

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

**ORGANİK VE KONVANSİYONEL FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)
YETİŞTİRİCİLİĞİNDE TUZ STRESİ UYGULAMASINDA AKTİVASYONU ARTAN
DREB2A GENİNİN EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

NESLİHAN ŞİMŞEK KIZIL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORGANİK VE KONVANSİYONEL FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)
YETİŞTİRİCİLİĞİNDE TUZ STRESİ UYGULAMASINDA AKTİVASYONU ARTAN
DREB2A GENİNİN EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

Neslihan ŞİMŞEK KIZIL tarafından hazırlanan tez çalışması 28.06.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Birsen CEVHER KESKİN

Tübitak MAM

Prof. Dr. Barboros NALBANTOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün BAP 2011-01-07-YULAP03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Büyük Aileme,

Haziran, 2013

Neslihan ŞİMŞEK KIZIL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış. xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	6
BÖLÜM 2	
2.1 Organik Tarım Nedir?	7
2.2 Organik Tarımın Amaçları	8
2.3 Organik Tarımın İlkeleri.....	9
2.4 Dünya 'da Organik Tarım	11
2.5 Türkiye 'de Organik Tarım	14
BÖLÜM 3	
3.1 Stres Nedir?.....	19
3.2 Tuz Stresi ve Tuzluluk	19
3.3 Tuz Stresinin Etkileri.....	20
3.4 Bitkilerde Tuz Stresine Tolerans	24

3.5	Tuzluluğun Gen Ekspresyonunda Oluşturduğu Değişiklikler	27
-----	---	----

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METOT	29
4.1 Bitki Materyali	29
4.2 Tamponlar ve Çözeltiler	30
4.3 Moleküler Markerlar	31
4.4 Enzimler	31
4.5 Kitler	31
4.6 Besi Yerleri	32
4.6.1 Luria Broth (LB)	32
4.7 Oligonükleotidler	32
4.8 Programlar	33
4.8.1 Chromas	33
4.8.2 Primer 3	33
4.8.3 Blast	33
4.8.4 EMBOSS Transeq	33
4.8.5 BioEdit	33
4.9 İklimlendirme Kabini Koşulları	33
4.10 Tohumların Çimlendirilmesi	33
4.11 Fidelerin Saksılara Transferi ve Büyütülmesi	35
4.12 Bitkilere NaCl Uygulaması	36
4.13 Genomik DNA İzolasyonu	37
4.14 Genomik DNA Miktarının Belirlenmesi	38
4.15 Genomik DNA'nın agaroz Jel Üzerinde Analizi	38
4.16 Genomik DNA'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonu	38
4.16.1 Kullanılan Primerler	38
4.16.2 PCR Koşulları	38
4.16.3 PCR Ürününün Jel Üzerinde Analizi	39
4.17 PCR Ürününün Agaroza Jelden Pürifikasyonu	39
4.18 Ligasyon	39
4.19 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması	40
4.20 Transformasyon	41
4.20.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması	41
4.20.2 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi	41
4.21 Plazmit İzolasyonu	41
4.22 RNA İzolasyonu İçin Bitki Örneklerinin Alınması	42
4.23 RNA İzolasyonu	42
4.23.1 RNA İzolasyonu İçin Hazırlık	42
4.23.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu	43
4.23.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi	43
4.24 RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi	43
4.24.1 Formaldehit Heli Hazırlanması	43
4.24.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması	44

4.25	RNA Saflık Ölçümü	44
4.26	Total RNA'dan Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması	44
4.27	cDNA Sentezi.....	45
4.28	cDNA Sentezinin PCR ile Kontrol Edilmesi	45
4.29	PCR Ürünlerinin Jel Üzerinde Analizi	46
4.30	Real Time PCR	46

BÖLÜM 5

SONUÇLAR.....	48
5.1 Genomik DNA İzolasyonu	48
5.1.1 PCR Ürünlerinin Analizi.....	48
5.1.2 PCR Ürününün Vektöre Ligasyonunun Klonlanması.....	49
5.1.3 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi ve Plazmit İzolasyonu.....	49
5.1.4 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	50
5.2 Real Time PCR için Primerlerin Tasarlanması	57
5.3 RNA İzolasyonu	59
5.4 RNA Saflık Ölçümü	60
5.5 Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması	61
5.6 cDNA Sentezi.....	62
5.7 Real Time PCR	63
5.8 Real Time PCR	61

BÖLÜM 6

TARTIŞMA VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	74

SİMGE LİSTESİ

\$	Amerikan Doları
%	Yüzde
<	Daha Küçük
≥	Büyük Eşit
μl	Micro Litre
A	Adenin
Atm	Atmosfer
B	Bor
C	Sitozin
C°	Santigrat Derece
Ca ⁺²	Kalsiyum
Cl	Klor Elementi
Cm	Santi Metre
CO ₂	Karbon Di Oksit
CO ₃ ⁻²	Karbonat
dSm ⁻¹	Desisimens Metre
G	Guanin
g	Gram
H ₂ O	Su
Ha	Hektar
HCO ₃	Bi Karbonat
K ⁺	Potasyum Elementi
Kg	Kilogram
Mg ⁺²	Magnezyum Elementi
mM	Milimol
Na	Sodyum Elementi
NaCl	Sodyum Klorür
NO ₃ ⁻	Nitrat
P	Fosfor Elementi
SO ₄ ⁻²	Sülfat

KISALTMA LİSTESİ

ABA	Absisik Asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
CAT	Katalaz
CBF	Sitozin Tekrar Bağlama Faktörü (C-Repeat Binding Factor)
CRT	Sitozin Tekrar (C-Repeat)
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Dr.	Doktor
DRE	Dehidrasyondan Sorumlu Eleman (Dehydration Responsive Element)
DREB	Kuraklıktan Sorumlu Genleri Bağlayan (Drought Responsive Element Binding)
DREB1	Kuraklıktan Sorumlu Genleri Bağlayan 1
DREB2	Kuraklıktan Sorumlu Genleri Bağlayan 2
EC	Elektriksel İletkenlik
ETO	Ekolojik Tarım organizasyonu
ETOH	Etanol
FİBL	Organik Tarım Araştırma Merkezi (Research Institute of Organic Agriculture)
Hsps	Sıcak Şoku Proteini (Heat-Shock Proteins)
IFOAM	Uluslararası Ekolojik Tarım Hareketleri Federasyonu (International Federation of Organic Agriculture Movements)
IMO	Ekoloji Pazarlama Enstitüsü (Institute for Marketecology)
KHK	Kanun Hükmünde Kararname
LEA	Geç Embriyogenesis (Late Embriyogenesis Abundance)
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat Oksidaz
Orser	Organik Ürünler Kontrol ve Sertifikasyon Kuruluşu
PO	Peroksidaz
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Tipleri
SOD	Süperoksit Dismütaz
Vb.	Ve Benzeri

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Kıtalara göre organik tarım alanları 13
Şekil 2.2	Ülkelere göre organik tarım alanları 13
Şekil 2.3	Yıllara göre Türkiye’deki organik üretim alanları.....16
Şekil 2.4	Yıllara göre Türkiye’de organik üretim yapan üretici sayısı 17
Şekil 2.5	Yıllara göre Türkiye’deki organik ürün sayısı 17
Şekil 4.1	Konvansiyonel ve organik toprak..... 29
Şekil 4.2	Konvansiyonel ve organik fasulye tohumu 34
Şekil 4.3	Fasülye fideleri.....34
Şekil 4.4	Saksılara şaşırtılmış organik fasulyeler.....35
Şekil 4.5	Saksılara şaşırtılmış konvansiyonel fasulyeler 36
Şekil 4.6	Tuz uygulaması yapılan organik ve konvansiyonel fasulyeler 37
Şekil 4.7	pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi 40
Şekil 4.8	pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi..... 40
Şekil 5.1	Genomik DNA’nın %1 ‘lik agaroz jeli üzerinde görüntülenmesi 48
Şekil 5.2	PCR ürünlerinin % 1 ‘lik agaroz jel görüntüsü 49
Şekil 5.3	Mavi beyaz seçilimi 49
Şekil 5.4	PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin % 1 ‘lik agaroz jel üzerinde görüntüsü 50
Şekil 5.5	A3 nükleotit ve amino asit dizini..... 53
Şekil 5.6	A7 nükleotit ve amino asit dizini..... 53
Şekil 5.7	B7 nükleotit ve amino asit dizini 54
Şekil 5.8	B8 nükleotit ve amino asit dizini 54
Şekil 5.9	DNA fragmenti dizininin BLAST analizi sonuçlarının NCBI web sayfasındaki görüntüsü 56
Şekil 5.10	Total RNA ‘ların % 1 lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi 59
Şekil 5.11	%1.5 lik agaroz jelde cDNA sentezi kontrolü 62
Şekil 5.12	Erime eğrisi analizi 63
Şekil 5.13	Amplifikasyon eğrisi 64
Şekil 5.14	Fasülye aktin melting curve analizi 65
Şekil 5.15	DREB2A melting curve analizi 65

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1	Bazı bitki türlerinin tuzluluktan zararlanma sınırı ve tuz konsantrasyonunun artması ile meydana gelen ürün kayıpları.....1
Çizelge 1.2	Farklı zaman dilimlerinde bitkilerin tuz stresine tepkileri.....4
Çizelge 3.1	Deniz suyu ve iyi kalitede sulama suyu özellikleri 20
Çizelge 4.1	Tampon ve çözeltiler 30
Çizelge 4.2	Moleküler markerlar 31
Çizelge 4.3	Enzimler..... 31
Çizelge 4.4	Kitler 31
Çizelge 4.5	LB 32
Çizelge 4.6	Primerler..... 32
Çizelge 4.7	Real Time PCR karışımının hazırlanması 47
Çizelge 4.8	RT PCR döğü programı 47
Çizelge 5.1	Dizin analizine gönderilen örneklerin adlandırılması 51
Çizelge 5.2	ClustalW analiz sonuçları 52
Çizelge 5.3	DREB2A primeri 57
Çizelge 5.4	Fasülye aktin primeri 58
Çizelge 5.5	RNA ölçüm grafiğı..... 60
Çizelge 5.6	RNA ölçüm değeri 61
Çizelge 5.7	Kesim yapılan RNA örneklerinin ölçümü 61

**ORGANİK VE KONVANSİYONEL FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)
YETİŞTİRİCİLİĞİNDE TUZ STRESİ UYGULAMASINDA AKTİVASYONU ARTAN
DREB2A GENİNİN EKSPRESYONUNUN KARŞILAŞTIRILMASI**

Neslihan ŞİMŞEK KIZIL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Eş Danışman: Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Önemli bir protein kaynağı olan fasulye bitkisi yemeklik tane baklagiller içerisinde 614.948 ton üretim miktarı ile birinci sırada gelmektedir. Ekilebilir tarım alanlarımızdaki en önemli problemlerden olan tuzluluk fasulye tarımını da olumsuz etkilemektedir.

Çalışmada organik ve konvansiyonel fasulye yetiştiriciliğinde tuzluluk stresi uygulamasında aktivasyonu artması beklenen DREB2A geninin analizi için örneklerden RNA izolasyonu yapılırken eş zamanlı olarak 20. saatte stres verilmiş yaprak örneğinden de genomik DNA izolasyonu yapıldı. DREB2A 'ya göre ileri ve geri primerler tasarlanarak PCR yapıldı. PCR ürünleri agaroz jelden pürifiye edilerek pGEM-T Easy vektörüne klonlanıp dizin analizine gönderildi. Plazmit izolasyonunun ardından çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgeleri uygun bir enzimle kesilip doğrusal hale getirildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi. Elde edilen 702 bp uzunluğundaki DNA dizininin GenBank veritabanında kaydedilmiş dizilere benzerliklerinin ve olası fonksiyonlarının belirlenmesinde BLASTN ve BLASTP analizleri yapıldı. Analizler sonucunda klonlanan gen bölgesinin, soya fasulyesi DREB1 geni ile benzerlik gösterdiği görüldü. Klonlanan gen bölgesinden Real Time PCR için kullanılacak

DREB2A ileri ve geri primerleri tasarlandı. Housekeeping gen olarak fasulye aktin geni kullanıldı. İzole edilen RNA'ların saflık ölçümlerinin ardından cDNA sentezi yapılarak Real Time PCR için melting curve analizleri yapıldı. Fasulye aktin ve DREB2A için yapılan melting curve analizlerinde amplifikasyon gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Tuzluluk stresi, organik tarım, DREB2A, Real Time PCR

ABSTRACT

THE COMPARISON BETWEEN DREB2A GENE EXPRESSION OF CONVENTIONAL AND ORGANIC BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) FARMING WHICH HAS INCREASING ACTIVITY UNDER SALT STRESS APPLICATION

Neslihan ŞİMŞEK KIZIL

Department of Molecular Biology and Genetics

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Dr. Nehir ÖZDEMİR Özgentürk

Co-Supervisor: Asst. Assoc. Dr. Senay Vural KORKUT

Bean, as an important source of protein, has the leading position among leguminous seeds with 614,948 tons of production. Salinity, which is one of the most important problems in our arable areas, is also affect bean farming negatively.

In this study, for the analysis of increasing activity of DREB2A gene by salinity stress application in organic and conventional bean farming while RNA isolation was performing at the same time at 20th hour to stress applied leaf sample genomic DNA isolation was done.

PCR was done by designing reverse and forward primers according to DREB2A. PCR products were purified by agarose gel and sent to index analyses by cloning into pGEM-T Easy vector. After plasmid isolation, cutting sites in multiple cloning area were cut by an appropriate enzyme and linearized; then the amount was determined and sent to index analyses. BLASTN and BLASTP analysis were done, to determine the similarities and possible functions between sequences that are recorded in the database directory of the GenBank and the resulting 702 bp long DNA index.

As a result of analysis; similarity between cloned gene area and soybean DREB1 gene was observed. To use in Real Time PCR, DREB2A forward and reverse primers were designed from the cloned gene area. Bean actin gene was used as a housekeeping gene. After measuring the purity of the isolated RNA, melting curve analysis were performed for Real Time PCR by synthesising cDNA. Amplification was observed in the melting curve analysis which are done for the bean actin and DREB2A.

Key words: Salinity stress, organic farming, DREB2A, Real Time PCR

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Sürdürülebilir besin üretimi ve ürün verimliliği açısından tehdit oluşturan en önemli abiotik stres faktörleri kuraklık, tuzluluk ve aşırı sıcaklıklardır [1]. Bu faktörler içinde kuraklık, ürün verimini düşüren dünya genelindeki en önemli etkindir [2].

Çizelge 1.1 Bazı bitki türlerinin tuzluluktan zararlanma sınırı ve tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte meydana gelen ürün kayıpları [3]

TÜRLER	ZARARLAN MA SINIRI	% 10 ÜRÜN KAYBI	% 25 ÜRÜN KAYBI	% 50 ÜRÜN KAYBI
EC (dS/m ⁻¹)				
FASULYE	1.0	1.5	2.3	3.6
HAVUÇ	1.0	1.7	2.8	4.6
SOĞAN	1.2	1.8	2.8	4.3
BİBER	1.3	2.2	3.3	5.1
MARUL	1.3	2.1	3.2	5.2
TATLI PATATES	1.5	2.4	3.8	6.0
TATLI MISIR	1.7	2.5	4.0	6.0
KEREVİZ	1.8	3.5	5.8	10.1
LAHANA	1.8	2.8	4.4	7.0
KARPUZ	2.0	2.5	3.5	4.5
KAVUN	2.2	3.6	5.7	9.1
HIYAR	2.5	3.3	4.4	6.3

Çizelge 1.1 Bazı bitki türlerinin tuzluluktan zararlanma sınırı ve tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte meydana gelen ürün kayıpları devamı [3]

DOMATES	2.5	3.5	5.0	7.6
KARNA BAHAR	2.7	3.5	4.7	5.9
KABAK	3.9	4.9	5.9	7.9
BUĞDAY	4.7	7.0	9.5	13.0
KUŞ KONMAZ	5.0	8.0	11.0	13.0
ARPA	8.0	9.6	13.0	17.0

Tuz stresi, bitkilerin makro, hücrel ve moleküler düzeyinde bir dizi değişimlere sebep olmaktadır. Tuzluluk, bitki hücrelerinin su ve iyon içeriklerini etkilemekte, kloroplast yapısını bozmakta, fotosentetik pigment, protein ile karbonhidrat içeriğini değiştirmekte, fotosentez ve diğer biyosentez reaksiyonları ile antioksidan enzimler ve ozmolitlerin sentezini etkilemekte, köklerden su ile beraber iyonların alımının ve yapraklara taşınmasının kontrolü, sitoplazmik yapılara ve hücrel membranlara zarar vermektedir. Bitkiler tuz stresinin bu çoklu etkilerine karşı karmaşık biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları devreye sokmaktadırlar. Bu mekanizmalar ile sağlanan tuz toleransı sayesinde hem hücrel yapılar korunmakta hem de hücrel fonksiyonlar sağlıklı şekilde devam ettirilmektedir [4]. Tuzluluk sorunu denildiğinde en fazla zararlı etkiyi yapan ve en yaygın iyonlar olan Na ve Cl iyonlarının toprakta yüksek düzeylerde bulunduğu anlaşılmaktadır [5].

Ergene [6] ve Terry [7] tuzlanmaya neden olan anyonları Cl^- , SO_4^{2-} nadiren de olsa HCO_3^- , CO_3^{2-} ve NO_3^- , tuzlanmaya neden olan katyonları ise Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} ve az miktarda da K^+ olarak sınıflamışlardır.

Tuzluluğun bitki gelişimine etkisini Aydemir [8] şu şekilde açıklamıştır:

- Zehir etkisi: Na ve B gibi elementler bitkilerde zehir etkisi yaparlar,
- Bitkide su açığı yaratma: Çözünabilir tuzlar besi ortamının su potansiyelini düşürür. Böylece bitkinin su alımı sınırlandırılmış olur. Bu etki ozmotik ayarlama mekanizmasıyla dengelenebildiğinden birinci etki kadar önemli değildir.

- Ozmotik ayarlama mekanizması: Ortamdaki yüksek tuz konsantrasyonu bitkinin besin alımını artırır. Bu artış bitki köklerinin su potansiyelini düşürür ve dolayısıyla bitkinin su alımı artar.

Terry'e göre [7] Dünya üzerindeki tuzluluğun en önemli kaynağı ana materyaldir. Yüzey ve taban suyu akışı sırasında ana materyaldeki çözünebilir tuzların yeraltı ve yerüstü sularına karışması tuzluluğun temel kaynağı olarak görülmektedir.

Ergene [6] ve Terry' e [7] göre ise tuzluluğun oluşmasında önemli bir faktör de topografyadır. Kapalı havzalar genellikle tuzlulaşma eğilimindedir. Özellikle taban suyu akışını engelleyen geçirimsiz tabakalar yüksek taban suyunun ve dolayısıyla tuzluluğun başta gelen nedenlerindendir.

Toprakların tuzluluk seviyelerine göre bitkilerin tepkisi beş grupta incelenebilir [8].

1. 0-2 dS/m (çok az tuzluluk): Tuzluluk etkisi çoğunlukla ihmal edilebilir,
2. 2-4 dS/m (az tuzlu): Çok duyarlı bitkilerin verimleri düşebilir,
3. 4-8 dS/m (tuzlu): Birçok bitkinin verimleri düşer,
4. 8-16 dS/m (çok tuzlu): Tuza dayanıklı bitkilerden normal verim alınabilir,
5. ≥ 16 dS/m (aşırı tuzlu): Tuza çok dayanıklı birkaç bitki türünde verim alınabilir.

Milette ve ark. [9] yaptıkları araştırmada tuzlu toprakların ıslahında sulama ve drenaj sistemlerinin kullanılmasının en yaygın yöntem olduğunu saptamışlardır.

Yapraklar tuzluluktan ilk etkilenen bitki organlarıdır. Tuzluluğun etkisi ile birlikte saatler hatta dakikalar ile tanımlanan süre içerisinde yaprak gelişmesinde ani bir düşüş gözlemlenmektedir. Bitkilerin tuzluluğa karşı göstermiş oldukları ilk reaksiyon sadece tuzluluk stresine ait özel bir tepkime olmayıp kök çevresindeki ozmotik potansiyel ve hücre su ilişkilerinden kaynaklanan su stresinde de görülmektedir [10].

Çizelge 1.2 Farklı zaman dilimlerinde bitkilerin tuz stresine karşı tepkileri [10]

	SU STRESİ ETKİLERİ	ÖZEL TUZ ETKİSİ
ZAMAN	TUZLULUĞA TOLERANSLI BİTKİ GELİŞİMİNDE GÖZLEMLENEN ETKİLER	TUZLULUĞA HASSAS BİTKİ GELİŞİMİNDE GÖZLEMLENEN EK ETKİLER
DAKİKALAR	YAPRAK VE KÖK GELİŞİM ORANINDA ANİ DÜŞÜŞ VE SONRASINDA KİSMİ ADAPTASYON	
SAATLER	YAPRAK VE KÖK GELİŞİMİNDE DEVAMLİ DÜŞÜŞ	
GÜNLER	YAPRAK GELİŞİMİNDE KÖK GELİŞİME ORANLA DAHA FAZLA ETKİLENMESİ	YAŞLI YAPRAKLARDA GÖRÜNÜR ETKİLER
HAFTALAR	YAPRAKLARIN VE/VEYA YAN SÜRGÜNLERİN SON HALİNİ ALMASI	YAŞLI YAPRAKLAR ÖLÜR
AYLAR	ÇİÇEKLENME ETKİLENMESİ, ZAMANININ TOHUM ÜRETİMİNDEKİ DÜŞÜŞ	GENÇ YAPRAKLAR ÖLÜR.

Bazı bitkiler stres koşullarına karşı mekanizmalar oluştururken, bazıları da koşullara adapte olurlar. Tuza duyarlı çoğu kültür bitkileri solma gösterirler. İleri aşamalarda ise ya yaşamları sona erer ya da önemli ürün kaybına uğrarlar [11].

Hopkins'e göre [12] tuz stresinin bitkilerin protein sentezinde birtakım değişiklikler meydana getirdiği, yeni gen etkinliklerinin belirmesine neden olabildiği gibi bazı genlerin etkinliğini azaltırken, bazılarının etkinliğini ise arttırabildiğini tespit etmiştir. Ayrıca Nakashima ve ark. bitkilerdeki kuraklık ve tuzluluğa karşı bazı genlerin sorumlu olduğunu açıklamaktadır [13].

Zhu'ya göre [14] ise tuzluluğu kontrol eden birçok gen aynı zamanda diğer abiyotik stres faktörlerini de kontrol edebilmektedir. Nayak ve ark. göre [15] abiyotik stres aracılığıyla gen anlatımı, değişik transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir ve DREB (kuraklıktan sorumlu genleri bağlayan – drought responsive element binding) proteinleri bu süreçte kilit rol oynamaktadır. DREB transkripsiyon faktörleri iki sınıfa

ayrılmaktadır: DREB1 ve DREB2. DREB2 transkripsiyon faktörü birçok bitkide kuraklığa karşı toleransla ilintili en ümit verici aday genlerden birisi olarak görülmektedir.

