

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO EKSİK KOŞULLARDA YETİŞTİRİLMİŞ *Hordeum spontaneum* C. Koch
GÖVDESİNDEN KURULMUŞ BASKILAYICI ÇIKARIM HİBRİDİZASYON
KÜTÜPHANESİNDEN SEÇİLEN cDNA'LARIN MOLEKÜLER VE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

BAHAR IŞIK

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

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

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO EKSİK KOŞULLARDA YETİŞTİRİLMİŞ *Hordeum spontaneum* C. Koch
GÖVDESİNDEN KURULMUŞ BASKILAYICI ÇIKARIM HİBRİDİZASYON
KÜTÜPHANESİNDEN SEÇİLEN cDNA'LARIN MOLEKÜLER VE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

Bahar IŞIK tarafından hazırlanan tez çalışması 19.10.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2012-01-07-YL01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca beni her konuda yönlendiren, benden yardımlarını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen başta değerli danışman hocam, Sayın **Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT**' a,

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

Biyoinformatik çalışmalar konusunda bilgisayar tedariki için Sayın **Prof. Dr. Nezhun GÖREN**'e,

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

Bana sağladığı çalışma olanağından ve yardımlarından dolayı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim elemanlarına,

Tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini yanımda hissettiğim Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans yapan diğer arkadaşlarım **Dilek ÇAĞLAR, Gizem ÇAVUŞOĞLU DOLMA, Neslihan ŞİMŞEK** ve **Yahya Emin DEMİRCİ**' ye,

Beni her türlü içten alakalarıyla bugünlerime getiren ve destekleyen annem **Haskar IŞIK**, babam **Halisi IŞIK** ve kızkardeşlerim **Arzu IŞIK** ve **Işıl IŞIK**' a,

Tüm bu süreç boyunca her zaman bana inanan ve yanımda olan herkese,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2012

Bahar IŞIK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Arpanın Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Tarihi	1
1.1.2 Çinko ve önemi	3
1.1.2.1 Toprakta Çinko.....	4
1.1.2.2 Bitkide Çinko.....	6
1.1.2.3 Çinkonun Fizyolojik Fonksiyonları.....	8
1.1.2.4 Bitkiler Tarafından Çinko Alımı	11
1.1.2.5 Çinko Etkinliği	12
1.1.2.6 Çinko Alımının Moleküler Biyolojisi	13
1.1.2.7 Çinkonun Bitki Besin Elementleriyle Arasındaki İnteraksiyonlar ..	15
1.1.3 Biyoinformatik Analizler	18
1.1.4 GenBank	19
1.2 Tezin Amacı	19
1.3 Hipotez	25

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD	26
2.1 Besiyerleri	26
2.2 Tamponlar ve Solüsyonlar	26
2.3 Moleküler Markırlar	27
2.4 Enzimler	27
2.5 Kitler	27
2.6 Kullanılan Oligonukleotid ve Vektör Dizinleri	27
2.7 Kullanılan Programlar	28
2.7.1 Cygwin	28
2.7.2 Phred ve Phrap.....	28
2.7.3 CAP3	28
2.7.4 Cross-Match.....	28
2.7.5 BEAP	29
2.7.6 VecScreen	29
2.7.7 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	29
2.8 SSH Kütüphanesinde Rekombinant Plazmid Kontrolü	30
2.8.1 Plazmid İzolasyonu İçin Örnek Kolonilerin Seçimi ve Büyütülmesi ...	30
2.8.2 Plazmid İzolasyonu.....	30
2.8.3 Plazmid Kesim	31
2.8.4 Agaroz Jelde Analiz.....	31
2.9 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması.....	31
2.10 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi	32
2.11 Biyoinformatik Analizler	32

BÖLÜM 3

SONUÇ VE ÖNERİLER	34
3.1 Plazmid İzolasyonu	34
3.2 Biyoinformatik Analizler	35
3.2.1 EST'lerin Hazırlanması ve Kontig – Singletlerin Oluşturulması.....	35
3.2.2 BLAST Analizleri.....	38
3.2.2.1 Gövde Kontig BLAST Analizleri.....	38
3.2.2.2 Gövde Singlet BLAST Analizleri	41
3.2.3 Gövde Kontik ve Singlet BLAST Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	41
3.3 Öneriler.....	54
KAYNAKLAR	57

EK A	
ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN CAP3 PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN KONTİGLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	70
EK B	
ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN CAP3 PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN SİNGLETLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	76
EK C	
ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN PHRAP PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN KONTİGLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	85
EK D	
ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN PHRAP PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN SİNGLETLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ	93
EK E	
ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN CAP3 PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN KONTİGLERİ OLUŞTURAN cDNA'LAR VE SAYILARI	101
EK F	
ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN PHRAP PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN KONTİGLERİ OLUŞTURAN cDNA'LAR VE SAYILARI	120
ÖZGEÇMİŞ	129

SİMGE LİSTESİ

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

KISALTMA LİSTESİ

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre
BLAST	Dizi homolojisi arama motoru
°C	Sentigrat derece
CAP3	EST birleştirme programı
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
EST	Anlatımı yapılan dizi işaretleri (Expressed Sequences Tags)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
IAA	İndol Asetik Asit
LB	Luria Broth
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Ortam Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika
RT	Revers Transkriptaz enzimi
SSH	Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyonu

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1	Kontrol grubu ve deney grubundaa gözlemlenen farklılıklar20
Şekil 1. 2	Baskılayıcı çıkarım hibridizasyonu22
Şekil 1. 3	Arpa bitkisinin gövde örneklerinden 1.PCR amplifikasyonun jel görünümü.....23
Şekil 1. 4	Arpa bitkisinin gövde örneklerinden 2.PCR amplifikasyonun jel görünümü..... 24
Şekil 1. 5	Arpa bitkisinin gövdesinden saflaştırılan PCR ürünlerinin jel görünümü 24
Şekil 1. 6	pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi25
Şekil 3. 1	Kütüphaneden rastgele seçilen kolonilerden izole edilip, PCR kesimleri yapılmış plazmidler35
Şekil 3. 2	Cygwin-Phred programına komutların girilmesi36
Şekil 3. 3	Cygwin-Cross Match programının dizinlerdeki vektör ve adaptör dizilerini işaretlemesi36
Şekil 3. 4	VecScreen Programının web sitesi görünümü37
Şekil 3. 5	BEAP programında 10. Kontigi oluşturan EST'ler ve bu dizilerin örtüşme biçimleri38
Şekil 3. 6	NCBI veritabanı BLASTN aracı web sitesi görüntüsü39
Şekil 3. 7	Arpa bitkisinin gövdesine ait Kontig 2 dizisinin BLASTN sonuçlarının NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü40
Şekil 3. 8	Phrap Programı Kontig 9 Clustalw görüntüsü42
Şekil 3. 9	Phrap programıyla oluşturulan Kontig 1'in clustalw analizi sonucu.....44

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1. 1 Arpa bitkisine ait sınıflandırma	2
Çizelge 1. 2 Bitki kısımlarının yaş ağırlıkları ve çinko içerikleri	21
Çizelge 3. 1 Cap3 Kontig BLAST Sonuçları Fonksiyon Çizelgesi.....	45
Çizelge 3. 2 Cap3 Singlet BLAST Sonuçları Fonksiyon Çizelgesi	49
Çizelge 3. 3 BLAST Analizi Sonuçlarının Fonksiyon Gruplaması	56

**ÇİNKO EKSİK KOŞULLARDA YETİŞTİRİLMİŞ *Hordeum spontaneum* C. Koch
GÖVDESİNDEN KURULMUŞ BASKILAYICI ÇIKARIM HİBRİDİZASYON
KÜTÜPHANESİNDEN SEÇİLEN cDNA'LARIN MOLEKÜLER VE
BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ**

Bahar IŞIK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Senay V. KORKUT

Çinko bütün organizmalar için önemli bir mikrobeseindir ve 1000'den fazla enzim ve proteinin temel bileşenidir. Canlı hücrelerde protein, karbohidrat ve lipid metabolizmasında, replikasyon ve transkripsiyonda, biyomembranların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için kritik rolleri vardır.

Çinko eksikliği tüm canlılarda bir çok bozukluğa neden olur. Düşük çinko koşullarında yetişen bir bitkide cüce gövde, genç yapraklarda kıvrılma ve yuvarlanma, yaprak uçlarının ölümü ve klorozis görülür. Memelilerde ise, çinkonun yetersiz olduğu bir beslenme şekli anemi, savunma sistemi bozuklukları ve gelişimsel problemlere neden olur. Bu nedenle, organizmalarda çinko düzeylerini iyi bir şekilde kontrol eden ve beklenmeyen eksikliklere veya fazlalıklara anında tepki oluşturan hücrel mekanizmalar gelişmiştir.

Tüm dünyada yaygın bir sağlık problemi olan çinko eksikliğinin giderilmesi için çinkonun eksik olduğu bilinen tarım alanlarında bu strese dayanıklı ürünler yetiştirilmelidir. Bitki türleri arasında çinko alım etkinliği bakımından genotipik varyasyonlar görülmektedir. Bu varyasyonlar çinkonun alımı, taşınımı ve depolanmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerin farklı anlatımından kaynaklanmaktadır. Araştırma grubumuzda çinko eksikliğinde anlatımı olan genlerin

yüksek verimlilikle identifikasyonu için Türkiye topraklarına iyi adapte olmuş *Hordeum spontaneum* C. Koch kullanılmıştır. Önceki projelerimizde, çinko eksik koşullarda yetiştirilmiş *Hordeum spontaneum* C. Koch yaprak, kök ve gövdesinden elde edilmiş RNA'lar kullanılarak, toplam 5808 klon içeren, üç farklı baskılayıcı çıkarım hibridizasyon (Suppression Subtractive Hybridization=SSH) kütüphanesi kurulmuştur. Yaprğa ait 960 klon ve köke ait 384 klonun dizin ve biyoinformatik analizleri tamamlanmıştır.

Bu çalışmada ise gövde SSH kütüphanesinde bulunan cDNA'ların izolasyon ve identifikasyonlarının gerçekleştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, 672 klon rastgele olarak seçilip dizin analizleri gerçekleştirildi. Ham dizin verileri biyoinformatik araçlar kullanılarak işlendi. Öncelikle, düşük kaliteli dizinler, vektör dizinleri ve rekombinant olmayan klonlar, Cygwin yazılımı ile kullanılabilen Phred ve Cross-Match programlarıyla uzaklaştırıldı. Daha sonra, CAP3 ve Phrap programlarıyla kontig ve singletler oluşturulup, her iki program için sonuçlar karşılaştırıldı. Kontig ve singlet dizinlerinin nükleotid ve protein BLAST analizleri gerçekleştirildi. BLAST analizlerinde dizinlerin, metabolizma, savunma ve stres cevabı, yapı ve hücrel organizasyon, transkripsiyon, translasyon, sinyal iletimi ve apoptosiste görev aldığı düşünülen çeşitli genlere benzediği bulundu. Bu genlerden bazılarının yapısal ve fonksiyonel olarak iyi karakterize edilmiş genlerdir. Bunlar içinde Ribuloz-1,5-Bifosfat karboksilaz/oksigenaz (RuBisCO), Lipid Transfer Protein (LTP), BLT4 protein, kitinaz, aktin, patojen-ilişkili protein, UDP-glukoz pirofosforilaz, papain-benzeri sistein proteinaz ve CPN60 proteinlerini kodlayan genler yer almaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Hordeum spontaneum* C. Koch, çinko eksikliği genleri, baskılayıcı çıkarım hibridizasyon kütüphanesi

**MOLECULAR AND BIOINFORMATICS ANALYSIS OF cDNA's SELECTED
FROM STEM SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION LIBRARY OF
Hordeum spontaneum C. Koch GROWN UNDER ZINC DEFICIENT
CONDITIONS**

Bahar IŞIK

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Şenay V. KORKUT

Zinc (Zn) is an important micronutrient for all organisms and an essential component of over 1000 enzymes and proteins. Zinc plays a fundamental roles in protein, carbohydrate and lipid metabolisms, replication, transcription and translation and for structural and functional integrity of biomembranes.

Zinc-deficiency causes many symptoms in all living things. In plants grown under low zinc conditions the general symptoms are stunting of shoot, curling and rolling of young leaves, death of leaf tips and chlorosis. In mammals low Zn in nutrition causes anemia, disorder of immunity and growth problems. Therefore, all organisms have evolved some mechanisms that tightly control zinc levels and respond to unexpected deficiency or excess of zinc in their cells.

The crop plants that are resistant to zinc-deficiency should be cultivated to eliminate Zn-deficiency as a worldwide health problem. There are genotypic variations in zinc-uptake efficiency between plants species. These variations cause differential expression of genes encoding proteins used in uptake, transport and storage of zinc. In our research group *Hordeum spontaneum* C. Koch which is well adapted to Turkey's

zinc-deficient soils was used for high throughput identification of genes that are expressed upon zinc-deficiency. In our previous projects three different SSH library, including about total 5808 clones, were constructed using RNAs extracted from leaf, stem and root of *Hordeum spontaneum* C. Koch which was grown on zinc deficient medium. Sequence and bioinformatics analysis of 960 leaf and 384 root clones were completed.

In this study we aimed isolation and identification of cDNAs that are found in stem SSH library. For this purpose 672 clones were selected randomly and sequenced. Raw sequence data was manipulated using some bioinformatics tools. Firstly low quality sequences, vector fragments and nonrecombinant clones were removed using Phred and Crossmatch programmes which are used with Cygwin software. Then contigs and singlets were generated using both CAP3 and Phrap programmes and results were compared.

Sequences of contigs and singlets were subjected to nucleotide and protein BLAST. The sequences showed significant similarity to a variety of genes that were implicated to have roles in metabolism, defence and stress responses, structure and cellular organisation, transcription, translation, signal transduction, and apoptosis. Some of these genes are well characterised in terms of structure and function. These include Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO), Lipid Transfer Protein, BLT4 protein, Chitinases, Actin, Pathogen-Related Protein, UDP-Glucose Pyrophosphorylase, Papain-like Cysteine proteinase and CPN60 protein encoding genes.

Key words: *Hordeum spontaneum* C. Koch, zinc deficiency genes, suppression subtractive hybridization libraries

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Arpanın Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Tarihi

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Eski Dünya tarımının dayandığı bitkilerden biridir. Bereketli Hilal'in çeşitli bölgelerinde arpa tanelerinin arkeolojik kalıntılarının bulunması [1], [2] (Zohary and Hopf 1993; Diamond 1998), arpanın yaklaşık M.Ö 8000'lerde evcilleştirilmiş olduğunu göstermektedir [3] (Nesbitt and Samuel 1996). Bu bitkinin yabani akrabası *Hordeum spontaneum* C. Koch olarak bilinir.

Yabani progenitör olan *Hordeum spontaneum* C. Koch bu bitkinin ilk habitatı olan İsrail ve Ürdün'den Türkiye'nin güneyine, İran ve Suriye'nin batısı ve Irak'ı da içine alan Bereketli Hilal'de halen kolonize olarak yetişir [4], [5]. (Harlan and Zohary 1966; Nevo 1992).

Bitkiler alemine ait Poaceae (buğdaygiller) familyasına dahil olan *Hordeum* L. cinsinde yaklaşık 115 tür bulunan bir bitkidir. Arpa bitkisine ait sınıflandırma Çizelge 1.1' de verilmiştir.

Çizelge 1.1 Arpa bitkisine ait sınıflandırma

Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Liliopsida (Tek çenekliler)
Takım	Graminales
Familya	Poaceae
Cins	Hordeum L.
Tür	<i>Hordeum spontaneum</i> C. Koch <u>K. Koch</u>
Tür	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Dünyada, tahıllar arasında üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer alan arpanın, Türkiye'deki üretimi ise buğdaydan sonra ikinci sıradadır. 2011'de dünya genelinde toplam üretimi 134.6 milyon ton olup, 2011 yılı itibarı ile yurdumuz 6.5 milyon ton üretim ile 6. sıradadır [6].

Üretimde başı çeken ülkeler sırasıyla, Rusya, Ukrayna, Fransa, Almanya, Kanada ve İspanya'dır. Arpanın ekimi dünyada 56.774.297 hektarlık alana yapılmaktadır.

Arpa neolitik dönemden itibaren insanlar tarafından önemli bir besin kaynağı olarak tüketilmiş olsa da, bugün daha çok hayvan yemi yapımında ve malt endüstrisinde kullanılmaktadır. 1980'lerde Avrupa ve Amerika'da besin değerinin anlaşılmasıyla gıda sektörüne yeniden girmiştir. Ancak, Asya ve kuzey Afrika'daki bazı kültürlerde arpanın gıda sektöründeki yeri eski çağlardan beri değişmemiştir. Bunun yanı sıra, arpa strese oldukça dayanıklı bir bitki olduğu için buğdayın ekilemediği kutup bölgelerinde ve yüksek dağlık bölgelerde ekilerek besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde arpa tüketiminin %90'ı hayvan yemi, kalan kısmı malt ve gıda endüstrisini kapsamaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılan oran çok düşük olup, malt sanayinde kullanılan oran her geçen yıl artmaktadır.

Arpa, tarih boyunca maruz kaldığı gerek ıslah çalışmaları gerekse doğal seleksiyonlar sonucunda, tarımsal üretimini kolaylaştıracak fenotipik özellikler kazanmıştır. Bu fenotipik özelliklerin yanında, arpanın erken olgunlaşması ve stres koşullarına yüksek

oranda uyum sağlayabilmesi gibi nitelikleri, kutuplardan ekvatorial bölgelere kadar tüm dünyada, ekime uygun bir ürün olmasını sağlamıştır [6]. Bugün arpa, kuzey kutbundan tropik bölgelere, her türlü iklim koşulları altında yaygın bir şekilde ekili olmakla birlikte, ılıman bölge tarım ekonomilerinde kilit rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, yabani arpanın ekstrem iklim koşullarına uyum sağlayabilme yeteneği ve dünyanın değişen iklim koşullarına adaptasyon potansiyeli göz önüne alındığında, gelecekte arpanın germplazm kaynaklarının yeni ürünler geliştirmede kullanılabileceği düşünülmektedir [7].

Kısa yaşam döngüsü, tek yıllık bir bitki olması ve genomunun yedi çift kromozomdan oluşması, arpayı moleküler çalışmalar için önemli bir model bitki yapmaktadır. Fizyolojik, morfolojik ve genetik açıdan büyük çeşitlilik göstermesi, geniş ölçüde genetik stokların ve haritaların bulunması ve kendi kendine döllenebilmesi sayesinde çok yönlü testlerin uygulanabilmesi, arpanın fizyolojik ve moleküler çalışmalar için önemini daha da arttırmaktadır [8].

1.1.2 Çinko ve önemi

Çinko (Zn), periyodik cetvelde 2b grubu 4. periyodunda yer alan ve atom numarası 30 olan bir geçiş elementidir. ^{64}Zn (48.63%), ^{66}Zn (27.90%), ^{67}Zn (4.90%), ^{68}Zn (18.75%) ve ^{70}Zn (0.62%) olmak üzere 5 tane izotopu bulunmaktadır. Formları çoğunlukla çözünebilir tuz ve çözülebilir- çözülemez organik kompleks moleküller şeklindedir [9].

Çinko bitkiler ve diğer organizmalar için temel bir elementtir ve enzim aktivasyonu, protein sentezi ve membran stabilitesi gibi birçok hücresel sürece katılır [10], [11]. Temel mikrobesein türü olarak belirlenmesinden bu zamana kadar yapılan çalışmalarla oldukça fazla sayı ve çeşitte biyokimyasal olayda görev aldığı belirlenmiştir [12]. Bitki ve hayvanlar için gerekli olan mineral besin olup anhidraz, RNA polimeraz, dehidrogenaz, oksidaz ve peroksidaz gibi 300'den fazla enzimin çalışmasında ve yapısını oluşturmada [13], [14], nükleik asit ve yağ metabolizmasında, protein metabolizması, apoptosiste [15], gen ekspresyonu, yapısal ve fonksiyonel biyomembran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde, fotosentetik karbon metabolizmasında ve klorofil biyosentezinde [16] ve IAA metabolizmasında [17] görev alır. Ayrıca Dof proteinleri, Zinc-finger- RING-tip

proteinleri, GATA1-6 transkripsiyon faktörleri [18] gibi bir çok transkripsiyon faktörünün yapısında yer aldığı bulunmuştur.

Çinkonun bitki ve hayvan metabolizmasında katıldığı önemli reaksiyonlar göz önüne alındığında eksikliğinin canlılar için neden büyük sorunlar oluşturacağını anlamak mümkündür. Çinko eksikliği insanlarda da birçok biyolojik, fiziksel, zihinsel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Örneğin kısa boyluluk, yetersiz zeka gelişimi, seksüel olgunlaşmanın geriliği, saç dökülmesi, deri hastalıkları, bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi sorunlar çinko eksikliğinden kaynaklanmaktadır [19], [20], [21]. Bitkilerde ise çinko eksikliğinde yaşlı yaprakların uç ve kenarlarında kloroz hastalığı belirmektedir. Daha sonra yapraklarda yer yer beyaz nekrotik lekeler meydana geldiği gibi, çinko eksikliğinde yapraklar küçük çarpık şekilli kıvrılmış haldedir. Bunun için çinko eksikliğinde meydana gelen bu karakteristik hastalığa küçük yaprak hastalığı (rozet oluşumu) adı verilmiştir [22].

Bilindiği gibi çinko, protein sentezi ve biyolojik membranların bütünleşmesinde gerekli olan bir elementtir. Çinko eksikliğinde bitkilerde protein sentezinin gerilediği ve buna bağlı olarak aminoasit ve amin birikiminin arttığı bilinmektedir [23], [24]. Çinko eksikliğinde bitkide aminoasitlerin ve diğer çözünen azot bileşiklerinin birikmesinin köklerin topraktan yapacağı azot alımı üzerine olumsuz etki yaptığı düşünülmektedir. Bitkide bu şekilde çözünen azot bileşiklerinin birikmesi, bitkinin yeşil kısımlarında azotla beslenme düzeyinin yeterli olduğu bilgisini köke ileterek kökün beslenme ortamında azot alımını sınırlandırmasına ve sonuçta bitkide gizli azot eksikliğinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bitkide ortaya çıkan gizli azot eksikliği hem bitki büyümesinin gerilemesine hem de o bitkinin danesinde yeterince protein sentezlenememesine yol açmaktadır.

1.1.2.1 Toprakta Çinko

Topraktaki total çinko 5 fraksiyona ayrılır [25].

- i) suda çözünen fraksiyon: toprak çözeltisinde mevcut olan,
- ii) değişebilir fraksiyon: elektriksel yükleriyle toprak partiküllerine bağlı olan iyonlar

iii) organik bağlı fraksiyon: organik bileşiklere adsorbe, şelat yada kompleks oluşturmuş iyonlar

iv) kil mineralleri ve çözünmez metalik oksit mineralleri üzerine değişmez şekilde bağlanan formlar

v) primer minerallerin ayrışmasıyla ortaya çıkan fraksiyonlar

Total çinko içeriğinin çok küçük bir miktarı toprak çözeltilisinde yer alır. Kabata-Pendias ve Pendias (1992) [26], topraktaki çözünür çinko konsantrasyon aralığının $4-270\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) arasında olduğunu bildirmişlerdir. Bu değerlerle, topraktaki ortalama total çinko konsantrasyonu ($50-80\text{ mg kg}^{-1}$) kıyaslandığında çözünür çinko konsantrasyonunun ne denli düşük olabildiği daha iyi anlaşılmaktadır Ancak çok yüksek asidik karakter gösteren topraklarda aynı değer $7137\mu\text{g L}^{-1}$ olduğu saptanmıştır. Bu da çinkonun çözünürlüğünün pH'ya son derece bağlı olduğunu ve çözünürlük ile pH değeri arasında negatif bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Cattlet ve ark., (2002) Kolorodo'da topraklarda çinkonun aktivitesinin pH'nın artmasıyla düştüğünü buna karşılık toprak organik karbon düzeyindeki artışla arttığını belirlemişlerdir [27].

Kiekens [28] kil ve organik maddeler tarafından çinkonun adsorpsiyonunu içeren iki farklı mekanizmanın ortaya çıktığına bildirmiştir. Bir mekanizma temel olarak asit koşullarda çalışır ve katyon değişimi ile yakından ilgilidir. Diğer mekanizma ise alkali/bazik koşullarda çalışır ve özellikle organik ligandların kemisorpsiyonu ve komplekslemesini içerir.

Bitkiler için kullanılabilir çinko, toprak çözeltilisinde mevcuttur ya da değişken bir form olarak adsorbe edilmiştir. Bitkilerce alınabilir-çinko konsantrasyonu topraktaki adsorpsiyon ve desorpsiyon süreçleriyle belirlenir. Toprakta bitkinin çinko kullanılabilirliğini, pH'sı, organik maddesi, kireci, redoks potansiyeli, rizosferdeki mikrobiyal aktivitesi, nem içeriği ile diğer besin elementlerinin düzeyi gibi faktörler etkiler [25].

Küresel bir toprak çalışmasında, Sillanpää (1990) 25 ülkeden topladığı toprak örneklerinin %50'sinin çinko-eksik olduğunu bulmuştur [29]. Türkiye'de çinko eksikliği, toprakta ve bitkide en yaygın görülen mikrobeyin eksikliğidir. Eyupoglu ve ark. (1994)'nin Türkiye'nin bütün illerinden topladığı 1511 toprak örneklerinin analizini

yaptığı çalışma Türkiye topraklarının %50'sinin çinko eksik olduğunu göstermiştir ki, bu oran 14Mha ekim alanına denk gelir [30].

1.1.2.2 Bitkide Çinko

Brown ve ark., (1993) [31] bildirdiğine göre, çinkonun biyolojik rolü Raulin [32] tarafından 1869'da, ekmek küfü (*Aspergillus niger*)'nde çinko yokluğunda büyümenin gerçekleşmediğinin keşfedilmesiyle ortaya çıkmış ve daha sonra insan ve hayvan dokuları için zorunlu bir element olduğu saptanmıştır.

Çinko eksikliğinin tarla şartlarında ilk olarak belirlenmesi 1932 yılında gerçekleşmiştir. 1932'den bu yana geçen süre içinde, çinkonun ekin üretiminde yaşamsal önemi olan bir mikro besin olduğu ortaya çıkmıştır ve bu elementin eksikliğinin dünya çapında diğer mikro besinlerden daha yaygın olduğu gösterilmiştir [31]. Tarımsal üretimde çinkonun rolü 20. yüz yıl başlarında keşfedilmesine karşılık, bitkideki spesifik fonksiyonları 1960'lı yılların sonlarına doğru keşfedilmiştir. Bu tarihten sona çinko içeren birçok enzim tanımlanmış ve bununla birlikte çinko eksikliğinde bitkideki kimyasal ve fizyolojik olayların etkileri belirlenmiştir.

Marschner [33] 'a göre çinkonun metabolik fonksiyonları, çinkonun N-, O- ve özellikle S- ligandları ile tetrahedral kompleksler oluşturmak için güçlü eğilime sahip olmasına dayanmaktadır ve dolayısıyla enzim reaksiyonlarında yapısal ve fonksiyonel (katalitik) bir rol oynar. 70'den fazla çinko içeren metaloenzim tanımlanmasına rağmen, bunlar bir bitkide toplam çinkonun çok küçük bir oranını açıklar [31].

Bitkilerde, çinko elektriksel yük değişimlerine maruz kalmaz ve bitkilerde en fazla bulunan formu, düşük moleküler ağırlıklı kompleksler, depo metaloproteinleri, serbest iyonlar ve hücre duvarlarında çözünmez formlar şeklindedir. Çinko, organik ligandlı komplekslerin oluşumu ile ya da fosforlu kompleksleşme ile hücre içinde inaktive edilebilir. Bitki türlerine bağlı olarak, bir bitkide çinkonun %58 ile %91'i suda çözünür formda olabilir (düşük moleküler ağırlıklı kompleksler ve serbest iyonlar). Yaygın olarak bu suda çözünebilir fraksiyonların fizyolojik olarak en aktif oldukları kabul edilir ve toplam çinko içeriğinde bitki çinko durumunun enzimatik bir indikatörü olarak kabul

edilir. Düşük moleküler ağırlıklı kompleksler normal olarak en fazla bulunan çözünebilir çinko formudur [31].

Lindsay [34], çinko kullanılabilirliğini etkileyen 8 ana faktörden bahsetmiştir ki bu faktörler çinko eksikliği stresiyle ilişkilidir.

1) Toprakların Düşük Çinko İçeriği: Total düşük çinko içerikli (10-30 mg Zn kg⁻¹) kumlu topraklar, turba ve gübrelili topraklar büyük olasılıkla ekinlerde çinko eksikliğine neden olur. Sillanpää [35], bu eksiklikleri 'primer eksiklikler' olarak adlandırır.

2) Toprakta Kısıtlanmış Kök Bölgeleri: Traktör tekerlekleri, pulluk, tava ve yüksek su tablaları gibi nedenlerle kök penetrasyonunun kısıtlanması da çinko alımını azaltabilir.

3) Kireçli Topraklar: Genellikle >7.4 pH'ya sahip kireçli topraklar nispeten düşük kullanılabilir çinko konsantrasyonuna sahiptir çünkü çinkonun çözünürlüğü artan pH ile azalır. Çinkonun CaCO₃'e adsorpsiyonu da katkıda bulunan bir faktördür. Sillanpää [30] düşük çinko kullanılabilirliği ile sonuçlanan durumlar için 'sekonder eksiklik' terimini kullanır; 'induklenen eksiklikler' olarak da adlandırılır.

