

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE WOX GEN AİLESİ
ÜYELERİNİN GENOM DÜZEYİNDE TANIMLANMASI VE TUZ STRESİ
SIRASINDA İFADE PROFİLLERİ

Simay Ezgi AKBULUT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE WOX GEN AİLESİ ÜYELERİNİN GENOM DÜZEYİNDE TANIMLANMASI VE TUZ STRESİ SIRASINDA İFADE PROFİLLERİ

Simay Ezgi AKBULUT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker BÜYÜK

Homeobox transkripsiyon faktörlerinin bir sınıfı olan *WUSCHEL- Related Homeobox* (WOX) gen ailesi bitkilere özgü embriyonik modelleme ve gelişim, kök hücre onarımı, organ ve tohum oluşumu ve izole edilen doku-organların yenilenmesi gibi önemli gelişim süreçlerinde rol oynar. Bu tez çalışmasında transkripsiyon faktörü olan WOX gen ailesi üyelerinin, evrimsel süreçlere katkısını aydınlatmak ve bitki biyoteknolojisi sahasına fayda sağlamak için birtakım biyoinformatik veri tabanları ve programlar kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fasulye genomuna ait toplamda 18 adet WOX (*Phvul-WOX*) geni tanımlanmıştır. Tanımlanan gen ailesi üyelerinin; dizilerin hizalanması, korunmuş motiflerin belirlenmesi, proteinlerin homoloji modellemesi, gen duplikasyonları, homolog, homolog olmayan değişim oranları saptanmıştır. Bunların yanında; ekzon-intron analizi, filogenetik analizler, promotor bölgelerin analizi, hücre dışı yerleşim oranlarının tespiti, miRNA analizi, senteni analizi, doku-spesifik mRNA ve tuz stresiyile ilişkili genlerin *in siliko* ifade analizi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaç WUS, orta ve eski olmak üzere üç sınıfa ayrılmıştır. Ağacın güvenilirliği motiflerin belirlenmesi ve ekzon-intron aracılığıyla doğrulanmıştır. *Phvul-WOX* genlerinin bitkinin yaprak dokusundaki *in siliko* ifade analizi ve hedeflenen genlerin tuz stresi muamelesi sonrasında qPCR reaksiyonlarıyla mRNA ifade seviyeleri tespit etmekle birlikte verilerin normalizasyonu ve istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle bu çalışma *P. vulgaris* türünde WOX genlerinin tanımlanması ve tuz stresi ile ilişkilerinin tespiti konuları noktasında bir ilk olmaktadır. İlerleyen zamanlarda gerçekleştirilecek çalışmalara kaynak niteliğindedir.

Haziran 2021, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: WOX gen ailesi, transkripsiyon faktörü, biyoinformatik, qPCR, tuz stresi

ABSTRACT

MSc Thesis

GENOME – WIDE IDENTIFICATION OF WOX GENE FAMILY MEMBERS IN *PHASEOLUS VULGARIS* L. AND THEIR EXPRESSION PROFILING DURING SALT STRESS

Simay Ezgi AKBULUT

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

Supervisor: Assoc. Prof. İlker BÜYÜK

The *WUSCHEL-Related Homeobox* (WOX) gene family, a class of homeobox transcription factors, plays a role in plant-specific embryonic modeling and important developmental processes such as embryonic development, stem cell care, organ and seed formation and regeneration of isolated tissues and organs. In this thesis, the identification and characterization of the members of the WOX gene family, which are transcription factors, was carried out by using a number of bioinformatics databases and programs in order to illuminate the contribution to evolutionary processes and to benefit the field of plant biotechnology. A total of 18 WOX (*Phvul*-WOX) genes belonging to the bean genome have been identified. Sequences alignment, determination of conserved motifs, homology modeling of proteins, gene duplications, homologous and non-homologous change rates were determined. Besides these; exon-intron analysis, phylogenetic analysis, analysis of promoter regions, detection of extracellular localization rates, miRNA analysis, synteny analysis, tissue-specific mRNA and in silico expression analysis of genes associated with salt stress were performed. The phylogenetic tree created is divided into three classes as WUS, intermediate and old. The reliability of the tree was verified by motif identification and exon-intron. *In silico* expression analysis of the identified *Phvul*-WOX genes in the leaf tissue of the plant and after salt stress treatment of the target genes, mRNA expression levels were determined by qPCR reactions, normalization and statistical analysis of the data were performed. Thus, this study is the first in terms of identification of WOX genes in *P. vulgaris* species and determination of their relationship with salt stress. It is a resource for future studies.

June 2021, 102 pages

Key Words: WOX gene family, transcription factor, bioinformatics, qPCR, salt stress.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince; tez araştırmalarımın her aşamasında gerek bilgi, öneri ve yardımlarıyla gerekse akademik ve manevi açıdan sağladığı desteklerden ötürü değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. İlker BÜYÜK’e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmamı yürütmemde her türlü imkanı ve desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS’a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Ankara Üniversitesi Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı’ndan arkadaşlarıma ve bilhassa edindiği bilgileri benimle paylaşan kıymetli dostum Aybüke OKAY’a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme, sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması, “Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından 21L0430006 proje numaralı “Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinde WOX Gen Ailesi Üyelerinin Genom Düzeyinde Tanımlanması ve Tuz Stresi Sırasında İfade Profilleri” konulu proje tarafından desteklenmiştir.

Simay Ezgi AKBULUT
Ankara, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Fasulye Bitkisi (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	2
1.1.1 Fasulyenin tarihçesi	3
1.1.2 Fasulyenin sınıflandırılması	3
1.1.3 Fasulye üretimi ve ekonomik önemi	4
1.1.4 Fasulyenin yetiştiği iklimler ve toprak istekleri	7
1.1.5 Fasulyenin besin değeri	7
1.1.6 Fasulyenin insan sağlığına faydaları	8
1.1.7 Fasulyede görülen hastalıklar	9
1.1.7.1 Bakteriyel hastalıklar	9
1.1.7.2 Viral hastalıklar	10
1.1.7.3 Mantar hastalıkları	11
1.1.7.4 Parazitik hastalıklar	12
1.2 Bitkilerde Stres	12
1.2.1 Stresin neden olduğu aşamalar	14
1.3 Tuz Stresi	15
1.3.1 Tuzluluk altında iyon homeostazisi	15
1.3.1.1 Tuza aşırı duyarlı SOS yolu	15
1.3.1.2 Yüksek afiniteli K ⁺ taşıyıcıları (HKT'ler)	16
1.3.1.3 Na ⁺ , K ⁺ / H ⁺ değiştiriciler (NHX'ler)	17
1.3.1.4 Plazma membran proteini (PMP3)	17
1.3.2 Bitkilerde tuz stresinin zararları	18
1.3.2.1 Kloroplast stresi	19
1.3.2.2 ER stresi	19
1.3.2.3 Mitokondriyal stres	20
1.3.3 Bitkilerin stres koşullarına cevap mekanizmaları	20

1.3.3.1 Ozmotik stres yolları ve uyumlu ozmolitlerin birikmesi	20
1.3.3.2 Tuz stresi yanıtlarında rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROT) ve detoksifikasyon	21
1.4 Kuraklık Stresi	22
1.4.1 Kuraklık stresinin zararları	22
1.5 Transkripsiyon Faktörlerinin Genel Yapısı ve Fonksiyonları	23
1.5.1 Transkripsiyon faktörlerinin sınıflandırılması	24
1.5.1.1 Transkripsiyon faktörlerinin faaliyet bakımından sınıflandırılması	24
1.5.1.2 Transkripsiyon faktörlerinin yapı bakımından sınıflandırılması	24
1.5.1.3 Transkripsiyon faktörlerinin tür bakımından sınıflandırılması	24
1.5.1.4 Transkripsiyon faktörlerinin özel amaçlar bakımından sınıflandırılması	25
1.5.2 Transkripsiyon faktörlerinin abiyotik stresle ilişkisi	25
1.5.3 Homeobox proteinleri	26
1.5.3.1 Homeodomainin yapısı	27
1.5.3.2 Bitki Homeodomain aileleri	27
1.5.3.3 WUSCHEL- Related Homeobox (WOX) gen ailesi	27
2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Genomunda WOX Proteinlerinin Tanımlanması	34
3.2 Dizilerin Hizalanması, Filogenetik Analizler ve Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi	37
3.3 Proteinlerin Homoloji Modellemesi	40
3.4 Fasulyede Gen Duplikasyonları ve Belirlenen Türler Arasında Karşılaştırmalı Fiziksel Haritanın Çıkartılması	40
3.5 Fasulyede Tanımlanan WOX Genlerinin Kromozom Dağılımı ve Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi	43
3.6 Sinteni Analizi	44
3.7 Fasulyede Tanımlanan WOX Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri ve Oranları	45
3.8 MikroRNA'ların (miRNA) Tespiti ve Hedefledikleri Fasulye WOX Genlerin Belirlenmesi	46
3.9 Fasulyede Tanımlanan WOX Genlerinin Transkriptom Datası ile <i>In Siliko</i> Gen İfade Analizi	46
3.10 Bitki Materyalleri, Büyüme Koşulları ve Stres Muamelesi	47
3.11 Total RNA İzolasyonu	49
3.12 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	51
3.13 Primer Dizaynı	52

3.14 Real-Time PCR	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	54
4.1 WOX Genlerinin Biyoinformatik Analizleri	54
4.2 Fasulyede WOX Genlerinin Kromozomal Dağılımı.....	54
4.3 Fasulyede WOX Genlerinin Türler Arası Filogenetik Analizleri	56
4.4 Fasulyede WOX Proteinlerinin Motif Bölgeleri.....	57
4.5 Fasulyede WOX Proteinlerinin Homoloji Modellemesi	58
4.6 Fasulyede WOX Genlerinin Ekzon ve İntron Bölgeleri.....	60
4.7 Fasulyede WOX Proteinlerinin Farklı Türdeki WOX Protein Ortologları	60
4.8 Fasulyede WOX Genlerinin Gen Duplikasyonları	63
4.9 Fasulyede WOX Genlerine Ait Promotor Bölgelerin Analizi.....	64
4.10 Fasulyede Tanımlanan WOX Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri.....	71
4.11 MikroRNA'ların Analizi	72
4.12 Sinteni Analizi	73
4.13 Fasulye WOX Genlerine Ait Doku-Spesifik mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi.....	75
4.14 Fasulyede Tuz Stresi İle İlişkili WOX Genlerinin <i>İn Siliko</i> İfade Analizi	76
4.15 Total RNA İzolasyonu	77
4.16 cDNA sentezi.....	78
4.17 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılan Fasulye Çeşitlerinde WOX Genlerinin mRNA Düzeyleri	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°	Derece
C	Santigrat
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
ACT	Aktin
cDNA	Komplementer DNA
cv.	Kültivar
DNA	Deoksiribonükleik asit
kcal	Kilokalori
M	Molar
mg	Miligram
miRNA	MikroRNA
mM	Milimolar
mRNA	Haberci RNA
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik asit
TF	Transkripsiyon Faktörü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WOX	Wuschel-Related Homeobox
WUS	Wuschel

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 2018 Yılı Kıtalar arası Fasulye Üretim Miktarları.....	5
Şekil 1.2 2018 Yılı Kıtalar arası Fasulye Tane Verim Miktarları.....	5
Şekil 1.3 2018 Yılı Kıtalar arası Fasulye Ekim Alanları	6
Şekil 1.4 1994-2018 Yılları Arası Uluslararası Fasulye Üretim Miktarları	6
Şekil 1.5 Çevresel Stres Faktörleri	13
Şekil 3.1 Bitki Transkripsiyon Faktörleri Veri Tabanı	34
Şekil 3.2 NCBI Veri Tabanı	35
Şekil 3.3 Decrease Redundancy Veri Tabanı	36
Şekil 3.4 Phytozome Veri Tabanı	36
Şekil 3.5 EXPASY Protparam Veri Tabanı	37
Şekil 3.6 MEGA 7.0 Programı	38
Şekil 3.7 İTOL Veri Tabanı	38
Şekil 3.8 Gene Structure Display Server 2.0 Veri Tabanı	39
Şekil 3.9 Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) Veri Tabanı	39
Şekil 3.10 Phyre2 Veri Tabanı	40
Şekil 3.11 Plant Genome Duplication Veri Tabanı (PGDD)	41
Şekil 3.12 Clustal Omega Veri Tabanı	42
Şekil 3.13 PAL2NAL Veri Tabanı	42
Şekil 3.14 Mapchart Programının Genel Görünümü	43
Şekil 3.15 Plantcare Veri Tabanı	44
Şekil 3.16 İTAK – Plant Transcription Factor & Protein Kinase Identifier and Classifier Veri Tabanı	45
Şekil 3.17 WoLF PSORT Veri Tabanı	45
Şekil 3.18 TargetP 1.1 Veri Tabanı	46
Şekil 3.19 CIMminer Veri Tabanı	47
Şekil 3.20 Zülbiye ve Yakutiye Kontrol Bitkileri	48
Şekil 3.21 Zülbiye ve Yakutiye Tuz Stresi Uygulanmış Bitkiler	49
Şekil 4.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> L. WOX Protein Kataloğu	54
Şekil 4.2 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Kromozomal Dağılımı	55
Şekil 4.3 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Kromozomal Dağılım Oranları	55

Şekil 4.4 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Filogenetik Ağacı	56
Şekil 4.5 <i>Phvul</i> -WOX Proteinlerinin Motif Bölgeleri	57
Şekil 4.6 <i>Phvul</i> -WOX Proteinlerinin 3 Boyutlu Yapı Modellemeleri	59
Şekil 4.7 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Ekzon-İntron Bölgeleri	60
Şekil 4.8 <i>Phvul</i> -WOX-1 Geninin Promotor Bölgeleri	65
Şekil 4.9 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Promotor Bölgeleri -1	66
Şekil 4.10 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Promotor Bölgeleri -2	67
Şekil 4.11 <i>P.vulgaris</i> - <i>A.thaliana</i> Sinteni Haritası.....	74
Şekil 4.12 <i>P. vulgaris</i> - <i>G. max</i> Sinteni Haritası	74
Şekil 4.13 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri	75
Şekil 4.14 <i>Phvul</i> -WOX Genlerinin <i>İn Siliko</i> İfade Seviyeleri	76
Şekil 4.15 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılan Fasulye Çeşitlerinde WOX Genlerinin mRNA Düzeyleri	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) bitkisinin sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2 2020 Yılı Türkiye Kuru Fasulye Üretimi ve Ekim Yapılan Alan Değerleri	7
Çizelge 1.3 Fasulyenin 100 g İçin Besin Değerleri	8
Çizelge 3.1 DNAaz Solüsyon Bileşenleri	50
Çizelge 3.2 cDNA Sentez Bileşenleri	51
Çizelge 3.3 cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları	51
Çizelge 3.4 Phvul-WOX Primerleri	52
Çizelge 3.5 qPCR Bileşenleri	53
Çizelge 3.6 qPCR Koşulları	53
Çizelge 4.1 Phvul-WOX Proteinlerinin İçerdikleri Domainler	58
Çizelge 4.2 <i>P. vulgaris</i> - <i>A. thaliana</i> Gen Duplikasyonları	61
Çizelge 4.3 <i>P. vulgaris</i> - <i>G. max</i> Gen Duplikasyonları	62
Çizelge 4.4 <i>Phvul</i> -WOX Gen Duplikasyonları	64
Çizelge 4.5 Işığa Duyarlı Elemanların Fonksiyonları.....	68
Çizelge 4.6 Hormona Duyarlı Elemanların Fonksiyonları	68
Çizelge 4.7 Çevresel Stresle İlişkili Elemanların Fonksiyonları	69
Çizelge 4.8 Promotor İle İlgili Elemanların Fonksiyonları.....	69
Çizelge 4.9 Gelişimle İlgili Elemanların Fonksiyonları	69
Çizelge 4.10 Yer Bağlama İle İlgili Elemanların Fonksiyonları.....	70
Çizelge 4.11 Diğer Elemanların Fonksiyonları.....	70
Çizelge 4.12 Phvul-WOX Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimi.....	71
Çizelge 4.13 RNA İzolasyon Nanodrop Ölçüm Sonuçları	77
Çizelge 4.14 cDNA Sentezi Nanodrop Ölçüm Sonuçları	78

1. GİRİŞ

Fabaceae/Leguminosae, 64 takım içerisinde 751 cins ile bitkiler aleminde *Orchidaceae* ve *Asteraceae*'dan sonra üçüncü büyük çiçekli bitki ailesidir. *Fabaceae* veya *Leguminosae* ailesi; fasulye, bezelye, mercimek, bakla, nohut gibi hem ekonomik hem de tarımsal açıdan oldukça önemli ve besin değerleri bakımından da yüksek değerlere sahip gıdaları içermektedir. *P. vulgaris* $2n=22$ diploid kromozom sayısına sahiptir. Yaklaşık 250 yıldır tarımı yapıldığı tahmin edilen *P. vulgaris*'i ilk tanımlayan kişi Linnaeus olmuştur. Başlarda kökeni Hindistan olarak düşünülse de pek çok araştırmacının gerçekleştirdiği detaylı incelemeler ve elde ettikleri bulgular eşliğinde fasulyenin menşeinin Orta Amerika olduğu tespit edilmiştir. Fasulyenin buradan diğer kıtalara olan yayılımının ise Amerika kıtasının keşfinden sonra özellikle İspanyollar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.