Bitkilerdeki strese dayanıklılık mekanizmasında rol alan genlerin anlatımını kontrol eden birçok transkripsiyon faktörü klonlanmıştır. Bunların hangi strese bağlı indüklendiği ve hangi sinyal ileti yoluyla bağlantılı işlev yaptığı konusunda çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda en iyi aydınlatılmış sistem *Arabidopsis thaliana*'da bulunan CBF / DREB transkripsiyon faktörlerinin yer aldığı regülondur. Bu transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler iki ayrı araştırma grubu tarafından mayada bir hibrid tekniği kullanılarak izole edilmişlerdir [16, 17]. Bu çalışmalardan daha önce stresle indüklenen genlerin promotorlarında bulunan G/ACCGAC nükleotid dizinini barındıran CRT/DRE elementinin (dehydration responsive elements / C repeats: C tekrar bölgesi / dehidrasyon duyarlı DNA düzenleme elementi) genlerin tuzluluk, kuraklık ve düşük sıcaklıkla uyarımında önemli olduğu tespit edilmiştir. CBF/DREB transkripsiyon faktörleri bu dizinleri tanır ve bağlanır [18, 19, 20].

Türkyılmaz'a göre [21] de bitkilerde NaCl'e maruz kalma, tuza toleransı arttıran yeni proteinlerin sentezlenmesini teşvik edebilmektedir. Tuz stresine maruz kalan bitki hücrelerinde çoğunlukla gözlenen yanıtın prolin birikimi olduğu söylenmektedir [22]. Ancak tuz stresinde prolin birikiminin kesin rolü henüz tam tespit edilememesine karşın, genel olarak prolinin tuza dayanıklılığın bir markırı olarak çalıştığı kabul edilmektedir [23].

Lopez ve ark. [24] fidelere uygulanan tuz konsantrasyonunun artmasına ve maruz kalma süresine bağlı olarak fide yaprak alanında azalma olduğunu tespit etmiştir. 50 ve 100 mM NaCl uygulanmış fidelerin yapraklarına 10 mM glisinbetain püskürtülmesinin yaprak alanlarını sırasıyla % 77 ve % 63 oranlarında arttırdığı fakat bu artışın stres altında olmayan bitkilere göre belirgin şekilde düşük değerlerde kaldığı belirtilmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Bitkiler, gerek tuzluluk gerekse beraberinde ortaya çıkan kuraklık, su stresi ve oksidatif stres gibi diğer stres faktörlerine karşı çoklu tolerans stratejileri geliştirmektedirler [4]. Bu tolerans stratejilerinin geliştirilmesinde organik ve konvansiyonel yetiştiricilikten kaynaklanan bir farkın olup olmadığının moleküler düzeyde fasulye bitkisinde incelenmesi ve fasulyenin organik ve konvansiyonel yetiştiricilik koşullarında tuz stresi ile ilgili CBF/DREB2A geninin ekspresyon farkının Real Time PCR kullanılarak araştırılması tezin amacıdır.

1.3 Hipotez

Organik tarım sisteminde yetiştirilen bitkiler konvansiyonel tarım sisteminde yetiştirilen bitkilere göre ortamdaki besini daha yavaş çözerek besinden yararlanırlar. Adaptasyon yetenekleri geliştiği için de daha dayanıklıdırlar. Dayanıklı olan organik bitki tuz stresine maruz bırakıldığı zaman konvansiyonel bitkiye göre DREB2A geninin anlatımının artacak olması tezin hipotezidir.

2.1 Organik Tarım Nedir?

Organik tarım; ekolojik sistemlerde hatalı uygulamalar sonucu kaybolan doğal dengeyi yeniden kurmaya yönelik, insana ve çevreye dost üretim sistemlerini içermekte olup, esas itibariyle sentetik kimyasal ilaçlar ve gübrelerin kullanımının yasaklanmasının yanında, organik ve yeşil gübreleme, münavebe, toprağın muhafazası, bitkinin direncini artırma, doğal parazit ve predatörlerden yararlanmayı tavsiye eden, bütün bu olanakların kapsamlı bir şekilde oluşturulmasını talep eden, üretimde miktar artışını değil ürünün kalitesinin yükselmesini amaçlayan bir üretim şeklidir [25]. Diğer bir ifade ile doğadaki dengeyi koruyan, toprak verimliliğinde devamlılığı sağlayan, hastalık ve zararlıları kontrol altına alarak doğadaki canlıların sürekliliğini sağlayan, doğal kaynakların ve enerjinin optimum kullanımı ile optimum verim alınan üretim sistemine ekolojik tarım denir. Ekolojik tarım; insan, çevre ve ekonomik olarak sürdürülebilir tarımsal üretim sistemini bütünleştiren bir yaklaşımdır. Sistemin amacı doğal kaynakları korumak, zararlı ve hastalıklardan arınmış bitkisel ve hayvansal ürünler üretmektir [26, 27].

Organik tarım, dil farklılıkları nedeniyle farklı ülkelerde farklı isimlerle anılmaktadır. Örneğin, İngiltere’de organik (*organic*), Almanya’da ekolojik (*ökologish*) ve Fransa’da biyolojik (*bioloque*) kelimeleri kullanılmaktadır. Ancak bunlar genel olarak birbirleriyle eşanlamli olarak kullanılmaktadır [28].

Organik tarım sistemi bazı çevrelerce yanlış bilindiği gibi gübre ve ilaç kullanılmadan yapılan modası geçmiş bir tarım sistemi değil, aksine modern tarımın tüm

imkanlarından yararlanarak doğal kaynakların ve enerjinin optimum kullanımı ile optimum verimlilik alınan bir üretim sistemidir [29].

Organik yetiştiricilikte üretim ile ilgili tüm faktörler bir bütün olarak ele alınmakta ve bu tekniği kullanarak üretim yapan tarım işletmelerinin kendine yeterliliği esas alınmaktadır. Bunun için toprak, bitki, hayvan ve insan arasındaki doğal döngünün doğal kökenli ham maddeler kullanarak mümkün olduğunca işletmenin kendi içinden veya yakın çevresinden sağlanması ilke edinilmektedir. Böylece kullanılan girdilerin, çevreyi tehdit eden her türlü etkisi azaltılmakta veya bunlardan tamamen kaçınılmaktadır [30].

Gaskell'e göre [31] organik tarım; üreticiden tüketiciye üretim, işleme ve pazarlama gibi tüm aşamalarında kontrol edilip sertifikalandırılması gereken bir üretim sistemidir. Organik tarımı diğer sistemlerden ayırt eden en önemli de faktör kontrol ve sertifikasyona dayalı oluşudur.

Organik yetiştiricilikte çiftlik gübresi, kompost, yeşil gübreleme ilgili Yönetmeliğe göre izin verilen diğer gübreler, toprak ve bitki gelişim düzenleyicileri, konvansiyonel yetiştiricilikte kullanılan besinlere alternatif olarak gösterilebilir [32].

2.2 Organik Tarımın Amaçları

Çevre ve insan sağlığı ile doğal kaynakların korunması, biyolojik çeşitliliğin sağlanması, bozulan ekolojik dengenin yeniden tesisi, sentetik kimyasal tarım ilaçları, hormonlar ve mineral gübrelerin kullanımını engelleyerek çevreyi olumsuz etkilerden korumak, organik ve yeşil gübreleme, münavebe, toprak ve gen kaynakları erozyonunu önlemek, yenilenebilir enerji kaynaklarını kullanmak ve enerji tasarrufu yapmak, bitkinin direncini arttırmak, biyolojik mücadelede doğal düşmanlardan faydalanmak, üretimde sadece miktar artışını değil aynı zamanda ürün kalitesini arttırmaktır [33].

Tarımsal üretimde doğal (toprak, su ve bitki) kaynakların korunması ve geliştirilmesi için kaynak kullanım planlamasının yapılması, bunun için sürekli bir bilgi edinme ve izleme sisteminin kurulması, çiftçilere yönelik olarak toprak koruma ve ıslah amaçlı eğitim programlarının geliştirilmesi, sürdürülebilir tarım için bitki ve hayvan genetik kaynaklarının daha etkin biçimde korunmasına ve kullanılmasına çaba harcanması,

tarımda zararlılarla mücadele ve kontrol yöntemlerinin daha çevre dostu bir yapıya kavuşturulması, bitkisel üretimde daha çevre dostu bitki beslenmesi yöntemleri geliştirilmesi ve kullanımının teşvik edilmesi, organik tarım programları ve uygulamalarının yaygınlaştırılarak bu amaçla geliştirilen ve uygulanan üretim teknolojilerinin eğitim ve yayma projelerinin geliştirilmesi organik tarımın amaçları olarak sıralanabilir [34].

En önemli amacı insanı ve diğer tüm canlıların ortak yaşama alanı olan doğayı korumak olan ekolojik tarımın nedenleri;

- Çevre kirliliğini önlemek,
- Biyolojik çeşitliliği korumak,
- Toprak ve genetik kaynak erozyonunu önlemek,
- Su miktar ve kalitesini korumak,
- Yenilenebilir enerji kaynaklarını kullanmak,
- Enerji tasarrufu sağlamak,
- Köyden kente göçü önlemek,
- Küçük çiftçilerin gelir düzeyini artırmaktır [35].

2.3 Organik Tarımın İlkeleri

Organik tarımın, doğayla uyumlu üretim, kendine yetebilen kapalı bir sistem ve ekim nöbeti olmak üzere başlıca 3 ilkesi bulunmaktadır. Bu ilkeler altında ülkesel ve yöresel koşullar dikkate alınarak organik tarım aktiviteleri değişkenlikler kazanabilir ve genel olarak şu faaliyetleri içerirler. Bitkisel üretimde; uygun yöntemlerle minimum toprak işleme, toprak verimliliğinin korunmasına ve artırılmasına yönelik çalışmalar, organik gübre kullanımı ve/veya sağlıklı toprak için toprakta zararlı etki bırakabilecek kimyasal gübre kullanmamak, genetik değişikliğe uğramamış, dayanıklı, sağlıklı tohum ve bitki seçimi, uygun ekim dikim yöntemi, bitki korumada ekolojik yöntem ve girdi kullanımı, hasat, depolama, işleme ve paketlenme faaliyetlerinin ekolojik yöntemler içinde yürütülmesi, hayvansal üretimde; sağlıklı hayvan yetiştiriciliği, uygun ahır koşulları,

organik yemlerden yararlanma, damızlık ve ırk seçiminde ekolojik uygunluk, ürünün kontrol ve sertifikasyonunu yaptırmak olarak sıralanabilir [25, 33].

Yukarıda sayılanlardan farklı olarak ETO'ya göre [36] ekolojik tarımın ilkeleri;

- Tüm üretim zincirinde sürdürülebilir bir sistem kurularak yüksek kalitede yeterli miktarda üretim yapmak,
- Üretim sistemi içindeki doğal döngüler ve canlı sistemleri ile uyumlu olarak çalışmak,
- Geçmiş bilgilerin ve geleneksel tarım sistemlerinin önemini fark etmek, bu bilgileri korumak ve bilgilerden yararlanmak,
- Güncel bilgileri doğal proseslerin işleyişini kavrayarak uygulamak,
- Hastalık ve zararlılara karşı mücadelede mevcut koşullara uygun tür, ırk ve çeşitlerin seçilerek bitkisel ve hayvansal üretimin uyum içinde yürütülmesine çalışmak,
- Tarımsal faaliyetler sonucu çevre, insan ve hayvan sağlığını etkileyebilecek her türlü kirliliği en aza indirmek, sentetik kimyasal gübre, ilaç, hormon ve katkı maddelerini kullanmamak,
- Hayvansal üretimde hayvanların doğal ihtiyaçlarını karşılayabilecekleri yaşam koşulları sağlamak,
- Üretim birimi içinde ve çevresindeki tarımsal ve doğal biyoçeşitliliği korumak,
- Üretim ve işlemede mümkün olabildiğince enerji tüketimini azaltmak, yerel ve yenilebilir kaynakları doğru kullanmak,
- Su kaynaklarını ve su ile ilgili yaşam sistemlerini korumak ve doğru kullanmak,
- Ekolojik üretim ve işleme sistemi içerisinde yer alan herkese temel ihtiyaçlarını karşılayabilecekleri güvenli ve sağlıklı çalışma ortamı sağlamak,
- Sosyal olarak eşit ve ekolojik açıdan dengeli bir üretim, işleme ve dağıtım zincirinin kurulmasını teşvik etmek, yerel ve bölgesel üretim ve dağıtımı teşvik etmek,

- Ulusal ve/veya uluslararası ekolojik tarım kurallarına göre üretimin gerçekleştirildiğinin bağımsız kontrol firmaları tarafından denetlenerek tüketicilere ekolojik ürün güvencesi vermek.

2.4 Dünya 'da Organik Tarım

Ekolojik tarım görüşü ilk kez 1910 yılında İngiltere’de gündeme gelmiştir. Daha sonra 1924 yılında Dr.Rudolf Steiner “Biyodinamik Tarım Yöntemi” konusunda bir kurs düzenlemiş, 1928 yılında da Biyodinamik Tarım Enstitüsü’nü kurmuştur. Bir diğer alternatif arayış 1930’lu yıllarda İsviçre ’de görülmüştür. Müller ve Rush İsviçre ’de en az dış girdi gereksinimi olan “Kapalı Tarım” konusunda başarılı çalışmalar yapmışlardır. Lemaire-Boucher Fransa’da bazı alglerin bitkilerde doğal dayanıklılığı arttırmak amacıyla kullanılabileceğini bildirmiştir [35].

1. ve 2. Paylaşım Savaşları sırasında popüler olan ekolojik tarım 1950 yılından sonra Amerika Birleşik Devletleri’nin Marshall yardımı ile önemini yitirmiş, sağlanan ekonomik katkılar ve aşırı desteklemeler sonucu entansif tarım süratle yayılmış, makineleşme, kimyasal ilaç ve gübreler ile kimyasal katkı maddeleri kullanılmaya başlanılmıştır. 60’lı yılların sonunda Avrupa Topluluğu’nun kurulması ve uyguladığı tarımsal destekleme politikaları, 1970 de pestisitlerin ve kimyasal gübrenin keşfi de bu gelişmeye katkıda bulunmuştur [25].

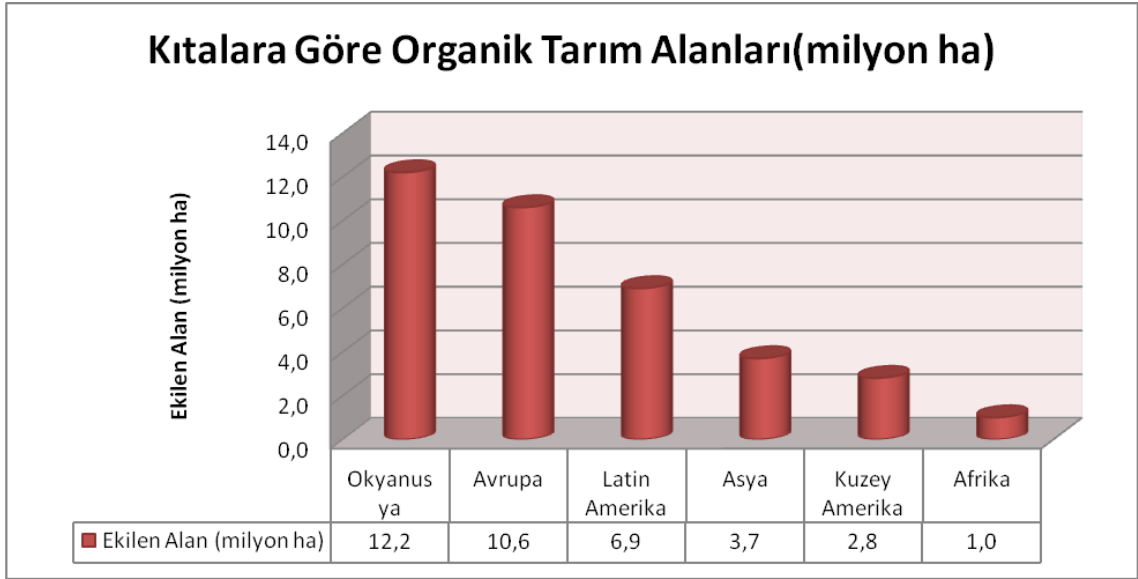
“Yeşil Devrim” olarak adlandırılan tarımsal üretimin artırılma çabalarının dünyadaki açlık sorununa çözüm olmadığı, aksine doğal dengeyi ve insan sağlığını olumsuz etkilediğini fark eden gelişmiş ülkeler, 1970’li yıllarda ticari olarak organik tarım çalışmalarına başlamışlardır. Almanya’da 1972 yılında Uluslararası Ekolojik Tarım Hareketleri Federasyonu (Internation Federation of Organic Agriculture Movements-IFOAM) kurulmuştur. Bu hareket, dünyadaki ekolojik tarım çalışmalarını bir çatı altında toplamayı, gerekli standart ve yönetmelikleri hazırlamayı, tüm gelişmeleri üyelerine ve üreticilere aktarmayı amaçlamıştır. Organik tarım tüketicilerin baskılarıyla 1980’li yıllarda aile işletmeciliği şeklinden çıkarak ticari bir boyut kazanmıştır [33]. IFOAM’ın Ekim 2011 yılında Güney Kore’de yapılan toplantısında 2014 Genel Kurul ve Dünya Organik Tarım Kongresi’nin Buğday Ekolojik Yaşamı Destekleme Derneği’nin ev sahipliğinde İstanbul’da gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Genel olarak konvansiyonel tarımdan organik tarıma geçişte etkili unsurlar beş kategoride sınıflandırılmıştır:

1. Toprak erozyonu ve hayvanların sağlığının kötüye gitmesi gibi konvansiyonel tarımla ilgili geçmiş problemlere çare bulmak.
2. Mali nedenler, mevcut ekonomik problemlerin çözülmesi ve çiftliğin uzun dönemde varlığını sürdürülebilmesi.
3. Bazı kimyasal maddelerin uygulanması sonucu oluşabilecek sağlık problemlerinden kaçınma gibi kişisel nedenler.
4. Felsefi, politik, dini veya çevrecilik gibi genel etmenler.
5. Organik girdi satıcıları, aile üyeleri, arkadaşların teşvikleri ve organik tarım tanıtım toplantılarına katılım gibi sosyal çevreden gelen teşvikler [28].

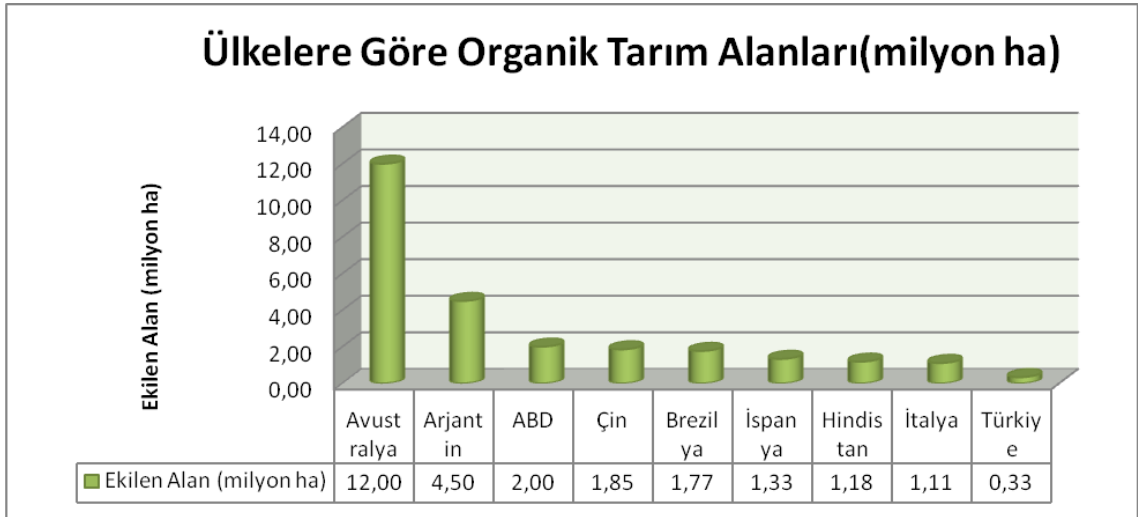
FIBL/IFOAM 'ın dünya genelindeki sertifikalı organik tarım hakkındaki 2013 araştırmasına göre bugün 160 ülkede, 37.2 milyon hektar alanda, 1.8 milyon üretici organik tarım yapmakta ve bu değerler her geçen gün artmaktadır [37].

Kıtalara göre organik tarım alanlarına bakıldığında; 12.2 milyon hektarla Okyanusya Kıtası ilk sıradadır. 10.6 milyon hektar ile Avrupa ikinci, 6.9 milyon hektar ile Latin Amerika üçüncü, 3.7 milyon hektar ile Asya dördüncü, 2.8 milyon hektar ile Kuzey Amerika beşinci ve 1.1 milyon hektar ile Afrika altıncı sırada yer almaktadır [37]. Organik tarım alanları ile ilgili veriler Şekil 2.1 ' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Kıtalara göre organik tarım alanları (milyon ha) [37]

Ülkeler sıralamasında ise 12 milyon ha ile Avustralya birinci, 4.5 milyon ha ile Arjantin ikinci ve 2 milyon hektar ile Amerika üçüncü sıradadır. Amerika'yı sırasıyla Çin, Brezilya, İspanya, Hindistan ve İtalya takip etmektedir. Şekil 2.2 ' de ülkelere göre organik tarım alanları gösterilmiştir [37].



Şekil 2.2 Ülkelere göre organik tarım alanları (milyon ha) [37]

Organik tarım alanları tüm tarım alanları içinde % 0.86 ' lık bir bölümde yapılmaktadır. Türkiye ' de ise bu oran dünya ortalamasının üstünde olarak % 1.82 ' dir [37].

2010 yılında yapılan araştırmaya göre organik tarım arazilerinde 2 milyon hektarlık bir büyüme ile % 6 'lık artış olmuştur. Bu büyümenin en güçlü yaşandığı yer bir milyon hektarlık artış ile Avrupa olmuştur. Arjantin, Türkiye ve İspanya artışın en çok olduğu ülkelerdir [37].