4) Organik Madde Bakımından Düşük Topraklar: Bu topraklar çinkoyu çok fazla muhafaza edemezler ve bu nedenle, eksikliklere daha meyillidirler. Bazı çalışmacılar ekstrakte edilebilir çinko ile organik madde içeriği arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

5) Düşük Toprak Sıcaklığı: Çinko eksiklikleri düşük sıcaklıklar nedeniyle erken gelişme sezonu süresince daha kötüdür. Kolorado' da çinko eksiklik problemleri sıklıkla serin nemli bahar ayları boyunca şiddetlidir ve Temmuz ortalarında bu durum kaybolur. Düşük sıcaklık etkilerinin bu açıklaması kök gelişiminin zayıf olmasından kaynaklanmaktadır.

6) Bitki Türleri ve Varyeteleri: Bitkiler çinko eksikliğine hassasiyet/toleransı bakımından belirgin bir şekilde fark gösterir. Tür içi varyasyonlar bazen türler arası varyasyonlar kadar büyüktür. Bazı araştırmacılar buğday varyetelerinin çinko kullanımında geniş bir etkinlik gösterebildiğini ortaya koymuştur. En 'çinko etkin' kultivarlar, düşük kullanılabilir çinko kaynağı şartları altında çinko-etkin olmayan varyetelerden daha fazla kuru madde ve tahıl üretebilmektedirler.

7) Kullanışlı Fosforun Yüksek Seviyeleri: Antagonizmden sorumlu mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. Fosfor kökün çinko alımını da bitki içinde çinkonun translokasyonunu da etkileyebilir. Fosforun aşırı miktarlarının çinkonun metabolik fonksiyonları üzerinde etkileri vardır.

8) Nitrojenin Etkisi: Nitrojen çinkonun kullanılabilirliğini iki muhtemel yol ile etkileyebilir. İlk olarak, nitrojen gübrelerinin eklenmesini takiben artan protein oluşumu kökte çinkonun, çinko-protein kompleksi olarak tutulmasına ve bitki çevresinde transloke olmamasına yol açabilir. İkinci olarak, amonyum nitrat ve amonyum sülfat gibi asitleştirici nitrojen gübreleri toprak pH'sında düşüğe ve çinko kullanılabilirliğinde bir artışa neden olabilir.

Çinkonun bitkide, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerle veya proteinlerle kompleksleşmiş halde bulunur. Düşük molekül ağırlıklı çinko kompleksleri katalitik aktivitelerde (örneğin Cu ve Zn tarafından amidlerin hidrolizinde) görev alırlar. Düşük molekül ağırlıklı çinko kompleksleri fizyolojik olarak aktif makromoleküllere çinko sağlanmasında önemli bir rol oynarlar. Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle kompleksmiş çinko kaynağı kolaylıkla bozunur ve bu nedenle enzimlere bağlı çinkonun fizyolojik aktif olarak kabul edilmesinde olduğu gibi bu bileşiklerdeki çinko da fizyolojik aktif çinko olarak kabul edilirler [36].

Protein yapısına katılan çinko, oldukça fazla sayıda enzimde fonksiyonel, yapısal veya düzenleyici olarak rol oynar. Çinko atomu genelde kuvvetli şekilde apoenzime bağlanmıştır ve buradan yalnızca konsantre kimyasallar ile uzaklaştırılabilirler. Ayrıca çinko; oksijen, azot ve kükürt içeren polar grupların radikalleriyle kuvvetli kompleksler oluşturur [37].

1.1.2.3 Çinkonun Fizyolojik Fonksiyonları

Çinkonun karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkisi fotosentez ve şekerlerin değişimi etkilemesiyle gerçekleşir. Çinko eksikliği bitki türlerine ve eksikliğinin şiddetine bağlı olarak net fotosentez düzeyinde % 50-70 arasında bir azalmaya neden olur. Bu azalmada birçok mekanizma rol oynar.

Çinko, karbonik anhidraz [38], [39], Ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz (RuBPC) [31] gibi enzimlerin yapısında yer alır. Bunun yanı sıra şeker pancarı [40] ve mısırdaki [41] sakkaroz oluşumunda görev alan sakkaroz sentaz enzimi ve fasulyede nişasta sentez [42] enziminin yapısında da yer alır.

Çinko eksikliğindeki bitkilerde gözlemlenen fotosentez azalması klorofil içeriğindeki bir azalmadan ve kloroplastlardaki normal olmayan yapıdan da kaynaklanmaktadır [31].

Protein metabolizmasında ise; genelde çinko eksikliğinde bitkide protein miktarı azalmaktadır. Ancak proteinin kompozisyonu değişmeden kalmaktadır. Çinko eksikliğine sahip fasulye yapraklarında kontrol uygulamasına göre yapraklarda daha fazla amino asit biriktiği belirlenmiştir [23]. Çinko ilavesiyle amino asit konsantrasyonunda azalma görülmüş ve bu azalma aynı zamanda protein konsantrasyonundaki artışa bağlanmıştır. Bu sonuç da çinkonun protein sentezinde temel bir rolünün olduğunu ortaya koymaktadır. Çinko eksikliğinin protein sentezini olumsuz etkileme mekanizması RNA'daki azalmadan ve ribozomların deformasyon ve azalmasından kaynaklanmaktadır [43], [44]. Bu bulguyu destekler sonuçlar Kitagishi ve ark., [24] tarafından desteklenmiş ve söz konusu çalışmada çeltik bitkisinde meristem dokusunda RNA düzeyi ve serbest ribozomların sayısı Zn eksikliğinde dramatik olarak azalmıştır.

Çinko eksikliği altında RNA'nın azalması RNA polimeraz ve RNase aktivitesiyle bağlantılıdır. Çinko, RNA polimeraz enzim aktivitesi için gerekli bir elementtir [45], [46] ve ribonükleaz enzimi tarafından gerçekleştirilen ataklara karşı ribozomal RNA'yı korur. RNaz aktivitesinin çinko uygulamasıyla şiddetli derece gerilediği bilinmektedir ve yüksek düzeyde ribonükleaz enzim aktiviteleri bitkilerde tipik çinko eksiklik göstergesidir [47].

Çinko, membran bütünlüğü üzerinde de etkilidir. Çinkonun hayvanlarda biyomembranların yapısında ve fonksiyonunda kritik bir fizyolojik rol oynadığı gözlenmiştir [48], [49]. Bitkilerde bu dolaylı olarak gösterilmiştir. Welch ve ark. (1982) [10], kök plazma membran geçirgenliğinin göstergesi olarak kök salgılarını kullanmışlar ve çinko ile beslenme düzeyi iyi olan bitkilere göre çinko eksikliğindeki buğday köklerinden daha fazla miktarda P₃₂ sızdığını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada da

Çinko eksikliğinde koklerden dıŐarıya 2.5 kat daha fazla K⁺, amino asit, Şeker ve fenolik bileşiklerin salgılandığı bulunmuştur. Bu bitkilere tekrar çinko verilmesi durumunda kokten dıŐarıya salgılanan maddelerde azalma olduğu saptanmıştır [50]. Bu sonuçlar çinkonun hucresel membranların butnlĞnn sağlanmasında bir rolünün olduğunu düŐündürmektedir.

Skoog, domates bitkisi üzerinde yaptığı çalışmada, çinko-eksik bitkilerde IAA seviyesinin düŐtüĐünü göstermiştir. Skoog, bu çalıŐmasıyla, çinkonun oksinin aktif bir Şekilde devamlılığı için zorunlu olduğu sonucuna varmıŐtır [51]. Bu düzenleme mekanizması açıklanamamakla birlikte, birçok araŐtırmacı çalıŐmalarıyla bu bulguyu destekleyen sonuçlar elde etmiŐlerdir [52], [53], [54].

Shkolnik ve ark. [55], çinko eksikliğinde fasulye yapraklarında giberellin ve benzeri maddelerin azaldığını saptamıŐlardır. Suge ve ark. 'nın yaptığı çalışmalarla arpa, mısır ve yulaf gibi bitkilerde de bu azalma gösterilmiştir [56]. Çinko eksikliğindeki bu bitkilere çinko verilmesi yalnızca bitki büyümesinde değil aynı zamanda giberellin ve benzeri bileşiklerin düzeylerinde de artışa neden olmuştur. Giberellik asit, triptofan ve triptaminin indol asetikasit (IAA)'e dönüŐümünü arttırdığı için [57] , Suge ve ark. Çinko noksanlığında IAA'den ziyade giberellik asitin ilk etkilenen madde olduğunu belirtmiŐlerdir [56]. akmak ve ark [23], fasulye bitkilerinde yaptıkları çalışma ile çinko eksikliğinin sitokinin üzerine etki yapmadığını göstermiştir.

Çinkonun generatif verime etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, çinko eksikliğinde fasulye, bezelye ve diğer bitkilerde çiçeklenmede ve tane veriminde önemli azalmaların olduğu gösterilmiştir [58], [59]. Besin zeltisinde Riceman ve Jones (1959) [60], beslenme ortamına çinko ilavesinin yeraltı Ğlnde bitkinin yeşil kısımlarında kuru madde verimi üzerinde hafif bir etkisinin olduğunu buna karşılık aynı koşulda dane veriminin belirgin Şekilde arttığını saptamıŐlardır. Bu artıŐın, çiçeklenme ve dane sayısındaki artıŐtan kaynaklandığı bildirilmiştir. Çinko uygulamasıyla tek bir dane ağırlılığının deĐiŐmemesi, çinkonun danenin büyümesinden çok danenin oluşumu üzerinde bir etkisinin olduğunu göstermektedir.

Çinko eksikliğinde bitkilerde dane verimindeki azalmanın nedenleri olarak yaprak ve tomurcukların kaybına neden olan absisik asit konsantrasyonunun artması ve anter ve

polenlerin gelişiminin ve fizyolojisinin engellenmesi gösterilmiştir. Çinko eksikliğindeki buğdayın küçük anterlere ve normal olmayan polenlere sahip olduğu bildirilmiştir [61].

1.1.2.4 Bitkiler Tarafından Çinko Alımı

Çinkonun toprak çözeltisinden öncelikle bitki köküyle Zn^{+2} şeklinde absorbe edildiği kabul edilir ve alımında çinkoya afinitesi yüksek bir protein aracılık eder. Plazma membranından çinko taşınması büyük bir negatif elektriksel potansiyele doğrudur ve bu işlem termodinamiksel olarak pasif bir süreçtir [62]. Plasma membranındaki bu negatif elektriksel potansiyel, buğdaygillerden başka monokotiledonlar ve dikotiledonlardaki iki değerlikli iyon kanallarında çinko için yönlendirici bir kuvvettir. Kochian, protein olmayan aminoasit olarak tanımlanan fitosideroforlar veya fitometaloforların çinko ile kompleks oluşturduklarını ve kök dışına taşındıklarını bildirmiştir [62]. Bu fitosideroforlar bitki demir ve çinko eksikliğindeyken sentezlenirler. Bu demir veya çinko kompleksi daha sonra taşıyıcı bir protein aracılığıyla hücreye taşınır.

Nambiar, bitkilerin kuru bir topraktan (matriks potansiyel -1.5 Mpa) sızan musilaj aracılığıyla çinko alabileceğini göstermiş ve ancak bu alım düzeyi ıslak bir topraktan alınan çinkonun yalnızca % 40 kadarı olduğunu belirlemiştir [63].

Yüksek pH'larda çinko, Zn^{+2} veya $Zn(OH)_2$ şeklinde alınır. Toprakta düşük çinko konsantrasyonunun bir sonucu olarak, çinko alımı doğrudan kök temasıyla gerçekleşir ve alım metabolik olarak kontrol edilmiştir.

Çinko ile diğer mikro besin elementleri arasında alım açısından bir rekabet söz konusudur. Örneğin çinko ve bakır, her ikisi de birbirlerinin alımını geriletir ve her ikisinin absorpsiyonunda aynı taşıyıcı yerleri kullanılır. Çinko eksikliğinde çeltikte kadmiyum (Cd) absorpsiyonunun da arttığı saptanmıştır. Ancak çinkonun havalı yerlere taşınma boyutu kadmiyumdaki kadar büyük olmuştur. Su altında kalmış topraklara çinko ilavesi DTPA'da ekstrakte edilebilir mangan (Mn) konsantrasyonunu arttırmış buna karşılık bakır (Cu), demir (Fe) ve fosfor (P)'ün alımını ve taşınımını geriletmiştir [64].

Çinko bitkide ya Zn^{+2} iyonu ya da organik asitlere bağlı olarak taşınır. Kök dokularında çinko birikmesine karşın gereksinim duyulması durumunda yeşil aksama taşınır. Çinko

yaşlı yapraklardan büyüyen yerlere kısmen taşınır. Çeltikte Mn uygulaması köklerden çinkonun taşınımını arttırmıştır. Chaudry ve Loneragan (1972), toprak alkali elementlerin bitkilerce çinko alımını geriletmesi $Mg^{+2} > Ba^{+2} > Sr^{+2} = Ca^{+2}$ şeklinde olduğunu bildirmişlerdir [65].

1.1.2.5 Çinko Etkinliği

Çinko etkinliği, çinko-eksik topraklarda iyi gelişim ve verim sağlamak için bitkinin yeteneği olarak tanımlanır [66]. Genetik kontrol altında olduğu görülen çinko-etkinliği, türler arası varyasyon gösterir [67].

Çinko etkinliğinin mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, bu mekanizmayı anlamak, çinko eksik topraklarda daha yüksek toleranslı genotiplerin yetiştirilmesi ve seçimi için büyük bir katkı sağlayacaktır [65]. Bu konu üzerine çalışmalar hububatlar özellikle buğday kullanılarak yapılmıştır [68], [69], [70].

Bir çeşidin yüksek çinko etkinliğine sahip olması o çeşidin yüksek bir biomas veya dane verimine de sahip olduğu anlamına gelmemelidir. Tarlada [67], [71] ve serada [72] yapılan denemelerde genetiksel olarak yavaş büyüyen veya fenotipik olarak küçük olan genotiplerin daha düşük bir büyüme oranına (daha düşük çinko gereksinimi) ve sonuçta da daha yüksek bir çinko etkinliğine sahip olabildiği bildirilmiştir. Buna karşılık daha büyük büyüme oranına sahip genotipler (daha fazla çinko gereksinimi) çinko eksikliğinden dolayı büyümede azalmalara ve sonuçta daha düşük bir çinko etkinliğine sahip olmaktadır. Bu nedenle, düşük büyüme performansı ve daha düşük verim kapasitesine sahip olmalarından dolayı yabancı buğday türlerinin besin elementi eksikliğine karşı etkinlik değerleri kültürü yapılan buğday türlerinden daha büyük olduğu saptanmıştır [33], [72].

Tahıllarda çinko eksikliğine dayanıklılıkta belirleyici olan birçok fizyolojik ve morfolojik mekanizma çalışılmıştır. Bugüne kadar çinko eksikliği koşullarında çinko-etkin çeşitlerin daha iyi büyümesini ve verim vermesini doğrudan açıklayabilen tek bir mekanizma bulunabilmiş değildir. Rengel'e [73], [74] göre, bir genotipin çinko noksanlığına karşı dayanıklılığında birden fazla mekanizma rol oynamaktadır. Rengel [74] ve Çakmak [75], genotiplerin çinko eksikliğine karşı dayanıklılığında belirleyici olan önemli fizyolojik ve

morfolojik mekanizmaları ortaya koymuşlar ve çeşitlerin çinko etkinliğinde özellikle köklerin çinko alım ve kökten yeşil kısımlara taşıma kapasitesi, kökten çinko mobilize edici organik bileşiklerin salgılanması (örneğin fitosidereförler) ve çinkonun içsel kullanımı gibi parametrelerin dikkate alınmasını önermişlerdir.

Fe ve Zn eksikliğinde salgılanan fitosidereförler, kireçli topraklarda çinkonun çözünürlüğünü ve hareketliliğini arttırmaları. Fitosidereförler ayrıca bitki içerisindeki çinkonun taşınmasını ve içsel kullanımını etkilerler [33], [76]. Çinko eksikliğine karşı görülen genotipsel farklılığın büyüme ortamından çinko alım kapasitesindeki farklılıkla ilişkili olabildiği bildirilmiştir. Rengel'e [73] göre, fizyolojik olarak kullanılabilir- çinko miktarını saptamada çinko içeren enzimleri ölçmek doğru bir yaklaşım olabilir. Buğday çeşitlerinde çinko-etkinliğini göstermede Cu/Zn-superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, yapraktaki total konsantrasyondan daha büyük bir ilişki göstermiştir [77]. Çinko noksanlığında oldukça yüksek bir çinko etkinliğine sahip olan çavdar ekmeçlik ve makarnalık buğdaylarla kıyaslandığında en yüksek Cu/Zn-SOD aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır.

1.1.2.6 Çinko Alımının Moleküler Biyolojisi

Toprak doğal nedenlerle veya kirlilik nedeniyle ağır metaller bakımından kontamine olabilirler. Ağır metallerin alım, taşınım ve birikim mekanizmaları tam olarak açıklanamamasına rağmen son zamanlarda çinko taşıyıcı proteinler tanımlanmıştır. Bu gelişmeler sorularımızın aydınlatılmasında ışık tutacak niteliktedirler.

ZRT1 ve ZRT2 (Zinc-Regulated Transporter) *Saccharomyces cerevisiae* 'de bulunan çinko taşıyıcı proteinlerdir. ZRT1 ve ZRT2 sırasıyla mayada bulunan yüksek ve düşük affiniteli çinko taşıyıcılarıdır [78], [79].

Çinkonun farklı miktarlarını içeren ortamda yetiştirilen maya hücreleri tarafından çinko alımının kinetik çalışmaları en az iki alım sisteminin varlığını gösterdi. Bir sistem tahmini olarak 10nM Zn(II) Km çinko için yüksek eğilime sahiptir ve sadece çinko-sınırlı hücrelerde aktiftir [78]. İkinci sistem ise çinko için 100nM Zn (II) Km ile düşük eğilime sahiptir ve Zn-dolu hücrelerde saptanabilir [79]. *S.cerevisiae*' de çinko taşıyıcıları olan

ZRT1 ve *ZRT2* %44 özdeşir ve birbiriyle %67 benzerlik gösterirler; ayrıca bu proteinler *IRT1* ile %30-35 özdeş ve %54-65 benzerdirler [80].

Mayada *ZRT1* ve *ZRT2* çinko taşıyıcı genleri transkripsiyon seviyesinde *ZAP1* transkripsiyon faktörü ile kontrol edilirler [78], [79], [81]. *ZRT1* aktivitesi, çinko miktarının artması durumunda plazma membranından *ZRT1*'in kaldırılması şeklinde etki gösterir.

Arabidopsis thaliana 'da *ZIP1*, *ZIP2* ve *ZIP3* çinko taşıyıcı genlerinin izolasyon ve karakterizasyonu için yapılan bir komplementasyon çalışmasında *zrt1zrt2* mutanlığı *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Normal olarak bitkide *ZIP1* ve *ZIP3*, çinko eksikliği durumunda köklerde ekspres edilmektedir. Bu genlerin ekspresyonu, çinko-eksik koşulda gelişemeyen *Saccharomyces cerevisiae* mutantlarında büyümeyi sağlamıştır. Bu gen ürünlerinin çinkonun topraktan alınmasında etkili olduğu öne sürülmüştür. *S.cerevisiae*'de *ZRT1* ve *ZRT2* genleri ve *A. Thaliana*'da *IRT1* geni ile benzer ürünler kodladığından bu genler *ZIP1*, *ZIP2* ve *ZIP3* (*ZRT-IRT* benzeri Protein) olarak adlandırıldı [82]. *IRT* (Iron-Regulated Transporter) *Arabidopsis thaliana*'da demir eksikliğinde köklerde ekspres edilen bir katyon taşıyıcısıdır [83]. *ZIP* proteinleri, protozoa, fungi, omurgalı ve omurgasız hayvanlarda bulunan ve farklı organizmalarda metal-iyon birikimi ve homeostatisinin sorularını yanıtlayan, metal-iyon taşıyıcılarının bir ailesi olarak tanımlanır [82].

Çinko diğer metal iyonları gibi topraktan köklere taşınır ve sonra bitki boyunca dağıtımı için hücre ve organel membranlarından geçmek zorundadır. Spesifik çinko taşıyıcıları bu süreçte farklı roller oynayabilir. Northern blot analizleri *ZIP1* ve *ZIP3*'ün çinko-duyarlı olduklarını göstermiştir. Bu genler, çinko-eksik bitkilerin köklerinde ekspres edilirler; çinko yeterli bitkilerin köklerinde ya da çinko-yeterli ve çinko-eksik bitkilerin gövdelerinde ya hiç mRNA belirlenmemiştir ya da az belirlenmiştir. Tekrarlanan denemelere rağmen *ZIP2* mRNA'sı her iki koşul altında yetişen bitkilerde belirlenmemiştir. *ZIP4* ayrıca çinko-eksikliğine cevap verir fakat *ZIP1* ve *ZIP3*'den farklı olarak, bu gen Zn-eksik bitkilerde kök ve gövdelerde indüklenir. Bu çalışmadaki bütün sonuçlar *ZIP1*, *ZIP3* ve *ZIP4*'ün çinko-eksikliğine spesifik olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar *ZIP* taşıyıcı ailesinin ökaryotik organizmalarda metal iyon metabolizmasında

rol oynadıklarını göstermiştir [82]. Gaither ve Eide [84] ZIP ailesinin yalnızca ökaryotlarda sınırlı olmadığını ayrıca bakterilerde de var olduğu sonucuna varmışlardır.

Thlaspi caerulescens geni, *ZNT1*, *zrt1zrt2* mutant maya suşlarına klonlanarak tanımlandı [85]. Bu gen ZIP gen ailesinin bir üyesi olan olası bir çinko taşıyıcısını kodlar. Northern analizi, *ZNT1* transkriptinin çinko durumu fark etmeksizin köklerde ve sürgünlerde çok fazla olduğunu gösterdi. ZIP4, *Arabidopsis* kök ve sürgünlerinde, her ikisinde, sadece bitki çinko-eksikken ekspres edilirken, *ZNT* çinko-taşıyıcı genlerin ekspresyonlarının çinko durumu fark etmeksizin her durumda gerçekleşmesi, *T.caerulescens'* in çinko-biriktirme yeteneğiyle ilişkilendirilmiştir [85].

Çinko homeostazı hücre ve vakuol membranlarındaki taşıyıcıların aktiviteleri ile gerçekleşir [86]. CDF (katyon difüzyon kolaylaştırıcı) proteinleri, metal iyonlarına homeostaz ve toleransında esansiyel bir rol oynayan ağır metal atılım-efflux ailesine aittir. CDF üyesi olan *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 (metal tolerat protein) ve AtMTP3 proteinlerinin vakuolar membranda yer aldığı ve yüksek çinko miktarlarında çinkoyu sitoplazma vakuollerinde çinko homeostazının devamı için tuttuğu gösterilmiştir [87], [88]. Tonoplastta önemli bir kolaylaştırıcı protein olan AtZIF1, çinkoyu organik bir liganda bağlayarak vakuollere taşır [89]. Transkripsiyonel kontrol çinko homeostazına katkı sağlar. *A. thaliana'*da Zn ve Fe eksikliği ile ZIP taşıyıcıları upregüle edilirler [90]. Vakuolar taşıyıcı ZIF1 ise çinko artışı ile indüklenir [89].

1.1.2.7 Çinkonun Bitki Besin Elementleriyle Arasındaki İnteraksiyonlar

Çinkonun makro elementlerle etkileşimlerine çinko-fosfor ve çinko-azot etkileşimlerini örnek verebiliriz.

i) Çinko-Fosfor İnteraksiyonu

Yüksek fosfor uygulamaları bitkideki çinko noksanlığının en yaygın nedenlerinden biridir. Bu ilişki uzun yıllardır bilinmesine karşılık bu ilişki açıklayan mekanizma henüz tam anlaşılammıştır. Marschner, belirli bir düzeyden sonra yapılan fosforlu gübrelemeyle veya toprakta fosfor içeriğindeki artışla bitki büyümesinde meydana gelecek artışların bitkideki çinko alımını ani bir şekilde azalttığını bildirmiştir [91].

Loneragan ve Webb, Zn-P interaksiyonunu iki farklı tipe ayırmışlardır [92].

1-) Yüksek fosfor uygulamasıyla yeşil aksamdaki Zn konsantrasyonunun azalması

2-) Yüksek fosfor uygulamasıyla yeşil aksamdaki Zn konsantrasyonunun azalmaması

En yaygın görülen Zn-P interaksiyon tipi madde 1’de belirtilen şekildedir. Bu daha çok toprakta fosfor ve çinkonun her ikisinin de sınırlı olduğu koşulda ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu topraklara yapılacak fosforlu gübrelemeler bitkide büyümeye neden olacak ancak büyümeyle birlikte dokudaki çinko seyrelmeye maruz kalarak bitkide çinko eksikliğinin görülmesine yol açacaktır. Buna karşılık yeşil aksamda seyrelme etkisi olmaksızın da fosfor uygulamasıyla çinko eksikliği ortaya çıkabilir. Bu durumda yüksek fosfor uygulaması ya bitki köklerine çinkonun absorpsiyonunu ya da köklerden yeşil aksama çinko taşınmasını engeller.

Loneragan ve Webb, fosfor toksisitesiyle ortaya çıkan çinko eksikliğiyle ilgili olarak öncelikli mekanizmayı bitkilerde yüksek fosforun çinkonun çökmesine neden olması olarak göstermişlerdir [92].

ii) Çinko-Azot İnteraksiyonu

Azot bitki büyümesini arttırması ve kök bölgesindeki (rizosferde) pH değişimleriyle bitkinin çinko ile beslenme düzeyini etkilemektedir. Birçok toprakta azot büyümeyi ve verimi sınırlandıran temel faktördür. Bu nedenle N ve Zn uygulamalarının birlikte verimi iyileştirmeleri sürpriz değildir. Örneğin bitkiler çoğunlukla N ve Zn’ya birlikte tepki verirken çinko tek uygulandığında bu tepkiyi vermediği bildirilmiştir. Çinko verilmediğinde uygulanan azot, bitki büyümesini artırarak dokulardaki çinkonun eksikliğine neden olur [93].

Amonyum sülfat gibi azotlu gübreler, toprakta belirgin bir asidik etkiye sahiptirler ve yüksek pH’ya sahip topraklarda bu gübreler çinkonun toprakta alınabilirliğini arttırırlar. Buna karşılık kalsiyum nitratlı gübreler rizosfer toprak pH’sını arttırabilir ve çinkonun alınabilirliğini azaltabilirler.

iii) Çinkonun diğer makro elementlerle etkileşimleri

Kalsiyum, magnezyum, potasyum ve sodyum gibi elementlerin su kültürü denemelerinde bitkilerce çinko alımını engelledikleri bilinmektedir. Buna karşılık topraktaki etkileşimleri elementlerin toprak pH’sı üzerindeki etkilerine bağlı olarak

değişmektedir. Örneğin jibs (CaSO_4) uygulamaları toprak pH'sını 5.8'den 4.6'ya düşürmüş ve bitkilerin Zn içeriğini arttırmıştır. Buna karşılık jibs uygulamasındaki Ca miktarı dikkate alınarak verilen CaCO_3 uygulamasında toprak pH'sı 5.7'den 6.6'ya çıkmış ve bitkinin Zn içeriği azalmıştır.

Düşük Ca'lu çözeltilerde K ve Mg uygulamaları bitkide Zn alımını engellemiş ancak Ca konsantrasyonunu arttırmıştır. Çeltikte, kuru dönemde K ve Zn uygulamalarına bitki büyümesi ve verimi açısından tepki verildiği buna karşılık sulu dönemde yalnızca K uygulamasına tepki verildiği bulunmuştur.

Fransa'da alüvyal kireçli topraklarda, tüm K uygulamalarında artan çinko uygulamalarına mısırdaki önemli düzeyde tepki verildiği bulunmuştur [94]. Potasyum ve çinko arasındaki olası etkileşim potasyum eksikliğindeki bitki köklerindeki plazma membrallarındaki sızıntıyla ilişkilidir.

Çinkonun mikro elementlerle etkileşimlerine ise, çinko-bakır ve çinko-demir etkileşimlerini örnek verebiliriz.

i) Zn-Cu İnteraksiyonu

i) Absorpsiyonun rekabetten dolayı engellenmesi (absorpsiyon sırasında Zn-Cu kökte aynı yeri paylaşırlar)

ii) Cu beslenmesi bitki içindeki Zn dağılımını ve taşınımını etkiler.

Her iki elementin toprakta düşük olduğu durumda yapılacak bir element uygulaması diğer elementin alımını sınırlandıracaktır. Bakırca iyi beslenmiş bitkilere göre bakır-eksik beslenmiş bitkilerde en yaşlı yaprakların ölümü ve bu yapraklardan N, Cu ve Zn'nun taşınması durmuştur [92].

ii) Zn-Fe İnteraksiyonu

Çinko ve demir etkileşimi tıpkı Zn-P etkileşimi gibi kompleks görüldüğü bildirilmiş ancak Zn-P etkileşimi kadar çok fazla ilgi gösterilmemiştir. Besin çözeltisinde düşük düzeylerde ($10 \mu\text{M}$ Fe) bulunan demirin buğdayda çinko absorpsiyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Buna karşılık besin çözeltisinde yüksek demir konsantrasyonlarının ($100 \mu\text{M}$ Fe) kullanıldığı yerlerde

demir, 0.05 μM ZnCl_2 ve Ca içermeyen bir ortamda çeltikte çinkonun absorpsiyonunu oldukça azaltmıştır.

