosophila melanogaster] NP_001162734.1 SID1 transmembran e family member 2 [Rattus norvegicus] NP_001101612.1	35.8 37.7	9.1 2.0
Kontik6	197	H.vulgare mRNA for LHC II type I protein X89023.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Chlorophyll A-B binding protein AK370975.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253131.1	327 320 309	1e-86 2e-84 4e-81	96 96 95	Frame 2 Large polymerase protein [Avian paramyxovirus 2] ADK25236.1	33.9	8.7
Kontik 7	248	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein ribulose-	420	2e-114	98	Frame 2 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/ox ygenase small subunit	48.1	4e-04

		bisphosphate carboxylase small chain AK358835.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248995.1 Hordeum vulgare ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit mRNA, complete cds U43493.1	420	2e-114	98	BAB19810.1 Predicted protein (RuBisCO_small)[Hordeum vulgare subsp. vulgare] >dbj BAJ89884.1 Predicted protein (RuBisCO_small)[Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ90550.1 Frame 3 Predicted protein (RuBisCO_small)[Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ89663.1	48.1	4e-04
			340	2e-90	92		48.1	4e-04
							38.9	0.27
Kontik 8	492	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Translation elongation factor G AK353897.1 Hordeum vulgare partial mRNA AJ234426.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare Azumamugi translation elongation factor EF-G gene AY028801.1	422	1e-114	83	Frame 2 Predicted protein (Translation elongation factor G) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ85116.1 Hypothetical protein Osl_16800 [Oryza sativa Indica Group] EAY94993.1 Frame 3 Translation elongation factor G [Hordeum vulgare subsp. spontaneum]	41.6	0.037
			333	7e-88	84		41.6	0.037
			522	5e-98	100		39,7	0,15
Kontik 9	1925	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxyg enase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast EF115541.1	1849	0,0	98	Frame 1 Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxy genase large subunit ABN59201.1 Frame 2 Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxy genase large subunit YP_002364509.1 Unnamed	169	2e-39
			1849	0,0	98		274	3e-71

		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1849	0,0	98	Protein product (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit [Carbohydrate transport and metabolism) [Hordeum vulgare] CAA25265.1	251	4e-64
			1849	0,0	98			
			1849	0,0	98			
Kontik 10	1510	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Helix-loop-helix domain, found in specific DNA-binding proteins that act as transcription factors AK354634.1	617	5e-173	98	-	-	-
Kontik 11	515	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Non-specific lipid-transfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily AK361740.1 H.vulgare Cw-21 mRNA X68654.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250295.1	737	2e-98	98	Frame 1 Conserved hypothetical protein [Verticillium albo-atrum VaMs.102] XP_003008793.1 Frame 3 Atypical protein kinase C lambda [Danio rerio] AAK91291.1	34,3	5,6
			737	2e-98	98		36.2	1.7
			726	9e-97	98			
			404	2e-49	85			

		H.vulgare Ltp4.2 gene	404	2e-49	85			
		Hordeum vulgare lipid transfer protein (blt4.9) gene	82.4	3e-12	76			
		H.vulgare Ltp4.3 gene						
Kontik12	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontik13	1475	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Translation elongation factor AK353897.1	715	0	99	Frame 1 Translation elongation factorEF- G [Hordeum vulgare subsp. spontaneum] AAK40279.1 AAK40271.1	46.6	0,009
		Hordeum vulgare partial mRNA AJ234426.1	521	4e-144	98	Frame 2-3 Predicted protein (Elongation factor G (EF-G) subfamily)[Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ85116.1	176	1e-41
		Hordeum vulgare subsp. vulgare Azumamugi translation elongation factor EF-G gene AY028801.1	517	1e-94	100			
Kontik14	321	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein rubredoxin_like, a small electron transfer protein iron binding site AK367764.1 AK376171.1 AK360444.1 AK364672.1 AK360082.1 AK362913.1	544	2e-151	97	Frame 2 Hypothetical protein Bxe_B1626 [Burkholderia xenovorans LB400] YP_553689.1	33,9	8,4
Kontik15	160	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein F-box domain AK364013.1	115	7e-23	93	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248545.1 AK248519.1 AK249500.1	115	7e-23	93			
		Hordeum	115	7e-23	93			

		vulgar carbonic anhydrase mRNA L36959.1						
Kontik16	1298	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily, TPP-binding module AK362454.1	1476 1459	0 0	97 98	Frame 1-2-3 Predicted protein (transketolase)[Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93658.1	71,6 73,9 78,2	2e-10 5e-11 2e-12
Kontik17	259	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248318.1	449	3e-123	98	Frame 1-3 putative senescence-associated protein [Pisum sativum] BAB33421.1 Frame 2 putative senescence-associated protein [Cupressus sempervirens] ACA30301.1	67.0 59.7	8e-10 1e-07
Kontik18	2043	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted proteinGDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanyltransferase; Provisional AK360727.1 AK358028.1	896	0	98	Frame 1 Os12g0190000 GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanyltransferase [Oryza sativa Japonica Group] NP_001066338.1 Frame 2 hypothetical protein Fluta_3656 [Fluviicola taffensis DSM 16823] YP_004346463.1	44,7 38.1	0,058 4.7
Kontik19	200	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Protein of unknown function (DUF1230) AK365128.1 Hordeum vulgare subsp.	248 202	9e-63 7e-49	93 93	-	-	-

		vulgare cDNA clone AK250696.1						
Kontik20	234	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Heme-dependent peroxidases similar to plant peroxidases AK356559.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248560.1	348 348	1e-92 1e-92	94 94	Frame 2 Predicted protein (Heme dependent peroxidases similar to plant peroxidases [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ87776.1	47.0	0.001
Kontik21	405	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Chlorophyll A-B binding protein AK356474.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251962.1 Hordeum vulgare gene for CP29 precursor for core chlorophyll a/b binding (CAB) protein of photosystem II (PSII) X63052.1	706 701 665	0 0 0	98 98 98	Frame 1 Precursor of CP29, core chlorophyll a/b binding (CAB) protein of photosystem II (PSII) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] CAA44777.1 Frame 2 Unknown [Zea mays] Chlorophyll A-B binding protein ACN28940.1 Frame 3 Unnamed protein product Chlorophyll A-B binding protein [Oryza sativa Japonica Group] BAG96979.1	73,9 67,0 54,3	2e-13 8e-11 6e-06
Kontik22	376	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK353743.1	257	3e-65	94	-	-	-
Kontik23	234	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252828.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK370758.1	492 396	3e-135 2e-106	98 98	-	-	-
Kontik24	1449	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone	686	0,0	99	Frame3 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis	75.9	1e-11