2.5 Türkiye’de Organik Tarım

Ülkemizde organik tarım faaliyetleri 1986 yılında Avrupa’daki gelişmelerden farklı şekilde, ithalatçı firmaların istekleri doğrultusunda, ihracata yönelik olarak başlamıştır. Önceleri ithalatçı ülkelerin bu konudaki mevzuatına uygun olarak yapılan üretim ve ihracata 1991 yılından sonra 2092 / 91 sayılı 24 Haziran 1991 tarihli Avrupa Topluluğu içinde organik tarım faaliyetlerini düzenleyen Yönetmelik doğrultusunda devam edilmiştir. Daha sonra bu Yönetmeliğin 14 Ocak 1992 tarihinde yayımlanan 94 / 92 sayılı ekinde; Avrupa Topluluğuna organik ürün ihraç edecek ülkelerin uymak zorunda olduğu hususlar ayrıntıları ile belirtilmiş ve ülkelerin kendi mevzuatlarını uygulamaya koymaları ve bu mevzuatın da dâhil olduğu çeşitli teknik ve idari konuları içeren bir dosya ile Avrupa Topluluğuna başvurmaları zorunluluğu getirilmiştir. Avrupa Topluluğu’ndaki bu gelişmelere uyum sağlamak için Tarım ve Köyşleri Bakanlığı çeşitli kurum ve kuruluşlarının işbirliği ile Yönetmelik hazırlama çalışmalarına başlamış ve “Bitkisel ve Hayvansal Ürünlerin Ekolojik Metotlarla Üretilmesine İlişkin Yönetmelik” 24 Aralık 1994 tarih ve 22145 sayılı Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe girmiştir. Daha sonra adı geçen Yönetmeliğin bazı maddelerinde uygulamada rastlanılan aksaklıkları gidermek amacıyla değişiklik yapılmış, organik tarım faaliyetleri sırasında yapılacak kusur ve hatalara karşı uygulanacak yaptırımların da Yönetmelikte yer alması sağlanmıştır. Düzeltme metni 29 Haziran 1995 gün ve 22328 sayılı Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe girmiştir. “Avrupa Topluluğuna Organik Ürün İhraç Eden 3.Ülkeler” listesinde yer almak üzere de gerekli bilgileri içeren bir “Teknik Dosya” hazırlanarak öngörülen süre içinde Dışişleri Bakanlığı kanalıyla resmi başvuru yapılmıştır [25].

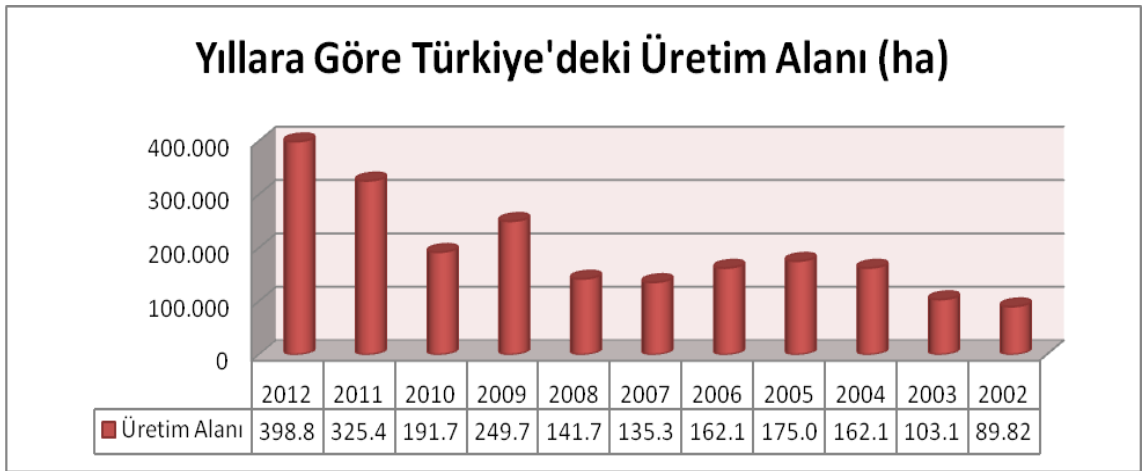
Bu uygulamaları takiben 11 Temmuz 2002 tarihli ve 24812 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik” yürürlüğe girmiştir. Organik ürünlerin üretimi, tüketimi ve kontrol edilip sertifikalandırılmasına dair “Organik Tarım Kanunu” 25659 sayılı 03.12.2004 tarihli olarak resmi gazetede yayınlanmış kanunu takiben 10.06.2005 tarihli ve 25841 sayılı “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik” yürürlüğe girmiştir. Günümüzde ise 18.08.2010 tarih ve 27676 sayılı “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik” yürürlüktedir. 639 sayılı Kanun Hükmünde Kararname (KHK) ile Bakanlığın ismi, yetki ve görevleri değişmiştir. Önceki adı Tarım ve Köyişleri olan Bakanlığın adı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı olmuştur. 651 sayılı KHK ile Bakanlığın teşkilat ve görevleri yeniden tanımlanmıştır. Çıkarılan KHK’lardan sonra 27676 sayılı Yönetmelikte değişiklik yapılmasına ilişkin olarak 06 Ekim 2011 tarihli ve 28076 sayılı “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik” yayınlanmış ve yayınlandığı gün yürürlüğe girmiştir. 2011 yılından sonra 14 Ağustos 2012 ve son olarak da 25 Mayıs 2013 tarihlerinde “Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik” yayınlanmıştır [38].

Çoğu Avrupa ülkesi ve ABD’de organik tarımın gelişimine çiftçiler öncülük etmesine karşın, Türkiye’de organik tarım Avrupalı özel organik tarım şirketlerinin elemanlarınca çiftçilere tanıtılmış ve benimsetilmiştir [39]. Başka bir anlatımla, Avrupa ve ABD’de organik tarımın yapılması üreticiden başlayarak (arz kaynaklı) yukarıdan aşağıya yapılmıştır. Bu durumda, Türkiye’de çiftçilerin organik tarımı benimsemelerinde etkili olan faktörler ve bunların öncelik sırasının, dünyadaki motivasyon unsurlarından farklı olması beklenebilir [28].

Türkiye’de bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, yetiştiricilerin organik üretime geçmelerinde ekonomik faktörlerin (özellikle prim fiyat ve pazar garantisi) en etkili motivasyon unsuru olduğu belirlenmiştir [26].

Tarım faaliyetleri ülkemizde ilk olarak geleneksel ihraç ürünleri olan kuru incir ve kuru üzüm ile Ege Bölgesi ’nden başlamış, daha sonra kuru kayısı ve fındık gibi ürünlerle diğer bölgelere yayılmıştır. Ürün işleme tesislerinin büyük kısmının İzmir’de olması ve

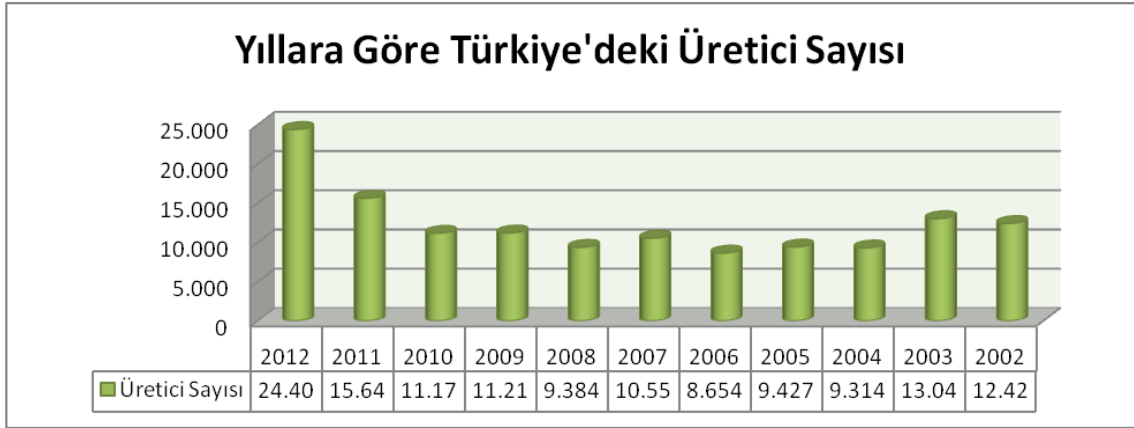
Üretilen rnlerin büyük kısmının İzmİr limanından ihraç edilmesi gibi nedenlerle, organizasyon kuruluşları, kontrol ve sertifikasyon firmaları gibi ekolojik tarım sektörünün hemen tüm kuruluşlarının merkez büroları İzmİr’de yer almaktadır [25, 35]. Organik tarım ile ilgili olarak hem bu organizasyonlar ile kontrol ve sertifikasyon kuruluşları hem de üretim verileri her geçen gün artarak devam etmektedir. Örneğin; 2002 yılında 89.826 hektar olan organik tarım arazisi 2012 yılı istatistiklerine göre yaklaşık olarak 4.5 kat artarak 399 bin hektar olmuştur. Yıllara göre artış şekil 2.3 ‘te gösterilmiştir. [40].



şekil 2.3 Yıllara göre Türkiye’deki organik üretim alanları (ha) [40]

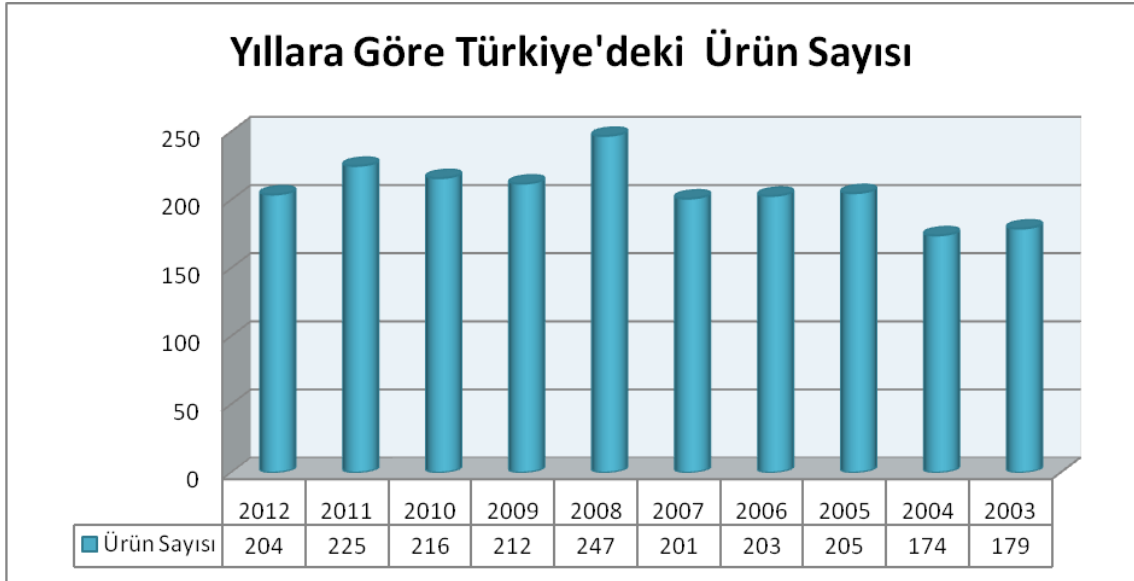
FIBL ve IFOAM’ın 2011 verilerine göre Türkiye organik tarım üretim alanında (ha) en yüksek artışın yaşandığı ülkeler arasındadır Arjantin’den sonra ikinci sıradadır. Türkiye’yi İspanya takip etmektedir [37].

Organik retim yapan üreticilerin sayısı da her geçen yıl artmaktadır. 1990 yılında 313 olan üretici sayısı 2001 yılına kadar düzenli bir artış göstermiştir. 2001 yılından sonra iniş ıkışlar yaşanmıştır. 2007 yılında 10.55 olan üretici sayımız 2012 yılı verilerine göre bu sayı 24.40 ‘a yükselmiştir. Yıllara göre üretici sayısı şekil 2.4 ‘te gösterilmiştir [40]. Bugün itibari ile Türkiye genelinde üretici sayısı bakımından Aydın birinci, Manisa ikinci ve İzmİr nc sıradadır [40].



Şekil 2.4 Yıllara göre Türkiye’de organik üretim yapan üretici sayısı [40].

Organik tarımsal üretim ilk olarak sadece birkaç ürün ile başlamışken yıllar içinde artı bir ivme kazanmıştır. 2002 yılında 150 adet ürün organik olarak üretilmekteyken 2011 yılında bu sayı 225 olmuştur. 2012 yılında ise bu sayı 204’e inmiştir. Yıllara göre ürün sayısı Şekil 2.5’te gösterilmiştir [40].



Şekil 2.5 Yıllara göre Türkiye’deki organik ürün sayısı [44]

Organik üretim alanının genişlemesine, ürün çeşitliliğin ve üretici sayısının çoğalmasına bağlı olarak yıllar içinde üretim miktarlarında da ciddi artışlar yaşanmıştır. 2002 yılında 310.125 ton olan üretim miktarı 2012 yılında 876 bin ton olmuştur [40].

Organik ürün ihracatı da yıllar içinde artışlar yaşamıştır. 2011 yılı ihracat değerleri 3.371 kg organik ürün miktarı ile 15.529 dolar olmuştur [40].

Türkiye’de ekolojik hayvansal üretim bitkisel üretim kadar belirgin bir gelişme göstermiş durumda değildir. Ekolojik bitkisel üretim 1980’li yıllarda başlarken, hayvansal üretimdeki çalışmaların ciddi anlamda 2000 yılından sonra başladığı söylenebilir. Son yıllarda ekolojik hayvancılık konusunda da sınırlı sayıda araştırma ve üretim çalışmaları başlamış ve organik süt üretimi konusunda ilk ciddi yatırım özel sektör tarafından 2003 yılında Gümüşhane Kelkit ilçesinde gerçekleştirilmiştir [35].

3.1 Stres Nedir?

Bitkiler yaşamlarını sürdürdükleri alanlarda, gelişimlerini kısıtlayıcı çeşitli olumsuz koşullara maruz kalmaktadırlar. Bitkilerde büyüme, gelişme ve metabolizmayı etkileyen ya da engelleyen durumlara stres adı verilmektedir [41]. Başka bir ifade ile bitkisel üretimde stres; bitkinin yaşadığı ortamda bir veya birden fazla etkenin, büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkileyerek, verim düşüklüğü ile sonuçlanan bir dizi gerilemeye neden olarak algılanmaktadır [42].

Stres faktörleri, bitkiler üzerine etkilerini çoğunlukla eş zamanlı ve kombine şekilde göstermektedirler. Stres faktörleri, orijinlerine göre abiyotik ve biyotik stres faktörleri olmak üzere iki grupta incelenebilmektedir. Abiyotik stres faktörleri soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve toprakta besin yetersizliği gibi çevresel faktörlerdir. Biyotik stres faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlardır [4].

3.2 Tuz Stresi ve Tuzluluk

Bitkilerde tuz stresi, üretimi etkileyen önemli bir kısıtlayıcı çevresel faktördür. Düşük yağış, yüksek evapotranspirasyon, yer altındaki çözülebilir tuz kaynakları, tuzlu sulama suyu ve yanlış yapılan sulamalar tarım alanlarında “tuzluluk probleminin” ortaya çıkmasına neden olmaktadır [43]. Tuz konsantrasyonu, kullanılabilir su potansiyelini 0.5-1.0 bara düşürmeye yetecek kadar yüksek ise bitki strese girer ve bu stres tuz stresi olarak tanımlanır [44].

Tuzluluk, bitkinin morfolojisi ve anatomisini de kapsayan tüm metabolizmasını etkileyen bir faktördür ve özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yıkanarak yeraltı suyuna karışan çözünebilir tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun topraktan ayrılarak tuzun toprak yüzeyinde ve yüzeye yakın bölümünde birikmesi olayıdır. Tuzluluk nedeniyle bitkisel üretimin ya da verimin düşmesinde bitkilerin, tuz düzeyi sürekli artan çevreye uyum gösterememeleri ana etmen olmaktadır [44, 45].

Tuzluluk sorunu denildiğinde en fazla zararlı etkiyi yapan ve en yaygın iyonlar olan Na ve Cl iyonlarının toprakta yüksek düzeylerde bulunduğu anlaşılmaktadır [46].

Kurak ve yarı kurak iklimlerde yaygın olan tuzlu topraklar genellikle nehirlere çıkışı olmayan kapalı havzalarda uygun olmayan toprak yapısı, sert toprak tabakaları, uygun olmayan sulama şekli, yetersiz drenaj sistemi ve aşırı buharlaşma neticesinde ortaya çıkmaktadır [47].

Tuz stresinden kaynaklanan iyon toksisitesi birinci derecede etkili stres faktörü, bunun ardından oluşan su alımının azalması olan su stresi ve mineral maddelerdeki eksiklikler ve beslenmedeki bozulmalar ikincil stres faktörleridir [45].

Çizelge 3.1 Deniz suyu ve iyi kalitede sulama suyu özellikleri [48]

İyon Konsantrasyonları (mM)	Deniz Suyu	Sulama Suyu
Na ⁺	457.0	< 2.0
K ⁺	9.7	<1.0
Ca ⁺²	10.0	0.5 – 2.5
Mg ⁺²	56.0	0.25 – 1.0
Cl ⁻	536.0	<2.0
SO ₄ ⁻²	28.0	0.25 – 2.5
HCO ₃ ⁻	2.3	<1.5

3.3 Tuz Stresinin Etkileri

Toprakta bulunan çözülebilir tuzların miktarı, bitkinin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan miktarın üzerine çıktığında sorunlar ortaya çıkmaya başlar. Toprak çözeltisindeki tuz konsantrasyonu arttığında ve su potansiyeli azaldığında, bitki hücrelerinin ozmotik

potansiyeli düşer ve bitki hücrelerinin bölünmesi ya da uzaması birden yavaşlar. Bu stres koşulları altında genellikle stomalar kapanır ve sonuç olarak fotosentez azalır. Stres koşullarının devam etmesi halinde bitki büyümesi tamamen durabilir [47].

Tuzluluk bitki gelişmesini üç temel prensip çerçevesinde engellemektedir:

1. Su eksikliği (su stresi)
2. Na^+ ve Cl^- iyonlarının fazla miktarda alınması nedeniyle oluşan iyon toksisitesi
3. İyon taşınımında ortaya çıkan dengesizlik nedeniyle hücre içindeki sıvının mineral yapısının ve Ca^{+2} dengesinin bozulması [49].

Tuz stresinde bitkilerde aşırı derecede biriken Na nedeniyle bitkilerin K alımı engellenmekte ve Cl özellikle NO_3 alımı üzerine olumsuz etki yaparak bitkilerde iyon dengesinde bozulmalara neden olabilmektedir [50].

Tuz stresi altındaki bitkilere dışarıdan uygulanan Ca, K veya P içeren bileşiklerin, bitkinin yaprak ve köklerinde Na ile rekabete girerek onun alınımını azalttığı ve bitki bünyesinde Ca, K ve P iyonlarının strese karşı koyabilecek yeterli düzeye ulaşmasıyla birlikte bitkinin strese karşı koyabilme kapasitesinin de arttığı bazı çalışmalarla bildirilmiştir [51].

Tuzluluk stresi ile karşı karşıya kalan bitkilerde genotipik özellikler çerçevesinde tepkiler oluşmakta, bazı bitki tür ve çeşitleri tuzluluktan az düzeyde etkilenirken, bazıları da ölümcül biçimde zarar uğrayarak etkilenmektedir [45].

Tuzlu koşullarda bitkilerde gözlenen büyüme gerilemesinin bir diğer nedeni de besin maddelerinin bitkilerce alınımı, taşınması ve kullanılmasının engellenmesidir [50]. Ayrıca tuzluluk, bitkilerde net fotosentez oranını, transpirasyon oranını ve stoma iletkenliğini azaltmakta, stoma direncini arttırmaktadır. Tuzluluğa maruz kalmış bitkilerde fotosentezin azalması; stoma kapanmasına bağlı olarak CO_2 fiksasyonundaki azalmaya bağlıdır [4].

Farklı bitki türlerinde tuzlulukla teşvik edilmiş çok sayıda protein belirlenmiştir. Bu proteinleri sadece tuzluluk şartlarında biriktirilen tuz stresi proteinleri ve diğer abiyotik faktörlerce biriktirilen stresle ilgili proteinler olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Proteinler, tuzluluk stresi şartlarında ozmotik düzenlemeye olanak sağlamaktadırlar [4].

Tuzluluk nohut, soya, fasulye, yonca gibi bitkilerde nitrojenaz aktivitesi ve nodülasyonu azaltmaktadır [4].

Toprak suyu tuzluluğunun bitki gelişmesi üzerindeki zararlı etkileri şu şekilde özetlenebilir;

- Yavaş ve yetersiz çimlenme,
- Fizyolojik kuraklık, solma ve kuruma,
- Bodurluk, küçük yapraklar, kısa gövde ve dallar,
- Mavimsi yeşil yapraklar,
- Çiçeklenmenin gecikmesi, daha az çiçek açma ve tohumların daha küçük olması,
- Tuza dayanıklı yabancı otların gelişmesidir [45].

Bitki yetiştirme ortamındaki fazla tuz bitkinin gelişmesini önemli ölçüde sınırlar. Tuzlar bitki büyümesine üç şekilde etki ederler;

- Fiziksel etki; ozmatik basıncın yükselmesi sonucu bitkinin su alımı ve dolayısıyla beslenmesi yavaşlar veya tamamıyla durur. Bitki su alımında güçlük çeker. Buna ozmotik basınç etkisi de denir.
- Kimyasal etki; bir kısım tuzla, bitki besin maddelerinin alımını zorlaştırıp, metabolizmayı bozarak bitkinin büyümesine zarar verirler. Buna özel iyonların toksisitesi de denir.
- Dolaylı etkiler; tuzluluk veya sodyumluğun toprak üzerinde meydana getirdiği değişiklikler, bitkilerin gelişmesine etki eder [45].

Ayrıca tuzluluk, çoğunlukla yapraklarda erken yaşlanmaya neden olmaktadır. Yaprak yaşlanması genellikle protein veya klorofil konsantrasyonundaki azalma ve hücre zarı geçirgenliğindeki artışla ifade edilmektedir [42].

Tuzlu topraklarda büyüyen bitkiler iki sorunla karşılaşır. Bunlar;

- Toprak çözeltisinde yüksek tuz konsantrasyonu (yüksek ozmotik basınç ve onunla uyumlu olarak düşük toprak su potansiyeli).

- Cl^- ve Na^+ gibi potansiyel olarak zehirli iyonların yüksek konsantrasyonları veya tuz iyonlarının uygun olmayan kombinasyonları [52].

Bir başka görüşe göre de topraklardaki yüksek tuzluluk bitkileri iki şekilde etkilemektedir. Birincisi, bitkilerin toprak çözeltisinden su alınımlarını engelleyen toplam tuz etkisi veya ozmotik etki, ikincisi ise bitkilerde bazı fizyolojik olayları etkileyen toksik iyon etkisidir. Yüksek tuz konsantrasyonunun bitkilerde oluşturduğu zarar temelde suyun ozmotik olarak tutulmasından ve protoplazma üzerinde belli iyonların zarar oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Çözeltideki tuz konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak doğrusal şekilde su potansiyeli azalır. Bunun bir sonucu olarak tuz konsantrasyonu arttıkça bitki daha az su alır. Ortamda Na^+ katyonunun, buna bağlı Cl^- ve SO_4^{2-} anyonların artması protoplazmada iyon dengesinin (K^+ , Ca^{+2} / Na^+) bozulmasına yol açar. Buna koşut olarak enzim aktivitesi azalırken, protein sentezi geriler, membran permeabilitesi azalır, kloroplast ve hücredeki öteki yapılar önemli derecede zarar görür. İyonlar arası dengenin bozulması tuzu oluşturan iyonlarla bitki besin elementleri arasında rekabete yol açarak tuz stresindeki bitkilerin bitki besin elementlerini yeterince alamamalarına neden olur. NaCl tuz seviyesinin yüksek olduğu topraklarda, bitkilerde özellikle NO_3^- , K^+ ve Ca^{+2} alımı önemli derecede azalır [53]. Bu etkilere bağlı olarak tuz stresi altındaki bitkilerde stomalar kapatılmakta, yaprak alanları da küçültülerek transpirasyon azaltılmaya çalışılmaktadır. Böylece bitki, su kaybını en aza indirmek ve topraktan su ile birlikte yüksek miktardaki tuzu almayı engellemeye gayret etmektedir. Yaprak alanındaki azalmanın yanında birim alandaki CO_2 fiksasyonu da azalmaktadır. Yaşamak için yoğun enerji kaybeden bitki, daha az fotosentez yaparak harcadıklarını yerine koyamadığı için gelişme ve büyüme geriler. Tuz stresi altında net CO_2 fiksasyonunun azalması; su noksanlığı, stomaların kapanışı, apoplastta tuzun birikmesi ve mezofil hücrelerinin turgoru kaybetmesi veya tuz iyonlarının doğrudan toksisitesi nedeniyledir [54].