Demir eksikliği altındaki bitkilerde çinko absorpsiyonu ve yeşil aksamdaki çinko konsantrasyonu önemli miktarda artmıştır. Bu artış çift çeneklilerde demir eksikliğinde Strateji I bitkilerinin rizosfer pH'sını asidik yapmalarıyla ilişkili olabilir. Tahıllarda ise Strateji II bitkilerin demir eksikliği altında salgıladıkları fitosideroforların kireçli bir topraktaki çinkoyu şelatlamasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte fitosideroforların demir absorpsiyonundaki kadar kökte çinko absorpsiyonunu arttırmadığı belirlenmiştir. Bu bulgular demirin çinko absorpsiyonu üzerinde dolaylı bir etkisinin de olabileceğini ortaya koymaktadır. Çinko eksikliğinde hem Strateji I hem de Strateji II bitkilerinde yeşil aksamdaki demir konsantrasyonunu arttığı görülmüştür. Bu olasılıkla rizosfer pH'sındaki asitleşme ve köklerden salgılanan reduktantlar ve fitosideroforlarla ilişkilidir.

1.1.3 Biyoinformatik Analizler

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

Farklı yöntemlerle oluşturulan bu cDNA' lardan kütüphaneler kurulur ve buradaki cDNA ların nükleotit dizi bilgisinin çözülmesi ile EST' ler (ekspres olmuş dizi işaretleri) oluşturulur. EST oluşturulmasının amacı tüm bir organizma ya da organizmaların istenilen hücre, doku veya organları için özgün olarak anlatımı yapılan genlerin belirlenmesidir [95].

EST, dizin analizi sonucu elde edilen genom parçalarıdır [96]. EST' ler bilinmeyen genlerin tanımlanması ve yerlerinin tespit edilmesinde, gen ekspresyonu ve regülasyonu hakkında veri toplanması ve genom haritalarının oluşturulması konusunda kısa süreli ve ekonomik bir yol sağlar.

Gen tespit edilmesi işleminde, EST koleksiyonları için başlangıç materyalinin cDNA olması, genomik dizilere üstünlük sağlar. Genomun büyük bir kısmı gen kodlamayan bölgelerden oluştuğu için genomik dizilerden genlerin tespit edilmesi zordur. İşlevsel

genomik çalışmalarda elde edilen cDNA dizilerinin EST olarak değerlendirilebilmesi için ham dizilerin işlenmesi ve birleştirilmesi gereklidir. İşlenme, ham EST dizilerinin içerdiği vektör, adaptör ve düşük değerli dizilerin uzaklaştırılması ve verilerin daha iyi incelenmesi için temizlenmesidir. Temizleme için Phill Green'den PHRED ve CROSS-MATCH, TIGR'den Lucy ve SeqClean ile NCBI tarafından sağlanan VecScreen gibi programlar bulunmaktadır. Bu programın dışında CHROMAS programı da dizilerden vektör dizilerinin temizlenmesi için kullanılır. Birleştirmede önemli sorun kontig olarak bilinen dizilerin kalitesinin yüksekliğidir. Fragment birleştirmede PHRAP ve CAP3 programları kullanılır. Bu programlar ile elde edilen sonuçların GenBank veritabanında BLASTN ve BLASTP analizleri yapılır [97].

1.1.4 GenBank

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

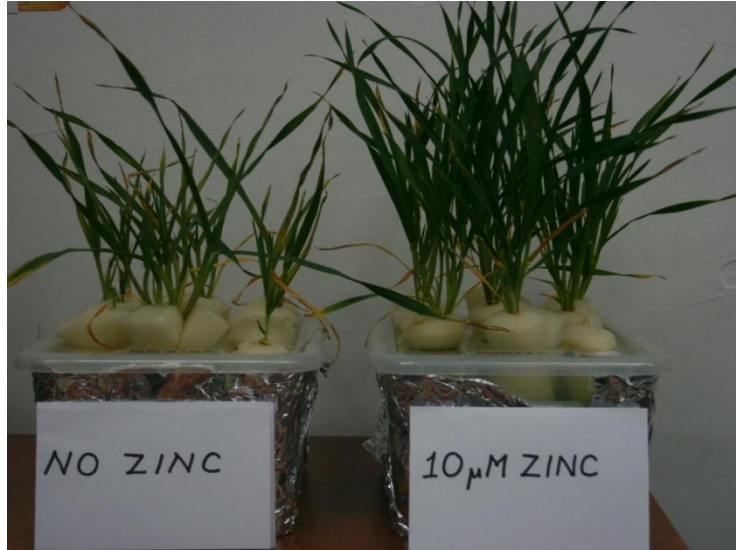
NCBI; GenBank araştırmacılarının doğrudan gönderdikleri dizi bilgileri ile oluşturulmaktadır. Diğer veri kaynakları ise, EST dizilerinin ve diğer dizileme merkezlerinin gönderdiği dizilerle oluşturulmaktadır.

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

1.2 Tezin Amacı

Tezin amacı, çinko-eksik ve normal koşullarda yetiştirilmiş *Hordeum spontaneum* C. Koch gövdesinden çıkarılmış RNA'lar kullanılarak kurulmuş SSH cDNA kütüphanesinden seçilmiş klonların analizleridir.

Hordeum spontaneum C. Koch gövde SSH kütüphanesi, laboratuvarımızda yürütülen bir araştırma projesi ve yüksek lisans çalışması kapsamında oluşturulmuştur [98]. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *Hordeum spontaneum* C. Koch (TR 62199) tohumları çimlendirildikten sonra, kaynakta belirtilen besin çözeltilerinde yetiştirilmiştir ve çinko kaynağı olarak $10 \mu\text{M Zn}_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1. 1 Kontrol grubu ve deney grubunda gözlemlenen farklılıklar, kontrol grubu $10 \mu\text{M}$ çinko içeren Hoagland besiyerinde büyütülürken, deney grubu çinko içermeyen Hoagland besiyerinde büyütülmüştür [98].

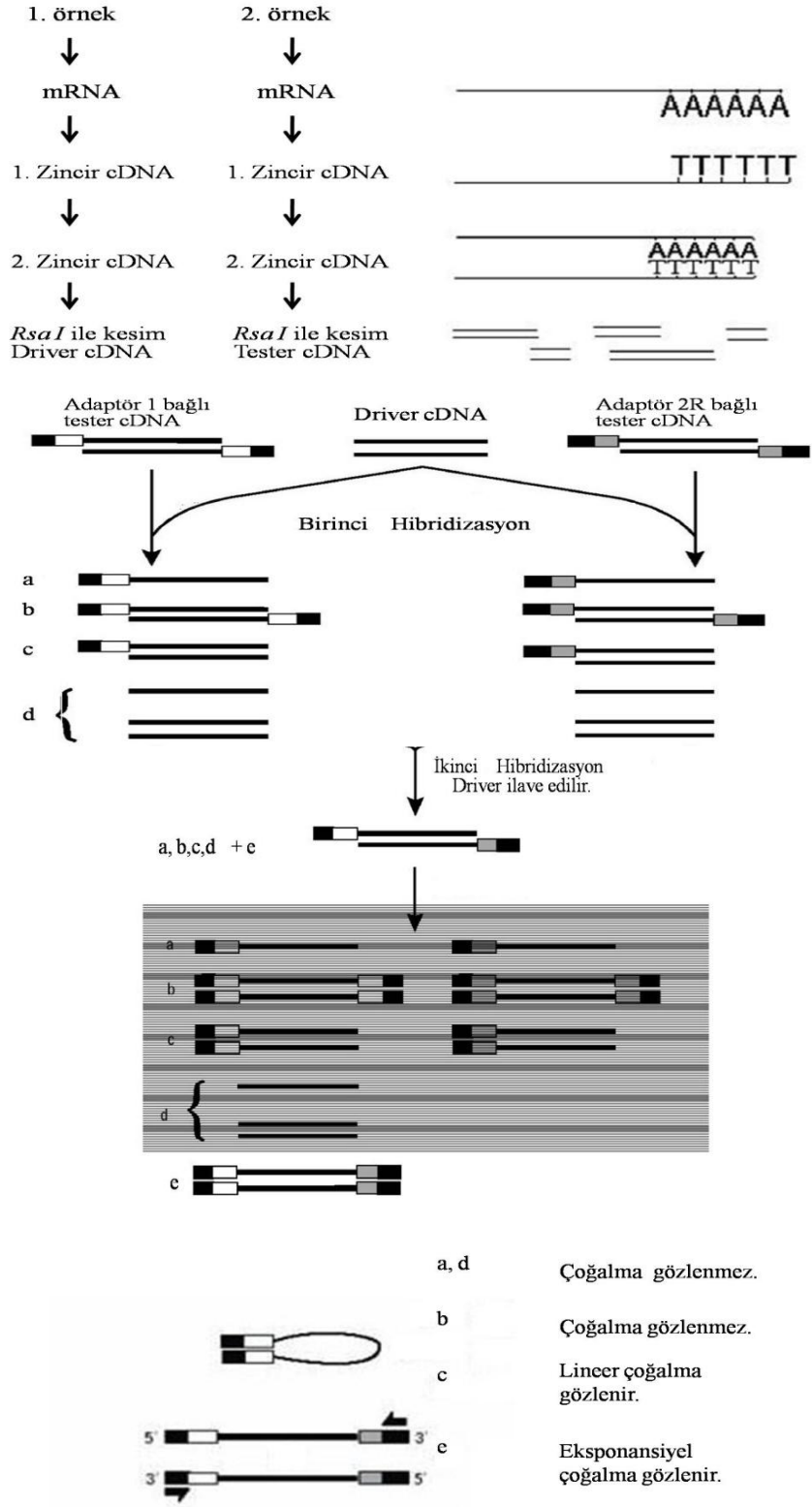
42 gün boyunca yetiştirilen bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımları ayrılıp bir kısmı, kurutulduktan sonra Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) ölçümleriyle deney grubunun çinko oranı ile kontrol grubunun çinko konsantrasyon oranları arasında farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 1.2). Sonuçlar deney grubundaki bitki kısımlarının çinko metal konsantrasyonunun düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca çinkonun en fazla miktarda yapraklarda toplandığı belirlenmiştir.

Çizelge 1.2 Bitki kısımlarının yaş ağırlıkları ve çinko içerikleri

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

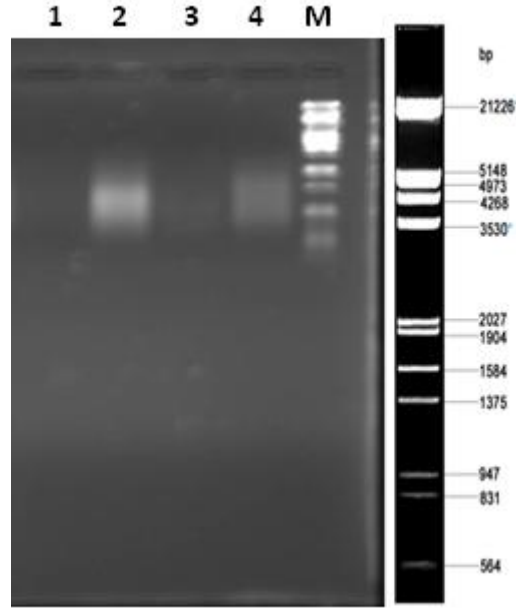
Kaynakta belirtildiği şekilde, bitki kısımlarından elde edilen total RNA kullanılarak, mRNA izolasyonu yapılmıştır.

Normal ve Çinko eksik koşullarda yetiştirilen *Hordeum spontaneum* C. Koch kök, gövde ve yapraklarından elde edilen mRNA'dan PCR-select cDNA Substraction işlemi kullanılmıştır. Çinko eksik ortamda yetiştirilmiş yabani arpadan hazırlanan mRNA'lardan (polyA⁺RNA) tester cDNA ve yine çinko normal ortamda yetiştirilmiş yabani arpadan hazırlanan mRNA' lardan da driver cDNA hazırlanmıştır.

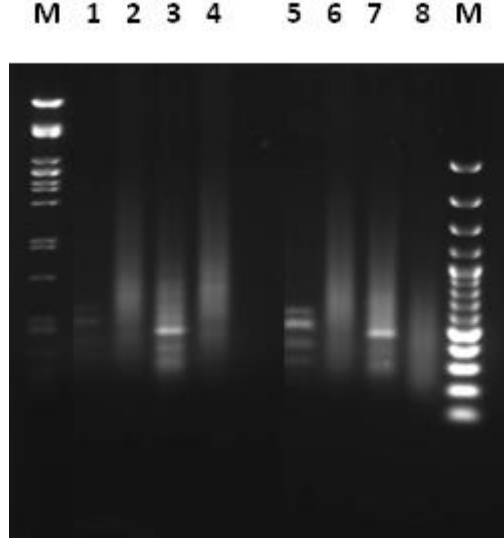


Şekil 1. 2 Baskılıcı çıkarım hibridizasyonu (Diatchenko vd., [99])

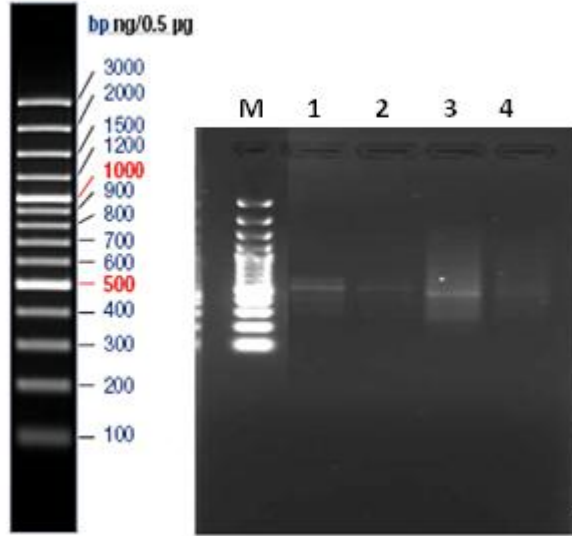
Elde edilen cDNA'ların uçlarına sentez primerleri ve adaptörlerin ligasyonu yapıp birinci ve ikinci hibridizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Birinci ve ikinci PCR ürünleri Şekil 1.3 ve 1.4 ve 1.5'de verilmiştir.



Şekil 1.3 Arpa bitkisinin gövde örneklerinden 1. PCR amplifikasyonun jel görünümü, 1. gövde çinkosuz çıkarım yapılmış, 2. gövde çinkosuz çıkarım yapılmamış, 3. gövde kontrol çıkarım yapılmış, 4. gövde kontrol çıkarım yapılmamış, M. marker Lambda

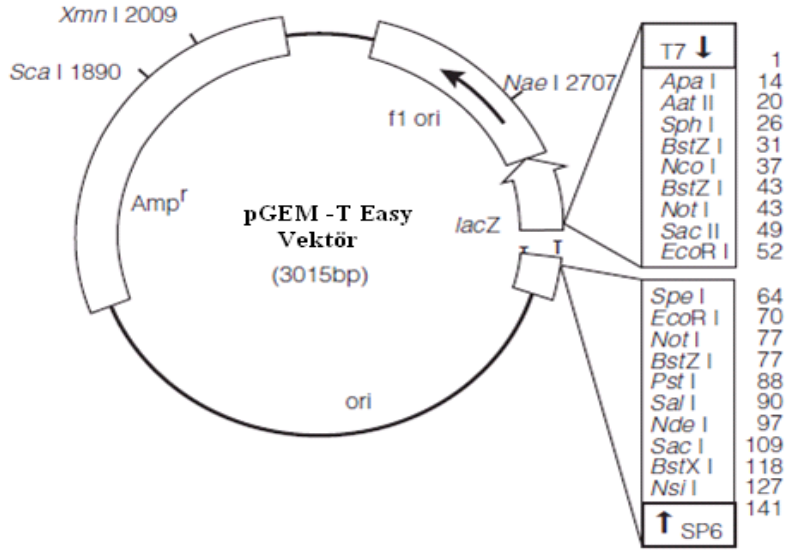


Şekil 1.4 Arpa bitkisinin gövde örneklerinden 2. PCR amplifikasyonun jel görünümü, M marker Lambda, 1. gövde çinkosuz çıkarım yapılmış seyreltilmiş, 2. gövde çinkosuz çıkarım yapılmamış seyreltilmiş, 3. gövde kontrol çıkarım yapılmış seyreltilmiş, 4. gövde kontrol çıkarım yapılmamış seyreltilmiş, 5. gövde çinkosuz çıkarım yapılmış, 6. gövde çinkosuz çıkarım yapılmamış, 7. gövde kontrol çıkarım yapılmış, 8. gövde kontrol çıkarım yapılmamış, Marker



Şekil 1.5 Arpa bitkisinin gövdesinden saflaştırılan PCR ürünlerinin jel görünümü, Marker 100bd, 1. gövde çinkosuz 1. elüsyon, 2. gövde çinkosuz 2. elüsyon, 3. gövde kontrol 1. elüsyon, 4. gövde kontrol 2. elüsyon

PCR işleminin ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM®-T Easy vektörü kullanılmıştır. pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi Şekil 1. 6'de verildiği gibidir.



Şekil 1. 6 pGEM®-T Easy vektörünün şematik gösterimi

PCR ürünleri saflaştırılıp, klonlandıktan sonra pGEM®-T Easy Vector System kitinde bulunan hazır kompetan JM109 hücrelerine transforme edilmiştir.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada Bölüm 1.2' de anlatıldığı gibi çinko eksik koşullarda yetiştirilmiş *Hordeum spontaneum* C. Koch gövdesinden elde edilen SSH kütüphanelerinden seçilen gövde klonlarının dizin analizinin yaptırılıp, çinko taşınımında rol alan önemli genlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Elimizde gliserol stokları bulunan ve PCR'a dayalı bir yöntemle kurulmuş 2784 klon içeren bir gövde cDNA kütüphanesi vardır. Bu kütüphaneden seçilmiş 672 klonun dizin analizi yaptırılarak bunların biyoinformatik analizlerle sistematik bir biçimde değerlendirilmesi yapılacaktır. Bu çalışma sonucunda *Hordeum spontaneum* C. Koch gövdesinde çinko eksik koşullarda fazla anlatım yapan genlere karşılık gelen cDNA'ların belirlenmesi öngörülmektedir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD

2.1 Besiyerleri

Besi Yeri	Hazırlanma şekli
Luria Broth (LB)	10g tripton, 5g yeast extract, 10 g NaCl karıştırılıp distile su ile 1L'ye tamamlandıktan sonra balıkla karıştırıcıda iyice çözülür ve otoklavda steril ettikten sonra, +4°C'de saklanır.
Luria Broth (LB) Agar	LB agar için, 1L LB için 15g agar eklenip, otoklavlanır ve bir miktar soğuduktan sonra petrilere dökülerek +4°C'de saklanır.

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

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

2.2 Tamponlar ve Solüsyonlar

Tampon veya Çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
Ampisilin stok solüsyonu	100 mg/ml ddSu ilave edildi. Filtreden geçirildi. -20°C'de bekletildi.
Etidyum bromid stok solüsyonu (EtBr)	5 mg/ml EtBr'e steril deiyonize su ilave edildi.

TBE çözeltisi (5X)	54 g Tris, 27,5 g Borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1L saf suya tamamlandı.
DNA Loading çözeltisi	1mM EDTA, pH 8.0, % 0.4 bromfenol mavisi ve %50 gliserol karışımı, DEPC'li su ilave edildi.

2.3 Moleküler Markırlar

Pst1'le kesilmiş DNA/EcoRI+HindIII	Lambda	%1'lik agarozda 21226 bp ile 564 bp arasında toplam 11 bant gözlenir.
------------------------------------	--------	---

2.4 Enzimler

EcoRI	Fermentas
-------	-----------

2.5 Kitler

Plasmid izolasyon Kiti	Roche High Pure Plasmid Isolation Kit
------------------------	---------------------------------------

2.6 Kullanılan Oligonukleotid ve Vektör Dizinleri

Larsson ve ark. [100]' deki makalesinden GADPH F1 ve GADPH R1 primerleri Alfa DNA firmasına sentezlettirildi. Adaptör 1 ve adaptör 2R primerleri SSH kitinde bulunmaktadır.

Primer adı	Primer dizini
cDNA sentez primeri, pr16	5'-TTTT GTACAAGCTT - 3'
Adaptör 1	5' GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGG CAGGT -3' , 3'-CCCGTCCA-5'
Adaptör 2R	5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGG GCGGT -3' , 3'-GCCTCCCGCCA-5'

PCR primerleri	P1 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC - 3' P2 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA - 3' PN1 5'-TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT - 3' PN2 5'-AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT - 3'
----------------	---

2.7 Kullanılan Programlar

2.7.1 Cygwin

Cygwin MS-Windows'un herhangi bir modern versiyonunu kullananlar için kurulmuş Unix-benzeri çalışma ortamı sağlayan ve ücretsiz indirilebilen bir yazılımdır [101]. Cygwin'in asıl amacı Unix türevi sistemlerde yer alan yazılımların Windows işletim sisteminde çalışmasını sağlamaktır. Phred, Phrap, CAP3 ve Chross-Match gibi Unix türevi biyoinformatik yazılımlar Cygwin üzerinden işletilebilir.

2.7.2 Phred ve Phrap

Washington Üniversitesi'nden Phil Green ve grubunun oluşturduğu unix paketler programıdır. Söz konusu programlar akademik kullanıcı olarak istenmiştir [102].

Bu programlar Cygwin programı kullanılarak çalıştırılmıştır. Phred analiz sonucu elde edilen dizilerden vektör ve kötü kaliteli dizilerinin uzaklaştırılması için ve Phrap de örtüşen dizilerin birleştirilmesi için kullanılır.

2.7.3 CAP3

CAP3, analiz sonucu elde edilen dizin verilerini kullanarak örtüşen dizinleri birleştirmek üzere kullanılan Phrap'e alternatif daha güvenilir sonuçlar veren bir programdır. Phred programının oluşturduğu baz quality değerlerini kullanır ve dizinlerdeki kalitesiz bölgeleri keserek consensus dizinleri oluşturur.

2.7.4 Cross-Match

Vektör dizinlerini uzaklaştırmak için kullanılan ve Cygwin üzerinden komutla çalıştırılabilen bir programdır. Vektör ve adaptör dizinlerini içeren Fasta formatlı

oluşturulmuş bir text dosyasını referans olarak aynı anda çok sayıda dizinde bu dizinleri işaretleyebilmemize olanak sağlar.

İnternette indirilebilen Chromas programına alternatiftir, Cross-Match programı aynı anda çok sayıda örnekle çalışmamıza olanak verdiği için bu çalışmada tercih edilmiştir.

2.7.5 BEAP

Koltes ve arkadaşları (2009) tarafından geliştirilen bu program Phrap ve CAP3 programları ile oluşturulan konsensus (kontig) dizilerinin kontrolünde kullanılır. Phrap ve CAP3 ile oluşturulan “.ace” uzantılı dosyayı input olarak kullanır ve oluşturulan herbir kontig için onları oluşturan EST’ler ile bunların örtüşme biçimlerini gösterir.

2.7.6 VecScreen

Kaynak [103]’de verilen adresten ulaşılabilen VecScreen programı, girilen EST dizinlerinde istenmeyen vektör dizinlerinin olup olmadığını gösteren bir çevrimiçi programdır. Vektör ve adaptör dizinleri uzaklaştırılmış dizinlerde herhangi bir kontaminasyon olup olmadığı, bu program ile kontrol edilir.

2.7.7 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Kaynak [104]’da verilen adresten Çevrimiçi erişebilen ve dizinler arasındaki benzerlikleri bulan BLAST programı girilen nükleotid yada protein dizinlerini veri tabanındaki dizinlerle karşılaştırır ve benzerliklerin istatistiksel anlamlarını hesaplar. BLAST gen ailelerinin üyelerinin belirlenmesinin yanısıra dizinler arasındaki fonksiyonel ve evrimsel ilişkileri anlamak için de kullanılabilir.

BLAST programı, “BLASTN”, “BLASTP”, “BLASTX”, “TBLASTN” ve “TBLASTX” gibi programları içerir. “BLASTN” programı, girilen nükleotid dizilerini, nükleotid veri tabanında tarar. “BLASTP”, nükleotid dizinlerinden elde edilen protein bilgisini veri olarak kullanarak; “BLASTX” ise girilen nükleotid dizinlerini protein dizinlerine çevirerek, protein veritabanı üzerinde benzerlik taramasını gerçekleştirir. “TBLASTN” girdi olarak protein bilgisini kullanarak ve “TBLASTX” ise girilen dizin verisini protein

bilgisine çevirerek, çevrilmiş nukleotid veri tabanında benzerlik taramasını gerçekleştirir.

Bunlar dışında, çalışmamızda kullandığımız VECSCREEN gibi özelleştirilmiş BLAST araçlarına yine site üzerinden erişebilir ve kullanılabilir.

Çalışmamızda *Hordeum spontaneum* C. Koch gövdesinden elde edilen EST'lerin BLASTP analizleri için dizinlerin protein bilgisi kullanıldı. Klonlama yönlü olmadığından doğru protein kodlayan dizinin vektöre yerleşme şansı 1 /6' dır. Ayrıca dizin okumalarındaki olası yanlışlıklar frame kaymalarına neden olabilir. Bu nedenlerle [105]' deki internet programında kontik ve singletlere ait proteinlerin 1., 2. ve 3. framelerde aminoasit dizin bilgisi oluşturuldu. Her üç frame için BLASTP analizleri yapıldı. Aynı işlem ters tamamlayıcı zincirin 1., 2. ve 3. frameleri için de yapıldı.

2.8 Gövde SSH Kütüphanesinde Rekombinant Plazmid Kontrolü

2.8.1 Plazmid İzolasyonu İçin Örnek Kolonilerin Seçimi ve Büyütülmesi

Gövde SSH kütüphanesinin rekombinant plazmid içermesi bakımından kalitesini değerlendirebilmek açısından, her bir 96'lık plateden 4'er örnek seçilerek cDNA'ları izole edilip agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Bu işlem için seçilen örnekler LB agar besiyerine öze yardımıyla çizgi ekim yapılarak bir gece büyütüldüler. Katı besiyerinde büyütülen örneklerden birkaç koloni seçildi. 4'er ml LB sıvı besiyeri içeren steril falcon tüplere 100 µl/ml olacak şekilde 40 µl ampisilin antibiyotiği eklendi. Seçilen koloniler ampisilinli LB besiyerine yine öze ile ekildi. İnkübatörde 37°C'de 220 rpm'de overnight büyütüldü.

2.8.2 Plazmid İzolasyonu

2 ml'lik eppendorflar etiketlenip, falconda over night büyütülen örneklerden 2'şer ml eppendorflara konularak 6000xg'de 1 dakika santrifujlenip süpernatantı atıldı. Falcondaki örnekler bitene kadar işlem tekrarlanarak pelletin birikmesi sağlandı. 250 µl suspansiyon buffer eklendi ve elde iyice çalkalanarak pelletin çözünmesi sağlandı. Suspansiyonun üzerine 250 µl lysis buffer eklenip tüpler elde 3-6 kez ters çevrilerek karışması sağlandı. Bu şekilde 5 dakikayı beklendi. 350µl soğutulmuş binding buffer

eklendi ve yine 3-6 kez ters-düz edilerek karışması sağlandı. Bu karışım 5 dakika buz üzerinde bekletildi. 10 dakikak 13000xg'de santrifüj yapıp, supernatant pipet yardımıyla kit içindeki filtreli tüplere alındı ve 1 dakika santrifuj edilerek alttaki süzüntü döküldü. Filtre üzerine 500 µl wash buffer I eklenip, 1 dakika santrifuj edilip, süzüntü tekrar döküldü. 700µl wash buffer II eklenip, 1 dakika santrifuj edilerek süzüntü döküldü. Filtreli tüpler 1 dakika boş (bir şey eklemeden) santrifuj edildi. Bulaş olmaması için süzüntü dökülmeden filtreler önceden etiketlenmiş 1,5ml'lik eppendorflara aktarıldı. Filtrelere 100µl elüsyon buffer veya PCR suyu eklenip (biraz bekletilip) 1 dakika 13000xg'de santrifujlendi. Plazmidler elute edilmiş olup filtreden süzülerek -20°C'de saklandı.

2.8.3 Plazmid Kesim

İzole edilmiş plazmidlerden 6'şar µl pipetlenip 200µl'lik PCR tüplerine eklendi. 2µl EcoRI tamponu, 11 µl steril su (ddH₂O) ve 1µl EcoRI enzimi eklendi. Karışması için 10 saniye kadar santrifujlendi 37°C'de 2 saat kesim yapıldı ve 85°C'de 10 dakika ısıtılarak kesim reaksiyonu durduruldu.

2.8.4 Agaroz Jelde Analiz

0,75 g agaroz tartılıp, 75 ml 1X TAE eklendi. Mikrodalgada 360 °C'de 4 dakika ısıtılarak eritildi. Etüvde 60°C'ye soğutulduktan sonra 3 µl EtBr eklenip karıştırılarak jel tepsinine döküldü. Jel donduktan sonra tanka jeli kapatacak şekilde 1X TAE eklendi.