Kuru fasulye yemeklik tane baklagiller arasında üretim ve ekim alanı verileri bakımından en yüksek değerlere sahip türdür. Dünya'da milyonlarca ton üretim ve hektar alanda yetişmektedir. Kıtalararası üretim, ekim alanı ve tane verimi bakımından bir yarış söz konusudur. Ülkeler bazında ise Türkiye maalesef henüz ilk 10'a girebilecek verilere ulaşamamıştır. Ülkemizin fasulye üretiminde yeterli seviyelere ulaşamamasının muhtemel sebebi iklim koşullarıdır. Fasulyeden yüksek tane verimi almak için abiyotik ve biyotik streslere maruz kalmaması gerekmektedir. Bilhassa tuzluluk ve kuraklık fasulye bitkisinin yetişmesini sınırlayıcı faktörlerdir. Çevresel streslere karşı olan yanıtta strese cevap veren genlerin transkripsiyonel seviyedeki ifadeleri önemli role sahiptir (Singh vd. 2002).

Transkripsiyon faktörleri strese cevap veren genlerin ifade seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynayan temel bileşenlerden biridir. 60 amino asitlik korunmuş bir DNA bağlama alanını içeren homeobox transkripsiyon faktörleri, bitki büyümesi ve gelişimi, hücre ölümünün belirlenmesi, hücre farklılaşması, morfogenez ve strese yanıt gibi süreçlerde yer almaktadır. Homeobox bitki transkripsiyon faktörleri 14 sınıftan oluşmaktadır ve bu sınıflardan biri olan *WOX* gen ailesi, embriyogenez, tohum ve organ

oluşumu, kök hücre bakımı, doku ve organ yenilenmesi gibi bitkinin en gerekli gelişim süreçlerinde görev almaktadır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, hedeflenen WOX gen ailesi üyelerinin pek çok biyoinformatik araç kullanılarak tanımlanması ve karakterize edilmesi, tuz stresi ile ilişkili genlerin *in siliko* ifade analizinin tespiti ve biri hassas diğeri dayanıklı iki farklı fasulye çeşidinin tuz stresine maruz kalması sonucu mRNA ifade seviyelerinin saptanması hedeflenmiştir. Bu kapsamda Phvul-WOX ekspresyon seviyeleri, tuz stres koşulları altında hem RNAseq hem de qRT-PCR verileri kullanılarak değerlendirilmesi ve *Phvul-WOX* genlerinin tuz stresi yanıtındaki önemi araştırılmıştır.

1.1 Fasulye Bitkisi (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fabaceae veya *Leguminosae* ailesi; fasulye, bezelye, mercimek, bakla, nohut gibi hem ekonomik hem de tarımsal açıdan oldukça önemli ve besin değerleri bakımından da yüksek değerlere sahip gıdaları içermektedir. Etimolojik açıdan ise, Türk Dil Kurumu fasulye kelimesini, baklagiller familyasına ait yeşil ürünü ve kuru tohumlarından yararlanılan bir bitki olarak açıklamıştır. *P. vulgaris*, ($2n=22$) diploid kromozom sayısına sahip kendi kendine tozlaşan bir bitkidir (De Ron vd. 2015). Morfolojik özellik olarak kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum olmak üzere 5 kısımdan meydana gelir. Kökler kazık kök etrafında bolca saçak kökler oluşturur ve normal koşullar altında uygun ortamı bulduğunda 60-70 cm derine inebilir. Köklerdeki havanın serbest azotunu toprağa bağlayan *Rhizobium phaseoli* bakterisinin bulunması *Fabaceae* familyası bitkilerine ait önemli bir özelliktir. Fasulye gövdesi çeşitli renklerde olabilir. Özellikle kırmızı, pembe, yeşil gövde rengine sahip olabilirler. Gövde renkli ise çiçek renginin de aynı olması beklenir. İki çeşit fasulye yaprağı vardır. Birinci çeşit yaprak, gövde üzerinde böbrek gibi karşılıklı konumlanan ve yaklaşık 1 ay sonra sararan kotiledon yapraklardır. İkinci çeşit yapraklar ise fasulye çeşidine göre değişiklik gösteren uçları hafif sivri yapıda kalp şeklini almış gerçek yapraklardır. Fasulye çiçeklerinde farklı renk tonlarına sahip çiçekler bulunur. Çeşide göre beyaz, mor, kırmızı veya sarı olabilir. Dişi organ helozoni adı verilen kıvrılmış bir biçimdedir. Erkek organlar ise polen tozlarını taşımakla görevli olup

dişi organı saran boruya benzer bir yapıdadır. Baklagiller familyası bu durum ile kendi kendine dölleme özelliği kazanmıştır. Fasulyeler meyve çeşidine göre; boyut, renk, şekil, genişlik, uzunluk açısından aralarında farklılıklar barındırır. Tohumlarında ise adet bakımından değişikliklere rastlanır. Çeşide göre 4-10 dolaylarında tohum bulunur. Nadiren de olsa tek tohumlu fasulyeler de gelişmektedir (Anonim 2020a).

1.1.1 Fasulyenin tarihçesi

Yaklaşık 250 yıldır tarımı yapıldığı bilinen (Ekinci 1976) *Phaseolus vulgaris* (fasulye), ilk olarak 1753'te Linnaeus tarafından tanımlanmıştır (Brücher 1988). Linnaeus çalışmaları sonucunda fasulyenin menşenin Hindistan olduğu iddiasında bulunsa da Vavilov (1931) *Phaseolus vulgaris* L. 'nin anavatanının mahsul çeşitliliği bakımından Orta Amerika olduğunu söylemiştir. Daha sonra Burkart ve Brücher'in (1953) yaptığı detaylı araştırmalar sonucu *Phaseolus aborigineus* adlı yabancı fasulye türlerini Arjantin'in kuzeybatısında bulmuşlardır. Ayrıca Gentry'nin (1969) Meksika ve Guatemala bölgesinde yaptığı incelemeler nihayetinde yabancı ve kültür fasulye türlerini fark etmiştir. Bu bilgiler ışığında fasulyenin menşei Orta Amerika olarak kabul görmüştür (Vavilov 1931, Burkart ve Brücher 1953, Kaplan 1956, Kaplan ve MacNeish 1960, Gentry 1969, Berglund-Brücher ve Brücher 1976, Brücher 1988, Freyre vd. 1996, Kaplan ve Lynch 1999, Torres vd. 2004, Hegay 2013). Bazı araştırmacılar ise fasulyenin Orta Amerika ve Güney Amerika bölgeleri olmak üzere iki gen havuzuna sahip olduğunu raporlamıştır (Blair vd. 2006, Kwak ve Gepts 2009, Bitocchi vd. 2012, Yeken vd. 2019). Fasulyenin Asya ve Avrupa'ya yayılışı, Amerika kıtasının keşfi ile başladığı İspanyollar aracılığı ile de kıtadan kıtaya yayılım gösterdiği düşünülmektedir. 250 yıldır da Anadolu'da tüketildiği düşünülmektedir (Büyük 2014).

1.1.2 Fasulyenin sınıflandırılması

Fasulye 751 cinse sahip *Fabaceae/Leguminosae* (Baklagiller) familyasının, *Papilionoideae* alt familyasına ait *Phaseolea* oymağının *Phaseolus* cinsine bağlı 19.000

türden biridir (Çizelge 1.1). Baklagiller, *Orchidaceae* ve *Asteraceae* ailelerinden sonra üçüncü en büyük ailedir (Christenhusz ve Byng 2016).

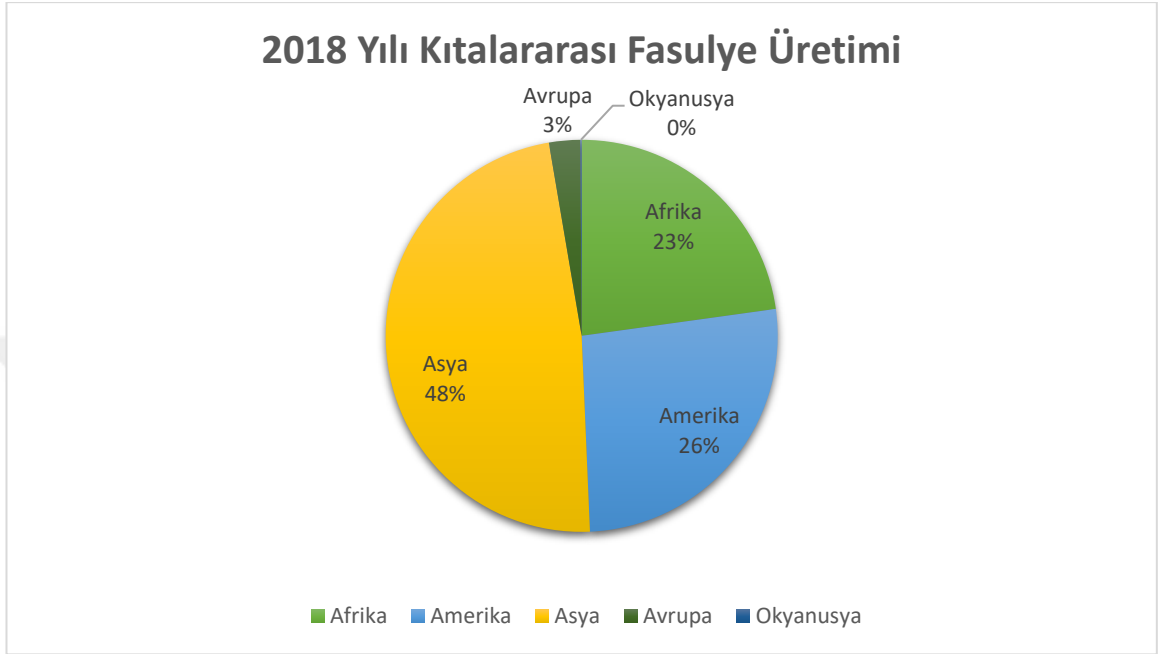
Çizelge 1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinin sınıflandırılması

Domain	Eukarya (Ökaryotlar)
Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae/Leguminosaea
Cins	<i>Phaseolus</i> L.
Tür	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

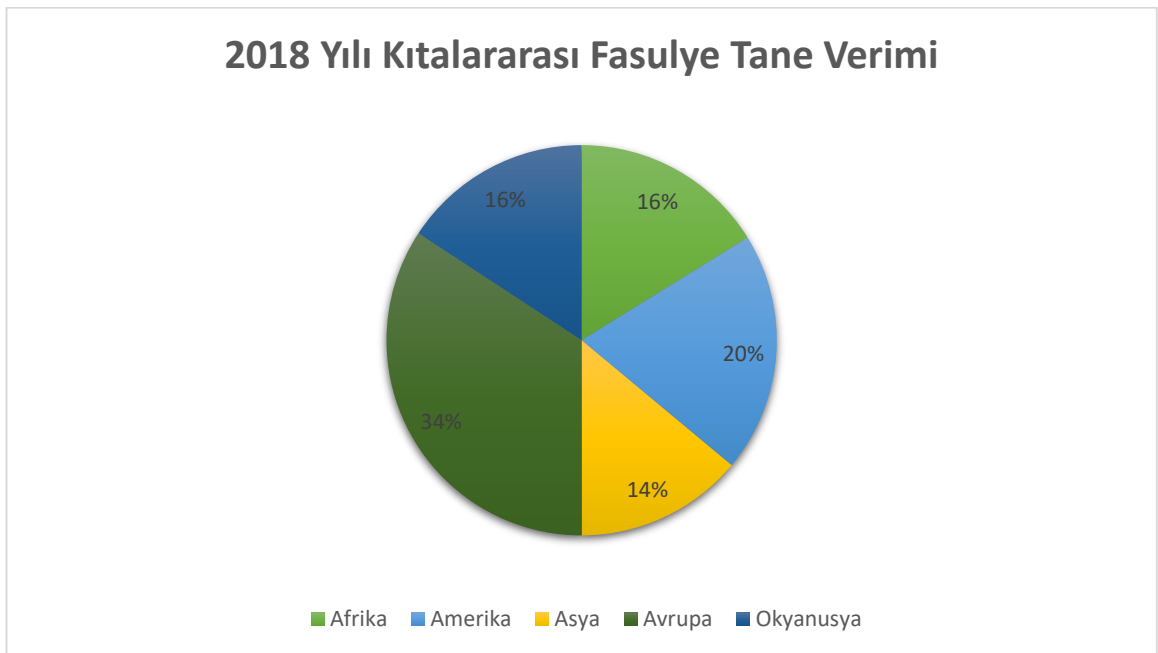
1.1.3 Fasulye üretimi ve ekonomik önemi

Yemeklik tane baklagiller, fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), mercimek (*Lens culunaris* Medik., *Lens esculenta* Moench.), bezelye (*Pisum sativum* L.), bakla (*Vicia faba* L.), nohut (*Cicer arietinum* L.) ve börülce (*Vigna sinensis* L.) gibi türlerin içinde bulunduğu dünyanın pek çok bölgesinde gelişim gösterebilen bu türlerin ortak adı olmuştur (Gülümser 2016). Kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), son ulaşılan üretim ve ekim alanı verilerine göre yemeklik tane baklagiller arasında en yüksek değerlere sahip türdür. 2018 yılı FAO verilerine göre fasulyenin dünyada ekim alanları 34 milyon 495 bin hektar alanı kaplıyorken üretimi 30 milyon 434 bin tondur. Kıtalar arası değerlendirme yapıldığında Asya kıtası üretim ve ekim alanları bakımından en yüksek seviyeye sahipken Avrupa kıtası da tane verimi bakımından en yüksek değere sahiptir (Şekil 1.1-1.3). Ülkeler arası üretim değerleri incelendiğinde listenin başında 6 milyon 220 bin ton ile Hindistan bulunurken en yüksek ton değeriyle listeyi takip eden ülkeler Myanmar, Brezilya ve ABD olmuştur (Şekil 1.4). Ekim alanları kıyaslandığında ise yine listenin başında 13 milyon 545 bin hektar alan değerle Hindistan bulunurken devamında Brezilya, Myanmar ve Meksika vardır. Diğer taraftan ülkemiz 1994-2018 yılları arası üretimde maalesef ilk 10'a girememiştir (Anonymous 2020). Bu açıdan kuru fasulye üretim miktarını arttırmaya

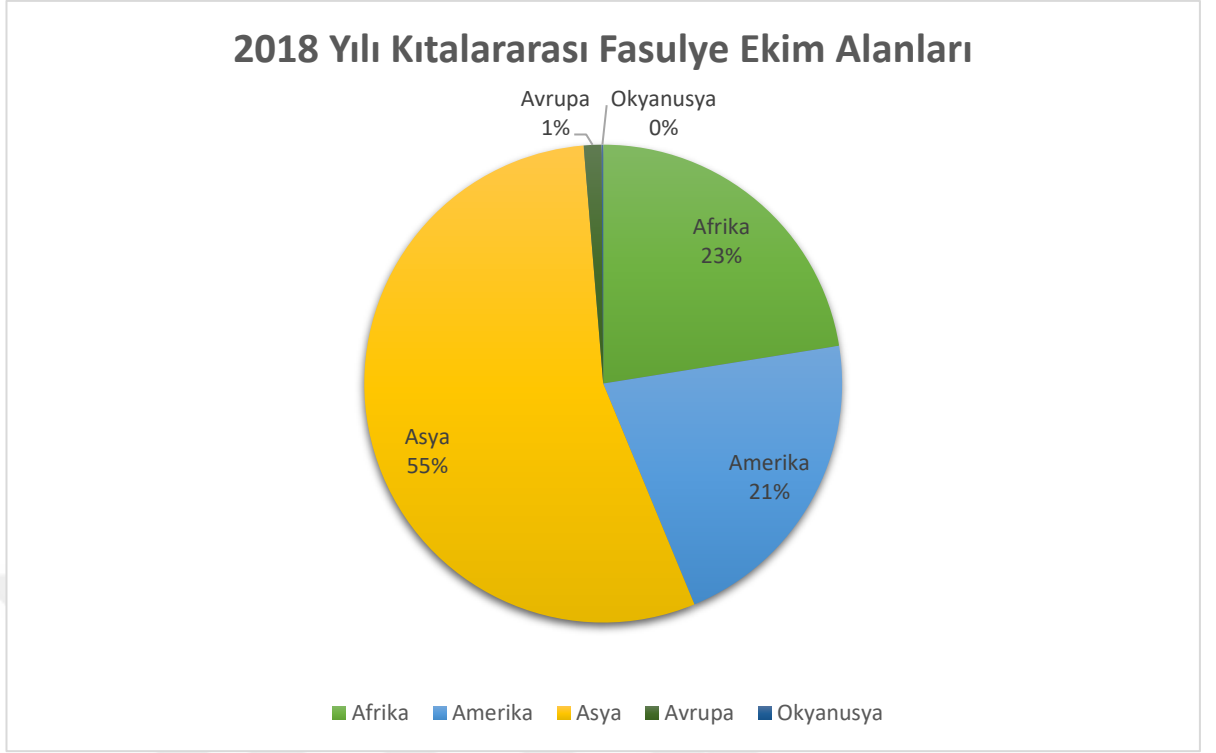
yönelik yakın zamanda yapılacak ve yapılması beklenen çalışmaların önemi büyüktür. 2020 yılı TÜİK verilerine göre ise ülkemizde yıllara göre dağılmış kuru fasulye üretimi ve ekim yapılan alan değerleri çizelge 1.2’de verilmiştir (Anonim 2020b).