Genel olarak tuz stresine maruz kalan bitkilerde genel olarak karşılaşılan farklılıklar arasında kök, gövde ve sürgün uzunluğunda azalma; bitki yaş ve kuru ağırlıklarında azalma; yaprak alanı ve sayılarında azalma; klorofil miktarında azalma; verimde meyve ve tat renklerinde bozulma kaydedilmektedir. Bitki uzun süre tuzluluk stresi altında

kaldığında, yaşlı yapraklarda iyon toksisitesi ve su noksanlığı, genç yapraklarda ise karbonhidrat noksanlığı ve buna bağlı belirtilerin ortaya çıktığı kaydedilmektedir [55].

Ayrıca sodyum, bitkinin birçok organeli üzerinde olumsuz etkide bulunmakta olup bitkide hem floem hem de ksilem iletim demetlerinde hareket edebilme yeteneğinde olduğu için bu etki daha çok bitkilerin yaşlı yaprak uçlarından başlayıp, yaprak ayası ve sapına doğru ilerleyerek nekrotik lekeler kadar dönüşen semptomlar vermektedir [47].

3.4 Bitkilerde Tuz Stresine Tolerans

Ashraf'a göre [47] bitkilerde farklı biçimlerde ortaya çıkan tuza dayanıklılık, yüksek oranlarda çözülebilen tuz içeren ortamlarda bitkilerin büyüme ve gelişme yeteneği olarak tanımlanır. Bir diğer ifade ile tuza dayanıklılık, tuz alımının engellenmesi, yani protoplazmaya ulaşmadan tuz denetimi veya toksik ve ozmotik etkilere karşı tolerans gösterebilme yeteneğidir [55].

Tuz toleransı ise çeşitli çözülebilir tuzların çok yüksek konsantrasyonlarını içeren ortamlarda bitkilerin büyüme ve hayat döngülerini tamamlayabilme yeteneğidir. Tuz toleransı, tuz stresine dayanıklılığın bir göstergesidir ve bitki türüne, yaşadığı ortam ve çevre şartlarına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Bitkiler, tuz stresine maruz kaldıkları zaman ilgili biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları devreye sokmaktadırlar [4].

Tuza tolerans bitkilerin protoplazma bileşenleri düzeyinde tuza karşı gösterdikleri tolerans olarak da tanımlanabilir. Protoplazma bileşenlerinin (proteinler, biyomembranlar vb.) tuza toleransı stres proteinleri ve sitoplazmik ozmotik düzenleyicilerin vasıtasıyla sağlanır. Tuz konsantrasyonunun artması ile beraber stres proteinlerinin sentezi 3-6 saat içerisinde belirli DNA serileri tarafından aktive edilir. Toksik özelliği olmayan prolin, alanin, glutamin, betain, mannitol, sorbitol gibi organik bileşikler, hücre içi ile dış ortam arasındaki ozmotik potansiyelin düzenlenmesinde görev alırlar [56].

Tuza dayanımı fazla olan bitkiler yüksek tuzluluklarda bile verimde önemli azalmalar oluşturmazken, tuza dayanımı fazla olmayan bitkiler düşük tuzluluklarda bile önemli azalmalar gösterebilir [57].

Çevresel faktörler ve fizyolojik etkilerin eşlik ettiği tuza tolerans özelliğinin esas kaynağı kalıtsal unsurlardır. Tuza tolerans bakımından bitkiler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Familya, cins ve türler arasında farklılıklar bulunduğu gibi, aynı türe ait genotipler arasında da tuza tolerans yönünden farklılıkların bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca bitkilerin tuza dayanımları, iklim koşulları, toprağın nem durumu, tuz çeşidi ve ortamdaki diğer tuzlara göre de oldukça farklılık göstermektedir [45, 58].

Genelde meyve bitkileri tuzluluğa, tarla, yem ve sebze bitkilerinden daha duyarlıdır. Öte yandan aynı bitkinin değişik organlarının tuza duyarlılıkları da farklıdır. Örneğin; tahıllarda dane ürünü, vejetatif ürüne oranla, tuzluluktan daha az etkilenir [8].

Tuz stresine neden olan Na ve Cl iyonlarının daha çok yaşlı yapraklarda tutulması ve genç yapraklara iletiminde kısıtlamalara sahip olmaları, tuza tolerant bitkilerin en bilinen özelliklerindendir. Bu bitkilerde genç yapraklarda, yaşlı yapraklara oranla daha fazla potasyum daha az sodyum elementinin bulunması, potasyumun floemle taşınımının sodyum elementine göre daha ileri düzeyde olmasına bağlıdır [46].

Genotipler düzeyinde farklı tepkilerin bulunduğu tuza tolerans mekanizmasının anlaşılabilmesi için çok değişik özellikler incelenmiş olup bir bitki genotipinin tuz stresine karşı toleransını gösteren 200 adet morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal parametre olduğu ileri sürülmektedir [44].

Ayrıca tuza toleransın belirlenmesinde bitki doku ve organellerinde iyon (Na^+ , K^+ ve Cl^-) birikimi, bitkide taşınımı ve dağılımı ile bu iyonların birbirine olan oranları (K/Na), bitkilerin organik madde biriktirme ve sentezleme yetenekleri ile hücre düzeyinde meydana gelen oksidatif stresten kaynaklanan zararlanmalar üzerinde durulmaktadır [58].

“Tuz toleransı”, bitkilerde farklı biçimlerde kendini gösterebilir. Levitt ‘in [44] açıkladığı iki farklı mekanizma daha sonra Marschner [49] tarafından geliştirilerek anlatılmıştır. Buna göre, eğer bir bitkide tuzdan sakınım (exclusion) ve tuzu kabullenme (inclusion) mekanizmalarından birisi iyi gelişmiş ise, bu bitki genotipinin tuza toleransı yüksek

olmaktadır. Sakınma, stres faktörlerinin korunma veya bu faktörlerin bitki dokularına girişinin azaltılması anlamına gelir. Bitkilerde sakınım mekanizması ya bitki ortam ara birimindeki kimyasal kompozisyonlar ve bitki morfolojisindeki değişimlerle (özellikle yaprak ayası alanı ve kalınlığı, stoma büyüklüğü ve yoğunluğu, kütikula kalınlığı ve kimyasal kompozisyonu, yaprak ve kök salgılarındaki toksik ve caydırıcı bileşiklerin varlığı) ya da ontogenik değişimlerle (stres dönemlerinde mevsimsel tohum, yumru ve soğan oluşturarak dormant ontogenik faza geçiş) sağlanabilmektedir. Tolerans ise stres faktörleri etkilerinin elimine edilmesi, indirgenmesi ya da onarılması anlamına gelmektedir. Bu da bitkide oluşturulan dokusal düzeydeki değişimler (reçine, yara peridermi oluşumu vb.), hücresel düzeydeki değişimler (çeper apozisyonları, hücre çeperi ve membranı ile kloroplast yapı değişimleri), moleküler düzeydeki değişimler (flavanoidler, fenilamidler, poliaminler, fitoaleksinler gibi sekonder metabolitlerin, kalloz gibi polisakkaritlerin ve lignin-süberin gibi fenol polimerlerin veya stres proteinlerinin sentezi) ve submoleküler düzeydeki değişimler ile (antioksidanlar ile SOD, CAT, PO gibi koruyucu enzimlerin sentezlenmesi) sağlanmaktadır.

Tuza gösterdikleri tolerans açısından bitkiler iki gruba ayrılırlar.

1. Halofitler: Yüksek Na^+ konsantrasyonuna sahip tuzlu koşullarda gelişimlerini devam ettirebilen bitkilerdir [53]. Bu bitkiler 200-500 mM NaCl ortamında büyüme gelişme göstermektedirler. Tuza dirençli olan halofitler genellikle sitoplazmadaki tuzdan kurtulmak için vakuoller içinde sınırlama veya tuzu salgı bezleriyle dışarı atma gibi özel yapılara sahiptirler [59].
 - Öhalofitler veya fakültatif halofitler: Optimum büyüme gelişme için tuza gereksinim duyan genotiplerdir. *Suaeda maritima*, *Atriplex nummularia* gibi.
 - Miyohalofitler: Sınırlı yüksek tuzluluk düzeylerinde büyüyüp gelişebilen genotiplerdir. Şeker pancarı, *Atriplex hastata* ve *Spartina townsendii*
 - Obligat halofitler: İlkel tuzlu su yosunları ve cyanobakteriler gibi sınırlı örnekleri vardır.
2. Glikofitler: Tuzlu koşullarda normal gelişimini devam ettiremeyen bitkilerdir [48]. Yüksek bitkilerin çoğu glikofit bitkiler kapsamında yer alırlar ve yüksek tuz

konsantrasyonunda yaşayamazlar. Tarımı yapılan bitkiler arasında olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) de yüksek oranda duyarlı bir bitkidir [60].

Arpa, pamuk, darı, buğday, şekerpancarı, hurma, ıspanak ve kırmızı pancar tuza toleranslı ($Ec\ 5-10\ dS/m^{-1}$); yer fıstığı, mısır, çeltik, şeker kamışı, ayçiçeği, soya fasulyesi, armut, incir, asma, guava, lahana, patates, domates, karnabahar, kabakgiller ve tatlı patates orta derecede toleranslı ($Ec\ 3-5\ dS/m^{-1}$); mercimek, bezelye, susam, elma, kayısı, turunçgiller, şeftali, ahududu, çilek, fasulye, turp, kereviz ve havuç tuza duyarlıdır [61].

3.5 Tuzluluğun Gen Ekspresyonunda Oluşturduğu Değişiklikler

Bitkiler tuz stresine maruz kaldıklarında gen anlatımlarında bazı değişiklikler meydana gelir. Son yıllarda tuz stresi ile anlatımı artan genlerin çoğu izole edilebilmiştir [62].

Tuz stresine karşı teşvik edilen genler, fonksiyonlarına göre 5 gruba ayrılmıştır [63].

1. Osmolitleri sentezleyen genler
2. Hücre bütünlüğünü sağlayan genler
3. Antioksidatif enzimleri kodlayan genler
4. İyon dengesini düzenleyen genler
5. Transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler

Bitkiler, abiyotik stres faktörleri ile mücadele etmek için, ilgili genleri aktive ederek stresle ilgili proteinleri üretmektedirler. Şaperonlar olarak rol oynayan Sıcak Şoku Proteinleri (Hsps: Heat-Shock Proteins) ve Geç Embryogenezis (LEA: Late Embryogenesis Abundance) Proteinleri, sıcaklık, tuzluluk ve su eksikliği tarafından teşvik edilmektedir [64].

Stres genlerinin ürünleri, bitkinin adaptasyonuna önderlik eder ve bitkinin hayatta kalmasına yardımcı olur. Ayrıca, gen ifadesinde değişikliklere neden olan stres, ABA, salisilik asit ve etilen gibi farklı moleküllerin üretiminde rol oynamaktadırlar [65].

Su veya tuz stresine karşı teşvik edilen genler, “erken yanıt geni (early response gene)” ve “gecikmiş yanıt geni (delayed response gene)” olarak sınıflandırılmaktadır. Erken

yanıt genleri hızlı (dakikalar içinde) ve geçici olarak teşvik edilmektedir. Bu teşvik, yeni protein sentezini gerektirmez çünkü tüm sinyal komponentleri zaten bulunmaktadır. Tersine, tuza duyarlı genlerin büyük çoğunluğunu oluşturan gecikmiş yanıt genleri, stres tarafından daha yavaş (saatler içerisinde) aktive edilmektedirler ve devamlı ifade edilirler. Erken yanıt genleri, gecikmiş yanıt genlerini son aşamada aktive eden transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadırlar [66, 67].

Bu çalışmada, tuzluluğa karşı oldukça duyarlı olan [49] ve dünyada en fazla ekim alanı ile üretim miktarına sahip yemeklik tane baklagil bitkisi olan fasulyenin [68] organik ve konvansiyonel yetiştiricilik koşullarında maruz bırakıldığı tuz stresi altında teşvik edilen CBF/DREB2A genleri arasında ekspresyon farkının olup olmadığı araştırılacaktır [49, 68].

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METOT

Araştırma, Haziran (2011) – Haziran (2013) tarihleri arasında Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı ve Real Time PCR TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarında yürütüldü.

4.1 Bitki Materyali

Araştırmada Asgen firmasının IMO Kontrol ve Sertifikasyon firması tarafından Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmelik hükümlerine göre kontrollerini yaparak sertifikalandırdığı organik sertifikalı Askız çeşiti fasulye tohumu organik yetiştiricilik için, konvansiyonel yetiştiricilik içinse aynı firmanın organik sertifikaya sahip olmayan ilaçlı Askız çeşiti fasulye tohumu kullanıldı.

Orser Kontrol ve Sertifikasyon Kuruluşu tarafından kontrolleri yapıp sertifikalandırılan Eskişehir 'de organik sertifikalı üretim yapan Şafak Eren isimli üreticinin organik fasulye yetiştirdiği alandan getirilen organik toprak organik fasulye yetiştirmek için kullanıldı. Aynı üreticinin konvansiyonel fasulye yetiştirdiği alandan getirilen konvansiyonel toprak da konvansiyonel fasulye yetiştirmek için kullanıldı.



Şekil 4.1 Konvansiyonel ve organik toprak

4.2 Tamponlar ve Çözeltiler

Çizelge 4.1 Tampon ve çözeltiler

Tampon veya çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1' lik solüsyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
TE çözeltisi (1 X), pH 8.0	10 mM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
Etanol	% 75- 80 stok solüsyonu hazırlandı.
Etidyum bromür stok solüsyonu (EtBr)	5 mg/ml EtBr' e steril deiyonize su ilave edildi.
MOPS (5 X)	0.2 MOPS pH 7, 50 mM NaOAc, 50 mM EDTA ve DEPC' li su bir gece inkübe edildikten sonra otoklavlandı.
RNA loading çözeltisi	1mM EDTA, pH 8.0, % 0.4 bromfenol mavisi ve % 50 gliserol karışımı, DEPC' li su ilave edildi.
dNTP karışımı	20 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.
EDTA solüsyonu	250 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl karışımı hazırlandı. pH 8.0'e ayarlandı.
TBE çözeltisi (5 X)	54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1 L saf suya tamamlandı.
DNA loading çözeltisi	250 mM Tris-HCl pH 7.5, % 0.2 bromfenol mavisi, % 0.2 ksilen siyanol ve % 40 gliserol karışımı
Ampisillin stok solüsyonu	100 mg/ ml ddSu ilave edildi. Filtreden geçirildi. – 20 °C' de bekletildi.
X- Gal stok solüsyonu	50 mg 5-bromo-4- kloro-3-indol β - D- galaktosidaz 1 ml DMF(di metil formamid) de çözüldü. Alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C' ye kaldırıldı.
IPTG stok solüsyonu	1 M (240 mg/ml) izopropanol β -D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20 °C' de saklandı.

4.3 Moleküler Markerlar

Çizelge 4.2 Moleküler markerlar

RiboRuler high range RNA Ladder	6000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 500 bp ve 200 bp bantları gözlenir.
MassRuler DNA Ladder Low Range	1 X' lik TBE' de 1031 bp ile 80 bp arasında toplam 11 bant gözlenir.
PstI ile kesilmiş Lambda	%1' lik agarozda 11501 bp ile 247 bp arasında toplam 17 bant gözlenir.
MBI Fermentes Ladder	% 1.5'luk agaroz jelde 50 bp bant gözlenir.

4.4 Enzimler

Çizelge 4.3 Enzimler

Taq polimeraz	Qiagen Taq DNA Polymerase
	Fermentas Long PCR Enzyme Mix

4.5 Kitler

Çizelge 4.4 Kitler

RNA izolasyon kiti	İnvitrogen Trizol Reagent
Genomik DNA izolasyon kiti	Qiagen DNeasy Plant Mini Kit
Jel pürifikasyon kiti	QIAquick Gel Extraction Kit
Ligasyon kiti	Promega pGEM-T Easy Vector Systems
Plazmit izolasyon kiti	Roche High Pure Plasmid Isolation Kit
Genomik DNA uzaklaştırma kiti	Roche DNase I Recombinant, RNase-free
cDNA sentez kiti	Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit

4.6 Besi Yerleri

4.6.1 Luria Broth (LB)

Çizelge 4.5 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 20 dakika otoklavlandı.

4.7 Oligonükleotidler

Çizelge 4.6 Primerler

Primerin Adı	Primer Dizini
Anchored Oligo (dt) ₁₈	5' -NVTTC TTT TTT TTT TTT TTT -3' N: A, C, G veya T V: A, C veya G
DAF2	5'-CTAATTCTGCATCTCCCTCAGGTC-3'
DAR2	5'-CAGCTCAGCAGCAGCGTCTACT -3'
DAF1	5'-ACTCGGGACAACGTTGGAT-3'
DAR1	5'-ACTCGGGACAACGTTGGAT-3'
PvActF2	5'- GGAATTGGAACTGCCAAGA -3'
PvActR2	5'- CTCGTGAATGCCAGGAGATT -3'
DREB2AF1	5'- TCGGCGACTTTGGAGATTAC -3'
DREB2AR1	5' -TACTCGGGACAACGTTGGAT -3'

4.8 Programlar

4.8.1 Chromas

İnternette indirilebilen bir programdır. Vektör dizilerinin çıkartılması için kullanılmıştır. Dizinler hem FASTA formatında görülebilir hem de kromatogram dosyalarını açar.

4.8.2 Primer 3

İnternet üzerinden kullanılan bir programdır. Primer tasarımı için kullanıldı.

4.8.3 Blast

NCBI internet sayfası üzerinden kullanılan bir dizin bilgisine benzerlik gösteren dizinleri tespit etmeye yarayan bir programdır.

4.8.4 EMBOSS Transeq

Nükleotid dizinlerini karşılıkları olan peptid dizinlerine çeviren internet üzerinden kullanılan bir programdır.

4.8.5 BioEdit

İnternet üzerinden ücretsiz indirilip kullanılabilen, dizin hizalama fonksiyonlarına sahip bir programdır.

4.9 İklimlendirme Kabini Koşulları

Organik ve konvansiyonel tohumların çimlenmesi ve yetiştirilmesi için moleküler biyoloji laboratuvarında bulunan iklimlendirme kabini kullanıldı. Yetiştirme koşulları için kabinin sıcaklığı 25° C, nemi % 50 ve fotoperiyodu 10 saat karanlık 14 saat aydınlık olarak ayarlandı.

4.10 Tohumların Çimlendirilmesi

Askız çeşidine ait organik ve ilaçlı tohumlar çeşme suyu ile yıkandı. 12' lik viyollara ayrı ayrı olacak şekilde torf konuldu ve etiketlemeleri yapıldı. Etiketlenmiş viyollara sırası ile

organik ve ilaçlı askız fasulye tohumlarından ekilip, can suyu verildi ve üstleri alüminyum folyo ile kaplanarak iklimlendirme kabinine konuldu.

2 gün aralıklarla viyollerin kontrolleri yapıldı ve imlenmeler kayıt altına alındı. Süreç içerisinde ilaçlı tohumların organik tohumlara göre daha hızlı çimlendiği gözlendi.



Şekil 4.2 Konvansiyonel ve organik fasulye tohumu



Şekil 4.3 Fasulye fideleri

4.11 Fidelerin Saksılara Transferi ve Büyütülmesi

Su ile yıkanan 15 cm'lik saksılara organik ve konvansiyonel topraklar ayrı ayrı konularak etiketlemeler yapıldı. Organik toprak renginin kırmızı kahve, konvansiyonel toprak ise renginin siyaha yakın olmasıyla fiziksel olarak da ayrımın yapılabilmesini sağladı. 6 adet organik fide, organik toprak bulunan 6 adet saksıya, 6 adet ilaçlı tohumdan yetiştirilmiş fide, konvansiyonel üretimin yapıldığı araziden getirilmiş toprağın bulunduğu 6 adet saksıya şaşırtılarak iklimlendirme kabinine konuldu.

Yetiştirme aşamasında günlük periyodik kontroller yapıldı ve her türlü değişiklik kayıt altına alınarak sulamaya 2 günde bir devam edildi.

Konvansiyonel fasulyelerdeki gelişimin organik fasulyelere göre daha erken ve daha hızlı olduğu ve ilk çiçeklenme ile ilk meyve oluşumunun konvansiyonel fasulyelerde daha önce olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.4 Saksılara şaşırtılmış organik fasulyeler



Şekil 4.5 Saksılara şaşırtılmış konvansiyonel fasulyeler

4.12 Bitkilere NaCl Uygulaması

Bitkiler, 2 adet organik kontrol saksısı, 2 adet organik saksı ve 2 adet yedek organik saksı ile 2 adet konvansiyonel kontrol saksısı, 2 adet konvansiyonel saksı ve 2 adet yedek konvansiyonel saksı olacak şekilde ayrılarak etiketlendi.

Tüm bitkilerin ortalama 25 cm boya ulaştığı dönemde tuz stresi uygulanmaya başlandı.

150 mM olarak hazırlanan tuzlu (NaCl) su örneklerin saksı diplerine ve yüzeylerine uygulanarak verildi.



Şekil 4.6 Tuz uygulaması yapılan organik (solda) ve konvansiyonel (sağda) fasulyeler

4.13 Genomik DNA İzolasyonu

Real Time PCR 'da ekspresyonunu görmek amacıyla primer tasarlanacak DREB2A geni klonlama çalışmaları için ilk olarak Genomik DNA izolasyonu DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde yapıldı.

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş konvansiyonel deney 20 saatlik bitki örneği, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içersinde toz haline getirilerek 2 ml ' lik mikro santrifüj tüpüne alındı. 100 mg örnek için 400 µl Buffer AP1 ve 4 µl RNase A ilave edilerek vortekslendi. 10 dakika 65 °C'de inkübe edildi. 130 µl Buffer AP2 eklenip 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 5 dakika 20 000 xg hızda santrifüj edildi. Süpernatant QIA shredder kolonlara pipetle aktarıldı ve 2 dakika 20 000 xg hızda santrifüj edildi. Süzüntü yeni tüplere alınarak 1,5 katı kadar Buffer AP3 / E eklenip pipetlenerek karıştırıldı. Karışım DNeasy Mini Kolonlara aktarıldı ve 1 dakika 6000 xg hızda santrifüj edildi. DNeasy Mini Kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi ve 500 µl Buffer AW eklenip, 1 dakika 6000 xg hızda santrifüj edildi. Tüplerdeki sıvı atıldı ve kolonlara tekrar

500 µl Buffer AW eklenip, 2 dakika 20000 xg hızda santrifüj edildi. Klonlar, yeni eppendorflara alındı, üzerlerine 100 µl su eklenip, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip, 6000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek DNA'ların eppendorflara geçmesi sağlandı. Elde edilen DNA – 80 °C 'de saklandı.