Kuyucuklara 6X yükleme tamponundan 1,6 µl ve 8,4µl örnek karıştırılarak toplam 10µl yükleme yapıldı. 75 Voltta yürütüldü.

2.9 Rekombinant Kolonilerin 96' lık Kültür Kaplarına Aktarımı ve Gliserol

Stoklarının Hazırlanması

96' lık Greiner kaplarına çok kanallı pipetlerle 100'er µl LB besiyeri konuldu ve LB'da büyütülmüş stok replikalardan 10'ar µl çekilerek yine çok kanallı pipetlerle eklenerek, 37 °C' de bir gece büyütüldü. İnkübasyon sonrasında 40 µl % 70' lik gliserol ilave edilerek -80 °C' de saklandı. Replikalarda; örneklerden 10 µl, 100 µl LB ve 40 µl % 70' lik gliserol kullanıldı. Örnekler -80 °C' de saklandı.

2.10 Kolonilerin Dizin Analizine Gönderilmesi

Stok kültürlerden gövdeye ait 672 koloni içeren 7 kap dizin analizi için BIOGEN firması aracılığıyla Almanya GATC Biotech firmasına gönderildi.

2.11 Biyoinformatik Analizler

Gövde SSH kütüphanesinden gönderilen 672 koloninin dizin sonuçları “.seq”, “.ab1” ve “.fas” uzantılı dosyalar halinde elde edildi.

Gövde dizin analiz sonuçlarındaki “.seq” uzantılı dosyalar CYGWIN programıyla tek bir dosya halinde toplandı ve vektör ve adaptör dizileri “CROSS-MATCH” programıyla uzaklaştırıldıktan sonra CAP3 programıyla kontig ve singletler oluşturuldu. Vektör ve adaptör dizin kontaminasyonunu kontrol etmek için çevrimiçi erişilen ve GenBank’ın veritabanını kullanan VecScreen programı kullanıldı. Oluşturulan kontigler BEAP programıyla kontrol edilerek kontigleri oluşturan EST’ler ve örtüşme biçimleri gözlemlendi. Kontig ve singletlerin BLASTN ve BLASTP analizleri yine GenBank veritabanını kullanan web sitesi üzerinden benzerliklerine bakılarak karşılaştırıldı. BLASTP analizleri için Frame 1, 2 ve 3 protein bilgileri oluşturuldu.

Dizinlerin biyoinformatik analizleri için, CYGWIN programı kullanıldı. Dizin sonuçlarından tüm *.seq uzantılı dosyalar ayrı bir dosyaya kopyalandı. Bu dosya “seqgovde” olarak adlandırıldı. Tüm seq dosyalarını tek bir sayfada toplamak için PHRED programı kullanıldı. Bilgisayarda kurulu Cygwin programına ilk olarak Phred programının konumu girilerek program tanıtıldı. Bunun için şu komutlar kullanıldı.

```
set PHRED_PARAMETER_FILE=/home/senay/proje/phredpar.dat
```

```
export PHRED_PARAMETER_FILE=/home/senay/proje/phredpar.dat
```

Daha sonra “proje” adlı dosya ve altdosyası olan “seqgovde” dosyasına girmek için ve bu dosyadaki tüm “*.seq” uzantılı dosyaları hedefleyip tek bir dosyada toplayabilmek için şu komutlar kullanıldı.

```
cd proje
```

```
cd seqgovde
```

```
files=*.seq
```

cat \$files > fasta_seq

Artık tüm .seq uzantılı dosyalar "seqgovde" dosyası içinde fasta_seq adında toplanmıştır. Dizinlerden vektör ve adaptör dizinlerini uzaklaştırmak için CROSS-MATCH programı kullanıldı. "seqgovde" dosyası içine kopyalanan "vector.seq" dosyasında kütüphanelerin klonlandığı pGEM®-T Easy vektörüne ve Adaptör 1 ve 2R'ye ait uzaklaştırmak istenen dizinler bulunmaktadır.

```
./cross_match.exe fasta_seq vector.seq -minmatch 8 -minscore 15 -screen > screen.out
```

komutu girilerek dizinlerdeki vektör ve adaptör dizileri X ile işaretlenmiş oldu. Dosya fasta_seq.screen isimiyle oluşturuldu. WordPad ile açılabilen bu dosyada X işaretli dizinleri uzaklaştırabilmek için Düzen (Edit) menüsünden Değiştir (Replace) seçeneği seçilerek X'ler aranarak boş bırakılan yeni değerle "Tümünü Değiştir" seçeneği seçilerek değiştirildi ve "fasta_seq.screen.filter" adıyla kaydedildi. Vektör ve adaptör dizinlerinin tam olarak temizlenip temizlenmediğini kontrol etmek için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html> sitesinden VECSCREEN programı kullanıldı. Cross-Match komutundaki parametreler VecScreen ile kontrol edilerek farklı şekillerde denendi ve kontaminasyonun en iyi -minmatch 8 ve -minscore 15 olduğu durumda temizlendiği görüldü.

Adaptör ve vektör dizinleri çıkarılmış dizinlerin konsensus (kontig) dizinlerini oluşturmak için CAP3 programı kullanıldı. Bunun için yine Cygwin üzerinde şu komut girildi.

```
./cap3.exe fasta_seq.screen
```

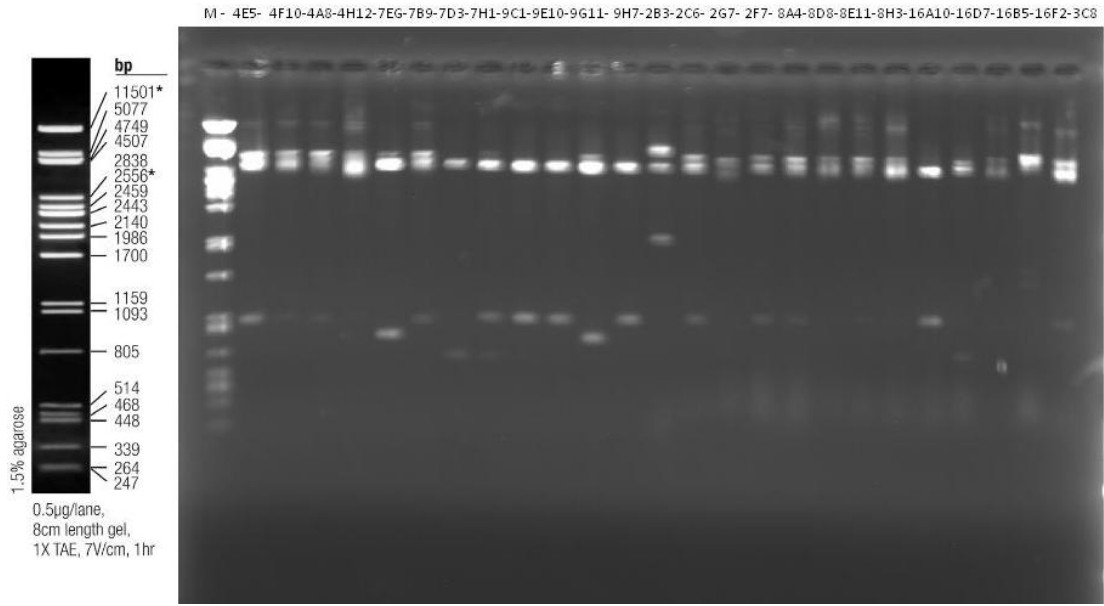
Bu komutla CAP3 programı contig ve singletleri oluşturarak .contigs ve .singlets uzantılı olarak kaydetti.

Kontigler BEAP programı ile kontrol edildi. BEAP programı ".ace" uzantılı dosyaları açan ve kontigleri oluşturan EST'leri ve örtüşme biçimlerini gösteren bir programdır. Elde edilen tüm kontig ve singletlerin BLASTN ve BLASTP analizleri <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> web sitesi üzerinden yapılarak GenBank veritabanı ile karşılaştırıldı.

SONUÇ VE ÖNERİLER

3.1 Plazmid İzolasyonu

SSH cDNA kütüphanesinden seçilen koloniler, LB besiyerinde büyütüldü ve rastgele seçilen 25 koloniden plazmid izolasyon kitindeki protokole uygun olarak izole edilen plazmidler *EcoRI* enzimiyle kesildikten sonra agaroz jelde yürütüldü. pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesinin iki tarafında yer alan *EcoRI* kesim bölgelerinin arasında 20bp olduğundan rekombinant olmayan plazmidler kesildiğinde yaklaşık 20bp'lık bir fragman görülmelidir. 25 ayrı klondan elde edilmiş plazmidlerin 23 tanesinde 800bp ile 1900bp arasında cDNA'lar olduğu görüldü (Şekil 3.1). Buradan da SSH kütüphanesinin %90 rekombinant yüzdesine sahip olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 3.1 Kütüphaneden rastgele seçilen kolonilerden izole edilip, PCR kesimleri yapılmış plazmidler

3.2 Biyoinformatik Analizler

3.2.1 EST'lerin Hazırlanması ve Kontig – Singletlerin Oluşturulması

GATC Tech 'den gönderilen dosyalardaki dizin analiz sonuçlarından “.seq” uzantılı olanları Cygwin programı ile WordPad ile açılabilen “fasta_seq” adında tek bir dosya içinde topladık (Şekil 3.2). Arpanın gövde kısmına ait 657 dizinin vektör ve adaptör dizileri Cross-Match programıyla işaretlenip, silindi (Şekil 3.3).

A

VecScreen

www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html

NCBI

BLAST PubMed Entrez Nucleotide Genome

NCBI Homepage

Contamination
Definition
Sources
Consequences
Detection

VecScreen
Overview
Example
Search Parameters
Match Categories
Interpretation
Exceptions

UniVec Database
Overview
Redundancy
Elimination
Benefits
Pseudo-Circularization
Vectors Represented
Statistics
Sources
Limitations

Screen a Sequence Using VecScreen

Enter your query sequence below as an Accession, GI, or FASTA.

CGGCCTCTCGTGAACACAAGCATGAGCATGCCATGAGAGTCTGGGCCTC
AAACATGACAGGTCCTAATGATGGTTGACCCAGCATATCAATGACAATCA
CCTTCCCTCCCTCCTCAGGGAAGGAATGGCATTCTTACACTGGGTTAGG
ATCTTACACAATCGTCTCACTCCAGTGGTGCAGCACAAGCTTGAGCAT
CACGGCCTGAGCCTTTGGGGCAGTGTGGAACAGGTCACCAGCGACATAGT
TGACTACACAGTCAGATGGAGTTTTTCTATGACCTTGGGG

Run VecScreen Clear Input

About VecScreen

VecScreen is a system for quickly identifying segments of a nucleic acid sequence that may be of vector origin. NCBI developed VecScreen to combat the problem of vector [contamination](#) in public sequence databases. This Web page is designed to help researchers identify and remove any segments of vector origin before sequence analysis or submission.

Failure to recognize foreign segments in a sequence can:

- lead to erroneous conclusions about the biological significance of

B

NCBI BLAST: Nucleotide Sequence

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI BLAST/ vector contamination/ Formatting Results - 1S2VDA2E01N

Formatting options Download

Vecscreen

Query ID	lcl 61505	Database Name	screen/UniVec
Description	None	Description	UniVec (build 7.0)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.26+ Citation
Query Length	440		

Interpretation of VecScreen

No significant similarity found. For reasons why, click here

Other reports: [Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#)

BLAST is a registered trademark of the National Library of Medicine.

Copyright | Disclaimer | Privacy | Accessibility | Contact | Send feedback

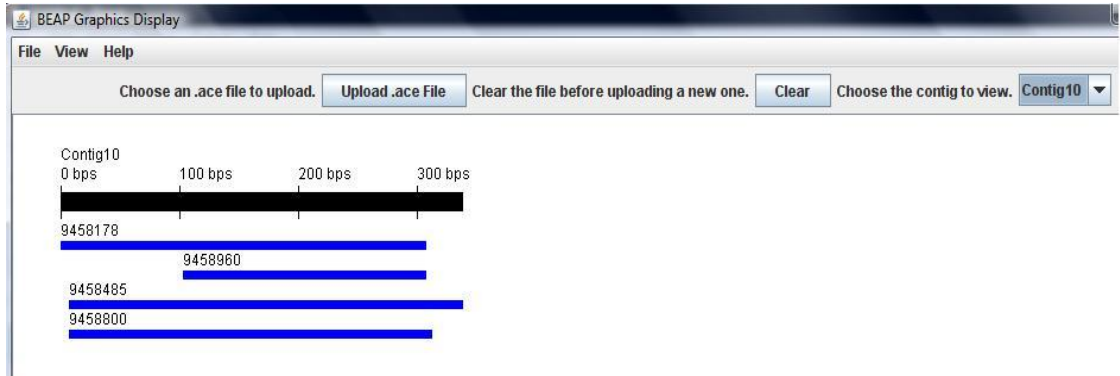
NCBI

Şekil 3.4 VecScreen programının web sitesi görünümü; A resminde tarama yapılacak dizin girildi, B resminde ise vektör dizisine ait kontaminasyonun kalmadığı gösterildi.

VecScreen programının, AGCAGGGTTATGCAGC dizinlerini vektör kontaminasyonu olarak göstermesine karşın bazı dizinlerin kendi içerisinde bulunduğunu belirleyerek vektör olmadığı sonucuna varıldı. Ayrıca BLAST sonuçlarında da çeşitli vektörlerle benzerliğinin yanı sıra *Hordeum vulgare* C. Koch 'ye ait protein için mRNA'ya denk geldiği görüldü.

Vektör ve adaptör dizinlerinin uzaklaştırılmasının ardından, EST fragmentlerinin eşleştirme işlemi CAP3 ve Phrap programı ile ayrı ayrı yapıldı. Bu programlarla örtüşen dizinler (kontig oluşturan) ve örtüşmeyen dizinler (singlet oluşturan) belirlendi.

BEAP programıyla, CAP3 ve Phrap programlarıyla oluşturulan kontigleri oluşturan EST'ler ve örtüşme biçimleri kontrol edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 BEAP programında 10. Kontigi oluşturan EST'ler ve bu dizilerin örtüşme biçimleri

3.2.2 BLAST Analizleri

3.2.2.1 Gövde Kontig BLAST Analizleri

Gövdeye ait cDNA kütüphanesinden CAP3 ve PHRAP programları kullanılarak iki ayrı kontig seti oluşturuldu. Aynı cDNA'lar kullanılarak Phrap programıyla 19 ve CAP3 programıyla 17 adet kontig elde edildi.

NCBI/ BLAST/ blastn suite

Standard Nucleotide BLAST

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

From

To

Or, upload file No file chosen

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Optional

Enter organism name or id--completions will be sug Exclude +

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Exclude Optional Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Entrez Query Optional

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with + sign

Şekil 3.6 NCBI veritabanı BLASTN aracı web sitesi görüntüsü

BLASTN analizlerinin sonuçları üç bölüm halindedir. Birinci bölüm, EST dizisinin özelliği hakkında bilgi verir. İkinci bölüm analizi yapılan dizin ile benzerlik gösteren dizinleri ve bu dizinlerin analiz sonuçlarını gösterir.

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

Üçüncü bölüm ise benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotit düzeyinde benzerliklerini verir (Şekil 3.7).

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

A

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite/Formatting Results - 2NP1ETVJ016

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Nucleotide Sequence (360 letters)

Query ID |cl|15151
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 360

Database Name nr
 Description All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Program BLASTN 2.2.27+ >Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Distribution of 15 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

Query 1 70 140 210 280 350

B

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer Put

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AK357755.1	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv1061E09	579	579	92%	6e-162	98%	U
BT009434.1	Triticum aestivum done wimk4.pk0003.f5.fis, full insert mRNA sequence	547	547	92%	2e-152	96%	G
XM_003572334.1	PREDICTED: Brachypodium distachyon succinyl-CoA ligase [ADP-forming	470	470	90%	4e-129	93%	U G
NM_001053999.1	Oryza sativa Japonica Group Os02g0621700 (Os02g0621700) mRNA, c	431	431	91%	2e-117	91%	U G
AK103523.1	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J03313K22, full insert sequer	431	431	91%	2e-117	91%	U
AK101005.1	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:J023148E03, full insert sequer	431	431	91%	2e-117	91%	U E G
EU967286.1	Zea mays done 306053 succinyl-CoA ligase beta-chain mRNA, complete	412	412	89%	7e-112	90%	U G
NM_001157181.1	Zea mays succinyl-CoA ligase beta-chain (LOC100264286), mRNA >gb	407	407	89%	3e-110	89%	U G
XM_002452426.1	Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	392	392	88%	9e-106	89%	U G
NM_001157721.1	Zea mays succinyl-CoA ligase beta-chain (LOC100264826), mRNA >gb	390	390	88%	3e-105	89%	U G
BT029713.1	Zea mays full-length cDNA done ZM_BFC004010 mRNA, complete cds	390	390	88%	3e-105	89%	U G
HQ289586.1	Triticum aestivum done UCDA00117 genomic sequence	202	286	48%	2e-48	98%	U G
HQ289585.1	Triticum aestivum done UCDA00116 genomic sequence	202	202	36%	2e-48	95%	U G
AP004033.3	Oryza sativa Japonica Group genomic DNA, chromosome 2, BAC done:C	187	187	36%	4e-44	92%	U G

C

Alignments

Select All Get selected sequences Distance tree of results

```
>|dbj|AK357755.1| Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete
cds, clone: NIASHv1061E09
Length=1615

Score = 579 bits (313), Expect = 6e-162
Identities = 328/334 (98%), Gaps = 6/334 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 14 ACCTGCCAAITTTCTTGTAGTGTGGTGGGAGCGCATCCGAGGGACAGGTCNGTGGAGCAI 73
          |||
Sbjct 1072 ACCTGCCAAITTTCTTGTAGTGTGGTGGGAGCGCATCCGAGGGACAGGTC-GTGGAGCAI 1130

Query 74 TTAAGATATTGACTTCAGATGATAGAGTGAAGGCAATCTNAGTTAACATTTTGGAGGI 133
          |||
Sbjct 1131 TTAAGATATTGACTTCAGATGATAGAGTGAAGGCAATCT-AGTTAACATTTTGGAGGI 1189

Query 134 ATCATGAAATGTGATGTGATAGCAAGTGGAAANTAGTGAATGCAGCTAACAGGTTGATCT 193
          |||
Sbjct 1190 ATCATGAAATGTGATGTGATAGCAAGTGGAA-TAGTGAATGCAGCTAACAGGTTGATCT 1248

Query 194 TAAGGTCCTGTTGTTGTTTCGGNCTAGAAGGCACCAATGTAGACCAAGGAAAAGGATTCT 253
          |||
Sbjct 1249 TAAGGTCCTGTTGTTGTTTCGG-CTAGAAGGCACCAATGTAGACCAAGGAAAAGGATTCT 1307

Query 254 TTAAGGAAAGTGGNAATGACATTGATCACTGCAGAGGATCTTGATGATGCTGCCGAGAAG 313
          |||
Sbjct 1308 TTAAGGAAAGTGG-AAATGACATTGATCACTGCAGAGGATCTTGATGATGCTGCCGAGAAG 1366

Query 314 GCTGNTAAAAGCATCGGTCAAATGATTAATGATT 347
          |||
Sbjct 1367 GCTG-TAAAAGCATCGGTCAAATGATTAATGATT 1399
```

Şekil 3.7 Arpa bitkisinin gövdesine ait Kontig 2 dizisinin BLASTN sonuçlarının NCBI veritabanı web sitesi görüntüsü. A: Birinci Bölüm, B: İkinci Bölüm, C: Üçüncü Bölüm

Tüm kontiglerin DNA ve protein düzeyinde BLAST analizleri gerçekleştirildi. CAP3 ve PHRAP programlarıyla benzerlikleri bulunan kontig dizilerinin nükleotid düzeyinde

analizleri için “BLASTN” ve protein düzeyinde analizleri için ise “BLASTP” araçları kullanıldı.

Cap3 ile oluşturulan kontiglerin BLAST analizi sonuçları Ek- A’da ve Phrap ile oluşturulan kontiglerin BLAST analiz sonuçları Ek-C’de verildi.

3.2.2.2 Gövde Singlet BLAST Analizleri

CAP3 ve Phrap programları kullanılarak oluşturulan singletlerin de nükleotid ve protein düzeyinde BLAST analizleri kontiglerde olduğu gibi her bir program için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Cap3 ile elde edilen singletlerin BLAST analiz sonuçları Ek-B’de ve Phrap ile elde edilen singletlerin BLAST analiz sonuçları Ek-D’de verildi.

3.2.3 Gövde Kontig ve Singlet BLAST Sonuçlarının Değerlendirilmesi

BLASTN analizlerinde Cap3 programıyla elde edilen kontiglerden Kontig 1’in “Lipid Transfer Proteini (LTP)”ne benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Phrap kontiglerinden ise Kontig 9 lipid transfer proteinlerine benzerlik göstermektedir. Cap3 programıyla oluşturulan Kontig 1, 6 cDNA (16R_A09-T7, 2R_D11-T7, 7R_B05-T7, 7R_G02-T7, 9R_D09-T7 ve 8R_D11)’dan meydana gelirken; Phrap programıyla oluşturulan Kontig 9, 3 farklı cDNA (9R_A05-T7, 2R_G04-T7 ve 2R_C03-T7)’dan meydana gelmektedir. Bu kontigler protein düzeyinde de aynı benzerliği vermektedirler.

Fakat, Phrap programıyla elde edilen Kontig 9’u oluşturan cDNA’ların her birinin nükleotid BLAST analiz gerçekleştirildiğinde dizinlerin LTP’ye benzerlik göstermediği görülmüştür. Bu nedenle kaynak [106]’de verilen web sitesi üzerinden kullanılabilen bir araç olan Clustalw ile Phrap programıyla elde edilen Kontig 9’un dizininin kontigin kendisini oluşturan cDNA’larla alignmenti yapılarak kontrolleri yapılmıştır (Şekil 3.8). cDNA dizinleri %100 benzer görünmektedir fakat oluşan kontigin birçok bölgesi farklı cDNA’lardan oluşmaktadır. Phrap programı ve CAP3 programı ile oluşturulan diğer kontigler karşılaştırıldığında Phrap kontiglerinde buna benzer anlamsız sonuçlar ve farklılıklar görülmüştür.


```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

9458016      GCCGAAAAGGGCACCTCT-TCAGTTGGTTTTGATCAAATCCTCAATTAT 49
9458795      GCCGAAAAGGGCACCTCT-TCAGTTGGTTTTGATCAAATCCTCAATTAT 49
9458004      GCCGAAAAGGGCACCTCT-TCAGTTGGTTTTGATCAAATCCTCAATTAT 49
fasta_seq.screen.Contig9      GTCCTCC-----CCTCTCTCTCCCATGG---AGATCATAACAGAGGATT 42
* * . . . . * . ***** **,*;***      ;*****;*.* . . . ;*:*

9458016      TTTCGAGCTATTTGTTTGTGTTTTGAGTTTGTAGCTGCGCATCCAAATTTTGTCTA 99
9458795      TTTCGAGCTATTTGTTTGTGTTTTGAGTTTGTAGCTGCGCATCCAAATTTTGTCTA 99
9458004      TTTCGAGCTATTTGTTTGTGTTTTGAGTTTGTAGCTGCGCATCCAAATTTTGTCTA 99
fasta_seq.screen.Contig9      ATTCAIG-TATAIGTAT-----AIATGCGTATG-----TGACCTC 76
;***.*; * **;*;***;*      * .***** **      **; **;

9458016      CAAAGGCATTTCTTTGTAATCAGAAGCTGTGGCTGGAACAACACCCGAGAG 149
9458795      CAAAGGCATTTCTTTGTAATCAGAAGCTGTGGCTGGAACAACACCCGAGAG 149
9458004      CAAAGGCATTTCTTTGTAATCAGAAGCTGTGGCTGGAACAACACCCGAGAG 149
fasta_seq.screen.Contig9      AACCTGCCAAGCGTCGATCGCTGGAGGTATG-----AGCGGCTATGATGG 121
. . . . **; . . . * * * . . . * . * . * . . . * . . . . . . . . . . . .

9458016      TAGATCAGTATGTAAGTTACCCCCCTTGTAACTGACAACGGGACCACC 199
9458795      TAGATCAGTATGTAAGTTACCCCCCTTGTAACTGACAACGGGACCACC 199
9458004      TAGATCAGTATGTAAGTTACCCCCCTTGTAACTGACAACGGGACCACC 199
fasta_seq.screen.Contig9      AAG--CAG-----GAGTTTCGATCAGTGG--ATCTTGGAGCAGTCCGACACT 162
:* * * * . . . . . . * . * * * * * * . . . . . . . . . . . .

9458016      TGCAC TTATATTATCATGCAAGGCTACAATTGCGATTTT---AAAAAAA 246
9458795      TGCAC TTATATTATCATGCAAGGCTACAATTGCGATTTTAA-AAAAAAA 248
9458004      TGCAC TTATATTATCATGCAAGGCTACAATTGCGATTTTAAAAA 249
fasta_seq.screen.Contig9      GGCGCTGATCGTGTAGGGGACG-CTGACGCGCCGACCTGG---AGGGGATG 208
*.* ** * . * . . * . * * . . . . * . . . *      * . . . . * . .

9458016      AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTA----- 266
9458795      AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTT----- 267
9458004      AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTGTACCTGCCCGG 280
fasta_seq.screen.Contig9      CCTGCGGCCCTGCGCGGCTTC----- 229
. . . . . . . . . . . . . . . . * * *

```

Şekil 3.8 Phrap Programı Kontig 9 Clustalw görüntüsü

Cap3 programıyla elde edilen ve 114 adet cDNA'dan oluşan, Kontig 7 “ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz” enzimine benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik Phrap programıyla oluşturulan ve 37 adet cDNA'dan oluşan Kontig 18'de görülmektedir. Kontig 7'yi oluşturan 114 adet cDNA, Kontig 18'i oluşturan 37 adet cDNA'yı kapsamaktadır.

Cap3 ile oluşturulan kontiglerden Kontig 8 “UDP-Glukoz Pirofosforilaz” enzimine benzerlik göstermektedir. Aynı benzerlik Phrap programıyla elde edilen kontiglerden Kontig 17'de görülmektedir. Cap3 Kontig 8, 367 adet cDNA'dan oluşurken; Phrap Kontig 17, 17 adet cDNA'dan oluşmaktadır ve Phrap Kontig 17'yi oluşturan cDNA'ların hepsi, Cap3 Kontig 8'in içinde de bulunmaktadır.

Cap3 programıyla elde edilen kontiglerden Kontig 10'un benzerlik analizlerinde “SRP54” sinyal tanıma partikülüne benzediği gösterilmiştir. Aynı benzerlik Phrap

kontiglerinden Kontig 8’de de görülmektedir. Cap3 Kontig 10, 4 adet cDNA’dan meydana gelirken; Phrap Kontig 8, Cap3 Kontig 10 oluşumuna da katılan, 3 adet cDNA’dan meydana gelmektedir.

Cap3 programıyla edilen Kontig 14’ün nükleotid ve protein BLAST analizlerinde “aktin” proteinine benzerliği bulunmuştur. Aynı benzerlik Phrap programıyla elde edilen Kontig 16’da da görülmüştür. Cap3 Kontig 14, 19 adet cDNA’dan meydana gelirken, Phrap Kontig 16 ise 12 adet cDNA’dan meydana gelmiştir. Phrap Kontig 16’yı oluşturan 12 cDNA’nın tamamı Cap3 Kontig 14’de bulunmaktadır. Cap3 Kontig 14 içinde bulunan fakat Phrap Kontig 16’da bulunmayan diğer 7 cDNA’nın nükleotid BLAST analizleri gerçekleştirildiğinde hepsinin aktine benzediği görülmüştür.