		AK248909.1 AK249435.1 AK248556.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Chlorophyll A-B binding protein AK353906.1 AK355827.1 AK356022.1 Hordeum vulgare Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1 AB500090.1	525	3e-145	91	vinifera] XP_002274741.1 Unknown [Zea mays] ZM_BFc0159N15 ACR36733.1 Hypothetical protein LOC100382418 [Zea mays] NP_001168632.1	71,6	3e-10
		AK355827.1 AK356022.1 Hordeum vulgare Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1 AB500090.1	403	2e-108	86		41,2	0,42
Kontik25	288	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Manganese-stabilising protein / photosystem II polypeptide AK358425.1 AK354253.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253085.1 AK253044.1 AK251452.1 AK251958.1	309	6e-81	95	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253085.1 AK253044.1 AK251452.1 AK251958.1	309	6e-81	95			
Kontik26	188	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248545.1 AK248519.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK364013.1 Hordeum vulgare carbonic anhydrase mRNA L36959.1	163	3e-37	95	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK364013.1	154	2e-34	94			
		Hordeum vulgare carbonic anhydrase mRNA L36959.1	137	2e-29	96			
Kontik27	238	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein	250	3e-63	89	-	-	-

		AK358425.1 AK354253.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253085.1 AK253044.1 AK251452.1 AK251958.1	250	3e-63	89			
Kontik 28	539	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK353897.1 Hordeum vulgare partial mRNA AJ234426.1 Hordeum vulgare subsp. Azumamugi translation elongation factor EF-G gene AY028801.1	534	2e-148	91	Frame 1 Predicted protein (Elongation factor G (EF-G) subfamily) [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ85116.1 Translation elongation factor EF-G [Hordeum vulgare subsp. vulgare] AAK40279.1 Frame 2 Translation elongation factor G [Hordeum vulgare subsp. spontaneum] AAX45013.1	77.4	8e-13
			459	1e-125	94		75.5	3e-12
			467	6e-84	97		39.3	0.22
Kontik29	423	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein PAP_fibrillin AK357118.1	599	5e-168	98	Frame 1/3 Predicted protein PAP_fibrillin [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ88333.1	77	8e-13

ARPA BİTKİSİNİN YAPRAK DOKUSUNA AİT 126 SİNGLETİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (blastN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (blastX- tblastX)		
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri
Singlet 1 1y1014	1476	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 2 1y1015	1510	Rauhia decora ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase large subunit AAF116979.1	398	3e-107	77	Frame 1/3 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97678.1 AAN27973.1	116	7e-24
Singlet 3 1y101	1304	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 4 1y 1020	349	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein PAP_fibrillin (plastid lipid- associated proteins) AK357118.1	294	2e-76	80	Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] PAP_fibrillin BAJ88333.1	99,5	2e-18
Singlet 5 1y1027	407	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Helix-loop-helix domain, found in specific DNA- binding proteins that act as transcription factors AK354634.1	375	9e-101	82	-	-	-
Singlet 6 1y 1036	1412	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 7 1Y 1039	1358	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare	1810 1810	0 0	98 98	Frame 1/2/3 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1 [Hordeum vulgare	60,8 594	4e-07 1e-167

		cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1810	0	98	subsp. spontaneum]. AY137453.1 Unnamed protein product [Hordeum vulgare] CAA25265.1		
Singlet 8 1y 1040	1542	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 9 1y 1054	318	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 10 1y 105	161	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein glutathione S-transferase" AK359004.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252331.1 Hordeum vulgare partial mRNA for putative glutathione-S-transferase AJ419771.1	235	5e-59	93	Frame 1 Conserved hypothetical protein [Penicillium marneffei ATCC 18224] XP_002146232.1 Frame 2/3 Predicted protein glutathione S-transferase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ90215.1	34,3	6,5
Singlet 11 1Y 1039	1473	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete	1816	0	98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	60,8	5e-07

		Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1816	0	98	large subunit [Ismene vargasii] AAF97660.1 AAF97678.1 Frame 3 unnamed protein product [Hordeum vulgare] Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit CAA25265.1	595	7e-168
Singlet 12 1Y 1068	1474	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1799	0	98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1 AAF97675.1 Frame 3 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	61,2	4e-07

		Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i> X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; <i>rbcl-psal</i> intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (<i>psal</i>) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1799	0	98			
Singlet 13 1y 1073	1343	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 14 1Y 1080	1363	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i> X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; <i>rbcl-psal</i> intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (<i>psal</i>) gene, partial cds;	1801 1801 1801 1801	0 0 0 0	98 98 98 98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1 AAF97675.1 Frame 3 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	60,8 598	5e-07 8e-169

		chloroplast AY836173.1						
Singlet 15 1Y 1085	1380	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1775	0	98	Frame 1/3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97675.1	53,9	6e-05
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	1775	0	98	Unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	619	5e-175
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1775	0	98			
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1775	0	98			
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1775	0	98			
Singlet 16 1Y 1086	1336	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	1799	0	98	Frame 1/3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1	60,8	4e-07
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	1799	0	98	Frame 3 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare]	636	2e-180

		AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1799	0	98			
			1799	0	98			
			1799	0	98			
Singlet 17 1y 1092	1355	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 18 1Y 1111	1507	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1251	0	88	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit Frame 3 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare]	148	2e-33
			1251	0	88		214	3e-37
			1251	0	88			
			1251	0	88			

		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1251	0	88			
Singlet 19 1y 1112	558	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 20 1y 1113	1260	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted proteinGDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanylttransferase; Provisional AK360727.1 AK358028.1	911 719	0 0	99 99	Frame 1 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanylttransferase BAJ91935.1 BAJ89242.1 BAJ86561.1	99,8	7e-19
Singlet 21 1y 1115	1633	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanylttransferase; Provisional AK360727.1 AK358028.1	481 355	8e-132 5e-94	86 86	-	-	-
Singlet 22 1Y 1117	1553	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1797 1797 1797	0 0 0	88 88 88	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97675.1 Frame 2 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1 Frame 3 Os12g0207600 [Oryza sativa Japonica Group] RuBisCO_large NP_001066389.1	53,9 619 70,1	6e-05 3e-175 9e-10

		Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i> X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; <i>rbcl-psal</i> intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (<i>psal</i>) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1797	0	88			
Singlet 23 1y 112	1546	-	-	-	-			
Singlet 24 1y 1124	1825	-	-	-	-			
Singlet 25 1Y 1128	1565	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i> X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; <i>rbcl-psal</i> intergenic	1812	0	98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97675.1	53,9	6e-05
			1812	0	98	Frame 2 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	609	4e-172
			1812	0	98	Frame 3 Os12g0207600 [Oryza sativa RuBisCO_large Japonica Group] NP_001066389.1	67,0	7e-09
			1812	0	98			
			1812	0	98			

		spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1						
Singlet 26 1y 1133	1548	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 27 1Y 1168	1559	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1831 1831 1831 1831 1831	0 0 0 0	98 98 98 98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97675.1 Frame 2 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1 Frame 3 Os12g0207600 [Oryza sativa RuBisCO_large Japonica Group] NP_001066389.1	53,5 650 69,7	8e-05 0,0 1e-09
Singlet 28 1y 1170	1594	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 29 1Y 1179	1470	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome	1792	0	97	Frame 1/2/3 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	573	2e-161

		EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1792	0	97	YP_874661.1		
			1792	0	97			
			1792	0	97			
			1792	0	97			
Singlet 30 1Y 118	1441	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast	1557	0	93	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAN27982.1 Frame 2 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	451	9e-125
			1557	0	93		451	1e-124
			1557	0	93			

		AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcL and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; rbcL-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1557 1557	0 0	93 93			
Singlet 31 1Y 1183	1456	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcL and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; rbcL-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1844 1844 1844 1844	0 0 0 0	98 98 98 98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97678.1 Frame 2 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Hordeum vulgare subsp. spontaneum] YP_874661.1	71,6 589	3e-10 3e-166

Singlet 32 1Y 1194	1497	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1	1803	0	98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAN27982.1	601	1e-169
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	1803	0	98	Frame 2 Os12g0207600 [Oryza sativa Japonica Group] NP_001066389.1	66,9	1e-08
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1803	0	98			
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1803	0	98			
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1						
Singlet 33 1y 120	248	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein "ICMT" Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) AK361630.1	453	2e-124	99	Frame 1 lysine 2,3-aminomutase YodO family protein YP_001112104.1	34,7	4,4
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250709.1	453	2e-124	99	Frame 2 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) BAJ92834.1	169	1e-40

Singlet 34 1Y 128	404	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 35 1Y 129	385	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 36 1Y 136	1325	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 37 1Y 139	294	Triticum aestivum clone wlsu2.pk0001.h3:fi s, full insert mRNA sequence BT009458.1	75	3e-10	89	-	-	-
Singlet 38 1Y 140	1510	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 39 1Y 158	1448	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 40 1Y 161	1219	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1	1775	0	99	Frame 1 [Pinus koraiensis] ABP35370.1	118	2e-24
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	1775	0	99	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAS01160.1	86,3	7e-15
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1775	0	99			
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1775	0	99			
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast						

		AY836173.1						
Singlet 41 Y 177	1285	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 42 Y 188	81	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein F-Box AK364013.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248545.1 AK248519.1 Hordeum vulgare carbonic anhydrase mRNA L36959.1	150 150 150	8e-34 8e-34 8e-34	100 100 100	Frame2 >gb EEA93694.1 peptidase M23B [Pseudovibrio sp. JE062] ZP_05085611.1 Frame 3 EMB1441 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	29,9 32,5	46 7,9
Singlet 43 Y233	1440	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal)	1827 1827 1827 1827 1827	0 0 0 0 0	99 99 99 99 99	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1 Frame 2 unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	60,1 598	7e-07 8e-169

		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; rbcL-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1801	0	98			
Singlet 48 Y 278	1454	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Non-specific lipid transfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily AK361740.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250295.1 AK248902.1 H.vulgare Cw-21 mRNA X68654.1 H.vulgare Ltp4.2 gene Z66529.1 Hordeum vulgare lipid transfer protein (blt4.9) gene U63993.1	281 281 281 167 167	7e-72 7e-72 7e-72 2e-37 2e-37	90 90 90 91 91	-	-	-
Singlet 49 Y 27	1306	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum	1327 1327 1327	0 0 0	87 87 87	Frame 1/2/3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Pspathyrostachys caduca] AAU11116.1 Unnamed protein product Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large [Hordeum vulgare] CAA25265.1	383 382	3e-104 7e-104

		voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1327	0	87			
			1327	0	87			
Singlet 50 Y 296	1298	Cherax quadricarinatus clone cherax_216 mRNA sequence DQ847737.1 Maylandia emmiltos isolate Psemill_28_3 MHC class II beta chain EF540314.1	69,4	6e-08	97	-	-	-
			54,7	0,002	94			
Singlet 51 Y 324	155	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 52 Y 336	1224	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 53 Y 338	1380	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted proteinThiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily, TPP-binding module AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare	1280	0	99	Frame 1 predicted protein transketolase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93658.1	255	1e-65
			1275	0	99			

		cDNA clone AK251463.1						
Singlet 54 Y 339	1446	Cherax quadricarinatus clone h14_A6 mRNA sequence	62,1	1e-05	97	-	-	-
Singlet 54 Y 340	1492	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 55 Y 350	1444	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 56 Y 351	11284	Cloning vector pGBT-R16, complete sequence HQ335169.1	394	8e-106	79	Frame 1 conserved hypothetical protein [Streptomyces ghanaensis ATCC 14672] >gb ABK60177.1 putative reverse transcriptase [Zingiber officinale] >gb EFE70172.1 conserved hypothetical protein [Streptomyces ghanaensis ATCC 14672] ZP_06579711.1	69,3	1e-09
Singlet 57 Y 355	484	Lithognathus mormyrus clone lmos9p10d12 mRNA sequence DQ851057.1	78,7	3e-11	94	-	-	-
Singlet 58 Y 369	397	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 59 Y 372	1369	pWE15A cosmid vector DNA Z12112.1	141	1e-29	86	Frame 3 translation elongation factor G [Hordeum vulgare subsp. Spontaneum AAX45013.1	60,8	4e-07
Singlet 60 Y 375	1353	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted proteinThiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily, TPP- binding module AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	1166 1160	0 0	98 98	Frame 1 predicted protein transketolase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93658.1 Frame 3 DNA-dependent helicase II [Vibrio caribbenthicus ATCC BAA-2122] ZP_07741222.1	255 36,6	8e-66 9,8
Singlet 61	1360	Hordeum vulgare subsp. vulgare	1393	0	99	Frame 1 predicted protein transketolase	253	3e-65