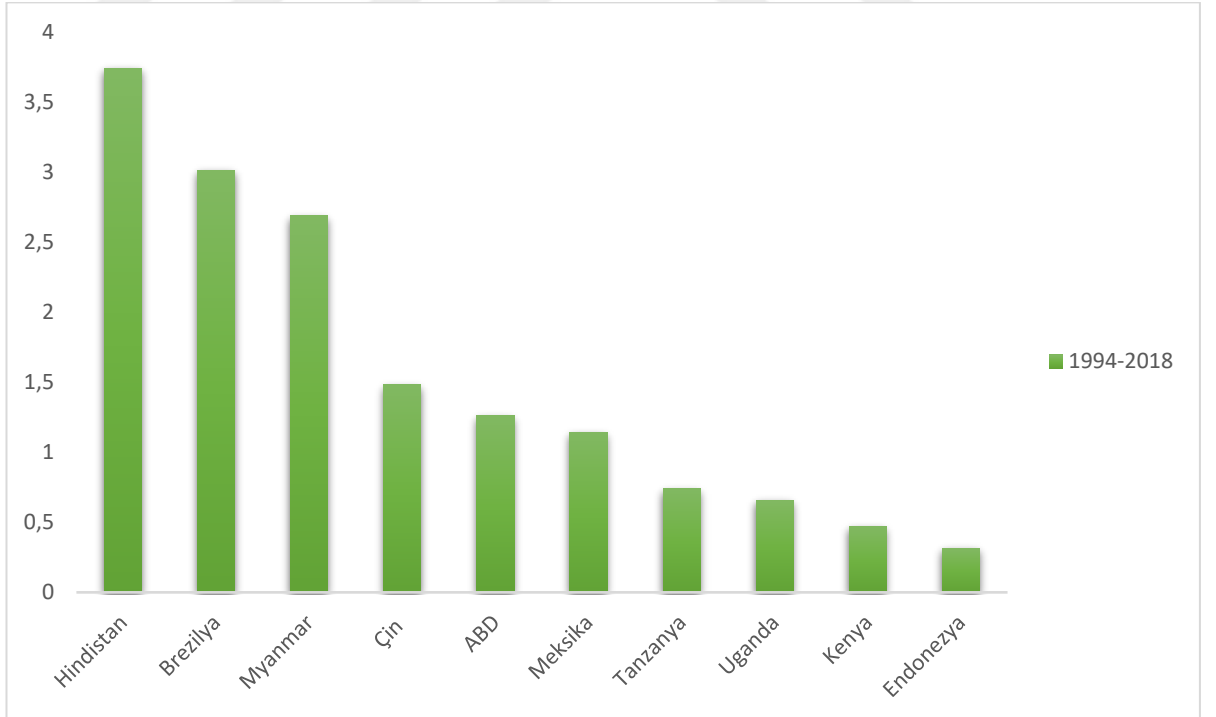
Şekil 1.1 2018 Yılı Kıtalar arası Fasulye Üretim Miktarları



Şekil 1.2 2018 Yılı Kıtalar arası Fasulye Tane Verim Miktarları



Şekil 1.3 2018 Yılı Kıtalar arası Fasulye Ekim Alanları



Şekil 1.4 1994-2018 Yılları Arası Uluslararası Fasulye Üretim Miktarları

Çizelge 1.2 2020 Yılı Türkiye Kuru Fasulye Üretimi ve Ekim Yapılan Alan Değerleri

YILLAR	Üretim (ton)	Ekilen alan (ha)
2019	225.000	889.385
2018	220.000	848.045
2017	239.000	897.221
2016	235.000	898.197
2015	235.000	935.840

1.1.4 Fasulyenin yetiştiği iklimler ve toprak istekleri

Fasulye Türkiye'nin bütün coğrafi bölgelerinde yetişebilme özelliğine sahip ılıman iklim bitkisidir. Çimlenme için gerekli ideal sıcaklık 15-20 °C'dir. Çimlenme, sıcaklık 15 °C'nin altına indiğinde yavaşlarken 10 °C'nin aşağısında veya 35 °C'nin yukarısında olduğunda ise çimlenme çok az ya da hiç olmamaktadır. Nemin ve sıcaklığın ideal olduğu bir ortamda ekim sürecini takiben 7-10 gün sonra çıkış gerçekleşir. Sıcaklığın düşük olduğu ortamlarda ise çıkış süresi 20-25 günü bulabilir. Vejetasyon süresi 70-140 gün arasında değişir. Bitkinin sarılcı ve bodur olması, erkenci veya geçici olması ya da bölgenin ekolojik koşulları vejetasyon süresiyle doğrudan ilişkilidir. Çiçeklenme süresi bitki çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Bodur tiplerde 10-15 gün, yan sarılcılarda 20-25 gün, sarılcılarda ise 30 günün üzerindedir. Çiçeklenme süresi ve oranı toprak nemi ile doğrudan ilişkilidir. Toprak nemi yeterli miktarda olmadığı takdirde çiçeklenme yavaşlar. Optimal sıcaklık 20-25 °C'dir. 30 °C'nin üzerinde sıcaklık görüldüğü takdirde çiçekler dökülür ve verim düşer. 10 °C altı durumlar tanenin gelişmesine mâni olmaktadır. Fasulye verimi yüksek tuzluluk ve alkali sorunu bulunmayan, pH'ı 7-8 aralığında ve bilhassa tınlı topraklarda iyi yetişmektedir (Keleş 2015).

1.1.5 Fasulyenin besin değeri

Fasulye, insanların doğrudan tükettiği baklagillerden biridir (Deshpande vd. 1991). Bu temel gıda, dünya çapında bilhassa Afrika'da 200 milyondan fazla ekonomik yetersizliği

olan insan için protein, karbonhidrat, bazı mineraller ve vitaminler bakımından ihtiyaçlarını gideren önemli bir besin kaynağıdır (Pennington ve Young 1990, Holland vd. 1991, Schmutz vd. 2014). Aşağıdaki tabloda fasulye bitkisinin yenilebilir 100 g için besin değerleri yer almaktadır (Anonim 2020c, Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3 Fasulyenin 100 g İçin Besin Değerleri

Bileşen	Birim	Ortalama
Enerji	kcal	44
Su	g	87,58
Protein	g	2,20
Karbonhidrat	g	6,99
Yağ	g	0,37
Tuz	mg	4
Demir (Fe)	mg	1,09
Fosfor (P)	mg	62
Kalsiyum (Ca)	mg	61
Magnezyum (Mg)	mg	34
Potasyum (K)	mg	316
Çinko (Zn)	mg	0,48
C vitamini	mg	16,0
Beta-karoten	µg	308
Lutein	µg	292

1.1.6 Fasulyenin insan sağlığına faydaları

Fasulye, besin değerleri bakımından yapılan çalışmalarla pek çok hastalığa iyi geldiği tespit edilmiş bir bitkidir. Kolesterol seviyeleri ve kandaki yüksek trigliserit oranı kalp hastalığını tetikleyen faktörlerdir. Kardiyovasküler hastalıkların risk faktörlerini azaltmanın yolu bol miktarda lif ve B vitamini içeren besinleri tüketmekten geçmektedir (Van Horn vd. 2008). Yapılan araştırmalar düzenli fasulye tüketiminin LDL ve toplam

kolesterolü düşürdüğü ve çeşitli risk faktörlerini kaldırmaya yardımcı olabileceğini gösterilmiştir (Garden-Robinson 2019).

Diyabet dünya çapında yaygın hastalıklardan biridir. Fasulye de dahil çeşitli baklagilleri yemek sadece diyabetin önlenmesinde değil, kan şekeri seviyelerinin düzenlenmesinde de rol oynar (Venn ve Mann 2004). Fasulye, karbonhidrat gibi sindirimi daha yavaş bileşenlerce zengin olması açısından tüketimi sağlandığında tokluk hissini arttırıp plazma, glikoz ve insülin seviyelerini dengeler (Leathwood ve Pollet 1998). Yakın zamanda yapılan bir araştırmaya göre, düzenli olarak fasulye tüketimi kan şekerini iyileştirmek, sistolik kan basıncını düşürmek ve koroner kalp hastalığı riskini azaltmada güzel sonuçlar vermiştir (Jenkins vd. 2012).

Fasulye içeren diyetlerin kanserde rolü bulunup bulunmadığı belirsizliğini korumaktadır (Aune vd. 2009). Ancak flavonoidler, tanenler, fenolik bileşikler ve bazı antioksidanlar gibi biyoaktif bileşiklerin diyet katkılar ve belirli kanser türlerinin gelişme riskini azaltabilme olasılığı vardır (Amarowicz ve Pegg 2008). Bir araştırmada fasulye, meyve ve sebze gibi antioksidan bakımından zengin içeriklere sahip besinler tüketildiğinde vücuttaki oksidasyonu azaltıp kanser riskini azalttığı sonucuna ulaşmışlardır (Wang vd. 2011). Bir diğer çalışmada ise lif içeriğine sahip fasulyenin, kolorektal kanser riskini azaltmada rol oynayabileceği tespit edilmiştir (Lanza vd. 2006).

1.1.7 Fasulyede görülen hastalıklar

Fasulyede bakteriyel, viral, mantar ve parazidik olmak üzere hastalıklar 4 çeşit yolla bulaşır.

1.1.7.1 Bakteriyel hastalıklar

Başlıca 3 çeşit bakteriyel hastalık görülmektedir. Bunlar; kahverengi leke, adi yaprak yanıklığı ve hale yanıklığıdır.

Kahverengi leke, *Pseudomonas syringae* pv bakterisinden kaynaklanır. *Syringae*, ABD'deki fasulyenin ekonomik açıdan en önemli hastalıklarından biridir. Patojen, rüzgarla savrulur, yağmur ve üstten sulama ile yayılır. Orta derecede sıcak hava, bulutlu gökyüzü ve yüksek nem enfeksiyonu kolaylaştırır (Hagedorn ve Inglis 1986, Dillard ve Legard 1991).

Adi yaprak yanıklığı, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* bakterisinden kaynaklanır. Hastalık rüzgarla savrulan yağmur ve üstten sulamanın yanı sıra kontamine ekipman, insanlar ve hayvanlar aracılığıyla yayılır. Ayrıca hastalığın bulaşması toprakta kalan hastalıklı bitki artıkları veya kontamine tohumlarla da olabilir. Sıcak hava koşulları ve yüksek nem olduğu dönemlerde görülmektedir (Hagedorn ve Inglis 1986).

Hale yanıklığı, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bakterisinden kaynaklanır. Adi yaprak yanıklığında olduğu gibi hale yanıklığına sebep olan bakteri de tohumla taşınır. Hale yanıklığının gelişimi nemli ancak soğuk koşullardır (Hagedorn ve Inglis 1986).

1.1.7.2 Viral hastalıklar

Fasulyede başlıca BCMV, BYMV, CYVV, BCTV, BGMV, TSV ve CMV gibi viral hastalıklar görülmektedir.

Fasulye mozaik virüsü (BCMV), yapraklar üzerinde gelişen dönüşümlü açık ve koyu yeşil lekelerle mozaik bir model oluşturur. Yapraklarda buruşma ve kıvrılma meydana gelebilir. Virüs yaygın olarak bitkiden bitkiye yaprak bitleri tarafından bulaşır. Ayrıca virüs, enfekte polen ve mekanik iletim yoluyla da bulaşabilir (Hagedorn ve Inglis 1986).

Fasulye sarı mozaik virüsü (BYMV), yapraklarda parlak sarı lekelerin varlığında açık ve koyu yeşil mozaik desenine neden olur (Schwartz vd. 2005). Bazıları yapraklarda şekil bozukluğuna ve çarpıklığa neden olur. Enfekte bitkiler bodur ve gür olabilir. BYMV'de mekanik yolla iletilirler.

Yonca sarı damar virüsü (CYVV), tipik olarak yapraklarda belirgin bir yeşil-sarı mozaik, bitkilerin bodurlaşması ve baklalarda beneklenmeye neden olur. Bazılarında damar nekrozu gelişebilir. Virüs, daha çok yaprak bitleri aracılığıyla bulaşır (Schwartz vd. 2005).

Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalık virüsü (BCTV), yaprakların büzülme ve trifoliatların kıvrık boyun formuna dönüşmesine neden olur. Enfekte bitkiler bodurlaşır, kümelenir ve enfeksiyondan kısa bir süre sonra bitki ölümü gerçekleşebilir. BCTV tohum kaynaklı değildir ve mekanik yolla iletilmez (Schwartz vd. 2005).

Fasulye altın mozaik virüsü (BGMV), ABD'nin güney kesimlerinde, Karayipler'de ve Meksika'da ortaya çıkabilir. Virüs, yapraklarda parlak sarı veya altın mozaik deseni, yaprak yuvarlanması, bitkilerin bodurlaşması gibi belirtiler göstermektedir. BGMV, beyaz sinekler tarafından bulaşır ve yüksek olasılıkla hastalık beyaz sineklerin hareketini ve üremesini sağlayan kuru dönemlerde ortaya çıkar (Hagedorn ve Inglis 1986, Schwartz vd. 2005).

Tütün çizgi virüsü (TSV), gövdedeki düğümlerin kızarmasına, enfekte olup bükülmesine neden olur. Virüs, tripsler tarafından bulaşmaktadır (Schwartz vd. 2005).

Salatalık mozaik virüsü (CMV), yapraklarda ciddi bir bozulma ve renk değişikliği, kabuklar kıvrımlı ve benekli hale gelebilir. CMV, yaprak bitleri aracılığıyla bulaşır (Schwartz vd. 2005).

1.1.7.3 Mantar hastalıkları

Fasulyede Pas ve Antraknoz adlı iki çeşit önemli mantar hastalığı vardır.

Pas hastalığı, çoğunlukla yapraklarda gelişen küçük, dairesel, kırmızımsı-kahverengi püstülleri içerir. Fasulye pası en çok nemli, güney subtropikal bölgelerde görülür (Schwartz vd. 2005).

Antraknoz hastalığı ise fasulye bitkisinin tüm toprak üstü kısımlarını enfekte ederek, gövdede, yaprakta ve kabuklarda koyu kahverengi lezyonlara neden olan bir mantardan kaynaklanır. Bitki dokusunun enfeksiyonu, ıslak ve soğuk koşullar tarafından tercih edilir. Mantar sporları, yağmur, böcekler, hayvanlar veya insanlar aracılığıyla yayılır (Hagedorn ve Inglis 1986, Schwartz vd. 2005).

1.1.7.4 Parazitik hastalıklar

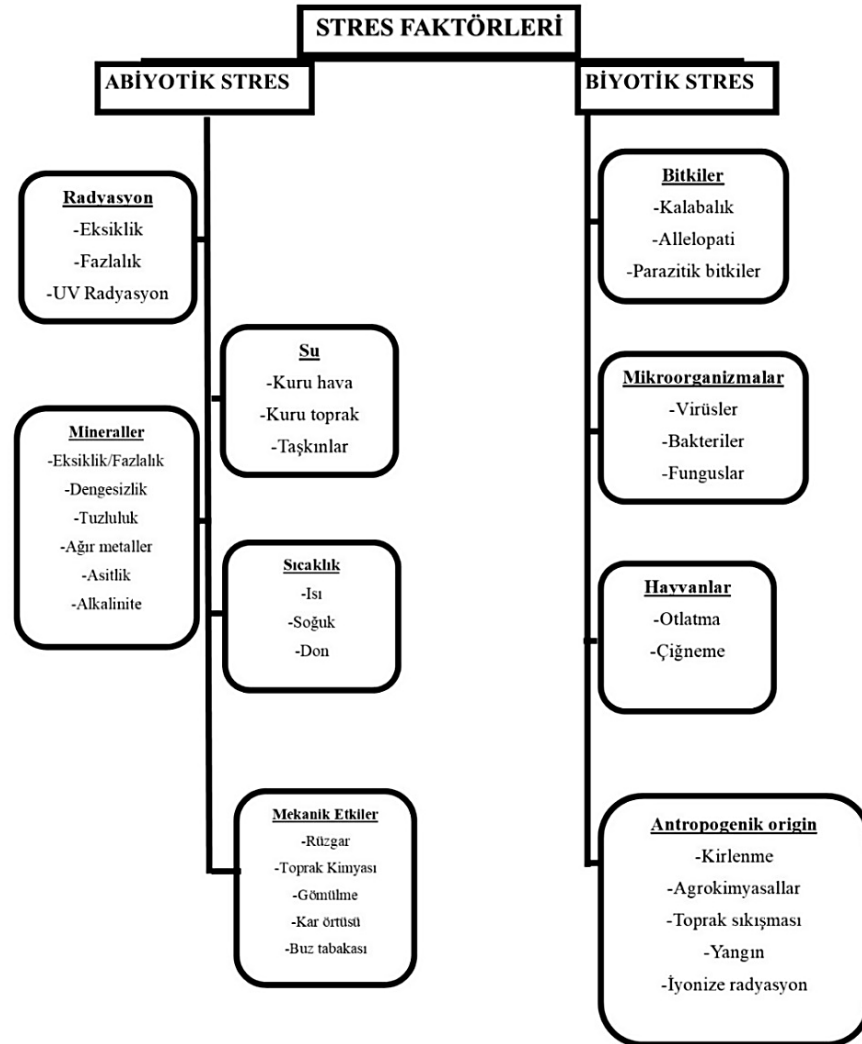
Bitki paraziti nematodları, kuru fasulye kökleriyle beslenen, toprak ve bitki dokularında hayatta kalan mikroskobik yuvarlak kurtlardır. Bir tarlada aynı anda birkaç tür meydana gelebilir. Geniş bir konukçu yelpazesine sahiptirler. Çevresel gereksinimleri ve neden oldukları semptomlar açısından farklılık gösterirler.