Cap3 programıyla elde edilen Kontig 16’nın nükleotid BLAST analizlerinde “kitinaz” proteinlerine benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı benzerlik Phrap programıyla oluşturulan kontiglerden Kontig 1’de görülmektedir. Cap3 programı ile oluşturulan Kontig 16, 3 adet cDNA’dan ve Phrap programı ile oluşturulan kontiglerden Kontig 1, 2 adet cDNA’dan meydana gelmiştir. Fakat Cap3 programıyla edilen Kontig 16 ve Phrap ile elde edilen Kontig 1’i oluşturan cDNA’lar aynı değildir. Tüm bu cDNA’ların tek tek nükleotid BLAST analizleri gerçekleştirildiğinde Cap3 programının oluşturduğu Kontig 16’yı oluşturan cDNA (8R_H11-T7, 4R_B02-T7 ve 4R_C02-T7) ’ların herbirinin kitinaz proteinlerine benzerlik gösterdiği belirlenmesine rağmen, Phrap programının oluşturduğu Kontig 1’i oluşturan cDNA (7R_B12-T7 ve 4R_B09-T7)’ların nükleotid BLAST sonuçları aynı benzerliği vermemektedir. Phrap programının oluşturduğu Kontig 1 için clustalw analizi yapıldığında, kontigin farklı dizinlerden oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.6).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

8500          TCACCCGCCAATTTTCTTGATGTTGGTGGGAGCG-CATCCGAGGGACAGG 49
8363          --ACCTGCCAATTTTCTTGATGTTGGTGGGAGCG-CATCCGAGGGACAGG 47
fasta_seq.screen.Contig1 GCTCCGCATCGGCTACTACAG--CGCTACTGCGGCATGCTTGGCACGGC 48
                :** . . . *:*: * * * . :*** ** * :** **.*

8500          TCGTGAAGCATTAAAGATATTGACTTCAGATGATAGAGTGAAGGCAAT 99
8363          TCGTGAAGCATTAAAGATATTGACTTCAGATGATAGAGTGAAGGCAAT 97
fasta_seq.screen.Contig1 CACCGAGGCAACCTCGACTGCTACCCAGCGAAACTTCGCTAGCTAGA 98
                . ***.***: :.* : ** *... **:* : *..**:* :

8500          CTAGTT--AACATTTTGGAGGTATCATGAAATGTGATGTGATAGCAAGT 147
8363          CTAGTT--AACATTTTGGAGGTATCATGAAATGTGATGTGATAGCAAGT 145
fasta_seq.screen.Contig1 CACTATGGATAGTGTATGACCGTGTACGAATAAAGGGCTACACTCATGA 148
                *:. :* *...* :** * **.* * **:::*. *... **:*:

8500          GGAATAGTGAATGCAGCTAAACAGGTGATCTTAAGGTCCTGTTGTTGT 197
8363          GGAATAGTGAATGCAGCTAAACAGGTGATCTTAAGGTCCTGTTGTTGT 195
fasta_seq.screen.Contig1 ATAAGGGGCAACACATATCCCATCATGAAATAAATAATTCGATATGTGAT 198
                . ** .* ** .** .*...: .* .*: ::*..* * : :*** .*

8500          TCGGCTAGAAGGCACCAATG-TAGACCAAGGGAAAAGGATTCTTAAGGAA 246
8363          TCGGCTAGAAGGCACCAATG-TAGACCAAGGGAAAAGGATTCTTAAGGAA 244
fasta_seq.screen.Contig1 CCAGTTGATCGTGTGATGATAATACGAGTAAAGTTGTTGTAACAAATTA 248
                *. * ..:* :* :*** **..*.* *..*: : *:. **.* :*

8500          AGTGAATG-ACATTG--ATCACTGCAGAGGATCTTGATGATGCTGCCGA 293
8363          AGTGAATG-ACATTG--ATCACTGCAGAGGATCTTGATGATGCTGCCGA 291
fasta_seq.screen.Contig1 TGTAAATGTTCAATAAAATCATATCATTACAACCTGGTTTAAAAAATAA 298
                :**..*:* :**:. **** : ** :. *:* *:* *..:.....*