Y 37		mRNA for predicted protein Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily, TPP-binding module AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	1387	0	98	[Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93658.1		
Singlet 62 Y 385	1352	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 63 Y 394	114	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ribulose-bisphosphate carboxylase small chain AK358991.1 AK355220.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250863.1	187 187	1e-44 1e-44	96 96	-	-	-
Singlet 64 Y417	1407	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	1820 1820 1820	0 0 0	99 99 99	Frame 1/2/3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Festuca YP_002364509.1 Unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	610 607	1e-172 2e-171

		nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1820	0	99			
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1						
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1820	0	99			
Singlet 65 Y 420	460	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 66 Y427	204	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein nsLTP1 AK361740.1	377	1e-101	100	-	-	-
		H.vulgare Cw-21 mRNA X68654.1	377	1e-101	100			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250295.1	372	5e-100	99			
		H.vulgare Ltp4.2 gene Z66529.1	209	4e-51	86			
		H.vulgare Ltp4.3 gene Z66528.1	93,5	5e-16	77			
		Hordeum vulgare lipid transfer protein (blt4.9) gene	209	4e-51	86			

		U63993.1						
Singlet 67 Y428	520	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK361740.1 H.vulgare Cw-21 mRNA X68654.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250295.1 H.vulgare Ltp4.2 gene Z66529.1 H.vulgare Ltp4.3 gene Z66528.1 Hordeum vulgare lipid transfer protein (blt4.9) gene U63993.1	302 302 296 143 75 143	2e-78 2e-78 9e-77 1e-30 5e-10 1e-30	92 92 92 80 86 80	-	-	-
Singlet 68 Y433	1482	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 69 Y439	942	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein transketolase AK362454.1	1319 1303	0 0	94 94	Frame 1/3 predicted protein transketolase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93658.1	51,2	2e-04
Singlet 70 Y445	1429	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 71 Y44	400	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein	289	1e-74	91	Frame 1 hypothetical protein MCP_0783 [Methanocella paludicola SANAE]	34,3	5,8

		AK361740.1 H.vulgare Cw-21 mRNA X68654.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250295.1 H.vulgare Ltp4.2 gene Z66529.1 H.vulgare Ltp4.3 gene Z66528.1 H.vulgare (clone pKG285) mRNA for lipid transfer protein precursor Z37115.1	289	1e-74	91	YP_003355838.1		
Singlet 72 Y452	1282	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanylttransferase; Provisional AK360727.1 AK358028.1	765	0,0	94	Frame 1 predicted protein GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanylttransferase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ91935.1	115	1e-23
Singlet 73 Y459	1429	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 74 Y478	519	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 75 Y484	872	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanylttransferase AK360727.1 AK358028.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	793	0	93	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	468	3e-128	95			

		AK362454.1						
Singlet 76 Y489	464	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248909.1 AK249435.1 AK248556.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein from seedling shoot at low temperature AK353906.1 Hordeum vulgare Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b- binding protein Lhcb1 AB500090.1	603 368 333	4e-169 2e-98 6e-88	95 85 84	Frame 1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera] XP_002274741.1 Frame 2 Os04g0457100 [Oryza sativa Japonica Group] NP_001052970.1	64,3 35,8	5e-09 2,2
Singlet 77 Y490	480	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 78 Y491	259	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 79 Y492	555	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 80 Y494	159	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 81 Y633	1542	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 82 Y672	1198	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	1303 1303	0 0	92 92	Frame 1 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1	63,5	5e-08

		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1303	0	92			
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1303	0	92			
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1303	0	92			
Singlet 83 Y686	1245	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-3 FN552497.1	73,1	4e-09	100	-	-	-
Singlet 84 Y724	1405	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1	1489	0	91	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Hordeum vulgare subsp. vulgare] YP_874661.1	267	3e-69
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	1489	0	91	Frame 2 unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	234	2e-59
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1489	0	91			
		Barley chloroplast						

		genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i> X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; <i>rbcl</i> - <i>psal</i> intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (<i>psal</i>) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1489	0	91			
Singlet 85 Y72	1387	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes <i>rbcl</i> and <i>atpB</i> X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (<i>rbcl</i>) gene, complete cds; <i>rbcl</i> - <i>psal</i> intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (<i>psal</i>) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1810 1810 1810 1810 1810	0 0 0 0	99 99 99 99	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Ismene vargasii] AAF97660.1 Frame 2 unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	60,8 600	5e-07 2e-169
Singlet 86	1749	-	-	-	-	-	-	-

Y736								
Singlet 87 Y740	1518	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 88 Y742	248	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 89 Y745	1476	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 90 Y748	1435	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1825 1825 1825 1825 1825	0 0 0 0 0	98 98 98 98 98	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1 Frame 2 unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	61,2 600	4e-07 2e-169
Singlet 91 Y749	193	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ATP synthase B/B' CF(0)	357	1e-95	100	-	-	-

		AK362301.1 AK366289.1 AK368757.1						
Singlet 92 Y769	1469	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 93 Y788	1319	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1825 1825 1825 1825 1825	0 0 0 0	99 99 99 99	Frame 1 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1 Frame 3 unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	59,7 594	1e-06 1e-167
Singlet 94 Y791	514	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein SNARE associated Golgi protein AK369228.1 AK366298.1	950	0	100	Frame 1 predicted protein SNARE associated Golgi protein; cl00429 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAK00430.1	301	3e-80

Singlet 95 Y810	1037	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 96 Y812	198	H.vulgare mRNA for LHC II type I protein X89023.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK370975.1	220 215	2e-54 9e-53	87 86	Frame 3 unknown [Zea mays] ACN31750.1	38,1	0,38
Singlet 97 Y818	300	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTLCD2-3 FN552497.1	69,4	1e-08	100			
Singlet 98 Y823	1532	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 99 Y833	1946	-	-	-	-	-	-	-

Singlet 100 Y873	1338	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1	1873	0	99	Frame 1 Os12g0207600 [Oryza sativa Japonica Group] NP_001066389.1	72,4	1e-10
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	1873	0	99	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit AAF97660.1	72,0	2e-10
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1873	0	99	Frame 3 ribulosebiphosphate carboxylase [Peridictyon sanctum] CAA90006.1	670	0,0
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1873	0		unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1		
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1			99			
Singlet 101 Y788	466	Cherax quadricarinatus clone cherax_216 mRNA DQ847737.1 DQ847737.1 sequence	73.1	1e-09	100	-	-	-
Singlet 102 Y885	1332	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 103 Y890	1449	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 104 Y917	1793	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 105 Y933	1990	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 106 Y938	1330	Hordeum vulgare subsp. vulgare	1437	0	98	Frame 3 predicted protein transketolase	253	4e-65

		mRNA for predicted protein Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	1432	9	98	[Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ93658.1		
Singlet 107 Y939	1500	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1716 1716 1716 1716 1716	0 0 0 0 0	97 97 97 97	Frame 1/2/3 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Festuca arundinacea] YP_002364509.1 unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	556 551	4e-156 8e-155
Singlet 108 Y948	1325	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein	1386	0	99	Frame 3 predicted protein transketolase	253	4e-65

		Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	1380	0	98	[Hordeum vulgare subsp. vulgare] J93658.1		
Singlet 109 Y950	628	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein GDP-L-galactose-hexose-1-phosphate guanyltransferase; Provisional AK360727.1 AK358028.1	540	5e-150	98	-	-	-
Singlet 110 Y951	1383	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	1229 1223	0 0	97 97	Frame 3 Predicted protein transketolase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] J93658.1	254	3e-65
Singlet 111 Y954	1848	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcl) gene,	1716 1716 1716	0 0 0	97 97 97	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Strumaria truncata] AAF97675.1 Unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare] CAA25265.1	53,5 465	7e-05 7e-129

		complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcL and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcL) gene, complete cds; rbcL-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1716 1716	0 0		97 97		
Singlet 112 Y956	1408	Cloning vector psiLentGene Basic, complete sequence AY508731.1	710	0	86	Frame 1 conserved hypothetical protein [Escherichia coli H591] ZP_08378005.1	69,3	1e-09
Singlet 113 Y957	157	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for papain-like cysteine proteinase (pap-16 gene) AM941126.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252337.1	219 165	5e-54 7e-38	96 96	- -	- -	- -
Singlet 114 Y961	201	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 115 Y962	1305	Expression vector pLoxGentrc, complete sequence JF934954.1	406	2e-62	87	Frame 1 conserved hypothetical protein [Escherichia coli H591] ZP_08378005.1	66,2	1e-08
Singlet 116 Y964	1338	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 117 Y966	1720	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 118 Y967	1466	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcL) gene,	1410 1410	0 0	98 98	Frame 1 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Strumaria truncata] AAF97675.1 Unnamed protein product Ribulose bisphosphate carboxylase large chain [Hordeum vulgare]	54,7 458	4e-05 1e-126

		chloroplast AY137456.1						
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1	1367	0				
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	1367	0		96		
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	1367	0		96		
						96		
Singlet 122 Y982	1280	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Thiamine pyrophosphate (TPP) family, Transketolase (TK) subfamily AK362454.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251463.1	1500	0	99	Frame 2 Predicted protein transketolase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] J93658.1	255	1e-65
			1495	0	99			
Singlet 123 Y984	419	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Elongation factor G (EF-G) AK353897.1 Hordeum vulgare partial mRNA; clone cMWG0699 AJ234426.1 Hordeum vulgare	364	2e-97	84	Frame 1 Os04g0538100 [Oryza sativa Japonica Group] NP_001053430.1 Translation elongation factor EF-G [Hordeum marinum subsp. Gussoneanum AAK40271.1 Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ85116.1	60,8	7e-08
			302	2e-78	87		56,2	2e-06
			176	1e-40	86		55,1	3e-06

		subsp. spontaneum translation elongation factor G (EF-G) gene, partial cds AY836205.1						
Singlet 124 Y988	1425	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 125 Y989	1409	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 126 Y98	1334	Cloning vector psiLentGene Basic, complete sequence AY508731.1	575	3r-160	84	Frame 1 Conserved hypothetical protein [Escherichia coli H591] ZP_08377996.1	42,7	0,13

ARPA BİTKİSİNİN KÖK DOKUSUNA AİT 26 KONTİK' İN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (blastN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (blastX- tblastX)		
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri
Kontik 1	193	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Double-stranded RNA binding motif AK356049.1	329	3e-87	98	Frame 2 Acetyl-CoA acetyltransferase [Plesiocystis pacifica SIR-1] ZP_01912478.1	33.9	8.4
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249305.1	329	3e-87	98			
Kontik 2	289	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein RNA-binding protein AK373820.1	502	2e-115	99	Frame 2 DNA Processing protein [Lactobacillus crispatus ST1] YP_003601526.1	33.9	7.7
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252361.1	502	2e-115	99	Frame 3 H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein RNA-binding protein; Provisional BAK05017.1	62.4	2e-08
Kontik 3	207	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone	344	1e-91	97	-	-	-

		AK251251.1 Hordeum vulgare HvPIP1;3 mRNA, complete cds AB009308.2	344	1e-91	97			
Kontik 4	384	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Aspartate aminotransferase family AK359363.1	647	0	97	Frame 2 type III restriction enzyme [Bacteroides sp. 4_1_36] ZP_07938610.1	36.6	1.1
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250046.1	647	0	97	Frame 3 polyadenylate-binding protein 2-A [Xenopus laevis] NP_001082057.1	36.6	1.2
Kontik 5	137	H.vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein P-loop containing Nucleoside Triphosphate AK359208.1	209	3e-51	95	-	-	-
		Hordeum vulgare Rca mRNA for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase small isoform, complete cds	209	3e-51	95			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249203.1 AK248820.1 AK252550.1						
		Hordeum vulgare subsp. vulgare ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase M55449.1						
		Hordeum vulgare rubisco activase						

		(RcaA2) mRNA M55447.1 Hordeum vulgare rubisco activase (RcaA1) mRNA M55446.1						
Kontik6	353	-	-	-	-	-	-	-
Kontik 7	191	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Oxygen evolving enhancer protein 3 (PsbQ); AK357796.1 AK356829.1 AK356794.1 AK359673.1	339	5e-90	100	Frame 1 CIP111 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]The AAA+ (ATPases Associated with a wide variety of cellular Activities) superfamily represents an ancient group of ATPases belonging to the ASCE (for additional strand, catalytic E) division of the P-loop NTPase fold. The ASCE division also includes...; cd00009" XP_002878101.1	33.5	9.4
Kontik 8	402	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Elongation factor G (EF-G) subfamily AK353897.1 Hordeum vulgare partial mRNA AJ234426.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare Azumamugi translation elongation factor EF-G gene AY028801.1	697 508 502	0 8e-141 1e-93	98 98 98	Frame 2 hypothetical protein LOC100384846 [Zea mays] NP_001170753.1	50.4	7e-05
Kontik 9	340	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249528.1 Hordeum vulgare subsp.	604 580	8e-170 1e-162	99 99	Frame 1 glutathione transferase10 [Zea mays] NP_001104979.1 Frame 2	36.2	1.6

		vulgare mRNA for predicted protein glutathione S-transferase AK354013.1				predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] glutathione S-transferase BAJ85232.1	155	2e-36
Kontik 10	503	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit AK369652.1 AK360618.1 AK354843.1 AK358450.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249588.1 AK249082.1 Hordeum vulgare ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit U43493.1 Hordeum vulgare rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase AB020943.1	881	4e-125	100	Frame 1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ox ygenase small subunit BAB19810.1 Predicted protein Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ90550.1 Frame 2 Pseudouridylate synthase, related [Neospora caninum Liverpool] CBZ54407.1 Frame 3 RuBisCO_small BAJ89663.1	81.6	3e-14
			698	2e-97	93		81.6	3e-14
							33.5	9.8
Kontik 11	355	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein photosystem I reaction center subunit N (PsaN); AK366882.1 AK359301.1	593	2e-166	97	-	-	-