4.14 Genomik DNA Miktarının Belirlenmesi

DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak izole edilmiş genomik DNA'ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. DNA'ların konsantrasyonları $OD_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Sulandırma Faktörü}$ formülüyle hesaplandı.

4.15 Genomik DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik jel hazırlamak için 0,75 g Agaroz (Aplichem), 80 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60°C'ye soğutulup içersine 3 µl etidyum bromür eklenerek jel tepsisine döküldü.

Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 V 'ta 90 dakika yürütüldü.

4.16 Genomik DNA'dan Polimeraz Zincir Reaksiyonu

4.16.1 Kullanılan Primerler

PCR reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla 2 çift primer tasarımı yapıldı. DAF1 5' GATGAGAGCACTTGAGCCTTTT 3' forward ve DAR1 5' ACTCGGGACAACGTTGGAT 3' reverse primerleri Nayak vd. çalışmasındaki primerlerden sentezlendi [15]. Diğer primer çifti ise Nayak vd. çalışmasındaki bilgiler kullanılarak DAF2 5' CTAATTCTGCATCTCCCTCAGGTC 3' forward ve DAR2 5' CAGCTCAGCAAGCAGCGTCTACT 3' reverse primerleri olarak Primer3 programında tasarlanarak sentezlendi. DAF1 ve DAR1 primeri çalışmazken DAF2 ve DAR2 primer çifti çalıştı. Primer dizileri Çizelge 4.6 ' da gösterilmiştir.

4.16.2 PCR Koşulları

500 µl lik PCR tüpü içerisine, 5 µl genomik DNA, 5 µl Qiogen PCR Buffer (10 X), 10 µl Q Solüsyonu (5 X), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl forward primer (10 mM), 1 µl reverse

primer (10 mM), 1 µl Taq Polimeraz enzimi (5U / µl), 26 µl H₂O konulup 50 µl ye tamamlandı.

PCR döngüsü şöyledir. 95 ° C de 10 dakika denatüre edildikten sonra, 4 ° C de 30 saniye denatürasyon yapıp 1 µl Taq Polimeraz enzimi reaksiyona eklendi. 94 ° C 5 dakika, 94 ° C de 30 saniye, 60 ° C 1 dk primer bağlanması ve 72 ° C 1 dk uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 ° C de 15 dk son uzatma yapılarak örnekler buz üzerine alınıp – 20 °C’ de saklandı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

4.16.3 PCR Ürününün Jel Üzerinde Analizi

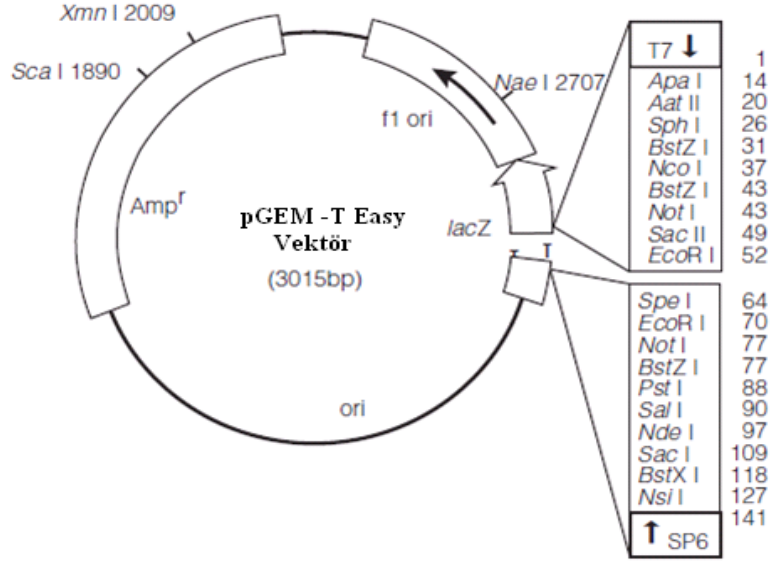
% 1 lik agaroz jel 4.15 te anlatıldığı gibi hazırlandı.

4.17 PCR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu

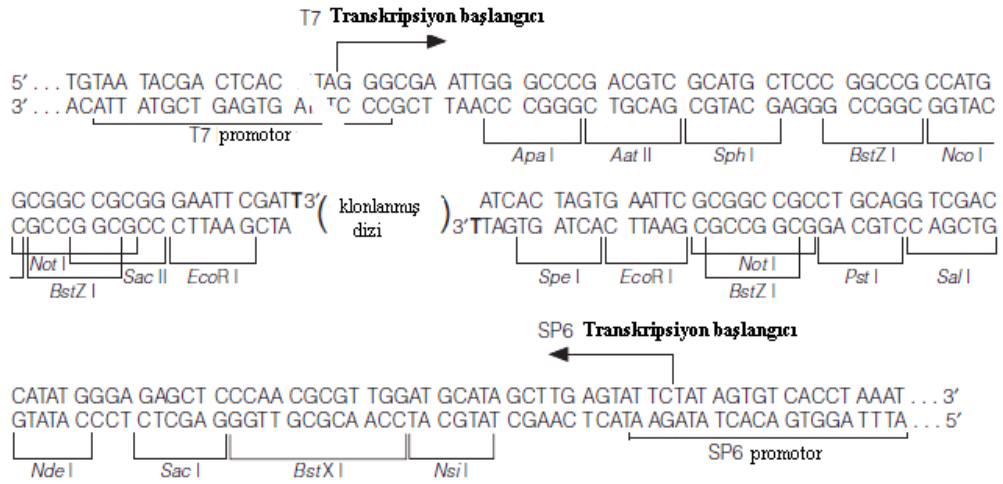
PCR ürünlerinin pürifikasyonu Qiaquick Jel Ekstraksiyon Kiti ile kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde yapıldı. Fragman agaroz jelden bisturi yardımı ile kesilip 2 ml’lik tüplere alındı. Jel hacminin 3 katı kadar QG tamponu eklenip 50 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. QIAquick kolonlarına aktararak 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. 0,5 ml QG tamponu eklenip 17900 xg hızda santrifüj edildi. 0,75 ml PE tamponu eklenip 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. QIAquick kolonları 1,5 ml ’lik temiz tüplere alınarak 30 µl steril su eklenerek 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi.

4.18 Ligasyon

Genomik DNA ’dan geliştirdiğimiz primerler kullanılarak PCR ile çoğaltığımız DREB2A gen bölgesine ait olduğu düşünülen DNA segmenti Promega pGEM-T Easy vektörü içersine ligasyonu yapılarak klonlandı. pGEM-T Easy vektörünün Şematik gösterimi Şekil 4.7 de ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 4.8’de verilmiştir (Promega vektör kullanım kılavuzu).



Şekil 4.7 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi



Şekil 4.8 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi

Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi vektör DNA'sı ile PCR ürünleri oranları 1 / 3 olacak şekilde hazırlandı. Ligasyonlar, 4 ° C'de 24 saat inkübe edildi.

4.19 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

DH5α ultra kompetan hücreler Inoue ve arkadaşlarının (1990) optimize ettiği protokole uygun olarak hazırlandı.

4.20 Transformasyon

4.20.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması

100 µl *E.coli* kültürü içine 5 µl ligasyon ürünü eklenip 4 ° C de 30 dk, 42 ° C de 1 dk 30 s ve 4 ° C de 2 dk bekletildi. Transformantlar 800 µl SOB içerisinde 45 dk 37 ° C de 220 rpm de büyütüldü.

Örnekler IPTG, X-GAL ve AMPİSİLİN içeren katı Luria-Bertani besi ortamına ekildi ve 37 ° C de 16 saat büyütüldü.

Katı besi yerleri içine plazmit almış kolonilerin seçimi için 100 µg/ml ampicilin eklenerek ve rekombinant plazmitlerin seçimi için ise 0,5mM IPTG ve 30 µg/ml X- gal eklenerek besi yerleri hazırlandı.

4.20.2 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Mavi renkte gözlemlenen koloniler içlerine genomik DNA almadan kapanmış plazmitleri taşıyan hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise genomik DNA 'ları alarak kapanmış plazmitler taşıyan hücrelerden oluşmaktadır.

Beyaz kolonilerin istediğimiz PCR ürününü alıp almadığını kontrol etmek amacıyla beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu yapıp restriksiyon enzimi ile kesildi.

4.21 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için; büyüyen koloniler kürdanla alınarak 4 ml Luria-Bertani ve 40 µl ampicilin içeren sıvı besi ortamına bırakılarak 37 °C de 16 saat 220 RPM hızda büyütüldü.

Plazmit izolasyonu High Pure Plasmid İzolasyon Kiti, Roche kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı.

2 ml kültür santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü, üzerine RNaz içeren süspansiyon çözeltisinden 250 µl ilave edilerek hücreler yeniden çözüldü. 250 µl liziz çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 350 µl binding çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 13000 xg hızda 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant filtrele pipetlenip, 1 dakika

13000 xg hızda santrifüj edildi. Tüpte biriken sıvı atıldı. Hücreleri yıkamak için filtrelere 700 µl yıkama çözeltisi II pipetlenip, 1 dakika 13 000 xg hızda santrifüj edildi. Tüpte biriken sıvı atıldı ve filtre kurutulmak için 13 000 xg hızda 1 dakika santrifüj edildi. DNA'yı filtreden ayırmak için filtre temiz tüpe alınıp, üzerine 30 µl elüsyon çözeltisi eklenip 1 dakika 13 000 xg hızda santrifüj edildi. Tüpe geçen DNA – 20 °C de saklandı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgeleri uygun bir enzimle kesilerek doğrusal hale getirilerek miktarı belirlendi ve Dizin analizine gönderildi.

4.22 RNA İzolasyonu İçin Bitki Örneklerinin Alınması

Bir kez verilen tuz uygulamasından sonraki 1 saat, 20 saat ve 3 günlük sürelerde bitkilerin yapraklarından örnekler alınarak etiketlendi ve RNA izolasyonu için – 80 °C ' de saklandı.

4.23 RNA İzolasyonu

Tuz stresi verilmiş organik ve konvansiyonel fasulyelere 4.22 'de belirtilen zamanlarda alınan yaprak örneklerinden RNA izolasyonu yapıldı.

4.23.1 RNA İzolasyonu İçin Hazırlık

RNA molekülleri nükleotidlerindeki riboz molekülünün OH grubu nedeniyle biyolojik ortamlarda fazlaca bulunan ribonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır. Bu nedenle RNA izolasyonundan önce ortamdaki RNaz'ların uzaklaştırılması 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.

4.23.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örnekleri, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde toz haline getirilerek, 2 ml'lik ependorf 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 12 000 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüj edildi. 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, 12 000 xg hızda 4 °C' de 20 dakika santrifüj edildi.

RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml Trizol Reagent için 1 ml %75'lik etanol eklenip, 7 500 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp pellet şeffaf görününceye kadar kurutuldu. Kuruyan pellet 100 µl DEPC'li su içerisinde çözülerek, 65 °C' de 10 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen örnekler - 80 °C' de saklandı.

4.23.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Trizol kullanılarak izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbanşı ölçüldü. RNA'ların konsantrasyonları $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Sulandırma Faktörü}$ formülüyle hesaplandı.

4.24 RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi

4.24.1 Formaldehit Jeli Hazırlanması

Tüm elektroforez aparatları DEPC'li su ile yıkanarak temizlendi. % 1'lik jel hazırlamak için 0,8 gram Agaroz (Applchem), 16ml 5X MOPS, 50 ml su ile çözüldü, 60 °C'ye soğutuldu. İçerisine 60 °C'ye ısıtılmış 14 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü.

4.24.2 Formaldehit Jeli İçin RNA rneklerinin Hazırlanması

4,5 µl RNA'ya, 2 µl 5X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 1 µl Etidyum bromür ilave edilerek, 55 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Bu karışım 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Total RNA'lar MOPS tamponuyla hazırlanmış % 1'lik Agaroze jelde 60 V'da 90 dakika yürütüldü.

4.25 RNA Saflık Ölçümü

İzole edilmiş RNA örneklerinden 1,5 µl alınarak Nanodrop 1000 / Thermo Scientific cihazında 260 nm dalga boyunda konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü.

4.26 Total RNA'dan Genomik DNA 'nın Uzaklaştırılması

Genom DNA'sının uzaklaştırılması, elde edilmiş olan total RNA'nın DNaz I enzimi etkisinde bırakıldıktan sonra RNA'nın tekrar çöktürülmesi ve sulandırılması basamaklarını içerir. Bu işlem için DNase I recombinant, RNase-free Kiti, Roche kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde uygulandı.

DNazI- 10X reaksiyon tamponu: 400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ pH 7.9

Steril ve RNaz içermeyen 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisine; total RNA (10 µg), 10X reaksiyon tamponu 5 µl, DNazI (10 U/µl) 2.5 µl konularak toplam hacim 50 µl 'ye tamamlanıp karışması sağlanarak 37 ° C 'de 20 dakika bekletildi. İnkübasyon için PCR cihazı kullanıldı. Mevcut protein ve DNaz I kontaminasyonunu uzaklaştırmak için fenol / kloroform (3:1) uygulaması gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası 40 µl fenol / CHCl₃ ilave edilerek 30 saniye karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Karışım buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Maksimum hızda (13 000 xg) 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Üst faz alınarak steril bir tüpe aktarıldı. Etanolle çöktürme aşaması için alınan üst faz üzerine 5 µl 3 M NaOAc (pH: 5.2) ve 200 µl saf etanol ilave edildi. En az 1 saat olacak şekilde – 80 °C'de bekletildi. Soğutmalı santrifüjde 10 dakika 13 000 xg 'de santrifüj edilerek RNA 'lar çöktürüldü. Etanol uzaklaştırılarak RNA çökeltisi üzerine DEPC 'li ddH₂O ile hazırlanmış olan % 70'lik etanol ilave edilerek 5 dakika 13 000 xg 'de santrifüj edildi.

Steril kabin içerisinde tüp kapakları açık şekilde tutularak etanolün uçması sağlandı. 20 µl DEPC 'li ddH₂O ile RNA çökeltisi çözülerek – 80 ° C 'de saklandı.

Kesim işlemi tamamlandıktan sonra RNA örneklerinin konsantrasyon ölçümleri 4.25 'de anlatıldığı gibi yapıldı.

4.27 cDNA Sentezi

DNaz I ile genomik DNA'nın uzaklaştırılmış olduğu total RNA materyali ve Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche kullanılarak kitin kullanım kitapçığında belirtildiği gibi tek iplikli cDNA sentezlendi. Sentezlenmiş olan cDNA kalıp olarak kullanılarak çoğaltılmak istenen cDNA bölgesi Anchored Oligo (dT)₁₈ primeri kullanılarak RT-PCR gerçekleştirilerek çoğaltıldı. Primer dizileri Çizelge 4.6 'da gösterilmiştir.

RNaz içermeyen steril ince duvarlı PCR tüpüne 1 µg total RNA ve 1 µl Anchored-Oligo (dT)₁₈ (50 pmol/µl) eklendi. Hacim 13 µl 'e steril RNaz ve DNaz içermeyen ddH₂O ile tamamlandı. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek 65 °C 'de 10 dakika denatürasyon yapıldı. PCR cihazındaki program durdurularak denatürasyon sonrası tüpler hemen buza alındı. Ependorf tüpte hazırlanan karışıma sırasıyla; 5X ters transkripsiyon reaksiyonu tamponu 4.0 µl, ribonükleaz inhibitörü (40U/µl) 0.5 µl, dNTP Mix (herbirinden 10mM) 2.0 µl, ters transkriptaz enzimi (20U/µl) 0.5 µl eklendi. Karışım tüpün dibine hafifçe vurularak karıştırıldıktan sonra kısa bir santrifüj yapıp karışımın tüpün dibine çökmesi sağlandı.

Hazırlanan karışımdan 7 µl olacak şekilde her bir PCR tüpüne dağıtılarak pipetajla karışması sağlandı. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek 85 °C 'de 30 dakika inkübe edilerek cDNA'lar sentezlendi. Enzimi durdurmak için 85 °C 'de 5 dakika tutuldu.

4.28 cDNA Sentezinin PCR ile Kontrol Edilmesi

Total RNA örneklerinden cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi amacıyla housekeeping gen *Phaseolus vulgaris* L. β-actin (PvActF2 ve PvActR2) ile PCR yapıldı. Primer dizileri Çizelge 4.6 'da gösterilmiştir.

200 µl'lik PCR tüpü içerisine; 10X reaksiyon tamponu 2.5 µl, MgCl₂ (25 mM) 1.5 µl (1.5 mM) son konsantrasyon, dNTP Karışımı (10mM herbirinden) 0.5 µl, primer çifti (10 pmol / µl herbirinden) 0.5 µl, taq polimeraz 0.125 µl, tek iplikli cDNA 2.0 µl eklenerek toplam reaksiyon hacmi 25 µl 'ye tamamlandı.

PCR döngüsünde 95 ° C de 5 dakika denatürasyon, 95 °C de 30 saniye / 55 °C de 30 saniye primer bağlanması, 72 °C de 30 saniyede uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C de 10 dakika son uzatma yapılarak örnekler buz üzerine alınıp – 20 ° C de saklandı.

4.29 PCR Ürünlerinin Jel Üzerinde Analizi

cDNA sentez reaksiyonunun çalışıp çalışmadığının kontrol edilmesi amacıyla yapılan PCR sonucu ürünleri agaroz jelde analiz edildi.

% 1.5 'luk jel hazırlamak için 1 gr Agaroz, 50 ml 1X TAE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60° C'ye soğutulup içerisine 2,5 µl etidyum bromür eklenerek jel tepsisine döküldü.

5.0 µl 'lik PCR örneği parafilm üzerinde 3 µl 6X DNA yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. Güç kaynağı 80 V 'a sabitlenerek minimum 30 dakika örneklerin ayrışması sağlandı.

4.30 Real Time PCR

Real Time PCR 'da kullanılan primer dizileri Çizelge 4.6 'da verilmiştir.

DNaz I ile toplam RNA'da bulunan genomik DNA'nın uzaklaştırılmasıyla başlanarak elde edilen saf total RNA'dan cDNA hazırlandı ve Çizelge 4.7 ' de verilenler sırayla ilave edilerek PCR karışımı hazırlanır.

Çizelge 4.7 Real-Time PCR karışımının hazırlanması

ddH ₂ O	6.5 µl
¹ SYBRGreenKarışımı	12.5 µl
Primer F(10pmol/µl)	0.5 µl
PrimerR(10pmol/µl)	0.5 µl
cDNA (1/1000 dilüe)	5.0 µl
Toplam	25.0µl

cDNA'lar reaksiyonların gerçekleşeceği cihaz için üretilmiş olan 96 kuyulu plate içindeki kuyucuklara dağıtılarak hazırlanan karışım cDNA'ların üzerine ilave edilip kuyuların üzeri optik geçirgen bir filmle veya şerit halindeki kapak kapatılır. Çizelge 4.8 'de verilen PCR programı kullanılarak program başlatılır.

Çizelge 4.8 RT-PCR döngü programı

Sıcaklık	Zaman	Döngü	Döngü sayısı
94 °C	5 dk	İlk denatürasyon	1
94 °C	30 sn	Denatürasyon	50
60 °C	30 sn	Bağlanma	
60 °C	10sn	Melting Curve Analiz	80

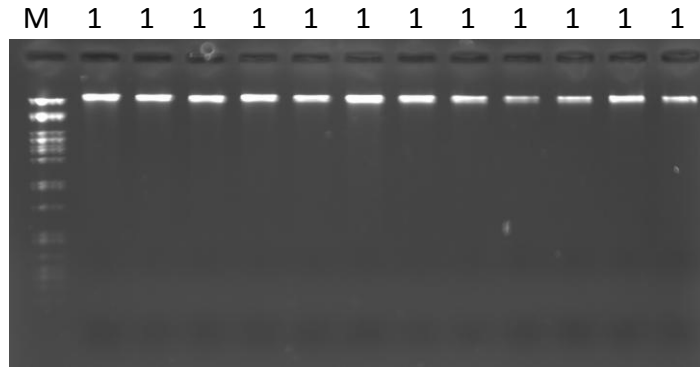
¹FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), cihaz ve protokolda değişiklik yapılmasına gerek kalmadan Real Time PCR cihazlarında ROX ile normalizasyonu sağlayan yeni bir referans boya içerir. Kullanıma hazır olan bu karışım, primer ve kalıp hariç FastStart Taq DNA Polimeraz, Reaksiyon tamponu, nükleotitler (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), SYBR Green I ve referans boya içerir.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

5.1 Genomik DNA İzolasyonu

Real Time PCR için ekspresyonunu görmek istediğimiz DREB2A geni primeri tasarımı için klonlamaya çalıştığımız gen bölgesini elde etmek amacıyla konvansiyonel deney 20 saatlik fasulye yaprağından genomik DNA izolasyonu 4.13 'de anlatıldığı gibi yapıldı. % 1 'lik agaroz jeline yüklenerek (Şekil 5.1) kalitesi belirlendi.

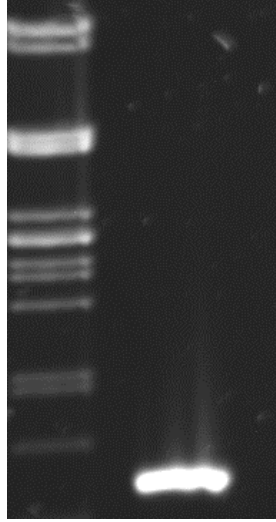


Şekil 5.1 Genomik DNA'nın % 1 'lik agaroz jeli üzerinde görüntülenmesi

M: Low Range DNA Ladder, 1: Konvansiyonel deney 20 saat genomik DNA

5.1.1 PCR Ürünlerinin Analizi

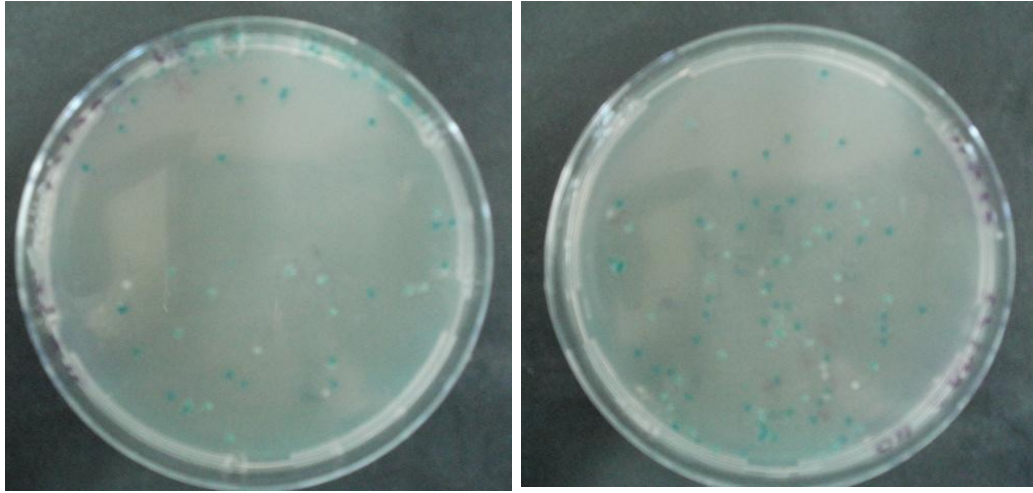
Genomik DNA'dan 5'-ACTCGGGACAACGTTGGAT-3' forward ve 5'-ACTCGGGACAACGTTGGAT-3' reverse primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları % 1 'lik agaroz jeline yüklenerek (Şekil 5.2) kontrolü sağlandıktan sonra PCR ürünlerinin pürifikasyonu Jel Ekstraksiyon Kiti, Qiaquick kullanılarak jelden pürifiye edildi.