8500          GAAGGCTGTAAAAGCATCGGTCAAATGATTAATGATT-- 330
8363          GAAGGCTGTAAAAGCATCGGTCAAATGATTAATGATT-- 328
fasta_seq.screen.Contig1 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTTGACCTGCCCGGGC 337
                .**...:****..*.....:*** :. .

```

Şekil 3.9 Phrap programıyla oluşturulan Kontig 1'in clustalw analizi sonucu

Bunların dışındaki Phrap ve CAP3 programları ile oluşturulan kontigler farklı numaralandırılmış olsalar da aynı cDNA'lardan oluşmuşlardır. Örneğin, Cap3 programıyla elde edilen kontiglerden Kontig 13 "papain-benzeri sistein proteinaz" enzimine benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik Phrap programıyla elde edilen kontiglerden Kontig 15'de de görülmektedir. Her iki kontig de aynı 10 cDNA'dan meydana gelmiştir.

Total kontig sayısına bakıldığında 17 adet kontig oluşturan CAP3 programı toplam 614 adet cDNA'yı kontig oluşumuna katarken; 19 adet kontig oluşturan Phrap programı toplamda 275 adet cDNA'yı kontig oluşumuna katmıştır. Söz konusu programların oluşturdukları kontigler ve kullandıkları cDNA'ların sayı ve numaraları Ek-E ve Ek-F'de verilmiştir. Tüm bu değerlendirmeler sonucunda CAP3 programının Phrap programına

göre daha değerlendirilebilir kontig dizinleri oluşturduğu görülmüştür ve CAP3 programıyla oluşturulan kontiglerin BLAST analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

BLAST analizlerinden sonra BLAST sayfasında verilmiş giriş numaraları ile dizinin benzerlik gösterdiği DNA yada proteinin referans bağlantısı kullanılarak ya da protein yada DNA adıyla tarama yapılarak ilgili yayın bulunmuştur. Bu yayınlar incelenerek her bir cDNA için genel fonksiyon sınıflaması yapılmıştır. Kontig BLAST sonuçları için bu sınıflamalar Çizelge 3.1’de; singlet BLAST sonuçları için sınıflamalar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Cap3 Kontig BLAST Sonuçları Fonksiyon Sınıflaması

Kontig Adı	cDNA Boyutu (bp)	DNA BLAST	Protein BLAST	Genel Fonksiyon
Kontig 1	249	H.vulgare (pKG2316 klonu) lipid transfer protein öncüsü mRNA <u>Z37114.1</u> (E-value 1e-107) H. vulgare BLT4 mRNA <u>X56547.1</u> (E-value 5e-72)	Oryza sativa Pirinç Non-spesifik Lipid Transfer Protein-1’de Lipid Bağlayıcı Kompleks (E-value 5e-05)	Metabolizma ve Savunma
Kontig 6	612	S.cereale cv. Petkus "Halo" encoding cpn60 <u>Z68903.1</u> (E-value 0.0) Zea mays RuBisCO subunit bağlayıcı protein beta subunit mRNA <u>AY675582.1</u> (E-value 0.0)		
Kontig 7	711	H.vulgare Ribuloz-	2-Karboksirabinatol-	Enerji ve

		1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijen az büyük altünite (rbcl) geni (E-value 2e-120)	1,5-bisfosfat ile kompleks oluşturmuş aktive pirinç RuBisCO enziminin kristal yapısı (E-value 3e-04)	Metabolizma
Kontig 8	1008	H.vulgare mRNA UDP-glukoz pirofosforilaz mRNA (E-value 0.0)	<i>Arabidopsis thaliana</i> UTP'ye bağlı UDP-glukoz pirofosforilazın kristal yapısı (E-value 8e-52)	Enerji ve Metabolizma
Kontig 10	331	Hordeum vulgare Srp54-2 mRNA ve sinyal tanıma partikülü 54 kDa altünite (Srp 54-3) mRNA (E-value 1e-143)		Sinyal İletimi
Kontig 13	483	Hordeum vulgare subsp. vulgare papain-benzeri sistein proteinaz (pap-15 geni) mRNA (E-value 0.0)	Ricinus communis'in programlı hücre ölümünde fonksiyon alan Kdel-kuyruklu Sistein Endopeptidazın Kristal yapısı (E-value 5e-14)	Enerji ve Metabolizma, Savunma
Kontig 14	383	Hordeum vulgare aktin mRNA (E-value 7e-177)	Aktin:DNAz I kompleksinin atomik yapısı (E-value 2e-15)	Savunma
Kontig 16	345	Hordeum vulgare kitinaz II (patogenez-ilişkili protein 3) (cht2 geni) mRNA (E-value 1e-73)	Brassica Juncea kitinaz katalitik modülünün kristal yapısı (Bjchi3) (E-value 0.71)	Savunma

Kontig 1'de benzerliği bulunan lipid transfer proteinleri (LTP), yağ asitlerine bağlanarak bir alıcı membran ve bir verici membran arasında fosfolipidlerin transferini yapan proteinlerdir [107]. LTP'lerin ekspresyonu patojen istilasđ gibi biyotik veya soğuk, kuraklık, NaCl uygulamasđ gibi abiyotik streslerle induklenir [108], [109], [110], [111]. LTP'nin ekspresyonunun ağır metal uygulamasđyla da indüklendiği bulunmuştur [112].

Yine Kontig 1'de benzerliği bulunan BLT4, bitki LTP ailesine ait bir proteindir [113]. BLT4.2, BLT4.6 ve BLT4.9 proteinleri birbirleriyle yüksek sekans benzerliği (%88) ve homolojisine (%94) sahiptir ve diğer lipid transfer proteinleriyle homologturlar [114]. Düşük sıcaklığa maruz arpa bitkilerinden izole edilen BLT4 geninin kromozom 3'de yer aldığı gösterilmiştir. İzole edilen bu BLT4 klonu buğday ve yulaf bitkisinin genleriyle homologtur. Üç gün düşük sıcaklığa maruz kalmış çiftlenmiş haploid hat-arpa bitkilerinin sürgün meristematik dokularında BLT4 mRNA'sının arttığı gösterilmiştir. BLT4 mRNA'sında artış şeklinde görülen bu düşük sıcaklık stresi cevabının kuraklık stresiyle de indüklendiği görülmüştür. Bu gen soğuk ve kuraklık gibi dehidratif streslerde cevap oluşturan düşük moleküler ağırlıklı bir proteini kodlar [115].

Düzgün olarak okunup biyoinformatik analizlerde kullanılabilen 650 cDNA'nın 117 tanesi (%18) aynı kontig içerisinde (Kontig 7) yer almaktadır, bu da RuBisCO (Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz) enzimine önemli derecede benzerlik göstermektedir. Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz enzimi fotosentezde karbon fiksasyonunda görev alan bir enzimdir ve "RuBisCO" olarak da bilinir RuBisCO mRNA'sđ bitki hücrelerinde çok fazla bulunur. Bu nedenle metodun spesifitesini düşürdüğü ve RuBisCO elde edilmemiş çıkarım deneylerinin daha etkin olduğu öne sürülmektedir [116]. Yine de RuBisCO'nun fonksiyonuna bakıldığında fotosentezin Calvin döngüsünde karbondioksitin Ribuloz-1,5-bifosfata bağlanmasını katalize etmektedir. Çinko eksikliği durumunda bitki hücreleri tüm kapasitesini en hayati metabolik reaksiyonlarını sürdürmek yönünde kullanabilir. Ayrıca RiBusCO ekspresyonundaki artış başka stres çalışmalarında da rapor edilmiştir. Çinko-eksikliğinde yetiştirilen pirinç bitkisinin yapraklarında karbonik anhidraz enziminin aktivitesinin çalışıldığı bir çalışmada çinko-eksikliğinde RuBisCO enzimin arttığı görülmüştür [117].

Kontig 8’de benzerliği bulunan UDP-glukoz pirofosforilaz (UGPaz) enzimi, UDP-glukozun sentezi ve pirofosforillenmesinden sorumludur. Sukroz oluşunu ve hücre duvar komponentleri için anahtar öncüdür. Çözünebilir sitosolik protein halinde veya membran-bağlı UGPaz şeklinde de bulunabilir. Metabolik ve gelişimsel şartlara bağlı olarak, UGPaz’lar *in vivo* olarak sukrozun sentez veya degradasyonunda yer alabilirler. UGPaz’lar Mg^{+2} -UTP + glukoz-1-P \rightleftharpoons Ppi + UDP-glukoz reaksiyonunu katalizlerler [118]. UGPaz’ın enzim aktivitesi soya fasülyesi ve şeker pancarı yapraklarında uzun dönem inorganik fosfat (Pi) eksikliği şartlarında artar [119], [120]. İnorganik fosfat fotofosforilasyon substratı olarak ve fotosentez süresince kloroplasttan karbon çıkarımının anahtar bir bileşeni olarak bitki metabolizmasında merkezi bir rol oynar [121], [122], [123], [124]. Huang ve arkadaşları (2000) [125], arpa köklerinde çinko eksikliğinin P taşıyıcı genlerinin ekspresyonunda bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Kontig 10’da benzerliği görülen “SRP54” (signal recognition particule 54= sinyal tanıma partikülü 54), SRP kompleksinin bir domainidir. Prokaryotlarda sitozolik ve ökaryotlarda kloroplast ve sitozolik tipleri bulunmuştur. SRP prokaryotlarda plazma membranına ökaryotlarda ise tipine göre endoplazmik retikulum membranından veya kloroplastın tilakoid membranından içeri ve dışarı protein taşınmasından sorumludur [126], [127]. Bitkilerde SRP54 kodlayan cDNA ilk kez ısı şoku uygulanmış arpa alevron dokusundan izole edilmiştir [128].

Kontig 13’ün benzerliği gösterilen papain-benzeri sistein proteazlar, sistein proteazların C1A familyasına aittir. Sistein proteazlar, katalitik sisteinde peptid bağlarını hidroliz ederler. Senesens, programlı hücre ölümü, tohumda protein depolaması, patojen ataklarına savunma gibi fizyolojik süreçlere katılan bir enzimdir [129], [130], [131].

Kontig 14’ün BLAST analizlerinde benzerliği bulunan, aktin proteini tüm hücrelerde yaygın olarak ekspres edilen bir proteindir. Aktin proteinleri ATPaz süperfamilyasının üyeleridir [132]. Hücrede kromatin modellenmesi, RNA işlenmesi ve taşınımı, transkripsiyon, hücre bölünmesi gibi bir çok olayda görev alırlar [133].

Kontig 16’nın BLAST analizlerinde benzerliği gösterilen kitinaz I ve II proteinleri bir patojen-ilişkili protein ailesine ait (PR-4) proteinlerdir [134]. Patojen ataklarına ek

olarak kitinazların çeşitli biyotik ve abiyotik streslerle indüklendiği gösterilmiştir [135]. Bitkilerde kitinaz indüksiyonu genellikle non-spesifiktir ve biyotik ve abiyotik streslerle artarlar. Çeşitli patojen ve streslere karşı bitki cevabının yalnızca bir bileşenidir. Kitinazlar küçük bir gen ailesi tarafından kodlanırlar [136], [137], [138]. Bazı bitkilerde birkaç izoformları da indüklenebilir. Birçok kitinaz, diğer PR-proteinler gibi, düşük moleküler ağırlıklıdır, proteazlara dayanıklıdır ve hücre dışına salınırlar. Bitki kitinazları genellikle 25-36 kDa arasında moleküler ağırlığa sahiptirler ve asidik veya bazik karakterli olabilirler [136], [138].

Çizelge 3.2 Cap3 Singlet BLAST Sonuçları Fonksiyon Sınıflaması

Singlet Adı	cDNA Boyutu (bp)	DNA BLAST	Protein BLAST	Genel Fonksiyon
Singlet 6	326	PREDICTED: Brachypodium distachyon ubiquitin-bağlayıcı enzim E2 32-benzeri (LOC100831984), mRNA XM_003558027.1 (E-value 6e-82)		Sinyal iletimi, Apoptosis
Singlet 8	182	Triticum aestivum putatif oksijen-evolving kompleks öncüsü (TAOEC01) mRNA, EF469610.1 (E-value 2e-79)	Chain A, Higher Plants Fotosistem II Psbq Polipeptidi Kristal Yapısı 1NZE_A (E-value 7e-25)	Enerji ve Metabolizma
Singlet 9	197	Hordeum vulgare Klorofil a/b-bağlayıcı protein kısmı mRNA AJ006296.1 (E-value 8e-94)		Enerji ve Metabolizma
Singlet 13	368	Zea mays Ribozom dönüşüm faktörü	Chain A, Thermus Thermophilus	Transkripsiyon ve Translasyon

		mRNA (LOC100284109), NM_001157006.1 (E-value 4e-119)	Ribozom dönüşüm faktörü 1EH1_A (E-value 3e-36)	
Singlet 14	362	Deschampsia antarctica clone Dacor 1.7 alanin aminotransferaz mRNA, 3' UTR AY090542.1 (E-value 2e-127)	Chain A, Hordeum vulgare Alanin Aminotransferaz kristal yapısı 3TCM_A (E-value 2e-40)	Metabolizma, Stres
Singlet 17	133	H.vulgare Patogenez-ilişkili protein geni (E-value 5e-59)	Chain A, Crystal Structure Of Sweet-Tasting Protein Thaumatococcus 3AOK_A (E-value 0.43)	Savunma
Singlet 20	368	Triticum aestivum MIKC-tip MADS-box transkripsiyon faktör WM21B mRNA (WM21B gene) AM502888.1 (E-value 2e-121)		Transkripsiyon ve Translasyon
Singlet 23	544	Triticum aestivum fosforibulokinaz RNA X51608.1 (E-value 0.0)		Metabolizma
Singlet 24	248	Hordeum vulgare subsp. spontaneum hypothetical (varsayılan) protein mRNA (E-value 0.0)		Diğer

Singlet 28	371	PREDICTED: Brachypodium distachyon ribozom- dönüşüm faktör, kloroplast-benzeri (LOC100834081), mRNA XM_003562841.1 (E-value 1e-129)	Bacillus Anthracis Ribozom dönüşüm faktörü kristal yapısı 4GFQ_A (E-value 3e-29)	Transkripsiyon ve Translasyon
Singlet 30	730	H.vulgare Glikolitik gliseraldehit-3- fosfat dehidrogenaz için GAPDH mRNA'sı X60343.1 (E-value 0.0)	Oryza Sativa Gliseraldehit- 3- Fosfat Dehidrogenaz yapısal ve fonksiyonel analizi 3E6A_O (E-value 3e-130)	Enerji ve Metabolizma
Singlet 31	218	Triticum aestivum putative oksijen- yükseltgeyici kompleks öncü (TAOEC01) mRNA'sı, EF469610.1 (E-value 1e-42)		Enerji ve Metabolizma

Cap3 programıyla oluşturulan singletlerden Singlet 6'nın BLAST analizleri sonucunda "Ubikutin-bağlayıcı enzim E2" ye benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Ubikutin seçici protein degradasyonunda görev alan küçük ve son derece korunmuş bir proteindir [139], [140]. Ubikutin konjugatlarının formasyonu ATP'ye ihtiyaç duyar ve 3 adımda gerçekleşir [141]. İlk olarak ubikutin, spesifik bir ubikutin-aktive edici enzim olan E1 tarafından aktive edilir. Ubikutin E2 adı verilen bir ubikutin-konjugasyon enzimi ile spesifik bir sistein rezidüsüne transfer edilir. Son adımda, E2 proteinleri, ubikutini alıcı proteinlere transfer eder. Çoğu protein substratını E2-ubikutinden hedef proteine yaklaştırmak için ubikutin transferini katalizlemede E3 adı verilen bir ubikutin-protein ligaz gereklidir. Uygun yapıdaki proteinler ilk önce E3'ün spesifik protein bağlayıcı

bölgese bağlanırlar ve daha sonra ubikutin E2'den substrata transfer edilirlar [134], [142]. Alternatif olarak, bazı E2'ler *in vitro* olarak ubikutini direkt olarak E3'den bağımsız bir süreçle alıcı proteine transfer edebilirler. Bu nedenle, E2'ler ubikutin konjugasyonunda merkezi bir rol alırlar. Ubikutin-aracılı proteolizde, ubikutin çoklu molekülleri hedef proteine bağlanır ve bu konjugatlar hücre içinde spesifik bir protein tarafından tanınarak yıkıma uğratılırlar [139], [141]. Tüm bu ubikütinasyon basamakları, ökaryotlarda son derece korunmuştur. Ubikutin diğer hücrel proteinlere kovalent olarak bağlanması seçici protein degradasyonu, DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrolü ve organel biyosentezini içeren önemli fizyolojik süreçleri kapsamaktadır [142]. Bitkilerde bir UBC subfamilyasının mayada olduğu gibi stres sonucunda üretilen normal olmayan proteinlerin proteolitik degradasyonunu kapsadığı gösterilmiştir. Sıcaklık stresi ve kadmiyum ağır metale maruz domates bitkilerinde UBC proteinlerinde artış görülmüştür [143].

Singlet BLAST sonuçlarından Singlet 14 "alanin aminotransferaz" enzime benzerlik göstermektedir. Aminotransferazlar tüm organizmalarda bulunan fosfat-bağımlı enzimlerdir. Farklı aminoasit çiftleri arasındaki transaminasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Bunlardan alanin aminotransferazlar hayvanlarda, mayada, bakteride ve bitkilerde bulunur. Alanin aminotransferazlar, alanin ve 2-okzoglutaratın piruvat ve glutamata tersinir olarak çevrimini sağlar. Bazı AlaAT homologlarının oksijen eksikliğine cevapta ve bakteri ve virüs enfeksiyonları yada çeşitli patojen atakları tarafından tetiklenen bitki savunma cevabına katıldıkları bilinmektedir [144], [145]. Peroksisomal ve mitokondriyal alanin aminotransferaz homologlarının fotorespirasyon (fotosolunum) metabolizmasının düzenlenmesinde işlevleri vardır [146], [147], [148], [149]. Olumsuz çevresel koşullara bitki yanıtının ilginç bir yönü alanin birikimidir. Bitkilerde optimal koşullar altında hücre içi alanin seviyesi düşüktür fakat alanin kökte aşırı su [150], oksijen yetmezliği ve azlığı [151], [152], [153], azot eksikliği [154] ve sürgünlerde su eksikliği [155], düşük sıcaklık [156] ve diğer koşullarda en fazla biriken amino asittir. Fakat stres koşullarında artan alanin üretiminin beraberindeki AlaAT indüksiyonunun fizyolojik önemi halen tartışma konusudur. Son bulgular alanin birikiminin primer fonksiyonunun piruvat seviyesini düzenleyerek solunum oranını kontrol etmek olduğunu göstermiştir [153]. Aynı zamanda yüksek konsantrasyonda

dahi alanin birikiminin bitki dokuları için zararlı etkilerinin olmaması önemlidir. Bu nedenle, gelişmiş bitkilerde alanin metabolizmasını kontrol eden AlaAT homologlarının anlaşılması birinci derece önem taşımaktadır.

BLAST analizleri sonucunda Singlet 8'in "oksijen yükseltgeyici kompleks"e ve Singlet 30'un "GAPDH"a benzerlik gösterdiği görüldü. Kuraklığa dayanıklı *Populus euphratica*'da kuraklık stresinde [157] RuBisCO aktivaz, oksijen yükseltgeyici kompleks ve GAPDH gibi glikolizise katılan bazı fotosentez- ve karbon- metabolizması-ilişkili proteinlerin ekspres edildiği görülmüştür. GAPDH enerji metabolizmasında rol oynayan glikolitik bir enzimdir. GAPDH, değişen hücresel koşullarda ekspresyonu her zaman sabit kalan "housekeeping" bir protein olarak tanımlanan ve northern blot analizlerinde normalizasyonda kullanılan bir proteindi. Fakat son yıllarda, glikoliz dışında farklı hücresel fonksiyonlara katıldığı ortaya çıkmıştır [158], [159]. GAPDH nükleusda bulunur ve normal fonksiyonları nuklear RNA çıkarımı, DNA replikasyonu ve DNA tamiridir [160], [161]. Patolojik olarak ise hayvansal dokularda nörodejeneratif hastalıklar, prostat kanseri ve viral patojeneze katılırlar [159]. GAPDH'lar maya metakaspazların spesifik substratlarıdır.

Singlet 17 "patojen-ilişkili proteinler"e benzerlik göstermektedir. Bitkilerde bazı hücre duvarı bileşenleri (seluloz, lignin) gibi fiziksel ve taninler ve fenolikler gibi kimyasal savunma mekanizmaları bulunmasına rağmen, diğer indüklenebilir savunma mekanizmalarına da sahiptir. Böylece bitkiler biyolojik streslere (fungi, bakteri, virus, böcek yada herbivorlar) [162], [163] maruz kaldığında çeşitli bileşenler sentezlerler. İndüklenebilir savunmalar; reaktif oksijen türleri, fitoaleksinler, hücre duvarı bileşenleri ve patojenez-ilişkili proteinler (PR, pathogenesis-related) olarak adlandırılan bir grubu içerirler. İndüklenebilir savunmaların yüksek çözünürlüklü jeller, kolon kromatografisi ve immünojenik reaksiyonları ve son olarak PR-proteinlerin sekans verileri ve farklı birkaç bitkideki genleri PR-proteinlerini 14 farklı gruba ayırır [164]. PR-proteinlerinin spesifik çeşitleri host-spesifiktir ve çeşitli uyaranlara cevap oluştururlar.

Singlet BLAST sonuçlarından Singlet 20 "MIKC-tipi MADS-box"lara benzerlik göstermiştir. MADS-box ailesine ait genler tarafından kodlanan transkripsiyon faktörleri ökaryotlarda gelişme ve sinyal iletiminin kontrolünde anahtar rol oynarlar.

MIKC-tip, çiçek morfogenezi, ovul gelişimi, vejetatif büyüme gibi gelişim sürecinin önemli kısımlarından sorumludur [165], [166]. MADS-box genlerinin ekspresyonu ve aktivitesi, çeşitli iç faktörlerin yanısıra sıcaklık ve gün uzunluğu gibi çevresel faktörlerle de etkilenir. MADS-box genlerinin domateste düşük sıcaklık stresiyle [167] ve diğer bitkilerde de sitokin, giberellin [168], etilen [169] ve oksin [170] gibi hormon uygulamalarıyla indüklendiği gösterilmiştir. Bu genler, pirinçte soğuk, tuz ve/veya kuraklığa cevapta farklı ekspresyon göstermiştir. Ayrıca çiçek gelişimi ile ilgili çok sayıdaki genin buğdayda abiyotik stresle ilişkili olduğunu gösterilmiştir [171].

Singlet 23'ün BLAST analiz sonucu "fosforibulokinaz" (PRK) enzimine benzerlik göstermektedir. Bu enzim RuBisCO için ribuloz-1,5-bisfosfat substratını oluşturur. Fotosentetik GAPDH ve PRK koordineli bir ekspresyon profili gösterirler [172]. Singlet 30'nun BLAST analizlerinde GAPDH'a benzerliği gösterilmiştir.

Bu çalışma arpa bitkisinde çinko eksikliğinde anlatım yapan genlerin belirlenmesinin ötesinde uzun süreli ve şiddetli çinko eksikliğinin gen anlatımı düzeyinde etkisini göstermesi bakımından önemlidir.

3.3 Öneriler

Çinko, bitkilerin normal gelişimi ve büyümesi için gerekli, temel bir mikroelementtir. Hücrede eksikliği kadar fazlalığı da zararlı etkiler oluşturur. Buna bağlı olarak bitkide çinkonun alımı, taşınması ve depolanması kontrollü bir şekilde düzenlenir. Çinko etkinliği çinkonun eksik olduğu koşullarda gelişebilme ve verimli olma yeteneği olarak tanımlanır. Türler ve aynı türün varyeteleri arasında çinko etkinliği bakımından farklılıklar vardır. Bu çalışmada Türkiye'nin çinko-eksik topraklarına iyi uyum sağlamış bir bitki olan *Hordeum spontaneum* C. Koch'da çinko eksik koşullarda hangi moleküler mekanizmaların harekete geçtiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Özellikle uzun süreli ve şiddetli çinko eksikliği durumunda bu mekanizmalarda görev alan aday genlerin anlatımının artacağı hipotezinden yola çıkarak gen anlatım farklılığına dayalı bir yöntem uygulanmıştır.

Araştırma grubumuzda daha önce yapılan bir çalışmada *Hordeum spontaneum* C. Koch'un yaprak, kök ve gövde dokularında çinko eksikliği ile anlatımları artan aday

genlerin belirlenmesi için baskılayıcı çıkarım hibridizasyon yöntemi kullanılarak yaprak, kök ve gövde cDNA kütüphaneleri kurulmuştur. Bunlardan ilk ikisinden seçilen klonların dizin ve biyoinformatik analizleri yapılmıştır [98]. Bu çalışmada ise gövde kütüphanesinden seçilen 672 klon dizin analizine gönderilmiştir. Dizinin analizi yapılan cDNA'ların sistematik bir biçimde değerlendirilebilmesi için kontig ve singletlerin oluşturulması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda dizinin analizinden gelen ve düzgün okuması gerçekleştirilmiş 657 klonun vektör ve adaptör dizileri Cygwin-Cross_Match programıyla işaretlenip uzaklaştırılmıştır. Bu dizilerin de temizlenmesi safhasında insert içermeyen yedi klon daha elimine edildi ve biyoinformatik analizler için 650 cDNA değerlendirilmiştir. Bu 650 cDNA içinde örtüşen dizinler belirlenerek kontig ve singletlerin oluşturulması için, aynı fonksiyona sahip iki ayrı program, CAP3 ve Phrap kullanıldı ve programların sonuçları karşılaştırılmıştır. CAP3 programıyla 17 adet kontig ve 31 adet singlet; Phrap programıyla 19 adet kontig ve 25 adet singlet dizini elde edilerek bu dizinlerin nükleotid ve protein benzerlik analizleri gerçekleştirilmiştir. İki programla oluşturulan kontiglerin cDNA içeriklerinin karşılaştırılması ve analizi sonucu CAP3 programının daha anlamlı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle daha ileri analizlerde CAP3 ile elde edilen kontig ve singletler kullanılmıştır.

Her kontigin aynı genin transkriptinden oluştuğu görülmüştür. Kontigin içerisindeki kısa uzun fragmanların SSH'de kullandığımız *RsaI* kesiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tüm klonların dizin analizlerinin yapılmadığı da göz önünde bulundurularak içerisinde çok fazla cDNA bulduran kontigleri oluşturan cDNA'lara karşılık gelen transkriptlerin en fazla ekspres edildiği sonucuna varılmıştır.

Kontig ve singlet dizinlerinin nükleotid ve protein düzeyinde BLAST analizleri yapılmıştır. Her bir dizin için nükleotid ve protein düzeyinde aynı sonucu veren benzerlikler değerlendirilmiştir. Her bir genin fonksiyonu ile ilgili ayrıntılı literatür taraması yapılmıştır. Çeşitli metabolik yollarda stres ve savunma tepkilerinde gen anlatımının işleyiş ve kontrol mekanizmalarında apoptozda görev yaptığı belirlenen genler tespit edilmiştir (Çizelge 3.3). Daha sonraki çalışmalarımız için çinko eksikliği durumunda geliştiği bilinen semptomlarla ilişkilendirilebilecek genlerin çalışılması hedeflenmektedir.

Çizelge 3.3 BLAST Analizi Sonuçlarının Fonksiyon Gruplaması

Genel fonksiyon	Kontig	Singlet
Metabolizma	4	5
Savunma	2	1
Stres	-	1
Transkripsiyon/Translasyon	-	2
Sinyal İletimi	1	1
Apoptosis	-	1

Bunun için çalışmada belirlenmiş olan genlerden özellikle stres ve savunma ile ilgili olan genlerin gerçekten çinko eksikliği ile artıp artmadığı konusunda ileri ekspresyon çalışmaları yapılmalıdır. Öncelikle bu genlerin tam uzunluktaki cDNA'ları elde edilmelidir ve çinko stresi uygulanmış bitkilerden çeşitli zaman aralıklarında örnek alınarak Real Time PCR analizleri yada Northern Blot analizleri ile doğrulama yapılmalıdır. Yine de abiyotik ve biyotik stres yolları çeşitli noktalarda kesiştiğinden ve spesifik bir stres uygulamasıyla anlatımı uyarılan genler başka streslerle de indüklenebilmektedir. Ayrıca bu tür çalışmalarda, sekonder fenotipler ortaya çıkacağından ve bu fenotiplerle ilgili genlerin ekspresyonu görülebileceğinden hangi genin direkt olarak çinko-eksikliği stresi ile ilişkili olduğunu belirlemek önemlidir. Bu da genlerin direkt fonksiyon kaybına yönelik deneylerin tasarlanması ile mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] ZOHARY, D., and M. HOPF. 1993. Domestication of plants in the Old World. The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Clarendon Press, Oxford, England.
- [2] DIAMOND, J. 1998. Guns, germs and steel. Vintage, London.
- [3] NESBITT, M., and D. SAMUEL. 1996. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. 41–100 in S. PADULOSI, K. HAMMER, and J. HELLER, eds. Hulled wheats (Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats). International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italy.
- [4] HARLAN, J. R., and D. ZOHARY. 1966. "Distribution of wild wheats and barley". Science 153:1074–1080.
- [5] NEVO, E. 1992. Origin, evolution, population genetics and resources for breeding of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in the Fertile Crescent. 19–43 in P. R. SHEWRY, ed. Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology. C.A.B. International, The Alden Press, Oxford.
- [6] Toprak Mahsülleri Ofisi,
<http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/raporlar/HububatSektorRaporu.pdf>, 01.05.2012
- [7] Pourkheirandish, M. ve Komatsuda, T., (2007). "The Importance of Barley Genetics and Domestication in a Global Perspective", Annals of Botany 100: 999-1008.
- [8] Forster, P. B., Ellis, P. R., Thomas, W. T. B., Newton, A. C., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R. A., Bahri, M. H. ve Salem, B. M., (2000). "The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley", Journal of Experimental Botany, 51: 342.
- [9] Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I ve Lux A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173: 677–702.
- [10] Welch, R.M, Webb M.J. ve Loneragan, J.F. 1982. Zinc in membrane function and its role in phosphorus toxicity [Crops]. *In Plant Nutrition 1982: Proceedings of*

the Ninth International Plant Nutrition Colloquium, Warwick University, England, August 22-27, 1982. Ed. A Scaife. 710-715.

- [11] Marschner H., (1986). Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press, London, 300–312.
- [12] Ackland, Leigh ve Michalczyk, Agnes (2006) Zinc deficiency and its inherited disorders - A review, *Genes & nutrition*, 41-50, New Century Health Publishers, LLC, New Orleans, LA
- [13] Vallee, B. ve Auld, D. S., (1989). “Active- site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 220-224.
- [14] Vallee BL, Auld DS. 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29:5647±5659.
- [15] Dreosti, I. E., (2001). “Zinc and the gene Review”, *Mutation Research*, 475; 161–167.
- [16] Doncheva S, Vassileva V, Ignatov G, Pandev S, Dris R ve Niskanen R (2001). “Influence of nitrogen deficiency on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in pepper plants”, *Agr Food Sci Finland* 10: 59-64 IF- 0.925
- [17] Çakmak İ., (2000). “Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species”, *Transley review. New Phytol.*, 146, 185- 205.
- [18] Ko LJ ve Engel JD (1993). “DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family”. *Mol Cell Biol.* Jul;13(7):4011–4022
- [19] Welch, R. M. ve Graham, R. D., (2004). “Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective”, *Journal of Experimental Botany*, 55: 353- 364.
- [20] HOTZ, C., ve BROWN, K.H., (2004). Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutrition Bull.* 25, 94-204.
- [21] Black RE, 2003. “Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world”. *J Nutr* 133: 1485S–1489S.
- [22] Alben, A.O. and Bogs, H.M. 1936. “Zinc content of soils in relation to pecan rosette”. *Soil Science* 41: 329-332.
- [23] Cakmak I, Marschner H ve Bangerth F., (1989). “Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)”. *Journal of Experimental Botany* 40:405±412.
- [24] Kitagishi K, Obata H ve Kondo T., (1987). “Effect of zinc deficiency on 80S ribosome content of meristematic tissues of rice plant”. *Soil Science and Plant Nutrition* 33: 423±430.
- [25] Alloway, B.J., (2004). Zinc in soils and crop, Springer Science Business Media B.V. Nutrition, Book.
- [26] Kabata - Pendias, A. ve H. Pendias (1992) Trace Elements in Soils and Plants (2nd edition) CRC Press, Boca Raton.

- [27] Cattlet, K.M, Heil, D. M., Linday, W. L. ve Ebinger, M. H. (2002). "Soil chemical properties controlling Zn⁺² activity in 18 Colorado soils". Soc. Soil Am. J. 66, 1182–1189.
- [28] Kiekens, L. (1980) Absorptieverschijnselen van zware metalen in gronden. Doctoral Thesis, University of Gent.
- [29] Sillanpää M. (1990). *Micronutrients assessment at the country level : an international study. FAO Soils Bulletin* 63. Rome, Italy :Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [30] Eyüpoğlu F., Kurucu N. ve Sanısağ U. (1994). Status of plant available micronutrients in Turkish soils. In: Soil and Fertilizer Research Institute Annual Report, No. R- 118, Ankara, Turkey (in Turkish), 25-32.
- [31] Brown, P.H., I. Cakmak ve Q. Zhang (1993) Form and function of zinc in plants. Chap 7 in Robson, A.D. (ed) *Zinc in Soils and Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 90 - 106.
- [32] Raulin, J., (1869). "Etudes clinique sur la vegetation". Annales des Sciences Naturelle: Botanique 11, 93-299.
- [33] Marschner, H., (1995). "*Mineral Nutrition of Higher Plants*" (2nd edition) Academic Press, London. 889.
- [34] Lindsay, W.L., (1972). "Zinc in Soils and Plant Nutrition", *Advances in Agronomy*, 24, 147 - 186.
- [35] Sillanpää, M. (1982) *Micronutrients and the Nutrient Status of Soils: A Global Study*, FAO, Rome, 444.
- [36] OLSEN, S. R., (1972). "Micronutrient interaction. In Micronutrients in Agriculture". Eds. J J Mortvcdt, P M Giordano, W L Lindsay, 199-227. American Society of Agronomy, Madison.
- [37] VALLEE, B.L., (1983). Zinc in biology and biochemistry. *In Zinc Enzymes*. Ed. T G Spiro. 1-24. John Wiley and Sons, New York.
- [38] TOBIN, A.J., (1970). "Carbonic anhydrase from parsley leaves". J. Biochem. 245, 2656- 2666.
- [39] OHKI, K., (1976). "Effect of zinc nutrition on photosynthesis and CA activity in cotton". Physiol. Plant. 38, 300-304.
- [40] SINGH, R. R., ve GANGWAR, M. S., (1974). Indian J. Agr. Sci. 43, 567.
- [41] SHROTRI, C. K, TEWARI, M. N., ve RATHORE, V.S. (1980). Effects of zinc nutrition on sucrose biosynthesis in maize Pliytochcmistry 19,139-140
- [42] JYUNG, W. U, EHMANN, A, SCHLENDICR, K. K., ve SCALA, J. (1975). "Zinc nutrition and starch metabolism in *Phaseolus vulgaris* L". Plant Physiol. 55, 414-420.
- [43] PRASK, J. A. ve PLOCKE, D. J., (1971). "A role for zinc in the structural integrity of cytoplasmic ribosomes of *Euglencgracilis*". Plant Physiol. 48, 150-155.

- [44] KITAGISHI, K. ve OBATA, H. (1986). "Effects of zinc deficiency on the nitrogen metabolism of meristematic tissues of rice plants with reference to protein synthesis". *Soil Sci. Plant Nutr.* 32, 397-405.
- [45] FALCHUK, K.11., HARDY, C., ULPINO, L. ve VALLEE, B. L. (1978). "RNA metabolism, manganese, and RNA polymerases zinc-sufficient and zinc-deficient *Euglena gracilis*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 4175-4 179.
- [46] JENDRISAK, J. ve BURGESS, R. R. (1975). "A new method for the large scale purification of wheat germ DNA-dependent RNA polymerase II". *Biochemistry* 14, 4639.
- [47] DWIVEDI, R. S. ve TAKKAR, P. N., (1974). "Ribonuclease activity as index of hidden hunger of zinc in crops". *Plant and Soil* 40, 170-181.
- [48] BETTGER, W. J. ANIL O'DELL, B. L., (1981). "A critical physiological role of Zn in the structure and function of biomembran", *Life Sci.* 28, 1425-1438.
- [49] CHVAPIL, M., (1973). "New aspects in the biological role of zinc: A stabilizer of macromolecules a membranes". *Life Sci.* 13, 1041 1049.
- [50] ÇAKMAK, I ve MARSCHNER, H. (1988a). "Increase in membrane permeability and exudation in roots of Zn Deficient Plants". *J. Plant Physiol.* 132,356-361.
- [51] SKOOG, F., (1940). "Relationship between zinc and auxin in the growth of higher plants". *Am. J. Bot.* 27. 939 950.
- [52] TSUI, C., (1948). "The role of zinc in auxin synthesis in tomato plant". *Am. J. Bot.* 35, 172-179.
- [53] KLEIN, R. M., CAPTUTO, E. M. ve WITTERHOLE, B. A. (1962). "The role of zinc in the growth of plant tissue culture". *Am. J. Bot.* 49, 323-327.
- [54] SALAMI, A. U. ve KENEFICK, D. C., (1970). "Stimulation of growth in zinc deficient com seedlings by the addition of tryptophan". *Crop Sci.* 10, 291-294.
- [55] SHKOLNIK, M. Y, DAVYDAVA, V. N. ve MOCHENIAT, K. I. (1975). "Effect of zinc on the content of gibberellin-like substances in Phaseolus leaves". *Fiziol. Rast.* 22, 1021-1024.
- [56] SUGE, H., TAKAHASHI, H., ARITA, S. ve TAKAKI, H., (1986). "Gibberellin relationships in zinc- deficient plants". *Plant Cell Physiol.* 27, 1010-1012.
- [57] MUIR, R. M. ve LANTICAN, B. P. (1968). "*In Physiology and Biochemistry of Plant Growth Substances*". Eds. G Settefield and F Wightman, 259-272. Range Press, Ottawa.
- [58] REED, H. S., (1941). "The relation of zinc to seed production". *J. Agr. Res.* 4, 635-644.
- [59] HU, H. ve SPARKS, D. (1990). "Zinc deficiency inhibits reproductive development in 'Stuart' pecan". *Hortscicnce* 25, 1392-1396.
- [60] RICEMEAN, D.C. ve JONES, G.B. (1959). "Distribution of zinc and copper in subterranean clover (*Trifolium subterraneum L.*) grown in culture solution supplied with graduated amount of zinc". *Aust. J. Agr. Res.* 973-122.

- [61] SHARMA, P.N, CHATTERJEE, C., SHARMA, C. P, NAUTIYA, N. ve AGARWALA, S.C., (1979). "Effect of zinc deficiency on the development and physiology of wheat pollen". *J. India Bot. Soc* 58,330-334.
- [62] KOCHIAN, L. V., (1993). "Zinc absorption from hydroponic solution by plant roots"; Derleyen: Robson A.D., *Zinc in Soils and Plants* Chap 4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 45-58.
- [63] NAMBIAR, E.K.S., (1976). "The uptake of zinc - 65 by oats in relation to soil water content and root growth". *Australian Journal of Soil Research*, 14, 67-74.
- [64] NEUE, H.U., C. QUIJANO, D. SENADHIRA ve T. SETTER, (1998). "Strategies for dealing with micronutrient disorders and salinity in lowland rice systems". *Field Crops Research*, 56, 139-155.
- [65] CHAUDRY, F.M. ve LONERAGAN, J.F., (1972). "Zinc absorption by wheat seedlings. 1. inhibition by macronutrient ions in short term experiments and its relevance to long term zinc nutrition". *Soil Society of America Proceedings*. 36, 323 - 327.
- [66] Graham, R. D. ve Rengel, Z., (1993). "Genotypic variation in Zn uptake and utilization by plants"; Derleyen: Robson A.D., *Zinc in Soils and Plants*, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 107-114.
- [67] Graham, R.D., J.S. Ascher, ve J.S. Hynes, (1992). "Selecting zinc - efficient cereal genotypes for soils low in zinc status". *Plant and Soil*, 146, 241 - 250.
- [68] Cakmak, I. *et al.*, (1998). "Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency". *Euphytica*, 100, 349-357.
- [69] Erenoglu, B., Cakmak, I., Romheld, V., Derici, R. ve Rengel, Z., (1999). "Uptake of zinc by rye, bread wheat and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency". *Plant Soil*, 209, 245-252.
- [70] Hacısalihoglu, G., Hart, J.J. ve Kochian, L.V. (2001) "High- and low-affinity zinc transport systems and their possible role in zinc efficiency in bread wheat." *Plant Physiol* 125: 456-463