1.2 Bitkilerde Stres

TDK'ya göre 'stres' ruhsal gerilim anlamına gelip, ingilizce kökenli bir kavramdır. Stres kavramının literatüre girişi Hans Selye tarafından gerçekleştirilmiştir. Selye (1936), stresi iki cümlede ifade etmiştir: 1) Tüm ajanlar hem stres hem de spesifik etki üreten stresörler olarak hareket edebilir. 2) Strese özgü yanıtlar ve spesifik olmayan genel yanıtlar vardır. Levitt (1980) ise stresi, "canlı organizmalar için potansiyel olarak elverişsiz herhangi bir çevresel faktör" olarak tanımlamıştır.

Bitkide strese Grime (1977) kısa ve öz bir açıklama getirmiştir. Grime (1977), fotosentez oranını sınırlayan ve bir bitkinin enerjiyi biyokütleye dönüştürme yeteneğini azaltan faktörleri bitki stresi olarak tanımlamıştır. Devamında Larcher'de (1987) "Bir bitkiye yapılan artan taleplerin, işlevlerin başlangıçta dengesizleşmesine yol açtığı, ardından normalizasyon ve geliştirilmiş direncin olduğu durum." olarak ifade etmiştir.

Genel bağlamda, bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkileyen ve gelişimini durduran, kısacası bitki için uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilmiştir. Bitkiler yaşamları süresince birçok uygunsuz koşullara maruz kalmaktadır. Bu koşullar abiyotik ve biyotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Levitt 1972). Biyotik stres faktörleri; mikroorganizmaların enfeksiyonu, zararlı hayvanların saldırıları, antropogenik kökeni yok eden etmenler ve bazı parazitik bitkilerin saldırıları sonucu oluşan stres faktörleridir. Abiyotik stres faktörleri ise radyasyon, sıcaklık, su, mineraller ve mekanik etkiler gibi etmenlerin azlığı veya çokluğu sonucu bitkinin fizikokimyasında değişime neden olan stres faktörleridir (Lichtenthaler 1996, Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Çevresel stres faktörleri (Larcher 1995)

1.2.1 Stresin neden olduğu aşamalar

Bitkiler strese maruz kalmadan önce büyüme, ışık, su ve mineral seviyelerinin belirli ölçüde olduğu optimum fizyolojidedirler. Bitki stresörlerle ve karmaşık stres olaylarıyla karşı karşıya kaldığında 4 aşamalı karakteristik fazlar dizisini takip eder.

1.Tepki aşaması: Alarm tepkisi olarak ifade edilir. Stresin başladığı andan itibaren bitkide normal yaşamsal faaliyetlerin kısıtlandığı ve fonksiyonel işlevlerde sapmaların gerçekleştiği aşamadır. Canlılık azalır. Katabolizmanın anabolizmayı aştığı biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelir.

2. Onarım aşaması: Direnç aşamasıdır. Stresin devam ettiği bu süreçte, bitki adaptasyon sağlamaya ve tamir mekanizmalarını çalıştırarak devam eden stres koşullarına dayanıklılık göstermeye çalışır.

3. Son aşama: Tükenme aşamasıdır. Stres faktörünün yoğunluğu ve stres döneminin uzunluğu arttığı takdirde bitki tükenme aşamasına girer. Adaptif kapasite alanına aşırı yüklenilmesi sonucu bitkide kalıcı hasarlar oluşur daha da ötesi ölüme yol açar.

4. Rejenerasyon aşaması: Stres faktörlerinin elimine edilmesi durumunda bitkide meydana gelen hasara bakılarak kısmi veya tam rejenerasyon gerçekleştirilip oluşan hasarlar tamir edilebilmektedir (Larcher 1995, Lichtenthaler 1996, Edreva 1998).

Her bitki biyokimyasal, fiziksel ve ekolojik açıdan farklı olduğu için stres etmenlerinin yol açtığı zarar da değişkenlik göstermektedir (Kadıoğlu 2004, Rao vd. 2005). Bitkilerin yaşamları süresince maruz kaldığı birçok stres faktörüne karşılık toleranslı tür ve çeşitlerin geliştirilmesi stresle ilgili mekanizmaların aydınlatıldığı çalışmalar açısından önem arz etmektedir.

1.3 Tuz Stresi

Tuzluluk, kuraklık ve yüksek sıcaklık gibi abiyotik stresler, bitki büyümesini ve verimliliğini etkileyen en önemli çevresel stres faktörlerinden biridir (Yu vd. 2020). Nemli iklim koşullarına kıyasla kurak ve yarı kurak iklim koşullarına sahip topraklar daha çok etkilenmektedir. Yükselen yeraltı su seviyelerinin yoğun tuz içeriğine sahip olması, hatalı drenaj ve sulama sistemleri toprağın tuzluluğunu etkileyen başlıca nedenlerdir (Rengasamy 2006). Dünya’da ekili arazilerin yaklaşık %20’si ve sulama yapılan tarım alanlarının ortalama %50’sinden fazlasını tuzluluk faktörü etkilemektedir (Shrivastava ve Kumar 2015). Toprak tuzluluğu çeşitli katyonlar dolayısıyla oluşmaktadır. Bu katyonlar Sodyum (Na^+), Magnezyum (Mg^{2+}), Kalsiyum (Ca^{2+})’dur. Sodyum diğerlerinin aksine toprağın fiziksel yapısının bozulmasına neden olan baskın bir tuzdur (Chaitanya vd. 2014). Toprağın kalitesini düşüren tuz molekülleri ise NaCl , MgSO_4 , KNO_3 ve NaHCO_3 ’tır.

1.3.1 Tuzluluk altında iyon homeostazisi

Tuzluluk, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklıklar gibi abiyotik stres faktörleri bitkilerin iyon homeostazisini bozmaktadır. Bitkilerde tuzluluk toleransı, hücre sitozolündeki K^+/Na^+ oranını sürdürerek hücresel iyon homeostazisini korumaktadır. Sitoplazmadaki Na^+ katyonunun azalması ile eş zamanlı olarak K^+ katyonun artması hücresel hasarın önüne geçer ve bitkilerde K^+/Na^+ oranının dengesine katkı sağlar. Hücre içi dengenin, sitoplazmadaki Na^+ ’nın aşırı birikimi kısıtlanarak veya tuz stresine maruz kalan bitkilerde sitozolik K^+ ’yı koruyarak sağlanabilir (Basu vd. 2020). Ayrıca Na^+ ’nın vakuollere bölünmesi stres etkisini azaltıcı bir durumdur.

1.3.1.1 Tuza aşırı duyarlı SOS yolu

Salt overly sensitive (SOS) yolağı, bitkilerin çeşitli çevresel streslerle karşılaştığında mücadele eden çoklu sinyal yollarını düzenlemekle görevlidir. Tuz stresi altındaki SOS transkripsiyon faktörü, bitkilerde hem Na^+ seviyesini kontrol etmekten sorumlu hem de

iyon homeostazını arttırmaktan sorumlu anahtar düzenleyicidir (Fraile - Escanciano vd. 2010). SOS yolu, *SOS1*, *SOS2* ve *SOS3* olmak üzere üç genden oluşan bir kompleks yapıdır. SOS'un bu üç protein alanı aşamalı bir şekilde aktifleşir. *SOS1* geninin görevi plazma membranındaki Na^+/H^+ *antiporter* 'ı kodlamaktır. *SOS2* geni bir Ser / Thr kinazdır ve *SOS3* geni ise bir Ca'dur. Ca^{2+} iyonları birçok fizyolojik süreçte rolü bulunan, tüm canlılarda aşağı akış sinyallerini aktifleştirmekle görevlidir (Sadia vd. 2020).

Ca^{2+} iyonlarının, bitki abiyotik stres koşullarına maruz kaldığında çeşitli sinyal yollarında aracılık etme görevi bulunmaktadır (An vd. 2020). SOS genleri iyon artışında değişikliklere göre birbirleriyle bağlantılı aktivasyonlar yürütürler. Mesela iyon konsantrasyonlarında herhangi bir artış, *SOS2*'nin aktif olmasını tetikler. Bu duruma paralel Ca^{2+} aracılı aktivasyon sonucu *SOS3* geni aktif olmaktadır. *SOS2* girişi, *SOS1*'i etkinleştirerek sitoplazmadan Na^+ çıkışını sağlamaktadır. Son yapılan bir çalışmaya göre, *SOS1* ve *SOS3*'ün aşırı ekspresyon göstermesinin asıl sorumlusunun Sodyum Potasyum Kök Bozukluğu3 (NaKR3) adlı bir proteinin olduğunu ve *Arabidopsis thaliana*'da tuz stresi toleransında katkısı bulunduğu ihtimalinin olduğu ileri sürülmüştür (Amin vd. 2020).

1.3.1.2 Yüksek afiniteli K^+ taşıyıcıları (HKT'ler)

HKT, bitkilerin iyon homeostazında rol oynayan hem monokotiledonların hem de dikotiledonların genellikle ksilem parankimasında bulunan önemli bir taşıyıcıdır (Munns vd. 2012). HKT proteinleri, Na^+ ve K^+ taşıma özellikleri bakımından iki alt ailede sınıflandırılmaktadır. HKT1 benzeri proteinin sorumluluğu Na^+ 'nın ksilemden sürgün floemine taşınması, Na^+ 'nın sürgünden köke ters translokasyonunu kolaylaştırmak ve sürgündeki Na^+ birikimini inhibe etmektir (Almeida vd. 2017). Başlarda HKT'lerin sodyum birikimine neden olduğu düşünülse de sonrasında yapılan çalışmalar neticesinde sürgünlerdeki Na^+ 'yı azaltma ve bitkilerde artan tuz toleransını sağladığı tespit edilmiştir (Plett vd. 2010). Bu taşıyıcı sınıf sadece Na^+ atılımına yardım etmekle kalmaz K^+ akışının sağlanmasında da rol alır (Li vd. 2014).

1.3.1.3 Na⁺, K⁺ / H⁺ değiştiriciler (NHX'ler)

Hücre içi NHX antiportörlerinin görevi; bitkilerde hücrel pH'yı düzenlemek ve Na⁺/K⁺ oranını dengede tutmaktır. NHX, hücrel vakuollerdeki Na⁺'nın bölümlere ayrılmasını sağlar. Hücre hacminin düzenlenmesinde önemi büyüktür (Basu vd. 2020). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada; *Puccinellia tenuiflora* ve *Salicornia europaea* adında iki halofit bitki türünden klonlanan NHX1 genlerinin sodyum dışlama yoluyla transgenik *Arabidopsis* hatlarında tuz stresiyle savaşmaya yardımcı olduğu tespit edilmiştir (Liu vd. 2017).

1.3.1.4 Plazma membran proteini (PMP3)

PMP3 proteini bir grup hidrofobik polipeptitten oluşur. Hücre içi iyon homeostazisinde görevli olmak adına tuz ve kuraklık stresine yanıt verir. *Arabidopsis* bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, sekiz *PMP3* gen homologu ve *AtRCI2A*'nın aşırı gen ifadesinin bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada *Arabidopsis*'teki hücrelere sınırlı Na⁺ girişinin olduğu ve yüksek tuz toleransının gerçekleştiği bulunmuştur. Mısır (*Zea mays*) bitkisinde yapılan bir diğer çalışmada ise tuza ve kuraklığa karşı artan hassasiyeti bulunan yüksek oranda korunmuş transmembran bölgelerde sekiz *ZmPMP3* geninin aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir (Amin vd. 2020).

Bitkiler yüksek seviyelerde Na⁺ birikimini önlemek için iki yol kullanmaktadır:

1. Na⁺ Pompalama: Bitkiler stres oluşturabilecek düzeyde yüksek Na⁺ katyonu ile muamele olduğunda kökler tarafından alınan tüm tuz iyonları Na⁺ ekstrüzyonu aracılığıyla rizosfere geri gönderilir ve bu şekilde hücre içi dengeler sağlanır (Zhao vd. 2020).

2. Vakuollerde Birikim: Aşırı Na^+ katyonunun sitozolde birikimini önlemenin bir diğer yolu da vakuollerde biriktirmektir. Böylelikle hem bitkiye olan zarar engellenmiş olur hem de iyon toksisitesinden korunum sağlanır (Zhao vd. 2020).

1.3.2 Bitkilerde tuz stresinin zararları

Bitkiler tuz stresine dayanıklılıkları bakımından ikiye ayrılır. Glikofitler yüksek tuz seviyelerinin bulunduğu topraklarda büyüyemezken, tuza direnç mekanizmaları geliştiren halofitler ise belirli ölçüdeki tuzlu topraklarda hayatta kalabilirler. Ayıkulağı (*Aster tripolium* L.) ve Sinirotu (*Plantago lanceolata* L.) gibi glikofit bitkiler 100-200 mM'lık tuz konsantrasyonuna dayanamazken, Deniz Börülcesi (*Salicornia herbacea* L.) ve Kara Pazı (*Atriplex vesicaria* Heward ex Benth.) gibi halofit bitkiler 300-500 mM'lık tuz konsantrasyonlarına sahip topraklarda yetişebilirler (Munns ve Termaat 1986, Hernández ve Almansa 2002, Parida ve Das 2005, Flowers ve Colmer 2015).

Tuzluluk, pek çok koşula göre değişiklik gösterebilen zararlara sahiptir. İklim koşulları, ışık yoğunluğu, bitki türü veya toprak koşulları oluşabilecek zararın değişken unsurlarıdır (Tang vd. 2015). İlk kısıtlama, bitkinin su almasını engelleyen ozmotik strestir. Ozmotik stres, ozmotik potansiyeli düşürür ve böylelikle hücre, kök ve sürgün büyümesi yavaşlar. Bu olaylar neticesinde hücre genişlemesinin inhibe olmasına ve hücre duvarı gelişiminin engellenmesine neden olur. Tuzluluğun getirdiği ikinci kısıtlama iyonik dengesizlik bir diğer deyişle iyonik stres veya iyon toksisitesidir. İyon toksisitesi ve vakuollerde sodyum bölünmesi nedeniyle yapraklar zarar görür ve nekroz tetiklenir. Bu tarz iyonik dengesizlikler çiçeklenme sürecini geciktirerek tohum olgunlaşmasını, hücre organellerinin işlevlerini ve beslenmeyi engeller (Basu vd. 2020, Nimbolkar vd. 2020, Zhao vd. 2020).

Bitki yetiştirirken ozmotik düzenleme, iyonların taşınması ve toksisite gibi karşılaşılan potansiyel zorluklar toprağın aşırı tuzlu olmasından kaynaklıdır. Pek çok araştırmacı tuzun gereğinden fazla alınması durumunda kuraklık stresi, besin alımı bozuklukları, metabolik aktivitelerin değişimi, genotoksisite, hücre bölünmesi ve genişlemesi, oksidatif

stres, iyon toksisitesi ve membran ayrışması gibi hücrel ve metabolik süreçlerin zayıflamasına sebep olduğu gerçeğini kabul etmiştir (Nimbolkar vd. 2020).

Bitkilerin yaşamsal faaliyetlerinin devamı için kloroplast, ER ve mitokondri gibi organellerin işleyişi önem arz etmektedir. Bilhassa glükofit bitkileri, herhangi bir abiyotik veya biyotik strese maruz kaldığında yaşamsal faaliyetlerine zarar vererek organel stresine sürüklenmektedir.

1.3.2.1 Kloroplast stresi

Kloroplastlar, fotosentezin ana karakteri olmasının yanı sıra amino asitler, vitaminler, izoprenoidler, yağ asitleri ve lipidlerin biyosentezinde de rol oynamaktadır (Chan vd. 2016). Kloroplastların işlevinde gerçekleşecek herhangi bir aksaklık, bitki hücrelerinin biyokimyasal, fizyolojik ve metabolik özelliklerinde de aksamalara yol açar. Yüksek tuzluluk, stomaların kapanması nedeniyle CO₂ alımının azalması, fotosentetik verimin azalması, tilakoid membran hasarı, oksidatif stres, bozulmuş ozmotik ve iyonik homeostaz ve bozulmuş protein sentezi kloroplastlar üzerinde olumsuz etkiye neden olur (Suo vd. 2017).

1.3.2.2 ER stresi

ER stresi, biyotik ve abiyotik stresler dolayısıyla ER’de yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimiyle gerçekleşir. Yanlış katlanmış proteinler, ER ile ilişkili protein bozunmasını ve otofajiyi tetikleyen bir protein kalite kontrol sistemi tarafından tanınabilir. Bitki tuz stresine maruz kaldığında ise tüm proteinler ER’de artış gösterip birikime sebep olur. Böylelikle ER stresi gerçekleşmektedir (Liu ve Howell 2016).

1.3.2.3 Mitokondriyal stres

Mitokondri, bitkilere enerji üreten ana fonksiyonu taşımanın yanında stres koşulları altında hayatta kalabilmesi için de büyük öneme sahip organeldir. Abiyotik stresle meydana gelen karışıklık, mitokondriyal geri düzenleme veya geri sinyal yoluyla strese duyarlı genlerin ekspresyonu etkinleştirilebilir (Che-Othman vd. 2017, Wang vd. 2018).