Şekil 5.2 PCR ürünlerinin % 1 'lik agaroz jel görüntüsü

5.1.2 PCR Ürününün Vektöre Ligasyonunun Klonlanması

PCR ürünü, Promega pGEM-T Easy vektörüne kit protokolüne göre klonlandı. Klonlanma reaksiyonun 5 µl 'si hazırlamış olduğumuz 200 µl kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon gerçekleştirildi. Mavi beyaz seçilimi (Şekil 5.3) için antibiyotik (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM) ve X – gal (30 µg/ml) ilave edilmiş katı Luria-Bertani ortamına eklenerek 37 °C 'e 16 saat büyütüldü.



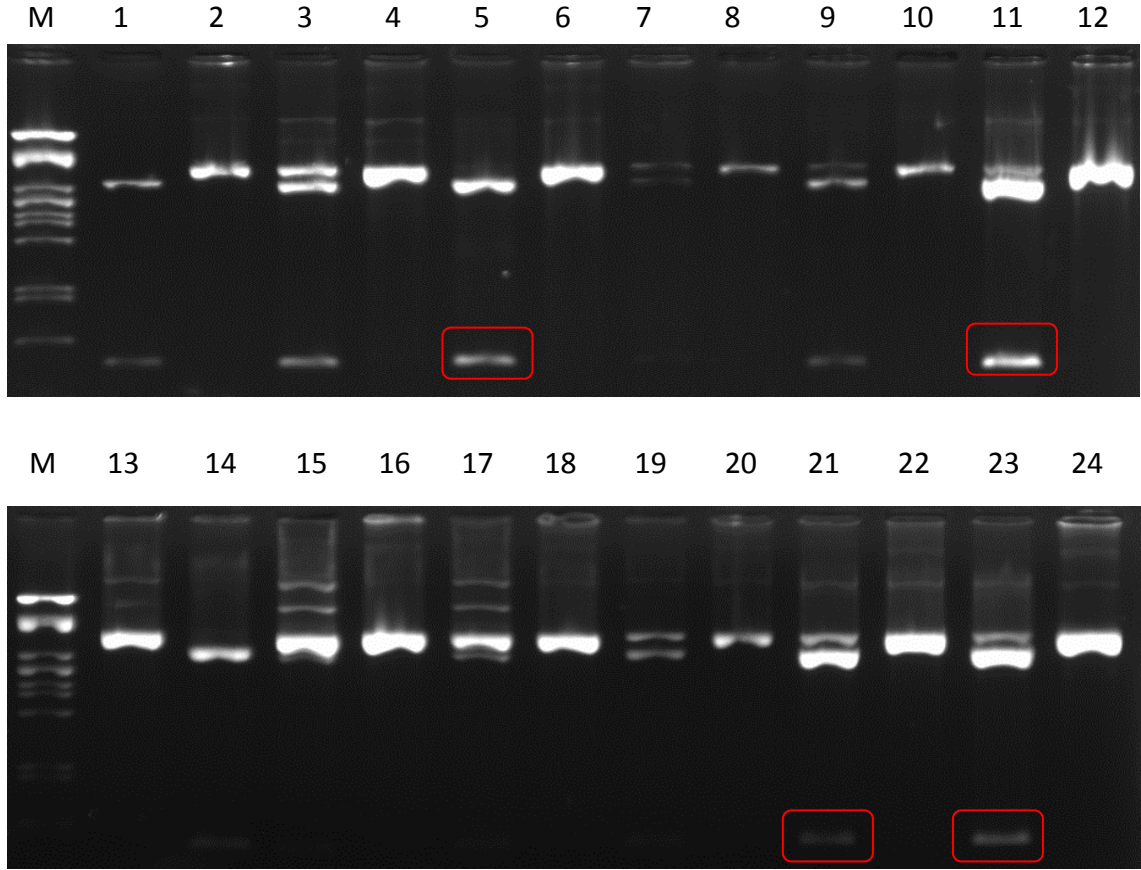
Şekil 5.3 Mavi beyaz seçilimi

5.1.3 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi ve Plazmit İzolasyonu

Beyaz kolonilerin istediğimiz PCR ürününü alıp almadığını kontrol etmek amacıyla beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu yapıp restriksiyon enzimleri ile kesildi.

İstenilen PCR ürününü taşıdığı belirlenen koloniden High Pure Plasmid İzolasyon Kiti, Roche kullanılarak 4.21 'da belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

İzole edilen plazmitler PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirildi.



Şekil 5.4 PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilen plazmitlerin % 1 'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü

M: Low Range DNA Ladder, 1. A1 EcoRI, 2. A1 PstI, 3. A2EcoRI, 4.A2PstI, 5.A3 EcoRI, 6. A3 PstI, 7. A4 EcoRI, 8.A4 PstI, 9. A6 EcoRI, 10.A6 PstI, 11. A7 Eco R1, 12. A7 PstI, 13. B2 EcoRI, 14. B2 PstI, 15. B3 EcoRI, 16. B3 PstI, 17. B4 EcoRI, 18. B4 PstI, 19. B5 EcoRI, 20. B5 PstI, 21. B7 EcoRI, 22. B7 PstI, 23. B8 EcoRI, 24. B8 PstI

5.1.4 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

Pgem-T Easy vektörü polilinker bölgesinde iki EcoRI bölgesi tanıdığından EcoRI ile kesilen plazmitlerden genomik DNA 'nın ayrılması beklenir. Ayrıca PstI ile kesilmiş plazmit de doğrusal olmalıdır. Jel üzerinde tahmini olarak EcoRI ile kesilen plazmitlerden A3 'ten 702 bp, A7 'den 690 bp, B7 'den 498 bp ve B8 'den 690 bp uzunluğunda fragmentler elde edildi. A3, A7, B7 ve B8 ClustalW analiz sonuçları Çizelge 5.2 'de verilmiştir. Bu plazmitler Biogen firmasına dizin analizi yapılması için yollandı.

Dizin analizi sonuçlarına göre A3, A7, B7, B8 örneklerinin nükleotid ve aminoasit dizileri sırasıyla Şekil 5.5, Şekil 5.6, Şekil 5.7 ve Şekil 5.8 'de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Dizin analizine gönderilen örneklerin adlandırılması

A3	Fermentas enzimi ile PCR'dan elde edilen elde edilen konvansiyonel kontrol 20 saatlik örnek
A7	Fermentas enzimi ile 16.07.2012 tarihinde PCR'dan elde edilen elde edilen konvansiyonel kontrol 20 saatlik örnek
B3	Fermentas enzimi ile 17.07.2012 tarihinde PCR'dan elde edilen elde edilen konvansiyonel kontrol 20 saatlik örnek
B7	Fermentas enzimi ile 17.07.2012 tarihinde PCR'dan elde edilen elde edilen konvansiyonel kontrol 20 saatlik örnek

Çizelge 5.2 ClustalW analiz sonuçları

A3	CGATTGATGAGAGCACTTGAGCCTTTTATGCAAACTGATTATTTCTCTGCCTCTTCTAA	60
A7	CGATTGATGAGAGCACTTGAGCCTTTTATG-AAAACGATTATTTCTCTGCCTCTTCTAA	59
B7	-----	
B8	--ATTGATGAGAGCACTTGAGCCTTTTATG-AAAACGATTATTTCTCTGCCTCTTCTAA	57
A3	TTCTGCATCTCCCTCACGTCAATCACACCCCTTCTCTCTCATTTTCATCTACTTCGTATTC	120
A7	TTCTGCATCTCCCTCACGTCAATCACACCCCTTCTCTCTCATTTTCATCTACTTCGTATTC	119
B7	-----	
B8	TTCTGCATCTCCCTCACGTCAATCACACCCCTTCTCTCTCATTTTCATCTACTTCGTATTC	117
A3	CTCCCCAACCAAAATCAAACCTAAACCAAACTCACCTCAGAATCAAAATCCTCCAGAA	180
A7	CTCCCCAACCAAA-TCAAAC-TAAACCAA--CTCACCTCAGA-TCAAA-TCCTCCAGA-	172
B7	-----	
B8	CTCCCCAACCAAA-TCAAAC-TAAACCAA--CTCACCTCAGA-TCAAA-TCCTCCAGA-	170
A3	TTCAGGGCCCCAAGGTCGGGATTCAACACCACGGTGGGTCATTCCAACCAACGTCAAAAT	240
A7	TTCAGG---CCCAGGTCGGGATTCAACACCACG-TGGGTCATTCCAACCAACGTCAAAAT	228
B7	-----CAACACCACG-TGGGTCATTCCAACCAACGTCAAAAT	36
B8	TTCAGG---CCCAGGTCGGGATTCAACACCACG-TGGGTCATTCCAACCAACGTCAAAAT	226

A3	CAAGCCCAGATGGGGCCAAAACGTGTCCCCATGAAACACGGTGGCGGGCCGCGAAAGCT	300
A7	CATGCCCAGATGGGGCCAAAACGTGTCCCCATGAAACACGGTGGCGGGCCGCGAAAGCT	288
B7	CAAGCCCAGATGGGGCCAAAACGTGTCCCCATGAAACACGGTGGCGGGCCGCGAAAGCT	96
B8	CAAGCCCAGATGGGGCCAAAACGTGTCCCCATGAAACACGGTGGCGGGCCGCGAAAGCT	286

A3	GCGAAGCTGTACCGTGGGGTGCGGCAACGGCATTGGGGGAAGTGGGTCGCCGAGATCAGA	360
A7	GCGAAGCTGTACCGTGGGGTGCGGCAACGGCATTGGGGGAAGTGGGTCGCCGAGATCAGA	348
B7	GCGAAGCTGTACCGTGGGGTGCGGCAACGGCATTGGGGGAAGTGGGTCGCCGAGATCAGA	156
B8	GCGAAGCTGTACCGTGGGGTGCGGTAAACGGCATTGGGGGAAGTGGGTCGCCGAGATCAGA	346

A3	CTCCAGAAGAACCACGCACGCCCTCTGGCTGGGAACATTCGACACCGGAGAGGAAGCGGCG	420
A7	CTCCAGAAGAACCACGCACGCCCTCTGGCTGGGAACATTCGACACCGGAGAGGAAGCGGCG	408
B7	CTCCAGAAGAACCACGCACGCCCTCTGGCTGGGAACATTCGACACCGGAGAGGAAGCGGCG	216
B8	CTCCAGAAGAACCACGCACGCCCTCTGGCTGGGAACATTCGACACCGGAGAGGAAGCGGCG	406

A3	CTGGCGTACGACAACGCAGCGTTTAAAGCTCCGAGGCGAGTTTCGCGGCCCTCAACTTCCCT	480
A7	CTGGCGTACGACAACGCAGCGTTTAAAGCTCCGAGGCGAGTTTCGCGGCCCTCAACTTCCCT	468
B7	CTGGCGTACGACAACGCAGCGTTTAAAGCTCCGAGGCGAGTTTCGCGGCCCTCAACTTCCCT	276
B8	CTGGCGTACGACAACGCAGCGTTTAAAGCTCCGAGGCGAGTTTCGCGGCCCTCAACTTCCCT	466

A3	CATCTGCGACACCAGGGAGCGTTTCGTATTCGGCGACTTTGGAGATTACAAGCCGCTACCT	540
A7	CATCTGCGACACCAGGGAGCGTTTCGTATTCGGCGACTTTGGAGATTACAAGCCGCTACCT	528
B7	CATCTGCGACACCAGGGAGCGTTTCGTATTCGGCGACTTTGGAGATTACAAGCCGCTACCT	336
B8	CATCTGCGACACCAGGGAGCGTTTCGTATTCGGCGACTTTGGAGATTACAAGCCGCTACCT	526

A3	TCTTCCGTGGACTCCAAGCTCCAAGCTATTTGTGAAAGCATGGGAAAACAGAACAACAAA	600
A7	TCTTCCGTGGACTCCAAGCTCCAAGCTATTTGTGAAAGCATGGGAAAACAGAACAACAAA	588
B7	TCTTCCGTGGACTCCAAGCTCCAAGCTATTTGTGAAAGCATGGGAAAACAGAACAACAAA	396
B8	TCTTCCGTGGACTCCAAGCTCCAAGCTATTTGTGAAAGCATGGGAAAACAGAACAACAAA	586

A3	AAGTGTGCTCCGTCGAAGACGTGAAGCCCAGGTACACGCTGCCGCTGAGCTGGCGCCG	660
A7	AAGTGTGCTCCGTCGAAGACGTGAAGCCCAGGTACACGCTGCCGCTGAGCTGGCGCCG	648
B7	AAGTGTGCTCCGTCGAAGACGTGAAGCCCAGGTACACGCTGCCGCTGAGCTGGCGCCG	456
B8	AAGTGTGCTCCGTCGAAGACGTGAAGCCCAGGTACACGCTGCCGCTGAGCTGGCGCCG	646

A3	GTGGATTCTGACGTGGCGCAATCCAACGTTGTCCCGAGTAAT--	702
A7	GTGGATTCTGACGTGGCGCAATCCAACGTTGTCCCGAGTAAT--	690
B7	GTGGATTCTGACGTGGCGCAATCCAACGTTGTCCCGAGTAAT--	498
B8	GTGGATTCTGACGTGGCGCAATCCAACGTTGTCCCGAGTAATCG	690

1	CGA	TTG	ATG	AGA	GCA	CTT	GAG	CCT	TTT	ATG	CAA	AAC	TGA	TTA	TTT
	R	L	M	R	A	L	E	P	F	M	Q	N	*	L	F
46	CTC	TGC	CTC	TTC	TAA	TTC	TGC	ATC	TCC	CTC	ACG	TCA	ATC	ACA	CCC
	L	C	L	F	*	F	C	I	S	L	T	S	I	T	P
91	TTC	TTC	TCT	CAT	TTC	ATC	TAC	TTC	GTA	TTC	CTC	CCC	CAA	CCA	AAA
	F	F	S	H	F	I	Y	F	V	F	L	P	Q	P	K
136	TCA	AAC	CTA	AAC	CAA	AAC	TCA	CCT	CAG	AAT	CAA	AAT	CCT	CCA	GAA
	S	N	L	N	Q	N	S	P	Q	N	Q	N	P	P	E
181	TTC	AGG	GCC	CCA	AGG	TCG	GGA	TTC	AAC	ACC	ACG	GTG	GGT	CAT	TCC
	F	R	A	P	R	S	G	F	N	T	T	V	G	H	S
226	AAC	CAA	CGT	CAA	AAT	CAA	GCC	CAG	ATG	GGG	CCA	AAA	CGT	GTC	CCC
	N	Q	R	Q	N	Q	A	Q	M	G	P	K	R	V	P
271	ATG	AAA	CAC	GGT	GGC	GCG	GCC	GCG	AAA	GCT	GCG	AAG	CTG	TAC	CGT
	M	K	H	G	G	A	A	A	K	A	A	K	L	Y	R
316	GGG	GTG	CGG	CAA	CGG	CAT	TGG	GGG	AAG	TGG	GTG	GCC	GAG	ATC	AGA
	G	V	R	Q	R	H	W	G	K	W	V	A	E	I	R
361	CTC	CAG	AAG	AAC	CGC	ACG	CGC	CTC	TGG	CTG	GGA	ACA	TTC	GAC	ACC
	L	Q	K	N	R	T	R	L	W	L	G	T	F	D	T
406	GGA	GAG	GAA	GCG	GCG	CTG	GCG	TAC	GAC	AAC	GCA	GCG	TTT	AAG	CTC
	G	E	E	A	A	L	A	Y	D	N	A	A	F	K	L
451	CGA	GGC	GAG	TTC	GCG	CGC	CTC	AAC	TTC	CCT	CAT	CTG	CGA	CAC	CAG
	R	G	E	F	A	R	L	N	F	P	H	L	R	H	Q
496	GGA	GCG	TTC	GTA	TTC	GGC	GAC	TTT	GGA	GAT	TAC	AAG	CCG	CTA	CCT
	G	A	F	V	F	G	D	F	G	D	Y	K	P	L	P
541	TCT	TCC	GTG	GAC	TCC	AAG	CTC	CAA	GCT	ATT	TGT	GAA	AGC	ATG	GGA
	S	S	V	D	S	K	L	Q	A	I	C	E	S	M	G
586	AAA	CAA	GAA	CAA	AAA	AAG	TGT	TGC	TCC	GTC	GAA	GAC	GTG	AAG	CCC
	K	Q	E	Q	K	K	C	C	S	V	E	D	V	K	P
631	GAG	GTA	CAC	GCT	GCC	GCT	GAG	CTG	GCG	CCG	GTG	GAT	TCT	GAC	GTG
	E	V	H	A	A	A	E	L	A	P	V	D	S	D	V
676	GCG	CAA	TCC	AAC	GTT	GTC	CCG	AGT	AAT						
	A	Q	S	N	V	V	P	S	N						

Şekil 5.5 A3 nükleotid ve aminoasit dizini

1	CGA	TTG	ATG	AGA	GCA	CTT	GAG	CCT	TTT	ATG	AAA	ACT	GAT	TAT	TTC
	R	L	M	R	A	L	E	P	F	M	K	T	D	Y	F
46	TCT	GCC	TCT	TCT	AAT	TCT	GCA	TCT	CCC	TCA	CGT	CAA	TCA	CAC	CCT
	S	A	S	S	N	S	A	S	P	S	R	Q	S	H	P
91	TCT	TCT	CTC	ATT	TCA	TCT	ACT	TCG	TAT	TCC	TCC	CCC	AAC	CAA	ATC
	S	S	L	I	S	S	T	S	Y	S	S	P	N	Q	I
136	AAA	CTA	AAC	CAA	CTC	ACC	TCA	GAT	CAA	ATC	CTC	CAG	ATT	CAG	GCC
	K	L	N	Q	L	T	S	D	Q	I	L	Q	I	Q	A
181	CAG	GTC	GGG	ATT	CAA	CAC	CAC	GTG	GGT	CAT	TCC	AAC	CAA	CGT	CAA
	Q	V	G	I	Q	H	H	V	G	H	S	N	Q	R	Q
226	AAT	CAT	GCC	CAG	ATG	GGG	CCA	AAA	CGT	GTC	CCC	ATG	AAA	CAC	GGT
	N	H	A	Q	M	G	P	K	R	V	P	M	K	H	G
271	GGC	GCG	GCC	GCG	AAA	GCT	GCG	AAG	CTG	TAC	CGT	GGG	GTG	CGG	CAA
	G	A	A	A	K	A	A	K	L	Y	R	G	V	R	Q
316	CGG	CAT	TGG	GGG	AAG	TGG	GTC	GCC	GAG	ATC	AGA	CTC	CAG	AAG	AAC
	R	H	W	G	K	W	V	A	E	I	R	L	Q	K	N
361	CGC	ACG	CGC	CTC	TGG	CTG	GGA	ACA	TTC	GAC	ACC	GGA	GAG	GAA	GCG
	R	T	R	L	W	L	G	T	F	D	T	G	E	E	A
406	GCG	CTG	GCG	TAC	GAC	AAC	GCA	GCG	TTT	AAG	CTC	CGA	GGC	GAG	TTC
	A	L	A	Y	D	N	A	A	F	K	L	R	G	E	F
451	GCG	CGC	CTC	AAC	TTC	CCT	CAT	CTG	CGA	CAC	CAG	GGA	GCG	TTC	GTA
	A	R	L	N	F	P	H	L	R	H	Q	G	A	F	V
496	TTC	GGC	GAC	TTT	GGA	GAT	TAC	AAG	CCG	CTA	CCT	TCT	TCC	GTG	GAC
	F	G	D	F	G	D	Y	K	P	L	P	S	S	V	D
541	TCC	AAG	CTC	CAA	GCT	ATT	TGT	GAA	AGC	ATG	GGA	AAA	CAA	GAA	CAA
	S	K	L	Q	A	I	C	E	S	M	G	K	Q	E	Q
586	AAA	AAG	TGT	TGC	TCC	GTC	GAA	GAC	GTG	AAG	CCC	GAG	GTA	CAC	GCT
	K	K	C	C	S	V	E	D	V	K	P	E	V	H	A
631	GCC	GCT	GAG	CTG	GCG	CCG	GTG	GAT	TCT	GAC	GTG	GCG	CAA	TCC	AAC
	A	A	E	L	A	P	V	D	S	D	V	A	Q	S	N
676	GTT	GTC	CCG	AGT	AAT										
	V	V	P	S	N										

Şekil 5.6 A7 nükleotid ve aminoasit dizini

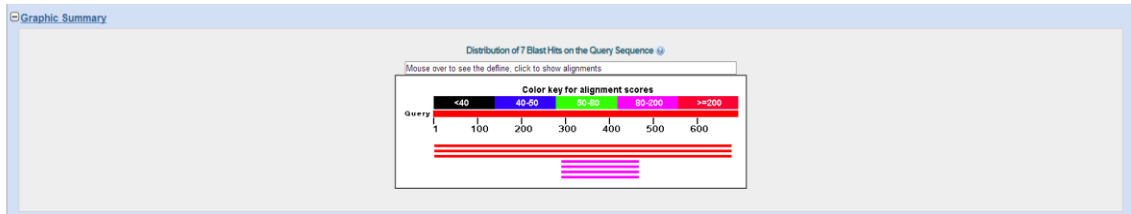
1	CAA	CAC	CAC	GTG	GGT	CAT	TCC	AAC	CAA	CGT	CAA	AAT	CAA	GCC	CAG
	Q	H	H	V	G	H	S	N	Q	R	Q	N	Q	A	Q
46	ATG	GGG	CCA	AAA	CGT	GTC	CCC	ATG	AAA	CAC	GGT	GGC	GCG	GCC	GCG
	M	G	P	K	R	V	P	M	K	H	G	G	A	A	A
91	AAA	GCT	GCG	AAG	CTG	TAC	CGT	GGG	GTG	CGG	CAA	CGG	CAT	TGG	GGG
	K	A	A	K	L	Y	R	G	V	R	Q	R	H	W	G
136	AAG	TGG	GTC	GCC	GAG	ATC	AGA	CTC	CAG	AAG	AAC	CGC	ACG	CGC	CTC
	K	W	V	A	E	I	R	L	Q	K	N	R	T	R	L
181	TGG	CTG	GGA	ACA	TTC	GAC	ACC	GGA	GAG	GAA	GCG	GCG	CTG	GCG	TAC
	W	L	G	T	F	D	T	G	E	A	A	L	A	Y	
226	GAC	AAC	GCA	GCG	TTT	AAG	CTC	CGA	GGC	GAG	TTC	GCG	CGC	CTC	AAC
	D	N	A	A	F	K	L	R	G	E	F	A	R	L	N
271	TTC	CCT	CAT	CTG	CGA	CAC	CAG	GGA	GCG	TTC	GTA	TTC	GGC	GAC	TTT
	F	P	H	L	R	H	Q	G	A	F	V	F	G	D	F
316	GGA	GAT	TAC	AAG	CCG	CTA	CCT	TCT	TCC	GTG	GAC	TCC	AAG	CTC	CAA
	G	D	Y	K	P	L	P	S	S	V	D	S	K	L	Q
361	GCT	ATT	TGT	GAA	AGC	ATG	GGA	AAA	CAA	GAA	CAA	AAA	AAG	TGT	TGC
	A	I	C	E	S	M	G	K	Q	E	Q	K	K	C	C
406	TCC	GTC	GAA	GAC	GTG	AAG	CCC	GAG	GTA	CAC	GCT	GCC	GCT	GAG	CTG
	S	V	E	D	V	K	P	E	V	H	A	A	A	E	L
451	GCG	CCG	GTG	GAT	TCT	GAC	GTG	GCG	CAA	TCC	AAC	GTT	GTC	CCG	AGT
	A	P	V	D	S	D	V	A	Q	S	N	V	V	P	S
496	AAT														
	N														