- [71] KALAYCI, M., TORUN, B., EKER, S., AYDIN, M., OZTURK, L. ve ÇAKMAK, I., (1999). "Grain yield, zinc efficiency and zinc concentration of wheat cultivars grown in a zinc-deficient calcareous soil in field and greenhouse". *Field Crops Research* 63, 87-98.
- [72] ÇAKMAK, I., ÇAKMAK, O., EKER, S., OZDEMİR, A., WATANABE, N. ve BRAUN, H.J., (1999c). "Expression of high zinc efficiency of *Aegilops tauschii* and *Triticum monococcum* in synthetic hexaploid wheats". *Plant and Soil*, 215, 203-209.
- [73] RENGEL, Z. (1999). "Physiological mechanisms underlying differential nutrient efficiency of crop genotypes" 227-265; Derleyen: Z. Rengel *Mineral Nutrition of Crops*.
- [74] RENGEL, Z. (2001). "Genotypic differences in micronutrient use efficiency in crops". *Communications in Soil and Plant Analysis*, 32, 1163-1186.

- [75] ÇAKMAK, I., (2001). "Screening wheat genotypes for zinc efficiency". In: Perspectives on the Micronutrient Nutrition of Crops; Derleyenler: K. Singh, S. Mori, R.M. Welch, Scientific Publisher, Jodhpur.
- [76] TREEBY, M., MARSCHNER, H. ve RÖMHELD, V. (1988). "Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators". *Plant and Soil*, 114, 217-226.
- [77] Cakmak I, Ozturk L, Eker S, Torun B, Kalfa H ve Yilmaz A. (1997b). "Concentration of Zn and activity of Cu/Zn-SOD in leaves of rye and wheat cultivars differing in sensitivity to Zn deficiency". *Journal of Plant Physiology* 151: 91–95.
- [78] Zhao, H., ve Eide, D., (1996a). "The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation". *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2454–2458.
- [79] Zhao, H., ve Eide, D., (1996b). "The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem* 271: 23203–23210.
- [80] Guerinot, M.L., (2000). "The ZIP family of metal transporters", *Biochimica et Biophysica Acta* 1465, 190-198.
- [81] Zhao, H., E. Butler, J. Rodgers, T. Spizzo, S. Duesterhoeft ve D. Eide, (1998). "Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements". *J. Biol. Chem.* 273:28713–28720.
- [82] Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M. L. ve Eide, D., (1998). "Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(12): 7220–7224.
- [83] Eide, D., M. Broderius, J. Fett ve M.L. Guerinot, (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 5624^5628.
- [84] Gaither, L. A. ve D. J. Eide. (2001). "Eukaryotic zinc transporters and their regulation". *Biometals* 14:251–270.
- [85] N.S. Pence, P.B. Larsen, S.D. Ebbs, M.M. Lasat, D.L.D. Letham, D.F. Garvin, D. Eide ve L.V. Kochian, (2000) "Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyper accumulator *Thlaspi caerulescens*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97
- [86] Puig S, Lola Pen~ arrubia: "Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants". *Curr Opin Plant Biol*, this issue, doi:10.1016/j.pbi.2009.04.008.
- [87] Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T. ve Maeshima, M., (2004) "Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis". *Plant Cell Physiol* 45 1749–1758.
- [88] Arrivault, S., Senger, T. ve Kra~mer, U., (2006). "The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn

- exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply". *Plant J*, 46:861-879.
- [89] Haydon, M.J. ve Cobbett, C.S., (2007). "A novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*". *Plant Physiol*, 143: 1705-1719.
- [90] Talke, I.N., Hanikenne, M. ve Krämer, U., (2006) "Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*". *Plant Physiol*, 142:148-167.
- [91] Marschner, H., (1993). "Zinc Uptake from Soils"; Derleyen: Robson, A.D. *Zinc in Soils and Plants*, Chap 5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 59-78.
- [92] Loneragan, J.F. ve M.J. Webb, (1993). "Interactions between Zinc and Other Nutrients Affecting the Growth of Plants"; Derleyen: Robson, A.D., *Zinc in Soils and Plants*, Chap 9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 119 - 134.
- [93] KIRK, G.J.D. ve J.B. BAJITA. (1995). "Root - induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilisation in the rhizosphere of lowland rice". *New Phytologist*, 131, 129 - 137.
- [94] Ramon, J. ve P. Villemin, (1989). "Effet d'un apport de zinc sur les rendements du maïs (sols dalluvions argilo-calcaires de l'Isere)", *Perspectives Agricoles* 135, Avril 1989, 67-77.
- [95] Primrose, S.B. ve Twyman, R.M., (2006). " Principles of Gene Manipulation and genomics", Blackwell Publishing, Oxford.
- [96] Adams, M.D. , Kelley, J.M. ve Gocayne, J.D., (1991). "Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome Project", *Science*, 252: 1651- 1656.
- [97] Chen, Y., Lin, C.C., Wang, C.D., Wu, H.B. ve Hwang, P., (2007). "An optimized procedure greatly improves EST vector contamination removal", *BMC Genomics*, 8:416.
- [98] Altınışık, Ç., B., (2011). Çinko Eksikliği Durumunda Farklı Anlatım Yapan Arpa Genlerinin İzolasyonu İçin Baskılayıcı Çıkarım Hibridizasyon Kütüphanelerinin Kurulması Ve Biyoinformatik Analizleri, Yüksek Lisans Tezi, Y.T.U Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [99] Diatchenko, L., Lau, Y-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. ve Siebert, P., (1996). "Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93. 6025-6030.
- [100] Larsson, K. A. E., Zetterlund, I., Delp, G. ve Jonsson, L. M. V., (2006). "N-methyltransferase involved in gramine biosynthesis in barley: Cloning and characterization", *Phytochemistry* 67:2002- 2008.

- [101] An Introduction to Cygwin, <http://www.physionet.org/physiotools/cygwin/>, 18.08.2012.
- [102] Laboratory of Phill Green, <http://www.phrap.org/>, 18.08.2012
- [103] VecScreen, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>, 18.08.2012.
- [104] Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 18.08.2012.
- [105] ExPASy Translate Tool, <http://web.expasy.org/translate/>, 18.08.2012
- [106] Align Sequences using ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, 25.08.2012
- [107] Kader, J-C., Juilenne, M. ve Vergnolle, C., (1984), "Purification and characterization of a spinach leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts", *European Journal of Biochemistry*, 139: 411-416.
- [108] Torres-Schumann, S., Godoy, J.A. and Pintor-Toro, J.A., (1992). "A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants". *Plant Mol. Biol.* 18,749-757.
- [109] Molina, A., Diaz, I., Vasil, I. K, Carbonero, P., ve Garcia-Olmedo F., (1996). "Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential response to bacterial pathogens". *Molecular Genetics Genomics*, 252, 162-168.
- [110] Colmenero-Flores, J., M., Campos, F., Garciarrubio, A., ve Covarrubias, A. A., (1997). "Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein". *Plant Mol Biol* 35:393-405.
- [111] Pearce, R.S., Houlston, C.E., Atherton, K.M., Rixon, J.E., Harrison, P., Hughes, M.A. ve Dunn, M.A., (1998). "Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9*, and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley". *Plant Physiol* 117:787-795.
- [112] Hollenbach, B., Schreiber, L., Hartung, W. ve Dietz, K.J., (1997). "Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly". *Planta* 203:9-19.
- [113] UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/P25307>, 29.08.2012.
- [114] Keresztesy, Z. ve Hughes, M.A., (1998). "Homology modelling and molecular dynamics aided analysis of ligand complexes demonstrates functional properties of lipid-transfer proteins encoded by the barley low-temperature-inducible gene family, *blt4*". *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 07/1998; 14(5):523-33.

- [115] Dunn, M.A., Hughes, M.A., Zhang, L., Pearce, R.S., Quigley, A.S. ve Jack, P.L., (1991) "Nucleotide sequence and molecular analysis of the low temperature induced cereal gene, BLT4". *Mol. Gen. Genet.* 229, 389-394.
- [116] Andersson, I. ve Backlund, A., (2008). "Structure and function of RuBisCO". *Plant Physiology and Biochemistry* 46 – 275-291.
- [117] Sasaki, H., Hirose, T., Watanabe, Y. ve Ohsugi R., (1998). "Carbonic Anhydrase Activity and CO₂-Transfer Resistance in Zn-Deficient Rice Leaves". *Plant Physiol.* 118: 929–934.
- [118] McCoy, J.G., Bitto, E., Bingman, C.A., Wesenberg, G.E., Bannen, R.M., Kondrashov, D.A. ve Phillips, G.N. Jr, "Structure and dynamics of UDP-Glucose pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana* with bound UDP-glucose and UTP". *J Mol Biol.* 2007;366:830–841.
- [119] Fredeen, A.L., Rao, I.M. ve Terry, N., (1989). "Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*". *Plant Physiol* 89: 225-230.
- [120] Rao, I.M., Fredeen, A.L. ve Terry, N., (1990). "Leaf phosphate status, photosynthesis and carbon partitioning in sugar beet". III. Diurnal changes in carbon partitioning and carbon export. *Plant Physiol* 9 2 29-36.
- [121] Edwards, G.E. ve Walker, D.A., (1983). "C₃, C₄: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis". Oxford: Blackwell Scientific publications.
- [122] Theodorou, M.E. ve Plaxton, W.C., (1993). "Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation". *Plant Physiology* 101, 339±344.
- [123] Kleczkowski, L. A., (1994b). "Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism". *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 339–367.
- [124] Rao, I.M., (1997). "The role of phosphorous in photosynthesis"; Derleyen: Mohammad Pessaraki, *Handbook of photosynthesis*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc., 173±194.
- [125] Huang, C.Y., Barker, S.J., Langridge, P., Smith, F.W. ve Graham, R.D., (2000). "Zinc deficiency up-regulates expression of high-affinity phosphate transporter genes in both phosphate-sufficient and –deficient barley (*Hordeum vulgare* L. cv Weeah) roots". *Plant Physiology* 124: 415±422.
- [126] Eichacker, L.A. ve Henry, R. (2001). "Function of a chloroplast SRP in thylakoid protein export". *Biochim. Biophys. Acta* 1541, 120–134.
- [127] Richter C.V., Träger C. ve Schünemann D., (2008). "Evolutionary substitution of two amino acids in chloroplast SRP54 of higher plants cause its inability to bind SRP RNA". 22;582(21-22):3223-9.
- [128] Chu, S., Zengel, J.M. ve Lindahl L., (1997). "A novel protein shared by RNase MRP and RNase P". *RNA* 3:382–391.
- [129] Beers, E.P., Woffenden, B.J. ve Zhao, C., (2000). "Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death". *Plant Mol Biol* 44: 399–415.

- [130] Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E. ve Levine, A., (1999). "The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants". *Plant Cell* 11: 431–443.
- [131] Van der Hoorn, R.A.L. ve Jones, J.D.G., (2004). "The plant proteolytic machinery and its role in defence". *Curr Opin Plant Biol.*
- [132] Bork, P., Sander, C. ve Valencia, A., (1992). "An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin and hsp70 heat shock proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7290–7294.
- [133] Grummt I., (2006). "Actin and myosin as transcription factors". *Current Opinion in Genetics & Development* 2006, 16:191–196.
- [134] Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. ve Vad, K., (1993). "Plant chitinases". *Plant J.* 3: 31–40.
- [135] Graham, L.S. ve Sticklen, M.B., (1994). "Plant Chitinases". *Can J Bot.* 72: 1057–1083.
- [136] Bol, J. F., H.J.M. Linthorst, ve B.J.C. Cornelissen. (1990). "Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection". *Annual Review of Phytopathology* 28:114-138.
- [137] Bowles, D.J., (1990). "Defense-related proteins in higher plants". *Annual Review of Biochemistry* 59: 873-907.
- [138] Linthorst, H.J.M., (1991). "Pathogenesis-related proteins of plants". *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 10:123-150.
- [139] Finley, D. ve Chau, V. (1991). "Ubiquitination". *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 25-69.
- [140] Rechsteiner, M. (ed) (1988) Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. Plenum Press, New York.
- [141] Hershko, A. (1988). "Ubiquitin mediated protein degradation". *J. Biol. Chem.* 263, 15237-15240.
- [142] S. Jentsch, (1992). "The ubiquitin-conjugation system". *Ann. Rev. Genet.* 26 179-207.
- [143] Feussner, K., Feussner, I., Leopold, I. ve Wasternack C., (1997). "Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato — the first stress-induced UBC of higher plants". *Institute of Plant Biochemistry, Weinberg 3, 06120 Halle/Saale, German.*
- [144] Kim, K.J., Park, C.J., An, J.M., Ham, B.K., Lee, B.J. ve Paek, K.H., (2005). "CaAlaAT1 catalyzes the alanine:2-oxoglutarate aminotransferase reaction during the resistance response against Tobacco mosaic virus in hot pepper". *Planta* 221, 857–867.
- [145] Taler, D., Galperin, M., Benjamin, I., Cohen, Y. ve Kenigsbuch, D., (2004). "Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease". *Plant Cell* 16, 172–184.

- [146] Liepman, A.H. ve Olsen, L.J., (2003). "Alanine aminotransferase homologs catalyse the glutamate: glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis". *Plant Physiol.* 131, 215–227.
- [147] Fukao, Y., Hayashi, M. ve Nishimura, M., (2002). "Proteomic analysis of leaf peroxisomal proteins in greening cotyledons of Arabidopsis thaliana". *Plant Cell Physiol.* 43, 689–696.
- [148] Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. ve Ohsumi, C., (2003). "Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis". *Plant J.* 33, 975–987.
- [149] Niessen, M., Krause, K., Horst, I., Staebler, N., Klaus, S., Gaertner, S., Kebeish, R., Araujo, W.L., Fernie, A.R. ve Peterhansel, C., (2012). "Two alanine aminotransferases link mitochondrial glycolate oxidation to the major photorespiratory pathway in Arabidopsis and rice". *J. Exp. Bot.* 63, 2705–2716.
- [150] Limami, A.M., Glevarec, G., Ricoult, C., Cliquet, J.B. ve Planchet, E., (2008). "Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress". *J. Exp. Bot.* 59 (9), 2325–2335.
- [151] de Sousa, C.A.F. ve Sodek, L., (2003). "Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia". *Environ. Exp. Bot.* 50, 1–8.
- [152] Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismind, K.P. ve Good, A.G., (2007). "Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*". *Plant J.* 49, 1108–1121.
- [153] Rocha, M., Sodek, L., Licausi, F., Hameed, M.W., Dornelas, M.C. ve van Dongen, J.T., (2010). "Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and independence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress". *Amino Acids* 39, 1043–1053.
- [154] Puiatti, M. ve Sodek, L., (1999). "Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean". *Plant Physiol. Biochem.* 37, 767–773.
- [155] Drossopoulos, J.B., Karamanos, A.J. ve Niavis, A., (1985). "Changes in amino acid compounds during the development of two wheat cultivars subjected to different degrees of water stress". *Ann. Bot.* 56, 291–305.
- [156] Mazzucotelli, E., Tartari, A., Cattivelli, L. ve Forlani, G., (2006). "Metabolism of caminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat". *J. Exp. Bot.* 57, 3755–3766.
- [157] Bogeat-Triboulot, M.B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., ve Fayyaz P., (2007). "Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions". *Plant Physiol.* 143:876–92.
- [158] Sirover, M.A., (1999). "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 159–184.

- [159] Chuang, D.M., Hough, C., ve Senatorov, V.V., (2005). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 269–290.
- [160] Morgenegg, G., Winkler, G.C., Hubscher, U., Heizmann, C.W., Mous, J. ve Kuenzle, C.C., (1986). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a nonhistone protein and a possible activator of transcription in neurons". *J. Neurochem.* 47 54–62.
- [161] Singh, R. ve Green, M.R., (1993). "Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase", *Science* 259 365–368.
- [162] Collinge, D.B. ve Slusarenko, A.J., (1987). "Plant gene expression in response to pathogens". *Plant Molec. Biol.* 9: 389–401.
- [163] Linthorst, H.J.M., (1991). "Pathogenesis-related proteins of plants". *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123–150.
- [164] Van Loon, L.C. ve Van Strien, E.A., (1999). "The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR- 1 type proteins". *Physiol. & Molec. Plant Pathol.* 55: 85–97.
- [165] Becker, A. ve Theissen, G., (2003). "The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of Xowering plants". *Molec Physiol Evol* 29:464–489.
- [166] Garcia-Maroto, F., Carmona, M.J., Garrido, J.A., Vilches-Ferròn, M., Rodriguez-Ruiz, J., Lopez, Alonso, D., (2003). "New roles for MADS-box genes in higher plants". *Biol Plantarum* 46:321–330.
- [167] Lozano, R., Angosto, T., Gomez, P., Payan, C., Capel, J., Huijser, P., Salinas, J. ve Martinez-Zapater J. M., (1998). "Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes". *Plant Physiol*, 117(1):91-100.
- [168] Bonhomme, F., Kurz, B., Melzer, S., Bernier, G. ve Jacquard, A., (2000). "Cytokinin and gibberellin activate SaMADS A, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*". *Plant J*, 24(1):103-111.
- [169] Ando, S., Sato, Y., Kamachi, S. ve Sakai S., (2001). "Isolation of a MADS-box gene (ERAF17) and correlation of its expression with the induction of formation of female flowers by ethylene in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.)". *Planta*, 213(6):943-952.
- [170] Zhu, C., Perry, S. E., (2005). "Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family". *Plant J*, 41(4):583-594.
- [171] Tardif, G., Kane, N.A., Adam, H., Labrie, L., Major, G., Gulick, P., Sarhan, F. ve Laliberte, J.F., (2007). "Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat". *Plant Mol Biol*, 63(5):703-718.
- [172] Marri, L., Sparla, F., Pupillo P., ve Trost, P., (2005). "Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,

phosphoribulokinase, and CP12 in *Arabidopsis thaliana*". *Journal of Experimental Botany*, 409: 73–80.

**ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN CAP3 PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN
KONTİGLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ**

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (BLASTN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (BLASTP)			
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)
Contig 1	249	H.vulgare (clone pKG2316) mRNA for lipid transfer protein precursor Z37114.1	398	1e-107	98	3'5' Frame 3 Chain A, Lipid Binding In Rice Nonspecific Lipid Transfer Protein-1 Complexes From Oryza Sativa IUVA_A	38.1	5e-05	74
		H.vulgare Cw-18 mRNA X68655.1	381	1e-102	97				
		Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK360670.1	348	1e-92	94				
		H. vulgare BLT4 mRNA X56547.1	279	5e-72	90				
Contig 2	361	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357755.1	579	6e-162	98	-	-	-	-
Contig 3	756	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253070.1 AK251217.1	682	0,0	98	-	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for	682	0,0	98				

		predicted protein AK357990.1 AK353670.1							
Contig 4	420	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK374021.1 AK363776.1	652	0,0	98	3'5' Frame 1 Chain M, Crystal Structure Of The Membrane Domain Of Respiratory Complex I From E. Coli At 3.0 Angstrom Resolution 3RKO_M	26.2	9.3	46
Contig 5	292	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251654.1	412	5e-112	95	-	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK372371.1	405	9e-110	97				
Contig 6	612	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248868.1	1020	0.0	98	3'5' Frame 1 Chain A, Three-Dimensional Structure Of Human Electron Transfer Flavoprotein To 2.1 A Resolution	29.6	1.3	38
Contig 7	711	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248914.1	723	0.0	98	5'3' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of Activated Rice RuBisCO Complexed With 2-Carboxyarabinitol-1,5-Bisphosphate 1WDD_A	41.2	3e-04	100
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1	442	2e-120	98				
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	442	2e-120	98	Chain A, A Crystal Form Of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase(Slash) oxygenase From Nicotiana Tabacum In The Activated 4RUB_A	41.2	3e-04	100
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate	442	2e-120	98	Chain L, Crystal Structure Of Unactivated Tobacco RuBisCO With Bound Phosphate Ions 1EJ7_L	41.2	3e-04	100

		carboxylase/ox ygenase large subunit (rbcL) gene, AY137453.1 Barley chloroplast genes rbcL and atpB X00630.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/ox ygenase large subunit (rbcL) gene, AY836173.1	442 442	2e-120 2e-120	98 98				
Contig 8	1008	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251968.1 H.vulgare mRNA for UDP-glucose pyrophosphory lase X91347.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK357990.1 AK353670.1	959 953 767	0.0 0.0 0.0	99 99 98	3'5' Frame 2 Chain A, X-Ray Structure Of Gene Product From Arabidopsis Thaliana At3g03250, A Putative Udp- Glucose Pyrophosphorylase 1Z90_A Chain A, Crystal Structure Of A Putative Udp- Glucose Pyrophosphorylase From Arabidopsis Thaliana With Bound Utp 2ICX_A Chain A, Crystal Structre Of Udp- Glucose Pyrophosphorylase Of Homo Sapiens 3R2W_A	179 179 127	8e-52 8e-52 1e-32	85 85 54
Contig 9	489	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK369974.1 AK376775.1	713 692	0.0 1e-91	96 97	3'5' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of The Acyl-Coa Carboxylase, Accd5, From Mycobacterium Tuberculosis 2A7S_A 3'5' Frame 3 Chain A, Protein Tyrosine Phosphatase Ptpn- 22 (Lyp) Bound To The Mono- Phosphorylated Lck Active Site Peptide 3BRH_A	27.3 26.6	5.9 9.1	56 33
Contig 10	331	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK368965.1	540	3e-150	98	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of Xylulokinase From Chromobacterium Violaceum	28.5	0.85	52

		Hordeum vulgare Srp54-2 mRNA, complete sequence; and signal recognition particle 54 kDa subunit (Srp 54-3) mRNA L48286.1	518	1e-143	97	3HZ6_A Tblastx Chain A, Crystal Structure Of The Hybrid State Of Ribosome In Complex With The Guanosine Triphosphatase Release Factor 3 3ZVP_A	27.6	0.051	14
Contig 11	370	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK354765.1 AK366006.1	531 505	2e-147 1e-139	97 97	3'5' Frame 1 Chain A, Structural Consequences Of Redesigning A Protein-Zinc Binding Site 1CVH_A	26.2	7.0	22
Contig 12	272	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK369652.1 AK360618.1 AK354843.1 AK358450.1	420	3e-114	98	3'5' Frame 2 Chain S, Structure Of Rice RuBisCO In Complex With Nadp(H) 3AXK_S	37.4	2e-04	88
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249588.1 AK249082.1 AK250591.1	420	3e-114	98	3'5' Frame 2 Chain S, Crystal Structure Of Activated Rice RuBisCO Complexed With 2-Carboxyarabinitol-1,5-Bisphosphate 1WDD_S	34.7	0.002	81
		Hordeum vulgare ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit mRNA U43493.1	327	2e-86	92	3'5' Frame 2 Chain S, Crystal Structure Of The Unactivated Form Of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase(Slash) oxygenase From Tobacco Refined At 2.0-Angstroms Resolution 3RUB_S	32	0.020	80
		Hordeum vulgare rbcS gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit AB020943.1	110	7e-21	88				
Contig 13	483	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251574.1	752	0.0	98	5'3' Frame 2 Chain A, Proposed Amino Acid Sequence And The 1.63 Angstrom X-Ray Crystal Structure Of A Plant Cysteine Protease Ervatamin B: Insight Into The Structural Basis Of Its Stability And Substrate Specificity. 1IWD_A	68.6	2e-14	48
		Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for papain-like cysteine proteinase (pap-15 gene) AM941125.1	737	0.0	97				

						5'3' Frame 2 Chain A, The 2.0 A Crystal Structure Of The Kdel- Tailed Cysteine Endopeptidase Functioning In Programmed Cell Death Of Ricinus Communis Endosperm <u>1S4V_A</u>	67.0	5e-14	49
Contig 14	383	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein <u>AK356840.1</u>	628	7e-177	99	5'3' Frame 1 Chain A, Atomic Structure Of The Actin:dnase I Complex <u>1ATN_A</u>	72	2e-15	86
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone <u>AK252278.1</u>	628	7e-177	99				
		Hordeum vulgare actin mRNA, complete cds <u>AY145451.1</u>	628	7e-177	99				
Contig 15	705	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein <u>AK359627.1</u> <u>AK374372.1</u> <u>AK353942.1</u>	1186	0.0	98	Chain D, Homology Model For The Spinach Chloroplast 50s Subunit Fitted To 9.4a Cryo-Em Map Of The 70s Chlororibosome <u>3BBO_D</u>	104	4e-26	41
Contig 16	345	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein <u>AK354017.1</u>	486	4e-134	98	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of Brassica Juncea Chitinase Catalytic Module (Bjchi3) <u>2Z37_A</u>	28.9	0.71	77
		H.vulgare mRNA for chitinase 2b <u>X78672.1</u>	479	6e-132	98	5'3' Frame 1 Chain A, Crystal Structure Of Class I Chitinase From Oryza Sativa L. Japonica <u>2DKV_A</u>	25.4	9.5	77
		Hordeum vulgare mRNA for chitinase II (pathogenesis- related protein 3) (cht2 gene) <u>AJ276226.1</u>	285	1e-73	98				
		Hordeum vulgare subsp. vulgare clone BL Chit2 chitinase mRNA <u>EU887263.1</u>	169	2e-38	99				

		H.vulgare mRNA for chitinase 2a X78671.1	163	7e-37	78				
Contig 17	228	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248244.1	357	2e-95	98	-	-	-	-

ARPA BİTKİSİNİN GÖVDE DOKUSU CAP3 PROGRAMI İLE OLUŞTURULAN SİNGLETLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (BLASTN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (BLASTX-tBLASTX)		
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri
Singlet 1 16R_A01-T7	70	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357990.1 AK353670.1	82.4	3e-13	92	-	-	-
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253070.1 AK251217.1	82.4	3e-13	92			
Singlet 2 16R_A08-T7	145	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252445.1	257	1e-65	99			
Singlet 3 16R_C08-T7	27	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 4 16R_D12-T7	463	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK369974.1 AK376775.1	778	0.0	99	-	-	-
Singlet 5 16R_H10-T7	370	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK372960.1 AK365515.1	669	0	99	3'5' Frame 1 Chain B, Crystal Structure Of L-Proline Dehydrogenase From P.Horikoshii 1Y56_B	26.9	4.6
		Triticum aestivum cDNA, clone: SET5_P09, cultivar: Chinese Spring AK331055.1	549	5e-153	94	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of Cathepsin B From Trypanosoma Brucei 3MOR_A	26.9	3.4

						5'3' Frame 2 Chain A, Glycerate Kinase From <i>Neisseria Meningitidis</i> (Serogroup A) 1T06_A	26.9	4.1
Singlet 6 16R_H11-T7	326	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK355686.1	505	1e-139	100	3'5' Frame 2 Chain A, The Structure Of Cbb3 Cytochrome Oxidase 3MK7_A	28.5	0.83
		Triticum aestivum cDNA, clone: WT012_B05, cultivar: Chinese Spring AK335101.1	411	2e-111	91	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of The Kif1a Motor Domain Complexed With Mg-Adp 1155_A	27.7	1.3
		PREDICTED: Brachypodium distachyon ubiquitin-conjugating enzyme E2 32-like (LOC100831984), mRNA XM_003558027.1	313	6e-82	86			
Singlet 7 2R_A02-T7	182	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357796.1 AK356829.1 AK356794.1 AK359673.1	331	9e-88	100	3'5' Frame 2 Chain A, The Structure Of Cbb3 Cytochrome Oxidase 3MK7_A	28.5	0.83
						5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of The Kif1a Motor Domain Complexed With Mg-Adp 1155_A	27.7	1.3
Singlet 8 2R_A02-T7	182	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357796.1 AK356829.1 AK356794.1 AK359673.1	331	9e-88	100	3'5' Frame 1 Chain A, Crystal Structure Of Psbq Polypeptide Of Photosystem II From Higher Plants 1NZE_A	92	7e-25
		Triticum aestivum putative oxygen-evolving complex precursor (TAOEC01) mRNA, complete cds EF469610.1	303	2e-79	97			
		Zea mays gene for Ferredoxin-NADP reductase binding protein Z26824.1	167	3e-38	91			

Singlet 9 2R_B02-T7	197	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251768.1	363	4e-97	100	3'5' Frame 1 Chain A, 2.76 Angstrom Crystal Structure Of A Putative Glucose- 1- Phosphate Thymidyltransferase From Bacillus Anthracis In Complex With A Sucrose. 3HL3_A	25	4.0
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253063.1	350	3e-93	100			
		Hordeum vulgare partial mRNA for chlorophyll a/b- binding protein AJ006296.1	351	8e-94	99			
Singlet 10 2R_D03-T7	27	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 11 2R_G12-T7	255	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK370222.1	472	8e-130	100	-	-	-
Singlet 12 3R_A07-T7	186	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK369022.1 AK367942.1	241	2e-60	97	3'5' Frame 3 Chain B, Crystal Structure Of An Intact Type Ii Dna Topoisomerase: Insights Into Dna Transfer Mechanisms 2ZBK_B	25.8	1.8
						Chain A, Structure Of Topoisomerase Subunit 1MU5_A	25.8	1.8
Singlet 13 3R_D01-T7	368	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK372161.1 AK358929.1	675	0	100	3'5' Frame 1 Chain A, Ribosome Recycling Factor From Thermus Thermophilus 1EH1_A	125	3e-36
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone FLbaf53k03 AK249952.1	669	0	99	Chain A, 2.65 Angstrom Resolution Crystal Structure Of Ribosome Recycling Factor (Frr) From Bacillus Anthracis 4GFQ_A	120	2e-34
		Triticum aestivum cDNA, clone: WT004_L08, cultivar: Chinese Spring AK332722.1	625	8e-176	98	3'5' Frame 3	26.9	3.4
		Zea mays ribosome recycling factor (LOC100284109), mRNA NM_001157006.1	436	4e-119	89	(Tetraspanin) Chain A, Crystal Structure Of Putative Arginyl T-Rna Synthetase From Campylobacter Jejuni		

						<u>3FNR_A</u>		
Singlet 14 3R_F05-T7	362	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK359363.1	664	0	99	5'3' Frame 1 (AAT_I superfamily) Chain A, Crystal Structure Of Alanine Aminotransferase From Hordeum vulgare 3TCM_A	142	2e-40
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250046.1	664	0	99		122	2e-33
		Deschampsia antarctica clone Dacor 1.7 alanine aminotransferase mRNA, 3' UTR and partial cds AY090542.1	464	2e-127	90	Chain A, Human Alanine Aminotransferase 2 In Complex With Plp 3IHJ_A		
Singlet 15 3R_F06-T7	62	-	-	-	-	-	-	
Singlet 16 3R_F07-T7	141	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK356301.1	261	9e-67	100	3'5' Frame 1 Chain A, Crystal Structure Of A Galactose Specific Lectin From Artocarpus Hirsuta In Complex With Methyl-A-D-Galactose 1TOQ_A	24.3	3.4
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252840.1 AK249713.1	261	9e-67	100		24.6	3.4
						Chain A, Crystal Structure Of Potassium-Independent Plant Asparaginase 2GEZ_A		
Singlet 17 4R_E11-T7	133	Hordeum vulgare thaumatin-like protein TLP2 mRNA AY839293.1	241	1e-60	100	3'5' Frame 2 (GH64-TLP-SF superfam) Chain A, High Resolution Structure Of A Cherry Allergen Pru Av 2 2AHN_A	31.6	0.015
		H.vulgare mRNA for a pathogenesis-related protein (Hv-1c) X58565.1	241	1e-60	100		29.3	0.082
		H.vulgare mRNA for a pathogenesis-related protein (Hv-1b) X58566.1	241	1e-60	100	Chain A. The Crystal Structure Of Zeamatin. 1DU5_A		
		Hordeum vulgare mRNA for pathogenesis protein 5 (pr-5 gene) AJ276225.1	241	1e-60	100	Chain A, Crystal Structure Of Sweet-Tasting Protein Thaumatin II 3AOK_A	26.9	0.43
		Hordeum vulgare						

		subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK355769.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf65g08 AK250244.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare mRNA for putative acidic pr5 (pr5a gene), isolated from a cDNA library after inoculation with Blumeria graminis, cultivar pallas P-01. AM403331.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare thaumatin-like protein TLP1 mRNA AY839292.1	235	5e-59	99			
		H.vulgare mRNA for a pathogenesis-related protein (Hv-1a) X58564.1	235	5e-59	99			
Singlet 18 4R_F12-T7	228	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf89d22 AK250561.1	409	5e-111	99	5'3' Frame 1 Chain A, Class Iv Chitinase Structure From Picea Abies At 1.8a 3HBD_A	59.3	2e-12
		Phyllostachys edulis cDNA clone: bphylf060p09, full insert sequence FP093947.1	211	2e-51	86	Chain A, Crystal Structure And Enzymatic Properties Of A Bacterial Family 19 Chitinase Reveal Differences With Plant Enzymes 2CIL_A	53.9	3e-10
		Triticum aestivum cDNA, clone: SET1_D20, cultivar: Chinese Spring AK336175.1	211	2e-51	84			
		Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA XM_002448060.1	207	2e-50	86			
		Triticum aestivum chitinase II precursor (Cht2) mRNA, complete cds AF112963.1	206	7e-50	83			
Singlet 19	17	-	-	-	-	-	-	-

4R_G01-T7								
Singlet 20 7R_C05-T7	368	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK368348.1 AK366552.1	669 674	0 3e-46	99 100	5'3' Frame 3 Chain A, The Crystal Structure Of A Hydrolase From Pseudomonas Aeruginosa Pa01 3OM8_A	33.5	0.020
		Triticum aestivum mRNA for MIKC-type MADS-box transcription factor WM21B (WM21B gene) AM502888.1	444	2e-121	92	5'3' Frame 2 Chain B, Structure Of Cryptochrome 3 - Dna Complex 2VTB_B	30	0.32
Singlet 21 7R_C09-T7	91	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK354893.1 AK371162.1 AK353755.1	145	5e-32	99	3'5' Frame 1 Chain M, Cyanide-Bound Structure Of Bifunctional Carbon Monoxide Dehydrogenase AC ETYL-Coa Synthase From Moorella Thermoacetica, Cyanide-Bound C-Cluster 3I04_M	25.7	1.9
						5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of Human Pank1 Alpha: The Catalytic Core Domain In Complex With Accoa 2I7N_A	25.7	2.6
Singlet 22 7R_D02-T7	379	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK374669.1 AK363402.1	693 688	0 0	100 99	3'5' Frame 1 Chain P, Localization Of The Small Subunit Ribosomal Proteins Into A 5.5 A Cryo-Em Map Of Triticum Aestivum Translating 80s Ribosome 3IZ6_P	192	1e-62
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249148.1	693	0	100			
Singlet 23 7R_D04-T7	544	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK361836.1 AK367369.1	1000	0	99	3'5' Frame 1 Chain A, X-Ray Structure Of Adenosine 5'-Monophosphate Deaminase From Arabidopsis Thaliana In Complex With Coformycin 5'-Phosphate 2A3L_A	29.6	1.3
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252870.1	1000	0	99			
		Triticum aestivum RNA for phosphoribulokina	917	0	97	3'5' Frame 2 Chain A, Structure	27.3	4.8

		se X51608.1 T.aestivum PRK gene for ribulose- 5-phosphate kinase X57952.1	927	0	97	Of The Catalytic Domain Of Human Soluble Guanylate Cyclase 1 Beta 3. 2WZ1_A		
Singlet 24 7R_H10-T7	248	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf150e10 AK252232.1	440	2e-120	99	3'5' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of Jmjd5 Domain Of Human Lysine- Specific Demethylase 8 (Kdm8) In Complex With N- Oxalylglycine 4AAP_A	26.2	2.3