Kontik 12	266	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain AK360438.1	451	9e-124	98	Frame 3 chloroplast ferredoxin 1 precursor [Zea mays] 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain ACA34367.1	35.8	1.8
Kontik 13	317	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Tyrosine kinase AK368040.1	355	9e-95	94	Frame 1 receptor kinase LRK9 [Avena sativa] AAM09946.1 Frame 1-2-3 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] Tyrosine kinase, catalytic domain TyrKc BAJ99243.1 BAJ87570.1 BAJ87718.1 BAJ95981.1	70.1 59.7 57.8 57	1e-10 1e-07 5e-07 8e-07
Kontik 14	242	Hordeum vulgare Lhcb1 gene for light harvesting chlorophyll a/b-binding protein Lhcb1, complete cds AB500090.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250765.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Chlorophyll A-B binding protein; cl02879" AK372776.1	392 377 233	5e-106 1e-101 3e-58	96 95 89	-	-	-
Kontik15	245	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted	398	1e-107	97	Frame 1 RecName: Full=Ribulose bisphosphate	40.0 38.9 38.9	0,095 0,24 0,25

		protein AK358672.1, AK358835.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250140.1 Hordeum vulgare ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase small subunit U43493.1 Hordeum vulgare rbcS gene for ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase AB020943.1	398	1e-107	97	carboxylase small chain Q38793.1 Ribulosebispho sphate carboxylase [Triticum aestivum] CAA25058.1 Predicted protein ribulose- bisphosphate carboxylase small chain [Hordeum vulgare subsp. vulgare] BAJ89884.1 Frame 3 Hypothetical protein [Secale cereale] CAA10497.1		
Kontik16	265	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein P-loop NTPase AK359208.1 Hordeum vulgare Rca mRNA for ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase AB564719.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone 249203.1 Hordeum vulgare rubisco activase (RcaA2) mRNA M55447.1 Hordeum vulgare rubisco activase (RcaA1) mRNA, 3' end M55446.1 Hordeum vulgare mRNA	464	1e-127	100	Frame 1 hypothetical protein PPL_04220 [Polysphondyliu m pallidum PN500] RT_like: Reverse transcriptase EFA82532.1 Os11g0707100 [Oryza sativa Japonica Group] P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases; NP_001068556.1 Frame 3 Unknown (protein for MGC:35458) [Homo sapiens] P-loop containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases; AAH29790.1 Predicted	34.7	5.0
			464	5e-121	98			
			464	5e-121	98			
			456	1e-107	100		35	8.3

		for RuBisCO activase, partial cds AB367449.1	355	7e-95	100	protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] P-loop NTPase BAJ90419.1		
Kontik17	259	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253052.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein FBP_aldolase_ l_a AK376959.1	671 610	0 2e-171	96 97	Frame 3 Ribulose bisphosphate carboxylase activase [Linum usitatissimum] ADD54616.1		
Kontik18	198	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein P-loop NTPase AK359 208.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248820.1 Hordeum vulgare rubisco activase (RcaA2) mRNA M55447.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase M55449.1 Hordeum vulgare rubisco activase (RcaA1) mRNA, 3' end M55446.1	351 351 348 318 226	7e-94 7e-94 9e-93 7e-84 4e-56	99 99 98 99 99	Frame 2 Peptide methionine sulfoxide reductase A1 [Arabidopsis thaliana] NP_568937.1 Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] Peptide methionine sulfoxide reductase; cl00366 BAK01533.1	40.8 40,0	0,066 0,096

Kontik19	210	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Peptide methionine sulfoxide reductase; cl00366 AK370332.1	344	1e-91	97	Frame 1 multidrug resistance-associated protein 4 [Canis lupus familiaris] NP_001184103.1 Frame 2 hypothetical protein [Plasmodium vivax Sal-1] >gb EDL44113.1 hypothetical protein, conserved [Plasmodium vivax] XP_001613840.1	33,5 34.7	9,3 4.5
Kontik20	235	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253057.1 AK252048.1	388	6e-105	97	-	-	-
Kontik21	240	H.vulgare (clone pKG2316) mRNA for lipid transfer protein precursor Z37114.1 H.vulgare Cw-18 mRNA X68655.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Non-specific lipid-transfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily AK360670.1 AK370109.1 H. vulgare BLT4 mRNA Non-specific lipid-transfer protein type 1(nsLTP1) subfamily; Plant nsLTTPs are small, soluble proteins that	405 388 355 287	6e-110 6e-105 6e-95 2e-74	97 96 94 89	- - -	- -	

		facilitate the transfer of fatty acids, phospholipids, glycolipids, and steroids between membranes. In addition to lipid transport and...; cd01960 X56547.1						
Kontik22	224	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Glutamine synthetase, beta-Grasp domain AK360336.1 AK364289.1 Hordeum vulgare mRNA for glutamine synthetase precursor X16000.1 Barley gln mRNA for glutamine synthetase 2 (EC 6.3.1.2) X53580.1	379 200	3e-102 3e-48	98 98	Frame 3 Glutamate-ammonia ligase (EC 6.3.1.2) – tobacco Glutamine synthetase S22527 Putative precursor chloroplastic glutamine synthetase [Oryza sativa] AAL87183.1	36,6 36,2	1,1 1,7
Kontik23	234	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein Chlorophyll A-B binding protein AK372776.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252089.1	422 283	9e-115 4e-73	90 95	- -	- -	- -
Kontik24	218	Hordeum vulgare p23k-3 mRNA for hypothetical protein AB251340.1 Hordeum vulgare p23k-4 mRNA for hypothetical protein AB251341.1	348 342	1e-92 4e-91	96 96	- -	- -	- -

		Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK353563.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250417.1 Hordeum vulgare p23k-2 mRNA for hypothetical protein AB251339.1 Hordeum vulgare p23k-1 mRNA for hypothetical protein AB251338.1 H.vulgare gene encoding jasmonate-induced protein X98124.1	337	2e-89	95			
			337	2e-89	95			
			337	2e-89	95			
			337	2e-89	95			
			331	1e-87	95			
Kontik25	324	TPA_exp: Hordeum vulgare mRNA for putative cysteine proteinase precursor (sf42 gene) BN000093.1 Hordeum vulgare partial mRNA for putative cysteine proteinase AJ496571.2 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Peptidase C1A subfamily AK361896.1 AK362853.1	529	5e-147	96	-	-	-
			529	5e-147	96			
			523	2e-145	96			