1.3.3 Bitkilerin stres koşullarına cevap mekanizmaları

1.3.3.1 Ozmotik stres yolları ve uyumlu ozmolitlerin birikmesi

Ozmotik stres, çeşitli sinyal yollarını tetikleyerek uyumlu ozmolitlerin biyosentezine ve birikimine yol açar. Bitkilerde hem kısa hem de uzun süreli gerçekleşen ozmotik stres toleransı büyük öneme sahiptir. Uyumlu ozmolit seviyeleri sitoplazmada artış göstererek su kaybının azalmasına, turgor basıncının ve hücre genişlemesinin artmasına katkıda bulunur. Bitkiler ozmotik ayarlamayı iki ana yol vasıtasıyla yani, organik ozmolitlerin *de novo* sentezi ve artan inorganik iyon alımını gerçekleştirmektedirler (Zhao vd. 2020).

Bitkiler yüksek tuzluluk koşulları karşısında hücre içi ozmotik potansiyel seviyeyi korumak için prolin, hidroksiprolin, glisin betain, poliaminler, şekerler ve (LEA) geç embriyogenez protein ailesi de dahil olmak üzere uyumlu ozmolitler biriktirir. Ozmotik uyumda baskın rolü bulunduğu bilinen prolin, tuzluluk altında çalışabilen bir metabolittir. Prolin, glutamik asidin azaltılması yoluyla P5C sentaz (P5CS) ve P5C redüktaz (P5CR) adlı iki ardışık enzimin biyosenteziyle sağlanmaktadır. P5CS, prolin biyosentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir ve esas aktivitesi transkripsiyonel seviyede kontrol edilir. Hem P5CS hem de P5CR genleri yüksek tuzluluk karşısında yukarı regüle edilir ve bu sayede prolin birikimi ve tuz stresi toleransı sağlanmış olur. Glisin betain (GB), tuz stresi karşısında artış gösteren ve dehidratasyon koşulları karşısında da ozmotik potansiyelin ayarını düzenlemekle ilişkili bir diğer ana metabolittir. Glisin betainin enzimleri korumak, zarları stabil hale getirmek ve çevresel stres koşulları karşısında meydana gelebilecek oksidatif stresi azaltmak temel fonksiyonları arasındadır. İndirgenmeyen bir

glikoz disakkarit olan trehaloz şeker, bitkiyi abiyotik stres zararına karşı korumakla görevlidir. Glikoz, fruktoz ve fruktanlar gibi diğer şekerler de kuraklık ve tuz stresi altında ozmotik uyumda rol oynar. Poliaminler ise putresin, spermidin ve spermin içeren organik aminlerdir. Poliaminlerin dışarıdan enjeksiyonu tuzluluğa ve diğer abiyotik streslere toleransı arttırabilir (Zhao vd. 2020).

1.3.3.2 Tuz stresi yanıtlarında rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROT) ve detoksifikasyon

Reaktif oksijen türleri (ROT), yüksek tuzluluk, kuraklık ve ısı stresi gibi çok çeşitli abiyotik stresler tarafından indüklenen ayrıca çok yönlü sinyaller olarak işlev görmektedir. Bitkilerde başlıca reaktif oksijen türleri (ROT); hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikalini ($OH^{\cdot}$) içermektedir. ROT'un esas üretim noktaları apoplast, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlardır. Apoplastta ROT üretimi, *AtRbohD* ve *AtRbohF* genleri, apoplastik diamin oksidaz, peroksidaz ve poliamin oksidazlar vasıtasıyla gerçekleşir (Miller vd. 2010). *AtRbohD* ve *AtRbohF* genleri tuz stresi karşısında yukarı regülasyon ifade olunurken Ma ve ark. (2012) göre de bu genlerin eş zamanlı mutasyonları tuz stresine karşı aşırı hassasiyeti bulunmaktadır (Ma vd. 2012). ROT'un düşük konsantrasyonlarda birçok biyolojik sürece katkısı vardır. ROT, bitki büyümesi ve gelişmesi, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere yanıttan sorumludur. Aksi halde yani yüksek tuzlu koşullar altında aşırı ROT birikimi, bitkiler üzerinde zararlı etkilere sahiptir. ROT'un zararlı etkileri devam ettiği takdirde, hücresel zarlarda lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, proteinlerin denatürasyonu, karbonhidrat oksidasyonu, pigment parçalanması ve enzimatik aktivitelerde aksaklık gibi birçok önemli hücresel yapıya zarar verme olasılığı yüksektir (Zhao vd. 2020). Bu sebepten ötürü, bitki hücrelerinde ROT konsantrasyonunun aktiviteleri düzenli bir şekilde kontrolü sağlanmalıdır.

Tuz stresi, ROT stresini azaltmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanları indükler. Bitkilerde, yüksek tuzluluk stresine bağlı ROT birikiminin neden olduğu oksidatif stresin hafifletilmesi için ROT antioksidanlarından yararlanılır. ROT

antioksidanları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), guaiacolperoksidaz (GPX), guaiacol peroksidaz (GPOX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), glutatyon peroksidaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST)'dir. Reaktif oksijen türleri arasında ROT'un oluşturduğu hasara karşı ilk savunma hattını çizen ve en etkili antioksidan süperoksit dismutaz (SOD)'dir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise; askorbik asit (ASH), alkaloidler, karotenoidler, flavonoidler, glutatyon (GSH), fenolik bileşikler ve tokoferol'dür. Sonuç olarak ROT'un zararlı etkileri ya bir enzimin aşırı ifadesiyle ya da antioksidanların birikimiyle bitkinin tuz toleransı sağlanabilir (Yang ve Guo 2018).

1.4 Kuraklık Stresi

“Kuraklık”, genel anlamda atmosferik veya hava olaylarının tanımı için kullanılır ve genellikle yağmur suyu seviyelerinin azaldığı döneme karşılık kullanılan bir terimdir (Bray 2001). Kuraklık, bitkiler için özellikle yarı kurak ve kurak alanlar başta olmak üzere dünyanın pek çok yerinde sorun teşkil eden en yıkıcı çevresel stres faktörlerinden biridir (Madhava vd. 2006). Bitki büyümesi ve gelişmesini olumsuz yönde etkiler. Kuraklık bir bölgeden diğerine değişiklik gösterebilir (Rana vd. 2013). Kuraklık stresi, topraktaki bitkiler için mevcut su miktarının azalışa geçip buna bağlı olarak toprak neminin de azalışta olduğu bir dönemdir (Dai 2012). Bir başka ifadeyle yaprak yüzeylerindeki terleme hızı, köklerden alınan su miktarından daha yüksek olduğunda meydana gelir (Salehi-Lisar vd. 2012).

1.4.1 Kuraklık stresinin zararları

Kuraklık, bitkilere ciddi hasarı bulunduğu bilinmekle birlikte, büyüme ve gelişimlerine zarar veren bir çevresel stres faktörüdür (Rahdari ve Hoseini 2012). Ayrıca ileride gelecek olan mahsullerin kalitesini, verimin niceliğini etkileyebilir (Jaleel vd. 2009). Kuraklık bitkilerin fizyolojik ve morfolojik fonksiyonlarını da değiştirir (Hirt ve Shinozaki 2004, Madhava vd. 2006). Yaprakların boyutunda azalış, stoma sayısında azalış, hücre duvarı

kalınlaşması, yaprak yüzeyinde kütinleşme, büyük damar sayısında artış ve tahıllarda tüp yapraklarının oluşumu kuraklığa maruz kalan bitkilerde meydana gelen birtakım değişikliklerdir (Salehi-Lisar ve Bakhshayeshan-Agdam 2016). Kuraklık stresinin oluşturduğu bir diğer önemli etki fotosentezin azalması ve/veya engellenmesidir (Bray 2001, Bhargava ve Sawant 2013). Bu etki nedeniyle bitkinin yaprak genişleme oranında azalma ve düşük yaprak yüzeyi, artan yaprak sıcaklığı, fotosentetik mekanizmanın bozulması ve erken yaprak yaşlanması gibi birçok hasar bırakır. Fotosentetik elektron taşıma bileşenlerinin birikmesi nedeniyle reaktif oksijen türlerinde (ROT) ve bilhassa hidrojen peroksit üretiminde artışı sağladığı için oksidatif hasar oluşabilir (Salehi-Lisar ve Bakhshayeshan-Agdam 2016).

1.5 Transkripsiyon Faktörlerinin Genel Yapısı ve Fonksiyonları

Transkripsiyon faktörleri, genlerin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan temel bileşenlerden biridir (He vd. 2016, Liu vd. 2018). Transkripsiyon faktörleri, genlerin aktivasyonunu transkripsiyonal seviyede etkileyen genomun belirlenen bölgelerine bağlanan proteinlerdir (Latchman 1997). Ökaryotik genomlardaki tüm genlerin %3-10'luk kısmını transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler oluşturmaktadır (Levine ve Tijan 2003, Harbison vd. 2004, Reece-Hoyes vd. 2005). Transkripsiyon faktörlerinin en temel özelliklerinden biri belirlenen genlerin promotor bölgeleri içindeki spesifik dizileri tanıyan DNA bağlanma alanları içermeleridir (Kummerfeld ve Teichmann 2006). Bu spesifik dizilere bağlanarak, hedeflenen genlerin transkripsiyonunu arttırmayı veya azaltmayı sağlarlar. Böylelikle hedeflenen genlerin aktifleşmesi durumunda aktivatör olarak, baskılanması durumunda da represör olarak ifade verirler. Transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyon sürecinde rol olan diğer bileşenlerle gerçekleştirdiği protein-protein etkileşimleri bir diğer önemli işlevlerindendir (Takagi ve Kornberg 2006, Walhout 2006). Stres toleransının düzenlenmesi yanında birçok biyolojik süreçte rol oynarlar (Shao vd. 2015).

1.5.1 Transkripsiyon faktörlerinin sınıflandırılması

Tüm transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanma bölgelerine göre 50-60 aileye ayrılmıştır. TF'lerin sınıflandırması tamamlanmamakla birlikte şu ana kadar tespit edilen bütün TF'ler belirli kategorilere göre sınıflandırılmıştır (Jan vd. 2019).

1.5.1.1 Transkripsiyon faktörlerinin faaliyet bakımından sınıflandırılması

TF'lerin bir genomda gen ekspresyonu ve sinyal iletimi sırasında gerçekleştirdiği faaliyetlere göre iki gruba sınıflandırılmıştır (Brivanlou ve Darnell 2002). Yapısal olarak aktif TF'ler; bir hücrede her zaman mevcut olan genler ve housekeeping genlerdir. Koşullu aktif olan TF'ler; gelişim aşamaları ve stres koşulları adı altında belirli koşullarla aktif olan genlerdir (Brivanlou ve Darnell 2002). Koşullu aktif olan TF'ler ise, kendi içerisinde gelişimsel sürece ve sinyale bağlı TF'ler olarak ikiye ayrılmıştır.

1.5.1.2 Transkripsiyon faktörlerinin yapı bakımından sınıflandırılması

Ökaryotik TF'ler yapısal nitelikler bakımından Transfac® adlı bir veri tabanı tarafından, DBD (DNA Bağlanma Domain)'lerine göre kategorilere ayırmaktadır. Transfac® tüm TF'leri yapı bakımından dört sınıfa ayırmıştır. Temel alanlar; 6 sınıf ve 21 aileden oluşmaktadır. Çinko Koordinasyon DNA Bağlama Alanları; 5 sınıf ve 13 aileden oluşmaktadır. Helix Turn Helix; 6 sınıf ve 15 aileden oluşmaktadır. Beta Scaffold Faktörleri; 11 sınıf ve 19 aileden oluşmaktadır. Bu sınıfların hiçbirisine dahil olamayan transkripsiyon faktörleri de fonksiyonları tespit edilene kadar diğer transkripsiyon faktörleri olarak sınıflandırmaktadır (Jan vd. 2019).

1.5.1.3 Transkripsiyon faktörlerinin tür bakımından sınıflandırılması

Bitki TF'lerinin DNA bağlanma alanlarıyla bağlantılı çalışan, taksonomik sıralamalar ile bitki TF'lerinin listelerinin oluşturulduğu PlantTFDB veri tabanı oluşturulmuştur (Pérez-

Rodríguez vd. 2010). PlantTFDB veri tabanı aynı zamanda BLAST ve Protein Veri Bankası'ndan edindiği verilerle daha fazla bilginin ulaşmasını ve TF'lerin daha iyi anlaşılmasına aracılık etmektedir. TF'lerin türlere göre açılmış çeşitli veri tabanları bulunmaktadır. Bitkilerde olduğu gibi hayvanlara, insanlara, patojenlere vb. türlere özgü veri tabanları mevcuttur (Jan vd. 2019).

1.5.1.4 Transkripsiyon faktörlerinin özel amaçlar bakımından sınıflandırılması

Bazı veri tabanları TF'leri belirli amaçlar açısından sınıflandırma gereği duymuştur. Örneğin, wDBTF veri tabanı buğday için açılmış TF'leri sınıflandırmaktadır. Benzer şekilde stresle indüklenen sinyallere tepki veren TF'leri kapsayan STIFDB2 adında bir veri tabanı oluşturmuşken, ağaçlara özgü TreeTFDB ve soya fasulyesi TF'lerine özgü de SoyDB veri tabanı kurulmuştur (Jan vd. 2019).

1.5.2 Transkripsiyon faktörlerinin abiyotik stresle ilişkisi

Bitkiler, çeşitli abiyotik stres koşullarına maruz kaldığında bu duruma yanıt olarak reaksiyon gösterirler. Bitkilerin karşılaştığı streslere verdiği cevaplar moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerle tespit edilmiştir. Transkripsiyon faktörleri, bitkilerin moleküler seviyede çeşitli çevresel streslere gösterdiği tolerans noktasında literatüre kazandırdığı bilgiler açısından büyük öneme sahiptir (Jan vd. 2019).

Bitkiler sesil doğaları gereği çeşitli çevresel streslere maruz kaldığı sürece ilgili strese yanıt vermektedir. Bitkilerin savunma mekanizmalarının keşfedilmesi, strese dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesi ve genetik mühendisliği alanına katkıda bulunulması açısından büyük öneme sahiptir. Geliştirilen genomik, transkriptomik, proteomik vb. omik teknolojileri sayesinde bitkilerin stres sinyal yollarının ve abiyotik stres cevabında yer alan ilgili moleküllerin aydınlatılması konusunda kıymetli bilgiler edinildi. Ancak bu yolda hala gizliliğini koruyan meseleler bulunmaktadır. Abiyotik stresin takip ettiği 3 aşamalı sinyal yolağı vardır; sinyali algılama, sinyali iletme ve strese duyarlı genlerin

ifadesi. Öncelikle stres uyararı bitki hücrelerinin hücre zarında veya duvarında bulunan sensörler veya reseptörler aracılığıyla algılanır. Daha sonra yakalanan hücre dışı sinyaller birtakım ikincil haberciler vasıtasıyla hücre içi sinyallere dönüştürülmek üzere sinyal yollarını uyarır. Sinyal iletim yollarında protein kinaz ve fosfataz enzimlerinin vasıta olduğu proteinlerin fosforilasyon ve defosforilasyon olayları sinyal değişimi için çok önemli birer mekanizmadır. Transkripsiyon faktörleri, fosforilasyonun sonunda protein kinazlar veya fosfatazlar aracılığıyla aktif hale geçer veya baskılanır. Strese duyarlı genlerin promotor bölgelerindeki cis elementlerine bağlanır ve transkripsiyonu düzenler. Ayrıca TF'lerin kendileri de transkripsiyon düzeyinde düzenlenir (Wang vd. 2016).

Son on yılda bitki stres toleransını aydınlatmak için ABA bağımlı veya ABA bağımsız yolda bitki abiyotik stres yanıtlarında rol oynayan birtakım TF'leri tanımlamak ve karakterize etmek çok önemli hale gelmiştir (Wang vd. 2016). Sadece bitkilere özgü olmayan MYB, MADS box, basic helix-loop-helix (bHLH), bZIP ve HB gibi aileler kapsamlı gen aileleridir. Bu ailelerin en önemli işlevlerinden biri değişen ortamlara karşı bitki büyümesi ve gelişiminin kontrolünü sağlamalarıdır (Hong 2016). Bitkilerde bulunan geniş protein ailelerinden biri olan Homeobox (HB) protein ailesi ve bu ailenin içinde yer alan WOX transkripsiyon faktörleri ile ilgili edinilen son bilgiler şöyledir.

1.5.3 Homeobox proteinleri

Homeobox proteinleri, 60 amino asitlik homeodomain olarak bilinen korunmuş bir DNA bağlama alanını içeren geniş kapsamlı transkripsiyon faktörleri ailesidir. İlk *homeobox* genleri meyve sineğinden (*Drosophila melanogaster*) elde edilmiştir. Bu genlerin kapsamlı araştırılması sonucu homeodomaini şifreleyen 180 bp'lik korunmuş bir DNA sekansı keşfedilmiştir (McGinnis vd. 1984a; McGinnis vd. 1984b). Daha sonra yapılan çalışmalarla nematodlar, mantarlar, bitkiler, insanlar gibi çeşitli organizmalarda da *homeobox* genleri tanımlanmıştır (Nam ve Nei 2005). Homeodomainin spesifik DNA dizilerinin tanınmasında rol oynadığı ve bu proteinlerin transkripsiyon faktörleri olarak hareket ettiği düşünülmüştür (Viola ve Gonzalez 2016). HB transkripsiyon faktörleri, bitki büyümesi ve gelişimi, hücre kaderinin belirlenmesi, hücre farklılaşması,

morfogenez, strese yanıt gibi çeşitli işlemlerde rol oynadığı tespit edilmiştir (Alvarez vd. 2018).