Şekil 5.7 B7 nükleotid ve aminoasit dizini

1	ATT	GAT	GAG	AGC	ATT	TGA	GCC	TTT	TAT	GAA	AAC	TGA	TTA	TTT	CTC
	I	D	E	S	I	*	A	F	Y	E	N	*	L	F	L
46	TGC	CTC	TTC	TAA	TTC	TGC	ATC	TCC	CTC	ACG	TCA	ATC	ACA	CCC	TTC
	C	L	F	*	F	C	I	S	L	T	S	I	T	P	F
91	TTC	TCT	CAT	TTC	ATC	TAC	TTC	GTA	TTC	CTC	CCC	CAA	CCA	AAT	CAA
	F	S	H	F	I	Y	F	V	F	L	P	Q	P	N	Q
136	ACT	AAA	CCA	ACT	CAC	CTC	AGA	TCA	AAT	CCT	CCA	GAT	TCA	GGC	CCA
	T	K	P	T	H	L	R	S	N	P	P	D	S	G	P
181	GGT	CGG	GAT	TCA	ACA	CCA	CGT	GGG	TCG	TTC	CAA	CCA	ACG	TCA	AAA
	G	R	D	S	T	P	R	G	S	F	Q	P	T	S	K
226	TCA	AGC	CCA	GAT	GGG	GCC	AAA	ACG	TGT	CCC	CAT	GAA	ACA	CGG	TGG
	S	S	P	D	G	A	K	T	C	P	H	E	T	R	W
271	CGC	GGC	CGC	GAA	AGC	TGC	GAA	GCT	GTA	CCG	TGG	GGT	CGC	GTA	ACG
	R	G	R	E	S	C	E	A	V	P	W	G	A	V	T
316	GCA	TTG	GGG	GAA	GTG	GGT	CGC	CGA	GAT	CAG	ACT	CCA	GAA	GAA	CCG
	A	L	G	E	V	G	R	R	D	Q	T	P	E	E	P
361	CAC	GCG	CCT	CTG	GCT	GGG	AAC	ATT	CGA	CAC	CGG	AGA	GGA	AGC	GGC
	H	A	P	L	A	G	N	I	R	H	R	R	G	S	G
406	GCT	GGC	GTA	CGA	CAA	CGC	AGC	GTT	TAA	GCT	CCG	AGG	CGA	GTT	CGC
	A	G	V	R	Q	R	S	V	*	A	P	R	R	V	R
451	ACG	CCT	CAA	CTT	CCC	TCA	TCT	TCG	ACA	CCA	GGG	AGC	GTT	CGT	ATT
	A	P	Q	L	P	S	S	A	T	P	G	S	V	R	I
496	CGG	CGA	CTT	TGG	AGA	TTA	CAA	GCC	GCT	ACC	TTC	TTC	CGT	GGA	CTC
	R	R	L	W	R	L	Q	A	A	T	F	F	R	G	L
541	CAA	GCT	CCA	AGC	TAT	TTG	TGA	AAG	CAT	GGG	AAA	ACA	AGA	ACA	AAA
	Q	A	P	S	Y	L	*	K	H	G	K	T	R	T	K
586	AAA	GTG	TTG	CTC	CGT	CGA	AGA	CGT	GAA	GCC	CGA	GGT	ACA	CGC	TGC
	K	V	L	L	R	R	R	R	E	A	R	G	T	R	C
631	CGC	TGA	GCT	GGC	GCC	GGT	GGA	TTC	TGA	CGT	GGC	GCA	ATC	CAA	CGT
	R	*	A	G	A	G	G	F	*	R	G	A	I	Q	R
676	TGT	CCC	GAG	TAA	TCG										
	C	P	E	*	S										

Şekil 5.8 B8 nükleotid ve aminoasit dizini

Elde edilen 702 bp uzunluğundaki DNA dizininin GenBank veritabanında kaydedilmiş dizilere benzerliklerinin ve olası fonksiyonlarının belirlenmesinde BLAST programı NCBI web sitesinden kullanıldı. BLAST programı yaygın olarak kullanılan dizi benzerlik sorgulaması programıdır. CHROMAS programı ile vektör dizileri çıkarılan dizinin BLASTN (nükleotid veritabanlı benzerlik araştırması) ve BLASTP (aminoasit veritabanlı benzerlik araştırılması) analizi yapıldı. BLASTN analizlerinin sonuçları üç bölüm halindedir. Birinci bölüm (Şekil 5.9 A), dizinin özelliği hakkında bilgi verir ve benzerlik skorunu grafiksel olarak gösterir. İkinci bölüm (Şekil 5.9 B), 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 (Şekil 5.9 C) ise benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotid düzeyinde benzerliklerini verir.



A

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
PREDICTED: Glucose max ethylene-responsive transcription factor ERFD50-2a.1 (LOC100188391) mRNA	540	540	97%	7e-150	82%	XM_003513111.1
Glucose max cDNA, clone GMFL01-11.B11	540	540	97%	7e-150	82%	AK285532.1
Glucose max DREB2 gene, complete cds	540	540	97%	7e-150	82%	AY28551.1
Tillium aestivum dehydration responsive element binding protein (DREB2) mRNA, complete cds	143	143	25%	2e-30	81%	CG28559.1
Tillium aestivum DREB2 (DREB2) mRNA, complete cds	143	143	25%	2e-30	81%	AY281345.1
Tillium aestivum cDNA, clone SET2, D98, outfall, Chinese Spring	124	124	25%	9e-25	90%	AF333969.1
Tillium aestivum putative DRE binding factor mRNA, complete cds	121	121	25%	1e-23	79%	CG28817.1

B

Real Time PCR’da örneklerin karşılaştırılması için DREB2A ileri ve geri primeri çalışmamızda elde ettiğimiz dizin bilgilerinden yararlanılarak Primer3 programı kullanılarak tasarlandı (Çizelge 5.3). Fasulye aktin primeri ise Repinski vd. çalışmasındaki aktin primeri bilgisinden yararlanılarak tasarlandı (Çizelge 5.4) [69].

[illegible]

1 ATGGAGAAGATCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCTTCGTGTGGCTCCTGAAGAACAC

61 CCCGTGCTTCTCACCGAGGCACCGCTTAATCCTAAGGCTAATCGTGAGAAAATGACTCAG

121 ATCATGTTTTGAGACCTTCAACACTCCTGCTATGTATGTTGCCATCCAAGCTGTGCTTTCC

181 CTTTACGCTAGTGGCCGTACAAC TGGTATTGTTCTGGACTCCGGAGACGGTGT CAGTCAC

241 ACGGTT CCTATCTATGAAGGCTATGCCCTCCCGCATGCAATCTTGCGTTTGGACCTTGCA

301 GGGCGTGATCTCACCGATGCCCTCATGAAAATCCTGACCGAGCGTGGTTACTCTTTACC

361 ACATCTGCAGAGCGGGAAATTGTGAGGGACATGAAGGAGAACTGGCCTATATTGCTCTT

421 GATTACGAGCAGGAATTGGAACTGCCAAGACTAGCTCAGCCGTTGAGAAGAGCTATGAG
>>>>>>>>>>>>>>> ileri primer

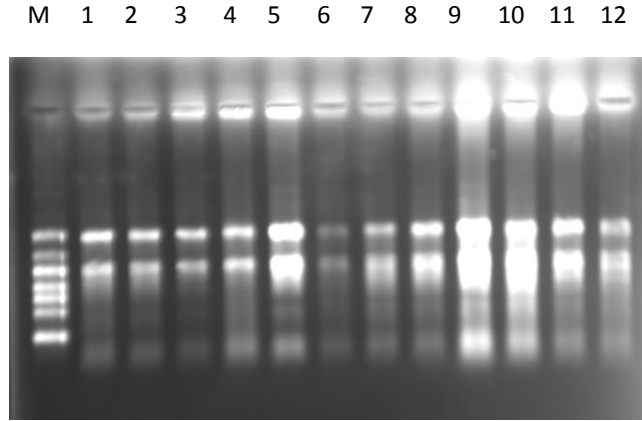
481 CTTCTGATGGGCAGGTGATCACTATTGGTGCTGAACGATTCCGGTGCCCCGAAGTTCTG

541 TTCCAGCCATCCATGATTGGGATGG AATCTCTCTGGCATT CACGAGACAACATACAACTCT
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<< geri primer

601 ATCATGAAGTGTGATGTGACATTAGGAA

5.3 RNA İzolasyonu

Tuz uygulamasından sonraki 1 saat, 20 saat ve 3 günlük sürelerde bitkilerin yapraklarından alınan örneklerden RNA izolasyonu 4.23.1 'de anlatıldığı biçimde yapıldı. % 1'lik RNA jeline yüklenerek kalitesi belirlendi (Şekil 5.10).



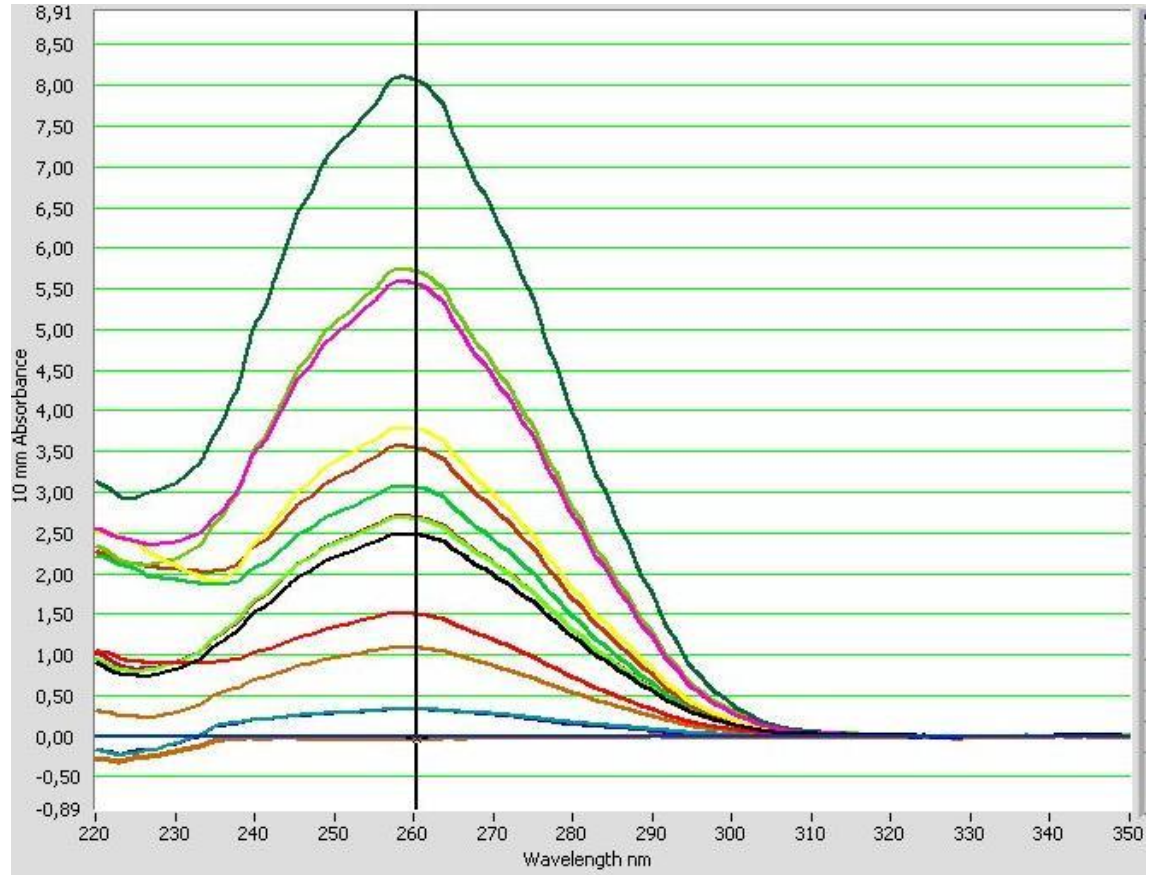
Şekil 5.10 Total RNA'ların % 1 lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi

M: High Range RNA Ladder, 1. 1 saat tuz stresi verilmiş organik kontrol örneği, 2. 1 saat tuz stresi verilmiş organik deney örneği, 3. 20 saat tuz stresi verilmiş organik kontrol örneği, 4. 20 saat tuz stresi verilmiş organik deney örneği, 5. 3 gün tuz stresi verilmiş organik kontrol örneği, 6. 3 gün tuz stresi verilmiş organik deney örneği, 7. 1 saat tuz stresi verilmiş konvansiyonel kontrol örneği, 8. 1 saat tuz stresi verilmiş konvansiyonel deney örneği, 9. 20 saat tuz stresi verilmiş konvansiyonel kontrol örneği, 10. 20 saat tuz stresi verilmiş konvansiyonel deney örneği, 11. 3 gün tuz stresi verilmiş konvansiyonel kontrol örneği, 12. 3 gün tuz stresi verilmiş konvansiyonel deney örneği

5.4 RNA Saflık Ölçümü

İzole edilen RNA örnekleri 4.25 'da anlatıldığı gibi ölçüldü. Herbir renk ayrı bir örneğin ölçüm eğrisini göstermektedir (Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6).

Çizelge 5.5 RNA ölçüm grafiği



Çizelge 5.6 RNA ölçüm değerleri

S/N	Örnek İsmi	ng/ul	260/280
1	Organik kontrol 1 saat	98.9	2.03
2	Organik deney 1 saat	59.9	2.01
3	Organik kontrol 20 saat	122.3	2.09
4	Organik deney 20 saat	43,2	2.04
5	Organik kontrol 3 gün	106.8	2.06
6	Organik deney 3 gün	13.1	1.98
7	Konvansiyonel kontrol 1 saat	222.5	2.05
8	Konvansiyonel deney 1 saat	107.6	2.07
9	Konvansiyonel kontrol 20 saat	322.8	2.03
10	Konvansiyonel deney 20 saat	150.8	2.09
11	Konvansiyonel kontrol 3 gün	228.7	2.04
12	Konvansiyonel deney 3 gün	141.7	2.11

5.5 Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması

Organik ve konvansiyonel fasulyelerden izole edilen total RNA örneklerinde bulunabilecek genomik DNA kalıntılarını temizlemek için DNase I recombinant, RNase-free kiti, Roche ile 4.26 de anlatıldığı biçimde kesim yapıldı. Kesimden sonra örneklerdeki kayıpları tespit edebilmek için 4.25 'de anlatıldığı gibi ölçüm yapıldı (Çizelge 5.7).

Çizelge 5.7 Kesim yapılan RNA örneklerinin ölçümü

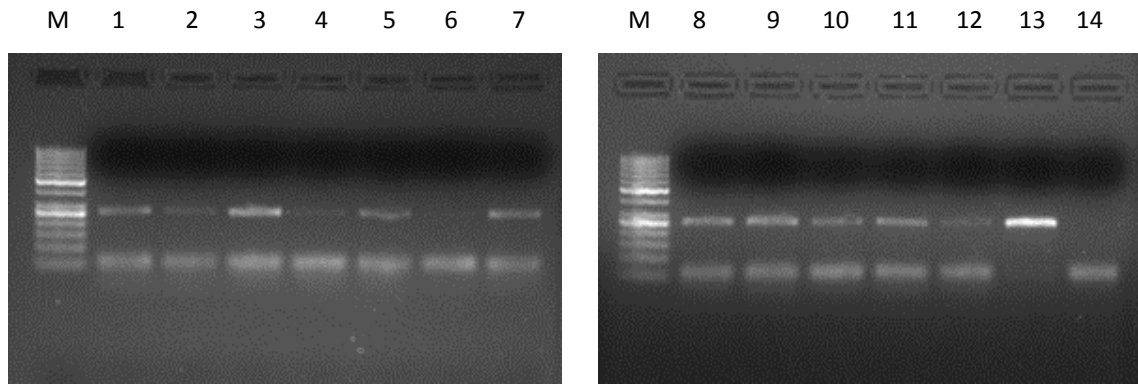
S/N	Örnek İsmi	ng/ul	260/280
1	Organik kontrol 1 saat	16.6	2.01
2	Organik deney 1 saat	16.1	1.96
3	Organik kontrol 20 saat	13.5	2.21
4	Organik deney 20 saat	13.6	1.85
5	Organik kontrol 3 gün	12.3	1.67
6	Organik deney 3 gün	14.1	2.23
7	Konvansiyonel kontrol 1 saat	13.3	1.78
8	Konvansiyonel deney 1 saat	13	1.74

Çizelge 5.7 Kesim yapılan RNA örneklerinin ölçümü devamı

9	Konvansiyonel kontrol 20 saat	14.5	2.03
10	Konvansiyonel deney 20 saat	17.2	1.79
11	Konvansiyonel kontrol 3 gün	14.2	2.11
12	Konvansiyonel deney 3 gün	18.5	2.19

5.6 cDNA Sentezi

Real Time PCR için ihtiyacımız olan cDNA 'lar izole edilen total RNA örneklerinden 4.27 'de anlatıldığı gibi yapıldı. cDNA sentezinin yapılıp yapılmadığının kontrolü için PCR yapıldı. PCR ürünleri % 1,5 'lik agaroz jeline yüklenerek cDNA 'ların sentezlenip sentezlenmediği kontrol edildi.



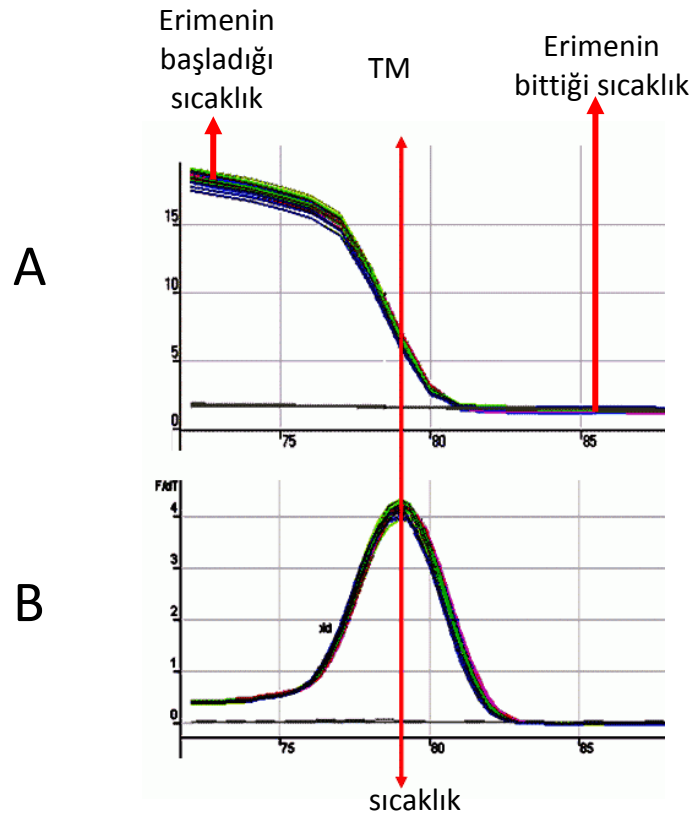
Şekil 5.11 % 1,5 'lik agaroz jelde cDNA sentezi kontrolü

M: MBI Fermantes 50 bp Ladder, 1. Organik kontrol 1 saat, 2. Organik deney 1 saat, 3. Organik kontrol 20 saat, 4. Organik deney 20 saat, 5. Organik kontrol 3 gün, 6. Organik deney 3 gün, 7. Konvansiyonel kontrol 1 saat, 8. Konvansiyonel deney 1 saat, 9. Konvansiyonel kontrol 20 saat, 10. Konvansiyonel deney 20 saat, 11. Konvansiyonel kontrol 3 gün, 12. Konvansiyonel deney 3 gün, 13. Pozitif kontrol bezelye cDNA, 14. Negatif kontrol ddH₂O

5.7 Real Time PCR

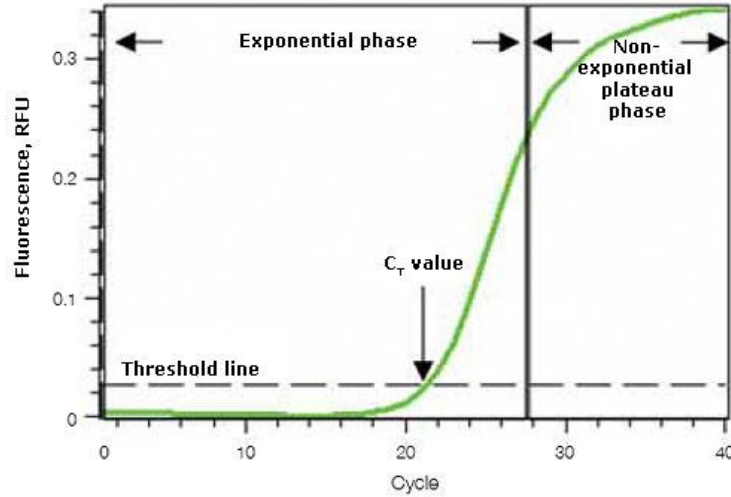
Nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan Real Time PCR teknolojisi; DNA sarmalına bağlanarak floresan ışına yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlar. Her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar [70].

Real Time PCR cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifiasyon ürünlerinin tespiti için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılabilmektedir (Şekil 5.12- A). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir “melting temperature, T_m ” (Çift zincirli DNA’nın % 50 ‘sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. T_m değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilebilir (Şekil 5.12-B) [70].