Kontik26	414	Hordeum vulgare p23k-1 mRNA for hypothetical protein AB251338.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK353563.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250417.1 Hordeum vulgare p23k-3 mRNA for hypothetical protein AB251340.1 Hordeum vulgare p23k-2 mRNA for hypothetical protein AB251340.1 Hordeum vulgare p23k-4 mRNA for hypothetical protein AB251341.1	673 667 667 667 652 604	0 0 0 0 0 1e-169	96 96 96 96 95 96	-	-	-

ARPA BİTKİSİNİN KÖK DOKUSUNA AİT 37 SİNGLETİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (blastN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (blastX- tblastX)		
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri
Singlet 1 K1-1-23	578	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Ribosomal protein S6 AK358993.1	1050	0	99	-	-	-
Singlet 2 K1-1-51	216	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein chaperone protein DnaJ AK364796.1	346	3e-92	97	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248874.1	346	3e-92	97			
Singlet 3 K1-1-54	267	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein P-loop NTPase AK359208.1	494	1e-136	100	Frame 2 Endonuclease/exon uclease/phosphatas e family [Methylophaga thiooxidans]	33,9	7,7
		Hordeum vulgare Rca mRNA for ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase AB564719.1	494	1e-136	100	Frame 3 Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] P-loop NTPase BAJ90419.1	186	7e-46
						Ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygen ase activase small isoform [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	186	7e-46
Singlet 4	340	Hordeum vulgare	372	9e-100	87	Frame 1	89,7	1e-16

K2-1-15		subsp. vulgare cDNA clone AK249528.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein glutathione S- transferase AK354013.1	348	2e-92	87	Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] glutathione S- transferase BAJ85232.1		
Singlet 5 K2-1-18	250	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252992.1	451	8e-124	99	Frame 3 S,adenosylmethioni ne decarboxylase precursor [Triticum aestivum] AAD17232.1	62,4	2e-08
Singlet 6 K2-1-22	1095	Cloning vector psiLentGene Basic, complete sequence AY508731.1	867	0	90	Frame 1 SocE [Bacillus cereus W] >ref ZP_03104355.1 .1 ZP_03104354.1 Frame 2 Conserved hypothetical protein [Streptomyces ghanaensis ATCC 14672] >gb ABK60177.1 ZP_06579711.1 Frame 3 Conserved hypothetical protein [Escherichia coli H591] ZP_08378005.1	89,7 102 69,3	7e-16 6e-20 1e-09
Singlet 7 K2-1-25	236	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249593.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase M55449.1 Hordeum vulgare rubisco activase (RcaA1) mRNA M55446.1	370 351 351	2e-99 8e-94 8e-94	97 98 98	-	-	-
Singlet 8 K2-1-38	226	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252708.1 AK252627.1 AK249868.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ribulose- bisphosphate	418 390	7e-114 2e-105	100 97	-	-	-

		carboxylase small chain AK355220.1						
Singlet 9 K2-1-3	502	Triticum aestivum cDNA, clone: WT013_E02, cultivar AK335574.1	876	0	98	Frame 1 Glycine decarboxylase P subunit [x Tritordeum sp.] AAB82711.1	307	2e-82
Singlet 10 K2-1-42	171	H.vulgare mRNA for glycine rich protein Z48625.1	193	4e-46	99	-	-	-
Singlet 11 K2-1-44	363	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Methyltransf_2 AK365008.1	480	3e-95	100	Frame 1 Flavonoid 7-O-methyltransferase [Hordeum vulgare subsp. vulgare] CAA54616.1	52	2e-05
		H.vulgare L. mRNA for flavonoid 7-O-methyltransferase X77467.1	480	3e-95	100	Frame 2 Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] Methyltransf_2 BAJ96211.1	140	4e-32
Singlet 12 K2-1-45	215	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ribulose-bisphosphate carboxylase small chain AK355220.1 AK367476.1 AK358991.1	259	5e-66	87	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252711.1 AK252627.1 AK250863.1	259	5e-66	87	-	-	-
Singlet 13 K2-1-64	332	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein glutathione S-transferase AK354013.1	224	3e-55	80	Frame 2 Maturase K [Lanaria lanata] CAE46257.1	34,7	4,2
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249528.1	224	3e-55	80	-	-	-
Singlet 14 K2-1-69	372	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Chromosome segregation protein SMC, primarily archaeal type; TIGR02169 AK372960.1 AK365515.1	675	0	99	-	-	-
Singlet	191	Hordeum vulgare	246	3e-62	89	-	-	-

15 K2-1-72		subsp. vulgare mRNA for predicted proteinCytochrome C oxidase subunit II, periplasmic domain; cl11412 AK361139.1 AK359907.1	246	3e-62	89			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253109.1 AK248464.1 AK248462.1	246	3e-62	89			
Singlet 16 K2-1-86	129	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251270.1	239	3e-60	100	Frame 3 Os04g0490800 [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein NP_001053167.1	89,7	1e-16
Singlet 17 K2-1-94	281	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253077.1 AK250645.1	518	9e-144	100	Frame 1 hypothetical protein CHLNCDRAFT_13554 2 [Chlorella variabilis] EFN54146.1 Frame 2 LipG [Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K- 10]>gb[AAS06668.1 LipG[Mycobacteriu m avium subsp. paratuberculosis K- 10] NP_963052.1 Frame 3 Os07g0141400 [Oryza sativa Japonica Group] hypothetical protein PsbP NP_001058863.1	37 34,7 117	1,0 4,0 7e-25
Singlet 18 K3-1-30	256	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein E1-E2 ATPase; pfam00122 AK374455.1 AK358556.1	207	2e-50	82	-	-	-
Singlet 19 K3-1-49	275	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Glutamine amidotransferases class-II (GATase) AK369319.1 AK357281.1 AK370748.1 AK362862.1	508	5e-141	100	Frame 1 amidotransferases Unknown [Zea mays] ACN33465.1 Frame 3 Hypothetical protein [Zea mays] ADT92200.1	52,8 42,4	2e-05 0,021
Singlet 20	272	Hordeum vulgare subsp. vulgare	484	9e-134	98	Frame 1	33,9	7,4