1.5.3.1 Homeodomainin yapısı

Homeodomain, üç α -sarmal yapısından meydana gelmektedir (Otting vd. 1990). Sarmal I ve II antiparalel iken III. sarmal diğer ikisine dik duran pozisyonundadır. II ve III. sarmalın sağlam bir dönüş gerçekleştirmesi ile helix-turn-helix (HTH) motifi oluşmaktadır. Sarmal III, tanıma sarmalı olarak adlandırılmasının yanında DNA'nın ana oluğuna girerek N-terminal kolu, küçük olukta spesifik etkileşimler kurar. Sarmal III ve N-terminal kolunun bu şekilde spesifik etkileşimler kurmasını sağlayan hidrofobik, kompakt, küresel yapı homeodomain olarak adlandırılmıştır. Bu üç sarmalın genel durumlarının DNA bağlanma alanları için önemi büyüktür (Viola ve Gonzalez 2016).

1.5.3.2 Bitki Homeodomain aileleri

Bitkilerde izole edilen ilk *homeobox* geni, mutant mısırların yapraklarındaki düğüm benzeri yapılardan elde edilmiştir (Vollbrecht vd. 1991). Kısa bir süre sonra farklı bitki türlerindeki homeodomaini kodlayan pek çok gen izole edilmiştir. Çoğunun işlevi gelişimsel süreçleri kontrol etmektir. Farklı bitki türlerinin homeodomain proteinleri yıllar içerisinde yürütülen çalışmalar sayesinde farklı ailelere sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma belli ölçütler altında karakterize edilen 14 homeodomain gen sınıfı oluşturmuştur. HD-ZIP süper sınıfı 4, TALE süper sınıfı ise 3 ayrı sınıftan oluşmaktadır. Bunların yanında PINTOX, WOX, DDT, PLINC, PHD, NDX, SAWADEE ve LD sınıfları bulunmaktadır (Mukherjee vd. 2009).

1.5.3.3 WUSCHEL- Related Homeobox (WOX) gen ailesi

WUSCHEL-Related Homeobox (WOX) transkripsiyon faktörü , bitki HB transkripsiyon faktörü ailesinin bitkiye özgü diğer bir sınıfıdır. WOX gen ailesi üyeleri, embriyonik

modelleme ve gelişim, kök hücre onarımı, organ ve tohum oluşumu ve izole edilen doku-organların yenilenmesi gibi önemli gelişim süreçlerinde rol oynar (van der Graaff vd. 2009, Hao vd. 2019). Bitkideki WOX gen ailesinin evrimsel ilişkiler bakımından WUS, orta ve eski olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Eski sınıf daha önce gelişmiş olup alglerden kapalı tohumlulara kadar olan kısmı kapsamaktadır. Orta sınıf pteridofitlerin kökeninden sonra ortaya çıkmıştır. WUS sınıfı ise yalnızca angiospermelerde bulunmakla birlikte sınıflar arasında en gelişmiş olanıdır (van der Graaff vd. 2009). Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre; WOX ailesi üyesi WUS'un transkripsiyon faktörü olarak hareket edip, sürgün apikal meristemindeki kök hücre nişinin korunması, lateral primordianın farklılaşması, bitki hücre totipotensi ve diğer hücresel süreçlerde görev aldığı tespit edilmiştir (Jha vd. 2020).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Haecker ve arkadaşları (2004) erken embriyo modellemesinde bir rolü olduğuna inandıkları *A. thaliana* WOX genlerini çalışmışlar ve in situ hibridizasyon yoluyla 12 adet gen tespit etmişlerdir. Daha sonra yapılan ayrıntılı analizler sonucu embriyoda spesifik ekspresyon modellerine sahip 6 üye belirlemişlerdir. Sonuç olarak, Haecker ve arkadaşlarının söz konusu çalışmasında bitkiye özgü *WUS-Related Homeobox* (WOX) genlerinden oluşan yeni bir gen ailesi tanımlanmıştır (Haecker vd. 2004).

Palovaara ve arkadaşları (2010) *Picea abies*'in gelişen tohumları ve somatik embriyolarında WOX2 ve WOX8/9'un genlerinin karşılaştırılmalı ifade analizini gerçekleştirmişler ve WOX genlerinin hem kotiledon hem de iğne oluşumunda rol oynadığı kanısına varmışlardır (Palovaara vd. 2010).

A. thaliana (Zuo vd. 2002), *C. canephora* (Arroyo-Herrera vd. 2008), *G. hirsutum* (Bouchabké-Coussa vd. 2013; Zheng vd. 2014) ve *M. truncatula* (Chen vd. 2009, Orłowska ve Kepczynska 2018, Tvorogova vd. 2015, 2019) gibi farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda WUS genlerinin bitkilerde vejetatiften embriyojenik faza geçiş olan somatik embriyogenezde önemli roller üstlendiği tespit edilmiştir.

WUS'un yüksek ifadesinin anormal embriyo benzeri yapıların oluşumuna ve embriyolarda yaprak benzeri yapıların oluşumuna yol açtığı saptanmıştır (Bouchabké-Coussa vd. 2013).

Lin ve arkadaşları (2013) *M. truncatula* 'da STF, *N. Sylvestris*'te ortolog LAM1, *Petunia*'da MAW ve *Arabidopsis*'te WOX1 ile WOX proteinleri üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Sonuç olarak, Lin ve arkadaşları söz konusu çalışmasında evrimsel olarak korunmuş WOX proteinlerinin bitkilerde yaprak kanatlarının büyümesine ve çiçek organı gelişimine aracılık ettiği kanısına varmışlardır (Lin vd. 2013).

Hedman ve arkadaşları (2013) kozalaklı *Picea abies*'de *WOX* gen ailesinin kapsamlı analizini yapmışlardır. Sonuçta, *WOX* gen ailesinde tespit edilen yüksek çeşitliliğin yaklaşık 300 milyon yıl önce gerçekleştiğini ve *Pinaceae* ailesinde ara kuşakta yakın zamanda bir genişleme olduğu bulunmuştur (Hedman vd. 2013).

Cheng ve arkadaşları (2014) *Oryza sativa*'da *WOX* genlerinin üreme organ gelişimi, hormon sinyalleme ve abiyotik strese yanıtı üzerinde çalışmışlardır. *WOX* genlerinin promotor bölgelerinde sitokinin tepki elemanları ve oksin tepki elemanı içerdiği bulunmuştur. Çeşitli abiyotik streslere maruz bırakılan pirinç fidelerinin *WOX* genlerinde ekspresyon seviyelerinin belirgin düzeyde değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı genlerin embriyogenez sırasında önemli rollerinin olabileceği belirlenmiştir (Cheng vd. 2014).

Zhu ve arkadaşları (2014) *Norway spruce*'da uygun embriyo modellemesi için *WOX8/9* geni üzerinde çalışmışlardır. *PaWOX8/9* geninin apikal-bazal embriyo modelini oluşturmak için önemli bir düzenleyici olarak görev yaptığını ve bu işlevin gymnosperm ve angiosperm arasında evrimsel olarak korunduğu sonucuna varmışlardır (Zhu vd. 2014).

Kong ve arkadaşları (2016) *Arabidopsis*'de, *WOX7* genini ele almışlardır. *WOX7* geninin şeker sinyali ile birleşiminde yan kök gelişimini düzenlediği ve bunun yanında transkripsiyonel baskılayıcı olarak işlev gördüğü sonucuna ulaşmışlardır (Kong vd. 2016).

Rupps ve arkadaşları (2016) somatik embriyogenez sırasında görev yapan *BBM*, *LEC1*, *WOX2* ve *SERK* genleri ile varsayılan homologlarının belirlenmesi için çalışmışlardır. Sonuçta, *L. decidua*'da embriyogenezin erken (*LdLEC1* ve *LdWOX2*) ve geç (*LdBBM* ve *LdSERK*) dönem varsayılan düzenleyicilerini tespit etmişlerdir. Tanımlanan genlerin homolojisi, ifade analizleri ile doğrulanmıştır (Rupps vd. 2016).

Rahman ve arkadaşları (2017) *Ananas comosus* L. bitkisinde WOX gen ailesi üyelerinin tanımlanmasını, kuraklık, ısı, tuz gibi abiyotik strese duyarlı genlerin ifade seviyelerini çalışmışlardır. Sonuçta, Rahman ve arkadaşları söz konusu çalışmasında kuraklık, ısı ve tuz stresine duyarlı AcoWOX genlerinin ifade seviyelerinde belirgin düzeyde değişim gözlenmiştir (Rahman vd. 2017).

Minh-Thu ve arkadaşları (2018) *Oryza sativa* 'da OsWOX13 geninin kuraklık toleransını artırıp erken çiçeklenmeyi tetiklemesi üzerine çalışmışlardır. Sonuç olarak, WUS geninin kuraklık stresine aracılık edip erken çiçeklenmeyi düzenlemede rol aldığı kanısına varmışlardır. Pirinç bitkisinde kuraklık stresi altında yaprak ve kökte OsWOX13 geninin ifade düzeyinde strese bağlı artış görülmüştür. Ayrıca OsWOX13 geninin aşırı ifadesi çiçek gelişimini etkilediği ve böylece pirinçte 7-10 gün daha erken çiçeklenme sağlandığı tespit edilmiştir (Minh-Thu vd. 2018).

Hao ve arkadaşları (2019) *Glycine max* bitkisinde WOX gen ailesinin genom çaplı analizini gerçekleştirmişler ve WOX genlerini kuraklık, ısı, soğuk ve tuz stresine maruz bırakmışlardır. Sonuçta, kuraklık, ısı, soğuk ve tuz stresine maruz bırakılan 33 GmWOX geninin ifade seviyelerinde belirgin düzeyde değişimler saptanmıştır (Hao vd. 2019).

Wang ve arkadaşları (2019a) *Camellia sinensis* bitkisindeki WOX genlerini geniş kapsamlı tanımlamış, kuraklık stresine ve dört farklı fitohormon stresine maruz bırakmışlardır. Sonuçta, kuraklık stresine duyarlı CsWOX genlerinin ifade seviyelerinde belirgin düzeyde değişim gözlenmiştir (Wang vd. 2019a).

Li ve arkadaşları (2019) allotetraploid *Brassica napus* 'da WOX gen ailesinin genom çapında tanımlanması ve analizi, poliploidizasyon sırasında WOX genlerindeki değişiklikleri çalışmışlardır. Sonuçta, *B. napus* 'da 52, *B. rapa* 'da 25, ve *B. oleracea* 'da 29 WOX geni tanımlanmıştır. Poliploidizasyon işlemi sırasında transpoze edilebilir öğelerin bol olduğu belirlenmiş olup, *B. napus* WOX gen ailesi üyelerinde gen kaybı olayları meydana geldiği tespit edilmiştir (Li vd. 2019).

Wang ve arkadaşları (2020a) *PagWOX11 / 12a* WOX geni üzerinde çalışmışlardır. Sonuç olarak, Wang ve arkadaşları söz konusu çalışmasında *PagWOX11 / 12a* WOX geninin kavakta kök uzamasını ve biyokütle büyümesini artırdığı, kuraklık stresine yanıt verdiği kanısına varmışlardır (Wang vd. 2020a).

Tang ve arkadaşları (2020) Physic nut bitkisi için WOX gen ailesinin genom çapında tanımlanması ve abiyotik strese duyarlı *JcWOX5* geninin fonksiyonel analizini çalışmışlardır. Sonuçta, Physic nut genomunda 12 adet WOX geni belirlemiş, bu genlerin filogenetik analizini, gen yapılarını ve korunmuş motiflerini belirlemişlerdir. WUS, orta ve eski sınıf olarak 3 grup tanımlamışlardır (Tang vd. 2020).

Li ve arkadaşları (2020a) *Bambusoideae*'de bulunan bazı türlerin WOX üyelerinin tanımlanması için çalışmışlardır. 12 *OlaWOX*, 9 *RguWOX*, 18 *GanWOX*, 27 *PheWOX*, ve 26 *BamWOX*'lar tespit edilmiş olup, antik, orta ve WUS sınıfları olarak kategorilere ayırmışlardır. Bambu WOX5'in promotorlarında MYB protein bağlama bölgeleri ve Dof protein bağlama bölgeleri bulunmuştur. Bambu WOX3, WUS ve WOX9'un destekleyicilerinde, bambu çiçek oluşumunu düzenlemede rolü bulunan MADS bağlama bölgeleri bulunmuştur (Li vd. 2020a).

Gu ve arkadaşları (2020) *Cucumis sativus*'da *CsWOX*'un genom çapında analizini yapmışlardır. Sonuçta, salatalıkta 11 *CsWOX* üyesi belirlemiş ve karakterize etmişlerdir. *CsWOX* genlerinin dokuya özgü ifadesini, farklı gelişim süreçlerinde yer alabileceklerini göstermişlerdir (Gu vd. 2020).

Ramkumar ve arkadaşları (2020) ilkel bir orkide olan *Apostasia shenzhenica*'da WOX gen ailesinin geniş çaplı karakterizasyonunu çalışmışlardır. Sonuç olarak, 10 adet *AsWOX* üyesi belirlemişlerdir. Bitkilerle homoloji modellemesine dayalı olarak eski, orta ve WUS olmak üzere üç gruba kategorize etmişler ve bu genler arasında filogenetik ilişki kurmuşlardır (Ramkumar vd. 2020).

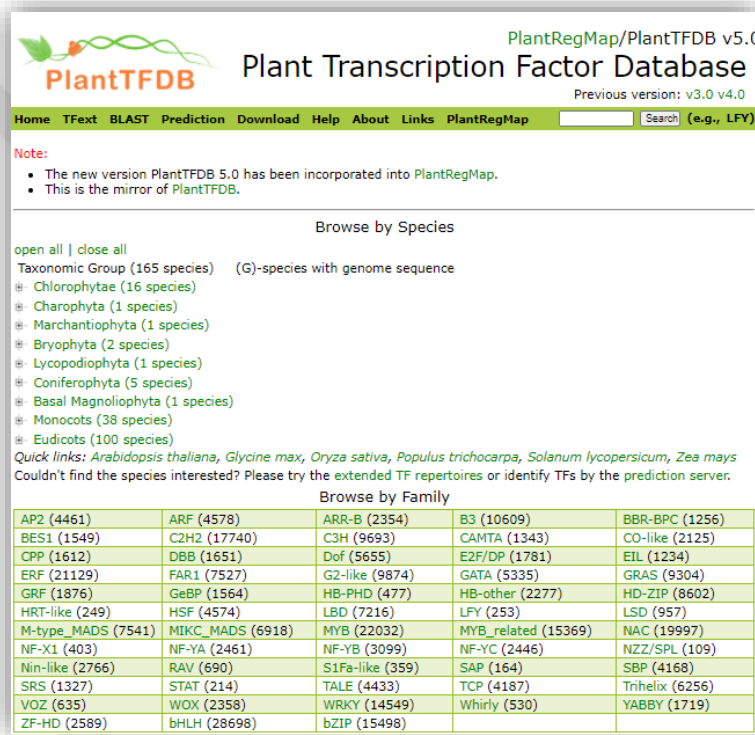
Chen ve arkadaşları (2020) WOX transkripsiyon faktörü *OsWOX4*'ün pirinçte *OsAUX1*'i etkinleştirerek birincil kök uzamasını kontrol etmesi üzerine çalışmışlardır. Sonuçlar, *OsWOX4*'ün kök meristem boyutunu ve kök olgun bölgedeki hücre uzunluğunu azaltarak birincil kök uzamasını negatif olarak düzenlediğini göstermiştir. *OsWOX4*'ün, hedef gen *OsAUX1*'i doğrudan aktive ederek oksin birikimini etkileyebileceğini doğrulamıştır (Chen vd. 2020).

Li ve arkadaşları (2020b) WOX gen ailesinin tanımlanması, buğdayda *TaWOX9* ve *TaWUS*'un etkileşimi ve fonksiyonel analizi üzerinde çalışmışlardır. Buğday genomundan 14 farklı *TaWOX* geni belirlemişlerdir. *TaWOX* proteinlerini WUS, ara ve eski olarak sınıflandırmışlardır. *TaWUS* ve *TaWOX9*'un WUS kutusu ve EAT benzeri motif içerdiğinden, *AtWUS*'a benzer şekilde ikili aktivasyon ve inhibisyon rolleri oynayabileceği kanısına varmışlardır (Li vd. 2020b).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genomunda WOX Proteinlerinin Tanımlanması

Bu çalışmada ökaryotik canlılardan olan fasulye bitkisinin biyoinformatik analizleri gerçekleştirildi. Fasulyeye ait WOX proteinlerinin belirlenmesi için bitki transkripsiyon faktörleri veri tabanı kullanıldı (Jin vd. 2016, Şekil 3.1).



PlantRegMap/PlantTFDB v5.0
Plant Transcription Factor Database
Previous version: v3.0 v4.0

Home TText BLAST Prediction Download Help About Links PlantRegMap Search (e.g., LFY)

Note:

- The new version PlantTFDB 5.0 has been incorporated into PlantRegMap.
- This is the mirror of PlantTFDB.