		Zea mays clone hypothetical protein mRNA EU965089.1 EU959044.1 EU954738.1 EU954706.1 EU954555.1	95.3	2e-16	90	5'3' Frame 3 Chain A, Prolyl Oligopeptidase From Porcine Muscle 1QFM_A	25.8	3.2
Singlet 25 8R_A10-T7	184	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK356049.1	337	2e-89	100	3'5' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of Mouse Mitochondrial Aspartate Aminotransferase KYNURENINE AMINOTRANSF ERASE IV 3HLM_A	27.3	0.63
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249305.1	337	2e-89	100			
Singlet 26 8R_B05-T7	38	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357990.1 AK353670.1	60	7e-07	97	5'3' Frame 1 Chain A, Structure Determination And Refinement Of Ribulose 1,5 Bisphosphate Carboxylase(Slash)oxygenase From Synechococcus 1RBL_A	22.3	4.7
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253070.1 AK251217.1	60	7e-07	97			
Singlet 27 8R_C06-T7	613	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK365017.1 AK357370.1	1127	0	99	3'5' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of S. Aureus Farnesyl Pyrophosphate Synthase 1RTR_A	31.2	0.35
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum isolate D05c hypothetical protein mRNA, partial cds HM539666.1	821	0	99	5'3' Frame 2 Chain A, Human Rpc62 Subunit Structure 2XUB_A	47	3e-06
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum isolate D04c	821	0	99			

		hypothetical protein mRNA, partial cds HM539665.1						
Singlet 28 8R_E08-T7	371	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK372161.1 AK358929.1	604	1e-169	95	5'3' Frame 1 (RFF superfamily) Chain A, 2.65 Angstrom Resolution Crystal Structure Of Ribosome Recycling Factor (Frr) From Bacillus Anthracis 4GFQ_A	107	3e-29
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249952.1	599	5e-168	95			
		PREDICTED: Brachypodium distachyon ribosome-recycling factor, chloroplastic-like (LOC100834081), mRNA XM_003562841.1	472	1e-129	88			
		Zea mays ribosome recycling factor (LOC100284109), mRNA NM_001157006.1	381	2e-102	84			
Singlet 29 8R_E10-T7	613	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK365017.1 AK357370.1	1133 1136	0 0	100 100	5'3' Frame 1 Chain A, Crystal Structure Of S. Aureus Farnesyl Pyrophosphate Synthase 1RTR_A	31.2	0.34
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum isolate D05c hypothetical protein mRNA, partial cds HM539666.1	826	0	100	3'5' Frame 2 Chain A, Human Rpc62 Subunit Structure 2XUB_A	47	3e-06
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum isolate D04c hypothetical protein mRNA, partial cds HM539665.1	826	0	100			
Singlet 30 9R_A08-T7	730	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK355370.1 AK355251.1	1349	0	100	5'3' Frame 1 Chain O, Crystal Structure And Functional Analysis Of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase From Oryza Sativa 3E6A_O	375	3e-130
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253106.1 AK250578.1	1349	0	100	3'5' Frame 2		

		H. vulgare GADPH mRNA for glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase X60343.1	1349	0	100	Chain A, Structure Of Human Casein Kinase 1 Gamma-1 In Complex With 2-(2-Hydroxyethylamino)-6-(3-Chloroanilino)-9-Isopropylpurine (Casp Target) 2CMW_A	30.8	0.76
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar TR306 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds. EF409633.1	639	2e-50	100	Chain A, Structure Of Casein Kinase 1 Gamma 3 2CHL_A	28.9	3.3
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Steptoe glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds. EF409632.1	639	2e-50	100			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Oregon Wolfe Barley Recessive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial EF409631.1	639	2e-50	100			
Singlet 31 9R_F12-T7	218	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, partial cds AK357796.1	300	3e-78	99	3'5' Frame 3	24.3	7.7
		Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds AK359673.1	285	9e-74	99	Chain B, Structure Of Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif3i Complex With Eif3b C-Terminus (655-700) 3ZWL_B		
		Triticum aestivum putative oxygen-evolving complex precursor (TAOEC01) mRNA, complete cds EF469610.1	182	1e-42	85			

**ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN PHRAP PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN
KONTİGLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ**

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (BLASTN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (BLASTX- tBLASTX)			
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)
Contig 1	337	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK354017.1	510	2e-141	100	5'3' Frame 1	50.8	2e-08	70
			503	4e-139	99	Chain A, Crystal Structure Of Class I Chitinase From Oryza Sativa L. Japonica 2DKV_A			
		H.vulgare mRNA for chitinase 2b X78672.1	300	5e-78	99	Chain A, Crystal Structure Of Gh Family 19 Chitinase From Carica Papaya 3COL_A	48.5	9e-08	66
		Hordeum vulgare mRNA for chitinase II (pathogenesis-related protein 3) (cht2 gene) AJ276226.1	174	3e-40	100				
		Hordeum vulgare subsp. vulgare clone BL Chit2 chitinase mRNA EU887263.1	182	2e-42	80				
		H.vulgare mRNA for chitinase 2a X78671.1							
Contig 2	589	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK248868.1	1072	0	99	3'5'Frame 1	27.7	5.9	33
						Chain A, Structure Of The Phyr Stress Response Regulator At 1.25 Angstrom			

						Resolution 3NOR_A 5'3' Frame 1 Chain A, Crystal Structure Of The Chaperonin Complex Cpn60CPN10(A DP)7 FROM <i>Thermus thermophilus</i> 1WE3_A	194	5e-58	55
Contig 3	613	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK365017.1 AK357370.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum isolate D05c hypothetical protein mRNA, partial cds HM539666.1 Hordeum vulgare subsp. spontaneum isolate D04c hypothetical protein mRNA, partial cds HM539665.1	1127 1130 821 821	0 0 0 0	99 100 99 99	-	-	-	-
Contig 4	368	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK372161.1 AK358929.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249952.1	675 669	0 0	100 99	3'5' Frame 1 Chain A, Ribosome Recycling Factor From <i>Thermus Thermophilus</i> 1EH1_A Chain A, Crystal Structure Of The Ribosome Recycling Factor (Rrf) From <i>Escherichia Coli</i> 1EK8_A	125 106	4e-36 7e-29	49 44
Contig 5	330	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK357755.1	603	3e-169	99	5'3' Frame 3 Chain B, Crystal Structure Of Pig Gtp-Specific Succinyl-Coa Synthetase In Complex With Gtp 2FP4_B Chain B, Crystal Structure Of The Complex Of Adp And Mg ²⁺ With Dephosphorylate d E. Coli Succinyl-Coa	129 109	4e-36 4e-29	58 58

						Synthetase <u>1COI_B</u>			
Contig 6	237	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK369652.1 AK360618.1 AK354843.1 AK358450.1	438	7e-120	100	5'3' Frame 2	66.6	5e-15	88
			438	7e-120	100	Chain S, Structure Of Rice RuBisCO In Complex With Nadp(H) <u>3AXK_S</u>	63.9	4e-14	84
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249588.1 AK249082.1 AK250591.1	438	7e-120	100	Chain S, Crystal Structure Of Activated Rice RuBisCO Complexed With 2-Carboxyarabinito 1-1,5-Bisphosphate <u>1WDD_S</u>	50.4	3e-09	77
			438	7e-120	100	Chain S, A Crystal Form Of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase(Slas h)oxxygenase From Nicotiana Tabacum In The Activated <u>4RUB_S</u>	29.3	0.22	46
Contig 7	280	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251654.1 Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK372371.1	438	8e-120	97	5'3' Frame 2	28.5	0.74	30
			425	7e-116	99	Chain A, Crystal Structure Of Carnitine Acetyltransferase <u>1NDB_A</u>	25.4	6.9	50
Contig 8	463	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK369974.1 AK376775.1	778	0.0	99	5'3' Frame 3	29.6	0.74	32
			769	5e-99	100	Chain A, Crystal Structure Of Ribulose-5-Phosphate 3-Epimerase (Yp_718263.1) From Haemophilus Somnus 129pt At 1.91 A Resolution			

						<u>3CU2_A</u>			
Contig 9	229	H.vulgare (clone pKG2316) mRNA for lipid transfer protein precursor Z37114.1	416	3e-113	99	3'5' Frame 2 Chain A, Lipid Binding In Rice Nonspecific Lipid Transfer Protein-1 Complexes From Oryza Sativa 1UVA_A	52.4	4e-10	79
		H.vulgare Cw-18 mRNA X68655.1	339	3e-108	98	Chain A, Structural Basis Of Non-Specific Lipid Binding In Maize Lipid-Transfer Protein Complexes With Capric Acid Revealed By High-Resolution X-Ray Crystallography 1FK0_A	49.7	4e-09	70
		Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK360670.1	366	3e-98	96	Chain A, X-Ray Structure Of A New Ltp1 1T12_A	47.4	3e-08	63
		H. vulgare BLT4 mRNA X56547.1	298	1e-77	91				
Contig 10	322	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK368965.1	575	7e-161	99	5'3' Frame 3 Chain W, Model Of Mammalian Srp Bound To 80s Rncs 2J37_W	36.2	0.002	32
		Hordeum vulgare Srp54-2 mRNA, complete sequence; and signal recognition particle 54 kDa subunit (Srp 54-3) mRNA L48286.1	553	3e-154	98	Chain A, Crystal Structure Of Apoptosis Inducing Factor (Aif) 1M6I_A	26.9	3.4	30
						Chain A, X-Ray Structure Of Annexin From Arabidopsis Thaliana Gene At1g35720 1YCN_A	26.2	5.5	41
Contig 11	215	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248244.1	375	5e-101	99	-	-	-	-
Contig 12	398	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK374021.1 AK363776.1	686	0	99	3'5' Frame 1 Chain A, Glutamine Binding Protein Open Ligand-Free Structure 1GGG_A	28.5	1.5	29
Contig 13	684	Hordeum vulgare subsp. Vulgare	1251	0,0	99	5'3' Frame 3 Chain D,			

		mRNA for predicted protein AK359627.1 AK374372.1				Homology Model For The Spinach Chloroplast 50s Subunit Fitted To 9.4a Cryo-Em Map Of The 70s Chlororibosome 3BBO_D Chain C, Crystal Structure Of The Ribosome At 5.5 A Resolution. 1GIY_C	305 191	1e-102 9e-60	78 52
Contig 14	323	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK354765.1	586	3e-164	100	5'3' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of The Fructose Specific Iib Subunit Of Pts System From Bacillus Subtilis Subsp. Subtilis Str. 168 2R48_A	29.3	0.27	52
						5'3' Frame 1 Chain A, The Structure Of The Mammalian Srp Receptor 2FH5_A	30.4	0.19	24
Contig 15	459	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251574.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for papain-like cysteine proteinase (pap-15 gene) AM941125.1	761	0.0	98	3'5' Frame 2 Chain A, Ceruloplasmin Revisited: Structural And Functional Roles Of Various Metal Cation Binding Sites 2J5W_A	26.6	8.9	35
			747	0	98	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of A Papain-Like Cysteine Protease Ervatamin-A Complexed With Irreversible Inhibitor E-64 3BCN_A	60.1	1e-11	45
						Chain A, Complex Structure Of Tarocystatin And Papain 3IMA_A	58.2	5e-11	40
						Chain A, The 2.0 A Crystal Structure Of The Kdel-Tailed Cysteine Endopeptidase Functioning In Programmed Cell Death Of Ricinus Communis	72.4	8e-16	46

						Endosperm 1S4V_A	65.5	2e-13	44
						Chain A, Actinidin From Actinidia Arguta Planch (Sarushashi) 3P5U_A	60.8	6e-12	48
						Chain A, 1.9 Angstrom Crystal Structure Of A Plant Cysteine Protease Ervatamin C 1OOE_A			
Contig 16	358	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK356840.1	647	0	98	5'3' Frame 3 (NBD_sugar-kinase_HSP70_actin superfamily)			
			647	0	99	Chain A, Atomic Structure Of The Actin:dnase I Complex 1ATN_A	211	1e-67	83
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252278.1	647	0	99				
		Hordeum vulgare actin mRNA, complete cds AY145451.1				Chain A, Crystal Structure Of Actin-Related Protein Arp4 From <i>S. cerevisiae</i> Complexed With Atp 3QB0_A	55.8	1e-09	41
Contig 17	975	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251968.1	965	0	99	3'5' Frame 1 (Glyco_tranf_GT A_type superfamily)			
			959	0	99	Chain A, Crystal Structure Of A Putative Udp-Glucose Pyrophosphorylase From Arabidopsis Thaliana With Bound Utp 2ICX_A	322	4e-106	89
		Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein AK357990.1 AK353670.1	804	0	99	Chain A, Crystal Structure Of Ugp1p 2I5K_A	211	2e-63	60
						3'5' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of The Plant Stress-Response Enzyme 3H7R_A	29.3	3.8	41

						Chain A, Crystal Structure Of Isoflavone O-Methyltransferase Homolog In Complex With Biochanin A And Sah 2QYO_A	161	2e-29	44
Contig 18	679	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK248914.1	749	0	99	5'3' Frame 2 (RuBisCO_large superfamily)			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Morex chloroplast, complete Genome EF115541.1	466	1e-127	100	Chain A, Crystal Structure Of Activated Rice RuBisCO Complexed With 2-Carboxyarabinito 1-1,5-Bisphosphate 1WDD_A	177	7e-52	96
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Angora ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ox ygenase large subunit (rbcl) gene, complete cds; chloroplast AY137456.1	466	1e-127	100	Chain A, A Crystal Form Of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase(Slas h)oxxygenase From Nicotiana Tabacum In The Activated State 4RUB_A	177	8e-82	96
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum voucher H3139 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ox ygenase large subunit (rbcl) gene, AY137453.1	466	1e-127	100	Chain L, Activated Spinach RuBisCO In Complex With The Product 3-Phosphoglycerate e1AA1_L	174	6e-51	94
		Barley chloroplast genes rbcl and atpB X00630.1	466	1e-127	100				
		Hordeum vulgare subsp. spontaneum ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ox ygenase large subunit (rbcl) gene, AY836173.1							
Contig 19	740	Hordeum vulgare subsp. Vulgare mRNA for predicted protein	737	0	99	3'5' Frame 3 (Methyltransf_2 superfamily) Chain A, Crystal Structure Of			

		<u>AK357990.1</u> <u>AK353670.1</u> Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone <u>AK253070.1</u> <u>AK251217.1</u>	737	0	99	Isoflavone O- Methyltransferas e Homolog In Complex With Biochanin A And Sah <u>2QYO_A</u>	112	2e-28	45
--	--	--	-----	---	----	--	-----	-------	----

ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN PHRAP PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN SİNGLETLERİN BLASTN VE BLASTP ANALİZLERİNİN SONUÇ ÇİZELGESİ

KLON ADI	cDNA BOYUTU (bp)	DNA BENZERLİĞİ (BLASTN)				PROTEİN BENZERLİĞİ (BLASTX- tBLASTX)		
		Benzerlik sonucu	Skor	E değeri	Benzerlik oranı (%)	Benzerlik sonucu	Skor	E değeri
Singlet 1 16R_A08-T7	145	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252445.1	257	1e-65	99	5'3' Frame 1 Chain A, Structural Basis Of Gibberellin(Ga3)-Induced Della Recognition By The Gibberellin Receptor 2ZSH_A	25.4	1.8
Singlet 2 8R_B05-T7	38	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357990.1 AK353670.1	60	7e-07	97	5'3' Frame 1 Chain A, Structure Determination And Refinement Of Ribulose 1,5 Bisphosphate Carboxylase(Slash)oxy genase From Synechococcus 1RBL_A	22.3	4.7
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253070.1 AK251217.1	60	7e-07	97			
Singlet 3 8R_A10-T7	184	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK356049.1	337	2e-89	100	3'5' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of Mouse Mitochondrial Aspartate AminotransferaseKYN URENINE AMINOTRANSFERASE IV 3HLM_A	27.3	0.63
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249305.1	337	2e-89	100			
Singlet 4 7R_H10-T7	248	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf150e10 AK252232.1	440	2e-120	99	3'5' Frame 2 Chain A, Crystal Structure Of Jmjd5 Domain Of Human Lysine-Specific Demethylase 8 (Kdm8) In Complex With N-	26.2	2.3
			95.3	2e-16	90			

		Zea mays clone hypothetical protein mRNA EU965089.1 EU959044.1 EU954738.1 EU954706.1 EU954555.1				Oxalylglycine 4AAP_A 5'3' Frame 3 Chain A, Prolyl Oligopeptidase From Porcine Muscle 1QFM_A	25.8	3.2
Singlet 5 7R_D04-T7	544	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK361836.1 AK367369.1	1000	0	99	3'5' Frame 1 Chain A, X-Ray Structure Of Adenosine 5'-Monophosphate Deaminase From Arabidopsis Thaliana In Complex With Coformycin 5'-Phosphate 2A3L_A	29.6	1.3
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252870.1	1000	0	99	3'5' Frame 2		
		Triticum aestivum RNA for phosphoribulokinase X51608.1	917	0	97	Chain A, Structure Of The Catalytic Domain Of Human Soluble Guanylate Cyclase 1 Beta 3. 2WZ1_A	27.3	4.8
		T.aestivum PRK gene for ribulose-5-phosphate kinase X57952.1	927	0	97			
Singlet 6 7R_D02-T7	379	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK374669.1 AK363402.1	693 688	0 0	100 99	3'5' Frame 1 Chain P, Localization Of The Small Subunit Ribosomal Proteins Into A 5.5 A Cryo-Em Map Of Triticum Aestivum Translating 80s Ribosome 3IZ6_P	192	1e-62
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK249148.1	693	0	100			
Singlet 7 7R_C09-T7	91	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK354893.1 AK371162.1 AK353755.1	145	5e-32	99	3'5' Frame 1 Chain M, Cyanide-Bound Structure Of Bifunctional Carbon Monoxide Dehydrogenase ACETY L-Coa Synthase From Moorella Thermoacetica, Cyanide-Bound C-Cluster 3I04_M	25.7	1.9
						5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of Human Pank1 Alpha: The Catalytic Core Domain In Complex With Accoa 2I7N_A	25.7	2.6

Singlet 8 7R_C05-T7	368	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK368348.1 AK366552.1	669	0	99	5'3' Frame 3	33.5	0.020
		Triticum aestivum mRNA for MIKC-type MADS-box transcription factor WM21B (WM21B gene) AM502888.1	674	3e-46	100	Chain A, The Crystal Structure Of A Hydrolase From Pseudomonas Aeruginosa Pa01 3OM8_A		
			444	2e-121	92	5'3' Frame 2	30	0.32
						Chain B, Structure Of Cryptochrome 3 - Dna Complex 2VTB_B		
Singlet 9 4R_G01-T7	17	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 10 4R_F12-T7	228	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf89d22 AK250561.1	409	5e-111	99	5'3' Frame 1	59.3	2e-12
		Phyllostachys edulis cDNA clone: bphylf060p09, full insert sequence FP093947.1	211	2e-51	86	Chain A, Class Iv Chitinase Structure From Picea Abies At 1.8a 3HBD_A		
		Triticum aestivum cDNA, clone: SET1_D20, cultivar: Chinese Spring AK336175.1	211	2e-51	84	Chain A, Crystal Structure And Enzymatic Properties Of A Bacterial Family 19 Chitinase Reveal Differences With Plant Enzymes 2CJL_A	53.9	3e-10
		Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA XM_002448060.1	207	2e-50	86			
		Triticum aestivum chitinase II precursor (Cht2) mRNA, complete cds AF112963.1	206	7e-50	83			
Singlet 11 4R_E11-T7	133	Hordeum vulgare thaumatin-like protein TLP2 mRNA AY839293.1	241	1e-60	100	3'5' Frame 2 (GH64-TLP-SF superfam)	31.6	0,015
		H.vulgare mRNA for a pathogenesis-related protein (Hv-1c) X58565.1	241	1e-60	100	Chain A, High Resolution Structure Of A Cherry Allergen Pru Av 2 2AHN_A		
		H.vulgare mRNA for a pathogenesis-	241	1e-60	100	Chain A, The Crystal Structure Of Zeamatin. 1DU5_A	29.3	0.082
						Chain A, Crystal Structure Of Sweet-	26.9	0.43

		related protein (Hv-1b) X58566.1	241	1e-60	100	Tasting Protein Thaumatin II 3AOK_A		
		Hordeum vulgare mRNA for pathogenesis protein 5 (pr-5 gene) AJ276225.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK355769.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbat65g08 AK250244.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare mRNA for putative acidic pr5 (pr5a gene), isolated from a cDNA library after inoculation with Blumeria graminis, cultivar pallas P-01. AM403331.1	235	5e-59	99			
		Hordeum vulgare thaumatin-like protein TLP1 mRNA AY839292.1	235	5e-59	99			
		H.vulgare mRNA for a pathogenesis-related protein (Hv-1a) X58564.1						
Singlet 12 16R_C08-T7	27	-	-	-	-			
Singlet 13 9R_F12-T7	218	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, partial cds AK357796.1	300	3e-78	99	3'5' Frame 3 Chain B, Structure Of Eukaryotic Translation Initiation Factor Eif3i Complex With Eif3b C-Terminus (655-700) 3ZWL_B	24.3	7.7
		Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds AK359673.1	285	9e-74	99			
		Triticum aestivum putative oxygen-evolving complex	182	1e-42	85			

		precursor (TAOEC01) mRNA, complete cds EF469610.1						
Singlet 14 9R_A08-T7	730	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK355370.1 AK355251.1	1349	0	100	5'3' Frame 1 Chain O, Crystal Structure And Functional Analysis Of Glyceraldehyde- 3-Phosphate Dehydrogenase From Oryza Sativa 3E6A_O	375	3e-130
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253106.1 AK250578.1	1349	0	100	3'5' Frame 2		
		H. vulgare GADPH mRNA for glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase X60343.1	1349	0	100	Chain A, Structure Of Human Casein Kinase 1 Gamma-1 In Complex With 2-(2-Hydroxyethylamino)-6-(3-Chloroanilino)-9-Isopropylpurine (Casp Target) 2CMW_A	30.8	0.76
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar TR306 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds. EF409633.1	639	2e-50	100	Chain A, Structure Of Casein Kinase 1 Gamma 3 2CHL_A	28.9	3.3
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Steptoe glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds. EF409632.1	639	2e-50	100			
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cultivar Oregon Wolfe Barley Recessive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds. EF409631.1	639	2e-50	100			
Singlet 15 16R_H10-T7	370	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK372960.1 AK365515.1	669	0	99	3'5' Frame 1 Chain B, Crystal Structure Of L-Proline Dehydrogenase From P.Horikoshii 1Y56_B	26.9	4.6
		Triticum aestivum cDNA, clone: SET5_P09, cultivar: Chinese Spring AK331055.1	549	5e-153	94	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of Cathepsin B From Trypanosoma Brucei 3MOR_A	26.9	3.4

						5'3' Frame 2 Chain A, Glycerate Kinase From Neisseria Meningitidis (Serogroup A) 1TO6_A	26.9	4.1
Singlet 16 16R_H11-T7	326	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK355686.1	505	1e-139	100	3'5' Frame 2 Chain A, The Structure Of Cbb3 Cytochrome Oxidase 3MK7_A	28.5	0.83
		Triticum aestivum cDNA, clone: WT012_B05, cultivar: Chinese Spring AK335101.1	411	2e-111	91	5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of The Kif1a Motor Domain Complexed With Mg-Adp 1I5S_A	27.7	1.3
		PREDICTED: Brachypodium distachyon ubiquitin-conjugating enzyme E2 32-like (LOC100831984), mRNA XM_003558027.1	313	6e-82	86			
Singlet 17 3R_F07-T7	141	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK356301.1	261	9e-67	100	3'5' Frame 1 Chain A, Crystal Structure Of A Galactose Specific Lectin From Artocarpus Hirsuta In Complex With Methyl-A-D-Galactose 1TOQ_A	24.3	3.4
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK252840.1 AK249713.1	261	9e-67	100	Chain A, Crystal Structure Of Potassium-Independent Plant Asparaginase 2GEZ_A	24.6	3.4
Singlet 18 3R_F06-T7	62	-	-	-	-	-	-	-
Singlet 19 3R_F05-T7	362	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK359363.1	664	0	99	5'3' Frame 1 (AAT_I superfamily) Chain A, Crystal Structure Of Alanine Aminotransferase From Hordeum vulgare 3TCM_A	142	2e-40
		Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK250046.1	664	0	99	Chain A, Human Alanine Aminotransferase 2 In Complex With Plp 3IHJ_A	122	2e-33
		Deschampsia antarctica clone Dacor 1.7 alanine aminotransferase mRNA, 3' UTR and partial cds	464	2e-127	90			

		AY090542.1						
Singlet 20 2R_A02-T7	182	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357796.1 AK356829.1 AK356794.1 AK359673.1	331	9e-88	100	3'5' Frame 2 Chain A, The Structure Of Cbb3 Cytochrome Oxidase 3MK7_A 5'3' Frame 3 Chain A, Crystal Structure Of The Kif1a Motor Domain Complexed With Mg-Adp 115S_A	28.5 27.7	0.83 1.3
Singlet 21 3R_C03-T7	57	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK357990.1 AK353670.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253070.1 AK251217.1	89.8 89.8	1e-15 1e-15	95 95	3'5' Frame 3 Chain A, The Crystal Structure Of Isocitrate Dehydrogenase KinasePHOSPHATAS E From E. Coli 3EPS_A	24.4	2.1
Singlet 22 3R_A07-T7	186	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK369022.1 AK367942.1	241	2e-60	97	3'5' Frame 2 Chain B, Crystal Structure Of An Intact Type Ii Dna Topoisomerase: Insights Into Dna Transfer Mechanisms 2ZBK_B Chain A, Structure Of Topoisomerase Subunit 1MX0_A 1MU5_A	25.8 25.8	1.9 2.0
Singlet 23 2R_G12-T7	255	Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein AK370222.1	472	8e-130	100	-	-	-
Singlet 24 2R_B02-T7	197	Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK251768.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone AK253063.1 Hordeum vulgare partial mRNA for chlorophyll a/b-binding protein AJ006296.1	363 350 351	4e-97 3e-93 8e-94	100 100 99	3'5' Frame 1 Chain A, 2.76 Angstrom Crystal Structure Of A Putative Glucose-1- Phosphate Thymidyltransferase From Bacillus Anthracis In Complex With A Sucrose. 3HL3_A	25	4.0

Singlet 25 2R_D03-T7	27	-	-	-	-	-	-	-
-------------------------	----	---	---	---	---	---	---	---

**ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN CAP3 PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN
KONTİGLERİ OLUŞTURAN cDNA'LAR VE SAYILARI**

CAP3 programıyla oluşturulan 17 adet kontigin oluşumuna totalde 614 cDNA katılmıştır.

CAP3 Kontigleri	Toplam cDNA Sayısı	Oluşturan cDNA'lar
Kontig 1	6 adet	9458944 9458069 9458444 9458425 9458830 9458643
Kontig 2	3 adet	9458962 9458500 9458363
Kontig 3	53 adet	945883 9458903 9458154 9458424 9458653 9458621 9458483 9458435 9458637

		9458649
		9458582
		9458035
		9458921
		9458173
		9458942
		9458455
		9458811
		9458003
		9458642
		9458448
		9458419
		9458146
		9458908
		9458917
		9458946
		9458805
		9458841
		9458847
		9458618
		9458471
		9458459
		9458329
		9458367
		9458356
		9458378
		9458098
		9458127
		9458849
		9458174
		9458814
		9458482
		9458941
		9458026
		9458029

		9458109 9458600 9458568 9458115 9458101 9458326 9458478 9458124 9458487
Kontig 4	5 adet	9458010 9458042 9458314 9458332 9458824
Kontig 5	3 adet	9458004 9458016 9458795
Kontig 6	2 adet	9458006 9458317
Kontig 7	114 adet	9458000 9458388 9458892 9458933 9458364 9458384 9458012 9458302 9458018 9458316 9458417 9458120 9458809 9458848 9458785

		9458339
		9458606
		9458481
		9458430
		9458639
		9458436
		9458164
		9458652
		9458103
		9458931
		9458924
		9458893
		9458461
		9458056
		9458052
		9458319
		9458300
		9458497
		9458037
		9458850
		9458641
		9458106
		9458951
		9458305
		9458816
		9458779
		9458565
		9458627
		9458617
		9458426
		9458504
		9458480
		9458421
		9458484
		9458361

		9458345
		9458368
		9458327
		9458366
		9458358
		9458389
		9458349
		9458131
		9458099
		9458130
		9458184
		9458128
		9458119
		9458094
		9458073
		9458040
		9457988
		9458958
		9458778
		9458143
		9458169
		9458002
		9458454
		9458845
		9458798
		9458499
		9458929
		9458020
		9458930
		9458501
		9458901
		9458776
		9458159
		9458113
		9458784

		9458107 9458453 9457987 9458832 9458853 9458629 9458493 9458343 9458105 9458157 9458589 9458048 9458796 9458141 9458057 9458633 9458324 9457997 9458456 9458965 9458966 9458354 9458654 9458021 9458008 9458306 9458318 9458476 9458383
Kontig 8	367 adet	9458418 9458110 9458362 9458165 9458611 9458852

		9458180
		9458370
		9458353
		9458133
		9458151
		9458027
		9458163
		9458579
		9458503
		9458625
		9457989
		9458181
		9458804
		9458176
		9458488
		9458631
		9458468
		9458412
		9458033
		9458017
		9458046
		9458449
		9458889
		9458973
		9458950
		9458381
		9458092
		9458970
		9458427
		9458149
		9458312
		9458344
		9458807
		9458323
		9458045

		9458373
		9457999
		9458333
		9458475
		9458414
		9458420
		9458624
		9458940
		9458918
		9458957
		9458655
		9458897
		9458097
		9458322
		9458423
		9458340
		9458050
		9458969
		9458968
		9458846
		9458139
		9458076
		9458882
		9458887
		9458172
		9458320
		9458839
		9458855
		9458581
		9458772
		9458612
		9458616
		9458829
		9458817
		9458372

		9458640
		9458413
		9458022
		9458828
		9458462
		9458638
		9458187
		9458352
		9458186
		9458505
		9458635
		9458492
		9458376
		9458309
		9458348
		9458112
		9458078
		9458777
		9458390
		9458310
		9458387
		9458104
		9457998
		9458375
		9457996
		9458821
		9458974
		9458815
		9458032
		9458574
		9458911
		9458840
		9458446
		9458614
		9458896

		9458299
		9458935
		9458630
		9458386
		9458834
		9458843
		9458495
		9458457
		9458902
		9458790
		9458806
		9458844
		9458081
		9458598
		9458385
		9458079
		9458794
		9458615
		9458603
		9458578
		9458359
		9458064
		9458773
		9458607
		9458955
		9458915
		9458792
		9458066
		9458434
		9458788
		9458975
		9458914
		9458646
		9458799
		9458775

		9458588
		9458474
		9458301
		9458152
		9458025
		9458932
		9458952
		9458789
		9458623
		9458560
		9458162
		9458111
		9458147
		9458102
		9458905
		9458943
		9458913
		9458954
		9458019
		9458590
		9458597
		9458572
		9458594
		9458570
		9458585
		9458608
		9458460
		9458428
		9458451
		9458360
		9458311
		9458341
		9458355
		9458330
		9458117

		9458121
		9458065
		9458024
		9457992
		9458063
		9458055
		9458023
		9458007
		9457991
		9458070
		9458062
		9458014
		9458013
		9458028
		9458059
		9458891
		9458766
		9458904
		9457993
		9458049
		9458586
		9458150
		9458491
		9458934
		9458818
		9458108
		9458831
		9458791
		9458783
		9458567
		9458604
		9458439
		9458350
		9458334
		9458926

		9458949
		9458916
		9458928
		9458912
		9458768
		9458801
		9458793
		9458769
		9458823
		9458767
		9458854
		9458774
		9458837
		9458765
		9458827
		9458787
		9458566
		9458619
		9458506
		9458498
		9458442
		9458489
		9458465
		9458433
		9458472
		9458440
		9458469
		9458429
		9458411
		9458369
		9458321
		9458328
		9458335
		9458303
		9458342

		9458325
		9458331
		9458338
		9458179
		9458114
		9458161
		9458183
		9458060
		9458927
		9458895
		9458910
		9458894
		9458925
		9458948
		9458884
		9458963
		9458939
		9458922
		9458898
		9458890
		9458937
		9458802
		9458900
		9458053
		9458634
		9458041
		9458584
		9458001
		9458486
		9458074
		9458168
		9458808
		9458142
		9458885
		9458770

		9458502
		9458810
		9458826
		9458577
		9458825
		9458907
		9458117
		9458437
		9458899
		9458599
		9458148
		9458803
		9458812
		9458011
		9458034
		9458158
		9458458
		9458036
		9458134
		9458051
		9458061
		9458466
		9458136
		9458587
		9458562
		9458118
		9458125
		9458044
		9458170
		9458563
		9458144
		9458009
		9458047
		9458583
		9458573

		9458135
		9458054
		9458182
		9458858
		9458313
		9458075
		9458441
		9458644
		9458346
		9458561
		9458571
		9458470
		9458058
		9458043
		9458039
		9458645
		9458569
		9458093
		9458613
		9458595
		9458592
		9458580
		9458596
		9458628
		9458416
		9458077
		9458986
		9458351
		9458473
		9458650
		9458392
		9458377
		9458626
		9458956
		9458601

		9458813 9458835 9458648 9458365 9458833 9458919 9458836 9458415 9458610 9458945 9458015
Kontig 9	2 adet	9458160 9458153
Kontig 10	4 adet	9458178 9458960 9458485 9458800
Kontig 11	9 adet	9458379 9458496 9458822 9458138 9458780 9458479 9458622 9458031 9458371
Kontig 12	3 adet	9458357 9458185 9458431
Kontig 13	10 adet	9458494 9458030 9458132 9458886

		9458155 9458591 9458888 9458347 9458920 9458923
Kontig 14	19 adet	9458576 9458820 9458909 9458906 9458298 9458068 9458315 9458337 9458786 9458447 9458374 9458072 9458771 9458972 9458463 9458175 9458464 9458651 9458467
Kontig 15	7 adet	9458605 9458071 9458116 9458432 9458961 9458947 9458336
Kontig 16	3 adet	9458647 9458307

		9458308
Kontig 17	4 adet	9458781 9458038 9458838 9458156

**ARPA BİTKİSİNİN GÖVDESİNDEN PHRAP PROGRAMIYLA ELDE EDİLEN
KONTİGLERİ OLUŞTURAN cDNA'LAR VE SAYILARI**

Phrap programıyla oluşturulan 19 adet kontigin oluşumuna totalde 275 cDNA katılmıştır.

Phrap Kontigleri	Toplam cDNA sayısı	Oluşturan cDNA'lar
Kontig 1	2 adet	9458500 9458363
Kontig 2	2 adet	9458317 9458006
Kontig 3	2 adet	9458636 9458602
Kontig 4	2 adet	9458647 9458308
Kontig 5	2 adet	9458357 9458431
Kontig 6	2 adet	9458095 9458620
Kontig 7	3 adet	9458830 9458069 9458944
Kontig 8	3 adet	9458800 9458178

		9458960
Kontig 9	3 adet	9458795 9458016 9458004
Kontig 10	3 adet	9458153 9458160 9458971
Kontig 11	4 adet	9458781 9458038 9458156 9458838
Kontig 12	4 adet	9458071 9458947 9458432 9458605
Kontig 13	4 adet	9458314 9458824 9458332 9458010
Kontig 14	6 adet	9458379 9458822 9458622 9458780 9458496 9458371
Kontig 15	10 adet	9458494 9458920 9458591 9458155 9458030 9458923 9458886 9458347

		9458888 9458132
Kontig 16	12 adet	9458175 9458464 9458467 9458906 9458651 9458576 9458786 9458771 9458447 9458072 9458820 9458298
Kontig 17	17 adet	9458077 9458392 9458015 9458415 9458473 9458650 9458945 9458377 9458416 9458610 9458836 9458351 9458626 9458833 9458835 9458919 9457986
Kontig 18	37 adet	9458417 9458103 9458169

		9458639
		9458931
		9458785
		9458012
		9458143
		9458796
		9458461
		9458048
		9458641
		9457997
		9458832
		9458778
		9458384
		9458302
		9458037
		9458388
		9458633
		9458453
		9458454
		9458497
		9458850
		9458933
		9458929
		9458300
		9458499
		9458798
		9458456
		9458654
		9458318
		9458476
		9458306
		9458383
		9458966
Kontig 19	159 adet	9458386

		9458955
		9458885
		9458074
		9458322
		9458812
		9458803
		9458053
		9458828
		9458372
		9457996
		9458640
		9458022
		9458575
		9458050
		9458638
		9458821
		9458427
		9458462
		9458625
		9458413
		9458624
		9458344
		9458001
		9458148
		9458041
		9458777
		9458606
		9458584
		9458186
		9458616
		9458855
		9458817
		9458579
		9458612
		9458950

		9458940
		9458839
		9458172
		9458918
		9458807
		9458631
		9458142
		9458897
		9458079
		9458586
		9458843
		9458019
		9458093
		9458458
		9458036
		9458973
		9458470
		9458595
		9458439
		9458655
		9458846
		9458117
		9458826
		9458049
		9458066
		9458770
		9458061
		9458915
		9458792
		9458136
		9458168
		9458437
		9458487
		9458806
		9458630

		9458034
		9458152
		9458788
		9458789
		9458025
		9458775
		9458571
		9458834
		9458644
		9458818
		9458560
		9458474
		9458952
		9458503
		9458044
		9458125
		9458134
		9458162
		9458147
		9458301
		9458900
		9458969
		9458913
		9458054
		9458858
		9458081
		9458313
		9458598
		9458592
		9458334
		9458611
		9458887
		9458840
		9458613
		9458588

		9458573
		9458623
		9458580
		9458466
		9458118
		9457993
		9458943
		9458076
		9458596
		9458628
		9458441
		9458446
		9458450
		9458707
		9458353
		9458970
		9458844
		9458799
		9458791
		9458067
		9458607
		9458158
		9458434
		9458475
		9458370
		9458362
		9458418
		9458646
		9458165
		9458180
		9458880
		9458811
		9458424
		9458478
		9458003

		9458600
		9458805
		9458035
		9458842
		9458849
		9458173
		9458146
		9458448
		9458642
		9458419
		9458109
		9458908
		9458917
		9458921
		9458582
		9458621
		9458653

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Bahar IŞIK
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.08.1987 / İstanbul
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :baharisik_34@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans iyi	Biyoloji	KTU	2008
Lise iyi	Fen	Orhan Cemal Fersoy Lisesi	2004