Şekil 5.12 Erime Eğrisi Analizi

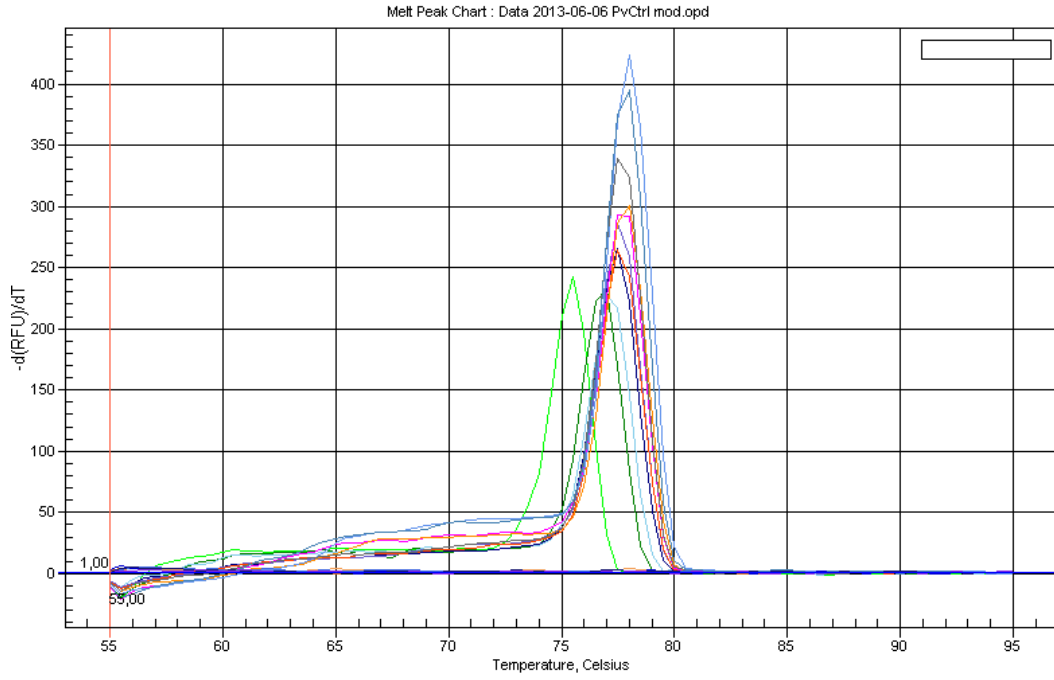
Eşik döngü değeri (threshold cycle = C_t) Real Time PCR uygulamalarında önemli bir parametredir. C_t değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır ve ürünün ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir [70].



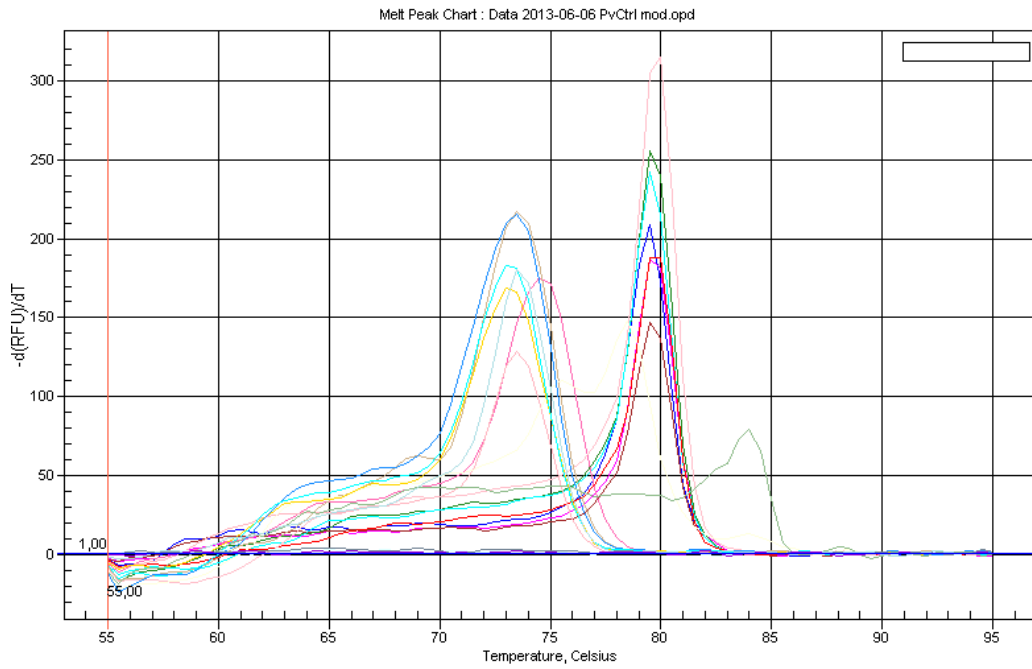
Şekil 5.13 Amplifikasyon eğrisi

Real Time PCR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır. Bu genler bir hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tümünde eksprese olan ve ekspresyon seviyesi dokudan dokuya değişmeyen genler olan housekeeping genlerdir [69]. Real Time PCR’da normalizasyon amacıyla en yaygın kullanılan housekeeping genlerden olan fasulye beta aktin geni kullanıldı.

Çoğaltılan DNA’nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA’ların melting curve analizlerinin yapılması gereklidir [71]. Buna göre fasulye aktin ve DREB2A için yapılan melting curve analizleri Şekil 5.14 ve Şekil 5.15 ‘de verilmiştir.



Şekil 5.14 Fasulye aktin melting curve analizi



Şekil 5.15 DREB2A melting curve

Melting curve sonuçlarına göre hem fasulye aktin hem de DREB2A için amplifikasyonlar gerçekleştirildi. Fasulye aktin melting curve analizinde pikler istenilen şekilde oluşurken DREB2A için melting curve analizinde pikler primerlerin dimer yapmış olabileceği veya kullanılmayan cDNA 'ların pik yapmış olabileceği gibi nedenlerden ötürü optimizasyon çalışmaları devam edecektir.

TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Zararlıların, yabancı otların ve hastalık etmenlerinin zirai ilaçlara direnç geliştirerek zararlarını sürdürüyor olmaları, su kaynakları ve doğanın geri dönüşümü olmayacak şekilde tüketiliyor oluşu, konvansiyonel tarımın insan sağlığı üzerindeki başta kanser olmak üzere olumsuz etkileri, tek tip tohum ve monokültür tarıma dayalı sistemlerin toprak verimliliğini azaltıcı etkisi, hızla artan gıda fiyatları, tüketicinin alacağı ürünün güvenli olduğundan emin olmak istemesi gibi etkenler bugün organik tarımın ne kadar önemli ve gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Sürdürülebilir bir üretim olan organik tarım sadece bugün kendimizin ve çocuklarımızın sağlıklı kalabilmesi için değil yarınlar için de önemli bir adımdır.

Organik tarımın stres faktörlerine karşı bitkinin mukavemeti açısından bir alternatif olma ihtimali organik tarımın önemini artıracaktır. Günümüz tarımcılığında en önemli verim kaybına neden olan çevresel faktörlerden biri tuz stresidir. 614.948 ton üretim miktarı ile yemeklik tane baklagillerde en fazla üretim alanına sahip olan fasulyede tuzluluk önemli bir stres faktörü olarak yetiştiriciliği etkilemektedir [72].

Organik tohumdan yetişen bitkilerin konvansiyonel tohumdan yetişen bitkilere göre biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı daha üstün dayanıklılık mekanizmaları geliştirebileceğini düşünerek bu gelişimi moleküler düzeyde incelemek için yaptığımız bu çalışmada organik ve konvansiyonel fasulye yetiştiriciliğinde tuz stresini uygulamasında aktivasyonu artması beklenen DREB2A geninin ekspresyon analizi için Real Time PCR yapıldı. Organik ve konvansiyonel yetiştiricilik arasındaki farkı kantitatif

olarak analiz etmenin zorluklarından dolayı, bu konuda Dünya’da ve Türkiye’de yapılmış çalışmalar çok azdır. Organik ve konvansiyonel yetiştirilen brokolide çevre sıcaklığının antioksidan özellikler ve mineral içeriklerine etkisi [73], organik ve konvansiyonel yetiştirilen kavunda meyve kalitesi ve antioksidan özelliklerinin karşılaştırılmalı analizleri [74] gibi çalışmalar çeşitli araştırma grupları tarafından çalışılmıştır.

DREB ailesi genlerinden DREB2A geni diğer DREB genlerine göre daha az çalışılmıştır. DREB2A geni ile ilgili *Arabidopsis thaliana* ile spesifik çalışmalar yapılmıştır [75]. Çalışmada klonladığımız DREB2A geni, NCBI ‘da en çok soya fasulyesi DREB1 geni ile benzerlik gösterirken daha önce fasulye bitkisi ile yapılan çalışmaların azlığından ötürü direkt olarak fasulye bitkisi ile benzerlik göstermedi.

Real Time PCR için yapılan melting curve analizlerinde amplifikasyonların gerçekleştiği görüldü. Fasulye aktin için melting curve analizinin iyi sonuç verdiği gözlemlendi. DREB2A için optimizasyon çalışmaları primerlerin daha spesifik bölgelerinden tasarlanması ile devam edecektir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Mallikarjuna, G., Mallikarjuna, K., Reddy, M. K., and Kaul, T., (2011). "Expression of *OsDREB2A* Transcription Factor Confers Enhanced Dehydration and Salt Stress Tolerance In Rice (*Oryza sativa* L.) .
 - [2] Lizana, C., Wentworth, M., P.Martinez, J., Villegas, D., Meneses, R., H. Murchie, E., Pastenes, C., Lercari, B., Vernieri, P., Horton, P., and Pinto, M., (2006). "Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stres", Journal of Experimental Botany, 57 (3) : 685-697.
 - [3] Mass, E.V., (1990). "Crops Salt Tolerance. Agriculture Salinity Assessment and Management. American Society Civil Engineers, In: K.K. Tanji, New York, 262-334).
 - [4] Yılmaz, E., Tuna, A., ve Bürün, B., (2011). "Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri", Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 7.1: 47-66.
 - [5] Munns, R., ve Termaat, A., (1986). "Whole-plant Responses to Salinity", Aust. J. Plant Physiol., 13 : 143-160.
 - [6] Ergene, A., (1982). Toprak Bilgisi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Erzurum.
 - [7] Terry, R., (1997). Soil Salinity, Aghrt 282 Class Lectures.
 - [8] Aydemir, O., (1992). Bitki Besleme ve Toprak Verimliliği, No: 315 Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Erzurum.
 - [9] Milette, D., Madramootoo, C., and Buckland, G.D., (1993). "Salt Removal In A Saline Soil Using Fall Irrigation Under Subsurface Grid Drainage", Can Agricultural Engineering, 35 (1) : 1-9.
 - [10] Munns, R., (2002). "Comperative Physiology of Salt and Water Stress", Plant, Cell and Environment, 25 : 239-250.
 - [11] Kacar, B., Katkar, A.V., ve Öztürk, Ş., (2002). Bitki Fizyolojisi, VİPAŞ A.Ş. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Bursa.
 - [12] Hopkins, W.G., (1995). Introduction to Plant Physiology, John Willey and Sons., Inc., USA.

- [13] Nakashima, K., K. Shinwari., Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K., (2000). "Organization and Expression of Two *Arabidopsis DREB2* Genes Encoding DRE-binding Proteins Involved in Dehydration and High Salinity Responsive Gene Expression, *Plant Molecular Biology*, 42: 657-665.
- [14] Zhu, J.K., (2000). "Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance Using *Arabidopsis*" , *Plant Physiology*, 124 : 941-948.
- [15] N. Nayak, S., Balaji, J., H., D. Upadhyaya., Hash, C. T., Kishor, K., Chattopadhyay, D., Rodriquez, L. M., W. Blair, M., Baum, M., McNally, K., This, D., A. Hoisington, D., and K. Varshney, R., (2009). "Isolation and Sequence Analysis of DREB2A Homologues In Three Cereal and Two Legume Species, *Plant Science*, 177 : 460-467.
- [16] Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka D.G., Schabenger, O. and Thomashow M.F. (1998) '*Arabidopsis CBF1* overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance', *Science*, 280 : 104-106.
- [17] Liu, Q. et al. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 : 1391–1406.
- [18] Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (1994) ' A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought , low-temperature , or high salt stres ' . *Plant Cell*, 6 : 251-264.
- [19] Baker S.S., Wilhelm K.S., and Thomashow M.F., (1994). ' The 5'- region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold, drought, and ABA- regulated gene expression ' . *Plant Molecular Biology*, 24 : 701-713.
- [20] Jiang, C., lu, B. and Singh, J., (1996). "Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of BN115 gene from *B.napus* " , *Plant Molecular Biology*, 30 : 679-684.
- [21] Türkyılmaz, (2004). Sodyum Klorürün Bazı Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Kültür Çeşitlerinde Mineral Beslenme ve Protein Metabolizması Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [22] Jones, H.G., Flowers, T.J., and Jones, M.B. (1993). *Plants Under Stress*, Cambridge University Press, Great Britain.
- [23] Lin, C.C., and Kao, C.J., (1996). "Proline Accumulation Is Associated With Inhibition of Rice Seedling Root Growth Caused By NaCl, *Plant Science*, 114 : 121-128.
- [24] Lopez, C.M.L., Takahashi, H., and Yamazaki, S., (2002). "Plant-Water Relations of Kidney Bean Plants Treated With NaCl and Foliarly Applied Glycinebetaine", *J. Agronomy & Crop Science*, 188: 73-80) yaptıkları bir çalışmada fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.).

- [25] Kurtar, E.S. ve Ayan, A.K. (2004). "Organik Tarım ve Türkiye'deki Durumu", Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (1) : 56-64.
- [26] Kavas, G. (2001). "Organik, Ekolojik ya da Biyolojik Tarım", Gıda, Dünya Yayınları, 6 (11) : 57-59.
- [27] Türk, R. (2001). "Dünya'da ve Türkiye'de Organik Tarım" ÇESAV "Organik Tarım ve İnsan Sağlığı" Paneli, 25 Mayıs 2001, Ankara.
- [28] Demiryürek, K., (2004). "Dünya ve Türkiye'de Organik Tarım", Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 8 (3/4) : 63-71.
- [29] Atasay, A., (2007). Eğirdir (Isparta) Koşullarında Organik Çilek Yetiştiriciliğinin Uygulanabilirliği Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [30] Aksoy, U., Altındışli, A., (1996). Ekolojik Meyve Yetiştirme İlkeleri, Ekolojik Tarım Organizasyonu (ETO) Yayınları, Bornova-İZMİR, 95-104.
- [31] Gaskell, M., (2000). "Farm Production Planning and Marketing Vegetables", Research and Information Center, University of California, Publication 7274.
- [32] Atasay, A., İşçi, M., Uçgun, K., Öztürk, G., Kaymak, S., Akgül, H., (2011). "Organik ve Konvansiyonel Olarak Yetiştirilen M9 Anaçlı Bazı Elma Çeşitlerinde Farklı Besin Uygulamalarının Bitkinin Morfolojik Gelişimi Üzerine Etkileri", Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 6 (1) : 1-6.
- [33] Öztemiz, S., (2008). "Organik Tarımda Biyolojik Mücadele", Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25 (2) : 19-27.
- [34] Turhan, Ş., (2005). "Tarımda Sürdürülebilirlik ve Organik Tarım", Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ekonomisi Dergisi, 11 (1) : 13-24.
- [35] Ak, İ., (2002). Ekolojik Tarım ve Hayvancılık, Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi, Bursa, Yıl:1, Sayı:2, 2002/2, 31-3.
- [36] ETO Yayınları, Ekolojik Tarım İlkeleri, <http://www.eto.org.tr/nedir.html>, 25 Aralık 2011.
- [37] Willer, H., and Kilcher, L., (2013). The World of Organic Agriculture 2013. IFOAM, Bonn & FiBL, Frick.
- [38] T.C. Resmi Gazete, Yönetmelik, <http://www.rega.gov.tr>, 03 Haziran 2013.
- [39] Aksoy, U., Altındışli, A. (1999). Dünya'da ve Türkiye'de Ekolojik Tarım Ürünleri Üretimi, İhracatı ve Geliştirme Olanakları, 1990-70, İstanbul Ticaret Odası Yayınları, İstanbul.
- [40] T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Organik Tarım İstatistikleri, http://www.tarim.gov.tr/uretim/Organik_Tarim/Organik_Tarim_Statistikleri.html, 03 Haziran 2013.
- [41] Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., (2001). Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.

- [42] Kuşvuran, Ş., Yaşar, Fikret., Abak, K., ve Ellialtıoğlu, Ş., (2008). “Tuz Stresi Altında Yetiştirilen Tuza Tolerant ve Duyarlı *Cucumis* sp. ‘nin Bazı Genotiplerinde Lipid Peroksidasyonu, Klorofil ve İyon Miktarlarında Meydana Gelen Değişimler.
- [43] Daşgan, Y., Koç, S., Ekici, B., Aktaş, H. Ve Abak, K., (2006). “Bazı Fasulye ve Börülce Genotiplerinin Tuz Stresine Tepkileri”, *Alatırım Dergisi*, 5 (1) : 23-31.
- [44] Levitt, J., (1980). *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vol. II, 2nd ed., Academic Press, New York.
- [45] Ekmekçi, E., Apan, M., Kara, T., (2005). “Tuzluluğun Bitki Gelişimine Etkisi”, *On Dokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (3) : 118-125.
- [46] Koç, S., (2005). *Fasulyelerde Tuzluluğa Tolerans Bakımından Genotipsel Farklılıkların Erken Bitki Gelişimi Aşamasında Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [47] Ashraf, M., (1994). “Breeding for Salinity Tolerance in Plant”, *Critical Reviews in Plant Science*, 13 (1) : 17-42.
- [48] Taiz, L., Cruz, S., and Zeiger, E., (2002). *Plant Physiology*, Sinauer Associates, USA.
- [49] Marschner, H., (1995). “Mineral Nutrition of Higher Plants”, Academic Press, 657-680.
- [50] Erdal, İ., Türkmen, Ö. ve Yıldız, M., (2000). “Tuz Stresi Altında Yetiştirilen Hıyar (*Cucumis sativus* L.) Fidelerinin Gelişimi ve Kimi Besin Maddeleri İçeriğindeki Değişimler Üzerine Potasyumlu Gübrelemenin Etkisi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 10 (1) : 25-29
- [51] Yakıt, S. ve Tuna, L., (2006). “Tuz Stresi Altındaki Mısır Bitkisinde (*Zea mays* L.) Stres Parametreleri Üzerine Ca, Mg ve K’nın Etkileri”, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (1) : 59-67.
- [52] Bilgin, N. ve Yıldız, N., (2008). “Besin Kültüründe Yetiştirilen (Kaya F1) Domates Çeşidinin (*Lycopersicon esculentum*) Artan NaCl Uygulamalarına Toleransı ve Tuzluluk Stresinin Kuru Madde Miktarı ile Bitki Mineral Madde İçeriğine Etkisi”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39 (1) : 15-21.
- [53] Tatar, Ö., (2006). *Tuzluluğun Bazı Çeltik Çeşit ve Hatlarının Çimlenme ile Fide Gelişimi Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [54] Karanlık, S., (2000). *Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması*, Doktora Tezi (Basılmamış), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [55] Tunçer, N., (2007). *Patlıcanda Tuza Toleransın Kalıtımı Üzerinde Araştırmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, Ankara.
- [56] Larcher, W., (2001). “Salt Stress”, *Physiological Plant Ecology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 427-428.

- [57] Yurtseven, E., Ünlükara, A., Top, A., ve Tek, A., (2001). "Tuzluluğun ve Sulama Aralığının Kolzada Verime ve Gelişmeye Etkisi", I. Sulama Kongresi, 8-11 Kasım, Antalya.
- [58] Shalata, A. and Tal, M., (1998). "The Effect of Salt Stress on Lipid Peroxidation and Antioxidants in The Leaf of the Cultivated Tomato and Its Wild Salt-Tolerant Relative *Lycopersicon pennellii*", *Physiol. Plant*, 104 : 169-174.
- [59] Kuşvuran, Ş., Yaşar, Fikret., Abak, K., ve Ellialtıoğlu, Ş., (2007). "Bazı Kavun (*Cucumis* sp.) Genotiplerinin Tuz Stresine Tepkileri", *Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 13 (4) 395-404 .
- [60] Mohr, H., and Schopfer, P., (1995). *Plant Physiology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 539-566.
- [61] Eroğlu, İ., (2007). Tuz Stresinin Bazı Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Kültür Çeşitlerinde Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [62] Gürel, A., ve Avcıoğlu, R., (2001). Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi, Bitki Biyoteknolojisi II- Genetik Müh. Ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
- [63] Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M, A., (2003). "Developing Salt Tolerant Plants In A New Century : A Molecular Biology Approach", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73 : 101-115.
- [64] Sairam, R.K., and Tyagi, A., (2004). "Physiology and Molecular Biology of Salinity Stress Tolerance in Plants", *Current Science*, 86 (10) : 407-421.
- [65] Mahajan, S., and Tuteja, N., (2005). "Cold, Salinity and Drought Stress: An Overview, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 : 139-158.
- [66] Kalefetoğlu, T., and Ekmekçi, Y., (2005). "Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri ve Dayanıklılık Mekanizmaları (Derleme)", *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 18 (4): 723-740.
- [67] Kaur, N., and Gupta, A.K., (2005). "Signal Transduction Pathways Under Abiotic Stresses in Plants", *Current Science*, 88 (11) : 1771-1780.
- [68] Özdemir, S., (2006). *Yemeklik Baklagiller*, İkinci Baskı, Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- [69] Repinski, S., L., Kwak. M., and Gepts. P., (2012). "The Common Bean Growth Habit Gene *PvTFL1y* Is A Functional Homolog of *Arabidopsis TFL1*", *Theor Appl Genet*, DOI 10.1007/s00122-012-1808-8.
- [70] Yüzbaşıoğlu, A., (2008). *Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- [71] Günel, T., (2007). "Gen Anlatımının Kantitatif Analizi Real Time PCR", *Türkiye Klinikleri Med. Sci.* 2007, 27 : 763-767.
- [72] Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat3.fao.org>, 20 Haziran 2013.

- [73] Ikaldrich, H.T., Kendall, P., Bunning, M., Stonaker, F., Kulen, O., and Stushnoff, C., (2011). "Environmental Temperatures Influence Antioxidant Properties and Mineral Content In Broccoli Cultivars Grown Organically and Conventionally", Journal of AgroCrop Science.
- [74] Salandanan, K., Bunning M., Stonaker, F., Kulen, O., Kendall, P., and Stushnoff, C., (2009). "Comparative Analysis of Antioxidant Properties and Fruit Quality Attributes of Organically and Conventionally Grown Melons (*Cucumis melo* L.), HortScience 44 (7) : 1825-1832.
- [75] Kim, J.S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., Yamauchi-Shinozaki, K., (2012). "Arabidopsis Growth-Regulating Factor7 Functions As A Transcriptional Repressor of Absciscic Acid- and Osmotic Stress-Responsive Genes, Including DREB2A", Plant Cell, 2012 Aug; 24 (8) : 3393-405.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Neslihan ŞİMŞEK KIZIL
Doğum Tarihi ve Yeri :26.11.1986 Trabzon
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :nesly093@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Mol. Biyo. ve Genetik	Yıldız Teknik Üniv.	2013
Lisans	Ziraat Mühendisi	Gaziosmanpaşa Üniv.	2009
Lise	Fen Bilimleri	Fenerbahçe Lisesi	2004

İŞ TECRÜBESİ

Firma/Kurum	Görevi
Kalitest Belgelendirme ve Eğitim Hizmetleri Ltd. Şti. (2011'den beri)	Organik Tarım / İTÜ Kontrolörü ve Tarım Bölümü Sorumlusu