Browse by Species

open all | close all

Taxonomic Group (165 species) (G)-species with genome sequence

- Chlorophytae (16 species)
- Charophyta (1 species)
- Marchantiophyta (1 species)
- Bryophyta (2 species)
- Lycopodiophyta (1 species)
- Coniferophyta (5 species)
- Basal Magnoliophyta (1 species)
- Monocots (38 species)
- Eudicots (100 species)

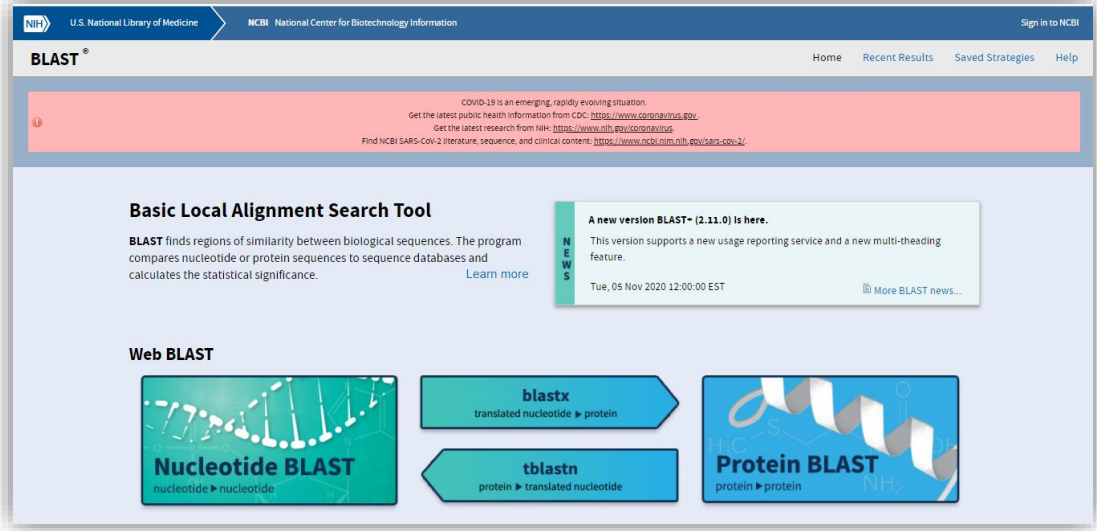
Quick links: *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Solanum lycopersicum*, *Zea mays*
Couldn't find the species interested? Please try the extended TF repertoires or identify TFs by the prediction server.

Browse by Family

AP2 (4461)	ARF (4578)	ARR-B (2354)	B3 (10609)	BBR-BPC (1256)
BES1 (1549)	C2H2 (17740)	C3H (9693)	CAMTA (1343)	CO-like (2125)
CPP (1612)	DBB (1651)	Dof (5655)	E2F/DP (1781)	EIL (1234)
ERF (21129)	FAR1 (7527)	G2-like (9874)	GATA (5335)	GRAS (9304)
GRF (1876)	GeBP (1564)	HB-PHD (477)	HB-other (2277)	HD-ZIP (8602)
HRT-like (249)	HSF (4574)	LBD (7216)	LFY (253)	LSD (957)
M-type_MADS (7541)	MIKC_MADS (6918)	MYB (22032)	MYB_related (15369)	NAC (19997)
NF-X1 (403)	NF-YA (2461)	NF-YB (3099)	NF-YC (2446)	NZZ/SPL (109)
Nin-like (2766)	RAV (690)	S1Fa-like (359)	SAP (164)	SBP (4168)
SRS (1327)	STAT (214)	TALE (4433)	TCP (4187)	Trihelix (6256)
VOZ (635)	WOX (2358)	WRKY (14549)	Whirly (530)	YABBY (1719)
ZF-HD (2589)	bHLH (28698)	bZIP (15498)		

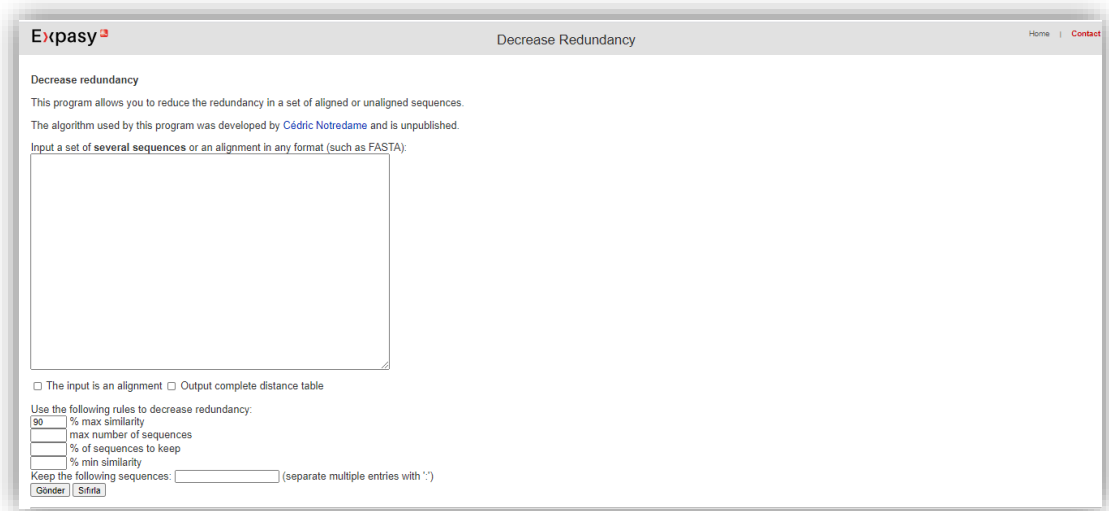
Şekil 3.1 Bitki Transkripsiyon Faktörleri Veri Tabanı

Bitki transkripsiyon faktörleri veri tabanından WOX transkripsiyon faktörlerine ait olduğu düşünülen ulaşılan tüm erişim numaraları sayesinde protein, genom ve CDS dizileri Phytozome veri tabanından FASTA formatı şeklinde kaydedilmiştir. Fasulye genomu için olası elde edilen tüm WOX dizileri NCBI (National Center For Biotechnology Information) ve Phytozome veri tabanları karşılaştırılarak blastlama (blastp) işlemi yapılmıştır (Şekil 3.2). Pfam Hidden Markov Model (HMM) kullanılarak bu protein dizileri üzerinde tarama yapılmıştır.

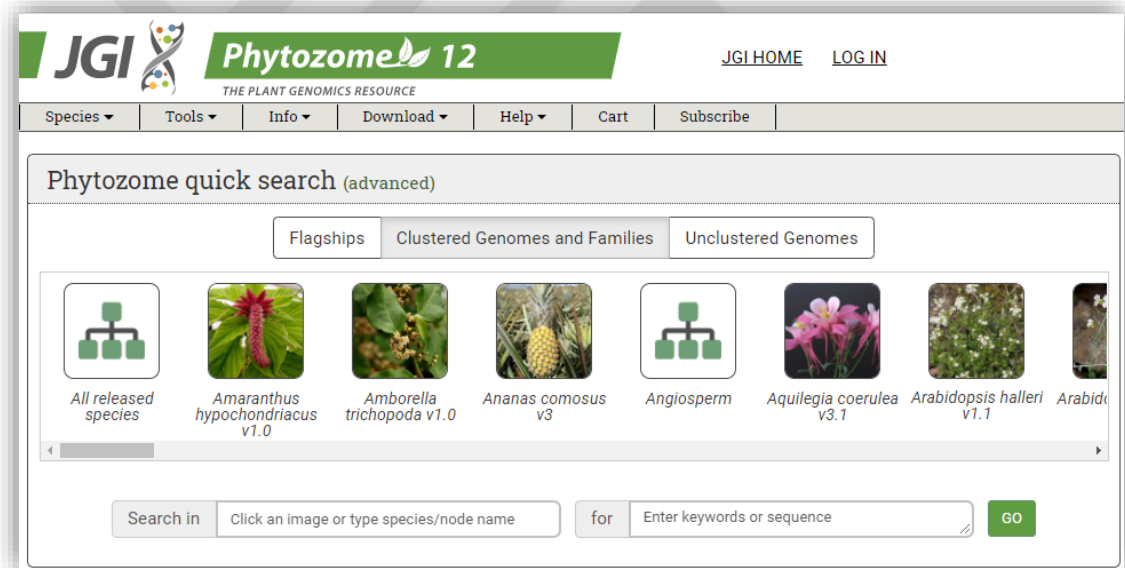


Şekil 3.2 NCBI Veri Tabanı

Pfam veri tabanı her biri çoklu dizi hizalamaları gizli Markov modelleri (HMM) temsil eden geniş bir protein ailesi topluluğudur. Klan olarak bilinen ilgili girdilerin üst düzey gruplarını kapsar (Goodstein vd. 2012). Bunlara ek olarak, tanımlanan WOX üyelerinin arasında benzerlik bulunup bulunmadığını kontrol etmek için ‘decrease redundancy’ veri tabanı kullanılmıştır (Artimo vd. 2012, Şekil 3.3). WOX dizilerinin hangi kromozom üzerinde bulundukları, dizilerin başlangıç ve bitiş noktaları kayıt altına alınmıştır (Goodstein vd. 2012, Şekil 3.4).



Şekil 3.3 Decrease Redundancy Veri Tabanı



Şekil 3.4 Phytozome Veri Tabanı

Tanımlanan protein dizilerinin EXPASY ProtparamTool veri tabanı aracılığıyla çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelerine ulaşılmıştır (Artimo vd. 2012, Şekil 3.5). Bu özellikler pH aralığı, moleküler ağırlık, değişkenlik durumu ve izoelektrik (pI) etki değerlerini oluşturmaktadır.

ProtParam tool

ProtParam (References / Documentation) is a tool which allows the computation of various physical and chemical parameters for a given protein stored in [Swiss-Prot](#) or [TrEMBL](#) or for a user entered protein sequence. The computed parameters include the molecular weight, theoretical pI, amino acid composition, atomic composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability index, aliphatic index and grand average of hydropathicity (GRAVY) ([Disclaimer](#)).

Please note that you may only fill out **one** of the following fields at a time.

Enter a Swiss-Prot/TrEMBL accession number (AC) (for example **P05130**) or a sequence identifier (ID) (for example **KPC1_DROME**):

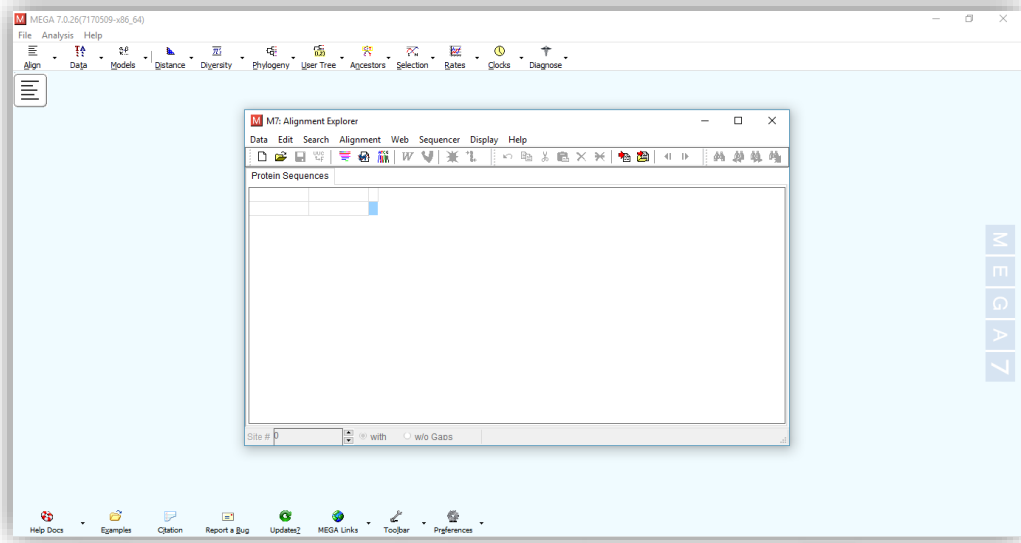
Or you can paste your own amino acid sequence (in one-letter code) in the box below:

Şekil 3.5 EXPASY Protparam Veri Tabanı

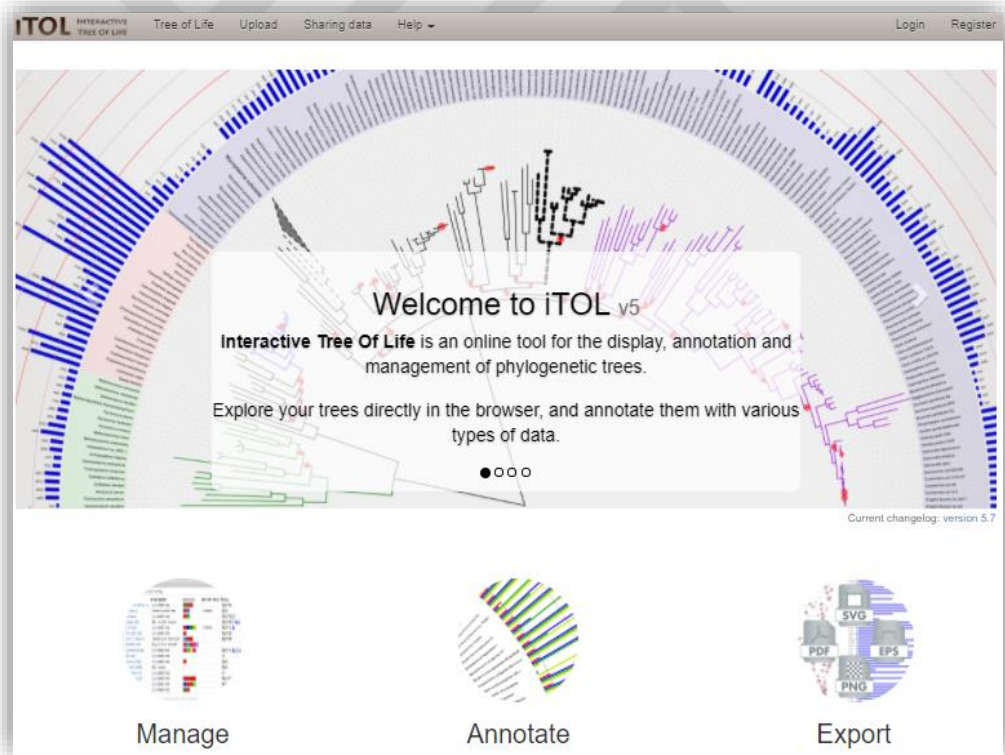
3.2 Dizilerin Hizalanması, Filogenetik Analizler ve Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi

Fasulye genomuna ait *WOX* gen ailesi dizilerinin hizalanması MEGA programı aracılığı ile ClustalW kullanılarak yapıldı. Yapılan dizi hizalama, filogenetik ağaç çizimi için kullanıldı. Filogenetik ağaç, MEGA v7 programında 1000 tekrarlı bootstrap değeri ile Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılarak elde edildi (Tamura vd. 2011, Şekil 3.6). Oluşturulan ağaç, Interactive Tree of Life (iTOL) ara yüzü ile görselleştirildi (Letunic ve Bork 2011, Şekil 3.7).

iTOL veri tabanı yeni bir filogenetik ağacın oluşturulmasında ve bu oluşturulan filogenetik ağacın görselleştirilerek evrimsel süreçte aralarındaki ilişkinin daha belirgin hale getirilmesine yardımcı olur. Filogenetik ağacın mümkün olduğunca doğru sonuç verebilmesi için Gene Structure Display Server V2.0 aracılığı ile ekzon-intron analizi yapılmıştır (Guo vd. 2007, Şekil 3.8). Fasulye genomuna ait *WOX* gen ve CDS dizileri kullanılarak ekzon-intron bölgelerini belirten görsellikte sonuca ulaşılmıştır.



Şekil 3.6 MEGA 7.0 Programı



Şekil 3.7 iTOL Veri Tabanı

Şekil 3.8 Gene Structure Display Server 2.0 Veri Tabanı

WOX proteinlerinin ilave korunmuş motiflerini belirlenmek için Multiple EM For Motif Elicitation Tool (MEME) veri tabanı kullanılmıştır (Bailey vd. 2006, Şekil 3.9). Analizi yaparken motif miktarının en fazla 20, motif genişliklerinin de optimum 2 ila 300 arasında olmasına özen gösterilmiştir.

Şekil 3.9 Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) Veri Tabanı

3.3 Proteinlerin Homoloji Modellemesi

Homoloji modellemesi yapmak için önceden tespit edilmiş WOX protein dizileri kullanılarak Phyre2 veri tabanından olası 3 boyutlu yapılarına ulaşılmıştır (Kelley vd. 2015, Şekil 3.10). Ulaşılan protein modellerinin güvenilirlik oranları değerlendirilmiştir.



Phyre2
Protein Homology/AnalogY Recognition Engine V 2.0

Subscribe to Phyre at Google Groups
Email:
Visit Phyre at Google Groups
Follow @Phyre2server

Position opening
If you are interested in joining the Phyre development team, please contact [Prof. Michael Sternberg](#) for further information.