K3-1-53		cDNA clone Trp-synth-beta_II AK248898.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Tryptophan synthase beta II AK354728.1	174	2e-40	97	predicted protein [Populus trichocarpa] >gb EEF05012.1 XP_002323251.1 Frame 2 O-acetylserine sulfhydrylase P38076.1	162	1e-38
Singlet 21 K3-1-58	237	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein OTU-like cysteine protease; cl14910 AK366619.1 AK360546.1 AK364485.1	438	6e-120	100	Frame 1 GG12409 [Drosophila erecta] XP_001982100.1	34,7	4,9
Singlet 22 K3-1-65	199	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251251.1 Hordeum vulgare HvPIP1;3 mRNA, complete cds Major intrinsic protein (MIP) superfamily AB009308.2	363 357	3e-97 1e-95	99 99	Frame 2 Protein kinase, putative [Aspergillus clavatus NRRL 1] XP_001276214.1	35,4	2,8
Singlet 23 K3-1-70	225	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ferredoxin-- NADP(+) reductase AK368450.1 AK367092.1	405	6e-110	99	Frame 3 Ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase [Triticum aestivum] CAD30024.2 Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] ferredoxin--NADP(+) reductase BAJ98295.1	99,0 97,1	2e-19 7e-19
Singlet 24 K3-1-90	427	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ZIP Zinc transporter; pfam02535 AK376120.1 AK360012.1 AK359262.1 Triticum aestivum cDNA, clone AK331366.1 Triticum aestivum putative zinc transporter (ZIP5) mRNA DQ490132.1	773 350 298	0,0 6e-93 2e-77	99 92 93	Frame 2 hypothetical protein SELMODRAFT_4489 20 [Selaginella moellendorffii] XP_002992839.1 Frame 3 Predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] Predicted divalent heavy-metal cations transporter [Inorganic ion transport and metabolism BAK07315.1 BAJ91221.1 Putative zinc transporter [Triticum aestivum] ABF55690.1	35,4 137 126	2,5 4e-31 9e-28

Singlet 25 K3-1-95	256	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251927.1 AK250369.1	438	7e-120	99	-	-	-
Singlet 26 K4-1-24	216	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252992.1	394	1e-106	99	Frame 2 S,Adenosylmethionine decarboxylase precursor [Triticum aestivum] AAD17232.1	42,7	0,014
Singlet 27 K4-1-31	330	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ribulose-bisphosphate carboxylase small chain AK364796.1 AK359339.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248874.1	604 604	8e-170 8e-170	99 99	Frame 2 unknown [Zea mays] ACR35606.1 Frame 3 predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] ribulose-bisphosphate carboxylase small chain BAJ90550.1 BAJ89884.1	56,2 230	2e-06 5e-59
Singlet 28 K4-1-42	225	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone	342	5e-91	94	Frame 3 putative calcineurin B subunit [Oryza sativa Japonica Group] Ca2+-binding protein BAD36027.1	48.5	3e-04
Singlet 29 K4-1-47	226	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249781.1	411	1e-111	99	Frame 1 putative calcineurin B subunit [Oryza sativa Japonica Group] BAD36027.1 Calcineurin subunit B [Zea mays] NP_001151790.1	52.4 51,2	2e-05 5e-05
Singlet 30 K4-1-62	203	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein Plant Basic Secretory Protein; pfam04450 AK361046.1 AK354328.1 Hordeum vulgare mRNA for hypothetical protein, clone pBH6-17 Y14202.1	370 370 370	2e-99 2e-99 2e-99	99 99 99	Frame 2 2'-5' RNA ligase [Thermotogales bacterium mesG1.Ag.4.2] ZP_07577498.1 Frame 3 Hypothetical protein Plant Basic Secretory Protein; pfam04450 [Hordeum vulgare] CAA74594.1	33,9 66,1	6,7 4e-08
Singlet 31 K4-1-66	281	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250046.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for	520 75	3e-144 2e-10	100 100	Frame 3 Os07g0108300 [Oryza sativa Japonica Group] alanine transaminase NP_001058716.1	185	2e-45

		predicted protein Aspartate aminotransferase family AK359363.1				Alanine aminotransferase [Oryza sativa Indica Group] AAO84040.1	182	1e-44
Singlet 32 K4-1-67	458	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein ZnF_GATA AK360901.1	841	0	99	Frame 1 binding-protein- dependent transporter inner membrane component family protein 62 [Achromobacter xylooxidans A8] YP_003981534.1 Frame 3 EmrB/QacA family albicidin efflux pump [Rothia dentocariosa ATCC 17931] YP_003984039.1 Drug transporter [Rothia dentocariosa M567] ZP_07073242.1	34,7 34,3	4,2 5,3
Singlet 33 K4-1-70	200	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein catalase_clade_1 Clade 1 of the heme-binding enzyme catalase AK357533.1 AK355674.1 AK359652.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248618.1	364 364	9e-98 9e-98	99 99	Frame 1 Hypothetical protein Cpham1_2156 [Chlorobium phaeobacteroides BS1] YP_001960542.1	33,9	7,2
Singlet 34 K4-1-77	274	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248826.1 AK249662.1	507	2e-140	100			
Singlet 35 K4-1-86	467	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251927.1 AK250369.1 Hordeum vulgare partial mRNA AJ234432.1	846 78,7	0 3e-11	99 97	Frame 1 GG15605 [Drosophila erecta] XP_001972591.1 Frame 3 phosphoethanolami ne methyltransferase [Triticum aestivum] AAL40895.1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] predicted protein S- adenosylmethionine -dependent methyltransferases	33,5 364 335	9,4 6e-85 8e-77

						(SAM or AdoMet-MTase), BAJ97525.1		
Singlet 36 K4-1-88	245	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 37 K4-1-8	339	Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxyge nase large subunit (rbcl) gene, complete cds; rbcl-psal intergenic spacer, complete sequence; and photosystem I subunit VIII (psal) gene, partial cds; chloroplast AY836173.1	627 627 627 627 627	2e-176 2e-176 2e-176 2e-176	100 100 100 100	Frame 1 photosystem II protein D1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare] YP_874633.1	230	5e-59

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Başak ÇELİK ALTINIŞIK
Doğum Tarihi ve Yeri :Ardahan/ 01.08.1978
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :basak_clk@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans orta	Biyoloji	İ.Ü	1998
Lise iyi	Fen	Beşiktaş Kız Lisesi	1994

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009-2010 yaz dönemi	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2000-devam ediyor	Fen Bilimleri Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni

YAYINLARI

Bildiri

Molecular and bioinformatics Analysis of cDNAs Selected from SSH Libraries Constructed From *Hordeum spontaneum* Grown Under Zinc deficient, Conditions The International Congress on Bioinformatics and Biomics, 18- 22 May, 2011, Pine bay Holiday Resort, Kusadası, TURKEY.