Other Resources
[Missense3D](#): Analyse structural impact of missense variants
[PhyreRisk](#): A dynamic database to view human sequences and structures and map genetic variants

[Cambridge 2019 Workshop](#) | [Older Workshops](#) | [Phyre2 paper](#)

E-mail Address
Optional Job description
Amino Acid Sequence
Or try the sequence finder
Modelling Mode ☒ Normal ☐ Intensive ☐
Please tick as appropriate. ☐ NOT for Profit ☐ FOR Profit (Commercial) ☐ Other ☐

Şekil 3.10 Phyre2 Veri Tabanı

3.4 Fasulyede Gen Duplikasyonları ve Belirlenen Türler Arasında Karşılaştırmalı Fiziksel Haritanın Çıkartılması

Fasulye genomu ile *G. max* ve *A. thaliana* genomları arasındaki karşılaştırmalı fiziksel haritanın çıkartılması için Phytozome veri tabanından erişilen peptit dizilerine NCBI'dan blastlama (blastp) yapılmıştır. Hem fasulye genomunun kendi içinde yaptığı gen duplikasyonlarını hem de belirlenen türler arasında yaptığı gen duplikasyonlarının tespiti için Plant Genome Duplication Database (PGDD) veri tabanı kullanılmıştır.

PGDD						
PLANT GENOME DUPLICATION DATABASE						
While PGDD is no longer funded and therefore is not being regularly updated, we intend to keep it online for as long as resources permit and interest warrants. Periodic updates may occur but cannot be assured. Note the last update of PGDD was in 2014. PGDD is a public database to identify and catalog plant genes in terms of intragenome or cross-genome syntenic relationships. Current efforts focus on flowering plants with available whole genome sequences (preferably assembled pseudomolecules with ordered gene models).						
DATA SOURCES						
Plant genomes in this database (47 genomes)						
Species name	Common name	Version	Gene number	Access	Reference	
 <i>Actinidia chinensis</i>	Kiwifruit	May 2013	32,670	KGD	<i>Nature Communications</i>	
 <i>Amborella trichopoda</i>	Amborella	Version 1.0	26,846	AGD	<i>Science</i>	
 <i>Arabidopsis lyrata</i>	Lyrata rockcress	Version 1.0	32,670	JGI	<i>Nature Genetics</i>	
 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidopsis	TAIR10	27,416	TAIR	<i>Nature</i>	
 <i>Brachypodium distachyon</i>	Purple false brome	Version 2.1	31,694	JGI	<i>Nature</i>	
 <i>Brassica oleracea</i>	Kale	Version 2.1	59,225	BRAD	<i>Genome Biology</i>	
 <i>Brassica rapa</i>	Chinese cabbage	Version 1.3	40,492	BRAD	<i>Nature Genetics</i>	
 <i>Beta vulgaris</i>	Sugar beet	RefBeet-1.1	27,421	BVR	<i>Nature</i>	
 <i>Cajanus cajan</i>	Pigeonpea	Nov 2011	48,680	IIPG	<i>Nature Biotechnology</i>	
 <i>Capsella rubella</i>	Capsella	Version 1.0	26,521	JGI	<i>Nature Genetics</i>	
 <i>Capsicum annuum</i>	Hot pepper	Version 1.55	34,899	PepperGenomeDB	<i>Nature Genetics</i>	

Şekil 3.11 Plant Genome Duplication Veri Tabanı (PGDD)

Fasulyede tanımlanan WOX genlerinin homolog ve homolog olmayan değişim oranlarını saptamak için CLUSTAL OMEGA veri tabanı ile çoklu dizi hizalaması yapılmıştır (Sievers ve Higgins 2014, Şekil 3.12). DNA dizilerinin hizalanması yöntemine dayanan PAL2NAL veri tabanı (Suyama vd. 2006), WOX genlerinin aminoasit dizileri ve bu proteinlerin orijinal komplementerlerinin bulunması vasıtasıyla homolog oranları (Ks), homolog olmayan oranları (Ka) ve evrimsel zorlama değerlerine ulaşmamızı sağlamıştır (Yang 2007, Şekil 3.13). Duplikasyon zamanları, MYÖ (Milyon Yıl Önce) cinsinden $T = Ks / 2\lambda$ ($\lambda = 6.5E-9$) formülüyle bulunmuştur (Lynch ve Conery 2003, Yang ve Nielsen 2000).

Clustal Omega

[Input form](#)[Web services](#)[Help & Documentation](#)[Bioinformatics Tools FAQ](#)[Feedback](#)[Share](#)[Tools](#) > [Multiple Sequence Alignment](#) > Clustal Omega

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our [pairwise sequence alignment tools](#).

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

PROTEIN

sequences in any supported format:

Or, upload a file: Dosya seçilmedi

[Use a example sequence](#) | [Clear sequence](#) | [See more example inputs](#)

Şekil 3.12 Clustal Omega Veri Tabanı

PAL2NAL

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

What is PAL2NAL?

[Top](#)

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

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

What's new

[Top](#)

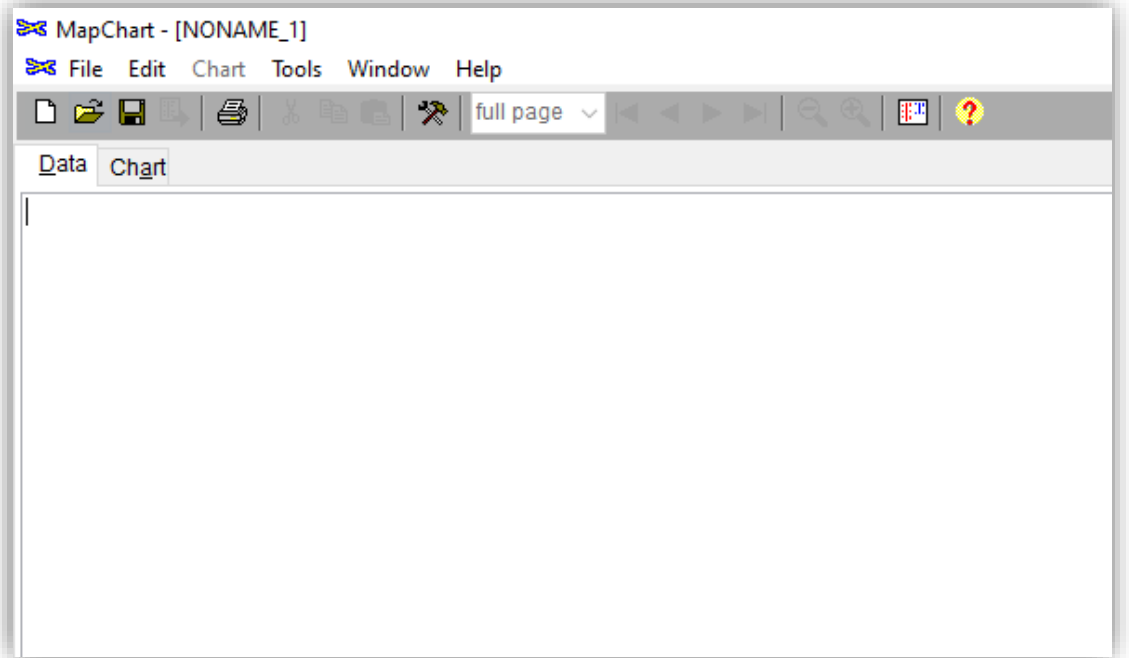
- Dec 02, 2011: Updated to version 14.
 - Codon tables are expanded. (Now all the [codon tables in NCBI](#) are covered.)

Şekil 3.13 PAL2NAL Veri Tabanı

3.5 Fasulyede Tanımlanan WOX Genlerinin Kromozom Dağılımı ve Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi

MapChart programı kullanılarak fasulyedeki WOX genlerinin, önceden erişilen kromozom verileri, başlangıç pozisyonları gibi bilgiler aracılığıyla kromozom dağılımları saptanmıştır. Sonuçlar bazı araçlar yardımıyla görsel olarak iyileştirilmiştir (Voorrips 2002, Şekil 3.14).

Promotor bölgeler, RNA polimerazın konumlandığı, bağlandığı ve transkripsiyonun başladığı başlangıç DNA dizileridir. Bu diziler genellikle genlerin akış yukarı bölgelerinde yer alır. Phytozome veri tabanı kullanılarak ilgili genin 2000 baz çifti gerisi promotor bölgesi olarak belirlenmiştir. Promotor bölgelerindeki cis elementlerine ulaşmak için PlantCARE veri tabanından faydalanılmıştır. Erişilen cis elementlerinin literatürdeki isimleri ve fonksiyonları tablolar halinde sunulmuştur (Lescot vd. 2002, Şekil 3.15).



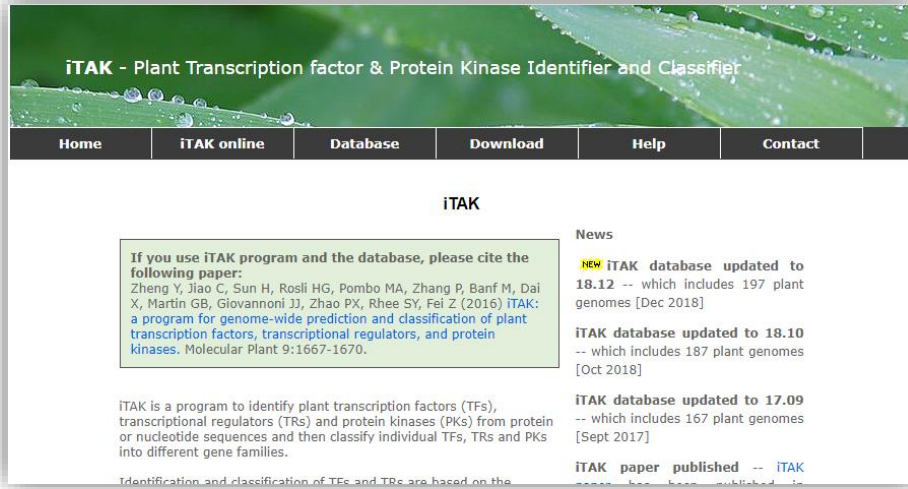
Şekil 3.14 Mapchart Programının Genel Görünümü



Şekil 3.15 Plantcare Veri Tabanı

3.6 Sinteni Analizi

Sinteni, gelişen genomik sıralama ve haritalama çalışmaları sayesinde yakın zamanda farklılaşan birden farklı türün genomlarında benzer gen bloklarının bulunması durumudur. Kısacası türlerin ortak dizilere sahip olmasıdır. Benzerlik gösteren genler ise ortolog gen adını almıştır (Robinson vd. 2019). *P. vulgaris* ile *A. thaliana* ve *G. max*'de bulunan *WOX* genlerinin sinteni haritası iTAK - Plant Transcription factor & Protein Kinase Identifier and Classifier kullanılarak çizilmiştir (Zheng vd. 2016, Şekil 3.16).



Şekil 3.16 iTAK – Plant Transcription Factor & Protein Kinase Identifier and Classifier Veri Tabanı

3.7 Fasulyede Tanımlanan WOX Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri ve Oranları

Tanımlanan proteinlerin, mitokondri, kloroplast, sitoplazma, koful vb. hücre içi yerleşim noktalarına ve oranlarına ulaşmak için WoLFPSORT ve TargetP 1.1 Server veri tabanlarından faydalanılmıştır (Horton vd. 2007, Emanuelsson vd. 2007) (Şekil 3.17-3.18).

Şekil 3.17 WoLF PSORT Veri Tabanı

DTU Bioinformatics
Department of Bio and Health Informatics

Services are gradually being migrated to <https://services.healthtech.dtu.dk/>.
Please try out the new site.

[Home](#)

TargetP 1.1 Server

TargetP 1.1 predicts the subcellular location of eukaryotic proteins. The location assignment is based on the predicted presence of any of the N-terminal presequences: chloroplast transit peptide (cTP), mitochondrial targeting peptide (mTP) or secretory pathway signal peptide (SP).

For the sequences predicted to contain an N-terminal presequence a potential cleavage site can also be predicted.

NOTE 1: TargetP uses [ChloroP](#) and [SignalP](#) to predict cleavage sites for cTP and SP, respectively.

NOTE 2: The method has been tested on *A. thaliana* and *H. sapiens* sets; see the [results](#).

New: the paper about using TargetP and other protein subcellular localization prediction methods:
Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools
Ole E. Emanuelsson, Sören Brunak, Gunnar von Heijne, Henrik Nielsen
Nature Protocols 2, 953-971 (2007).

is now again available for download - please click [here](#).

Instructions	Output format	Article abstract	Data sets
--------------	---------------	------------------	-----------

SUBMISSION

Paste a single sequence or several sequences in [FASTA](#) format into the field below:

Submit a file in [FASTA](#) format directly from your local disk:

Dosya seçilmedi

Organism group

☒ Non-plant
☐ Plant

Prediction scope

☐ Perform cleavage site predictions

Cutoffs

☒ no cutoffs; winner-takes-all (default)
☐ ...

Şekil 3.18 TargetP 1.1 Veri Tabanı

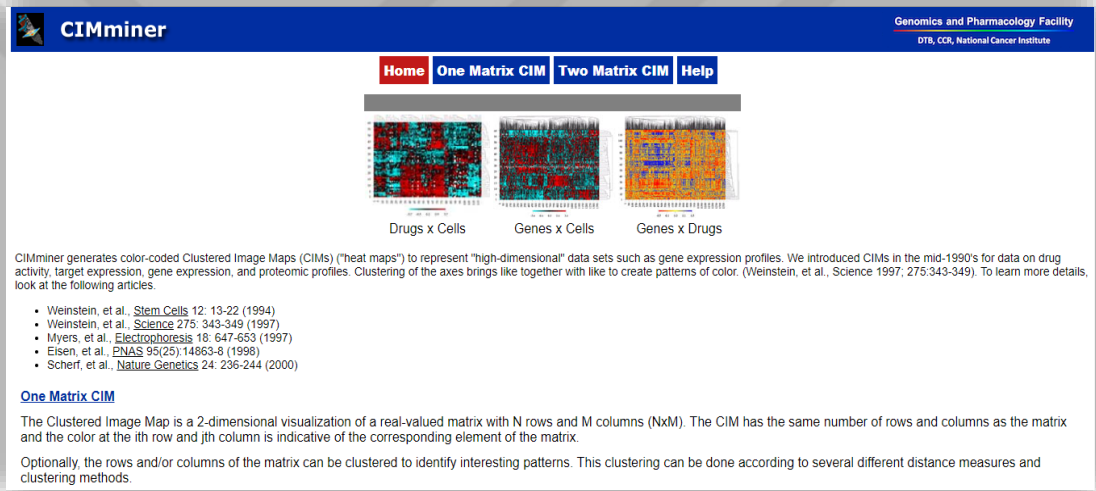
3.8 MikroRNA'ların (miRNA) Tespiti ve Hedefledikleri Fasulye WOX Genlerin Belirlenmesi

Tüm bitki miRNA'ları ve CDS fasulye WOX hedef dizileri psRNATarget Server aracılığıyla hizalanmıştır (Zhang ve Skolnick 2005, Dai ve Zhao 2011). Hizalamanın sonucunda miRNA erişim numaralarına ve hedefledikleri genlere ulaşılmıştır. Tüm bitki miRNA dizileri miRBase v22.0 veri tabanından alınmıştır. miRNA'ların hedeflediği varsayılan gen homologlarının güvenilirliğini ve tanımlanmasını sağlamak için blastlama (blastx) yapılarak fasulye EST (NCBI) dizilerine karşı taranmıştır.

3.9 Fasulyede Tanımlanan WOX Genlerinin Transkriptom Datası ile *In Siliko* Gen İfade Analizi

Phytozome veri tabanı kullanılarak WOX genlerinin doku spesifik mRNA ifade seviyelerine ulaşılmıştır. Hiz ve ark. (2014) NCBI veri tabanına yüklenen SRA verilerini *in siliko* gen ifade analizinde kullanmak için Illumina RNAseq teknolojisiyle okumalar yapılmıştır. SRA verileri, SRR957667 (kontrol yaprak) ve SRR957668 (tuz ile muamele edilmiş yaprak)'dir (Hiz vd. 2014). Okumalara başlamadan önce verileri normalize

ederek birleştirmek için CLC-Genomics programı kullanılmıştır (Sequencing 2011). Normalizasyon ve birtakım kalite filtreleme algoritmalarının işleme süreçlerinden sonra her gen dizisi için erişilen okumalar FASTA formatında saklanmıştır. Illumina ile üretilen okumalar kalitesiz ise FastQC programı ile belirlenip çıkartılmıştır (Brown vd. 2017). CLC-Genomics programı kullanılarak geriye kalan kaliteli olduğu düşünülen okumaların ifade seviyelerine bakılmıştır. Hedeflenen gen bölgesinin RPKM ifade değerleri ve doku spesifik mRNA ifade seviyeleri Log2 formunda oluşturulan kare matrisler şeklinde kaydedilmek üzere depolanmıştır. CIMminer veri tabanı kullanılarak ifade seviyeleri görsel açıdan anlamlı hale getirilmiştir (Weinstein vd. 1997, Şekil 3.19).



Şekil 3.19 CIMminer Veri Tabanı

3.10 Bitki Materyalleri, Büyüme Koşulları ve Stres Muamelesi

Çalışmada tuza dayanıklı fasulye ‘Yakutiye cv.’ ve tuza duyarlı fasulye ‘Zülbiye cv.’ kullanılmıştır. Tohumlar “Geçiş Bölgesi Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye” den temin edilmiştir (Güler vd. 2012). Önceki yapılan çalışmalar doğrultusunda ‘Yakutiye’ çeşidi tuza toleranslı iken ‘Zülbiye’ çeşidi tuza duyarlı olarak literatüre geçmiştir (Buyuk vd. 2016, Inal vd. 2017, Ilhan vd. 2018). Gen ekspresyon analizi için her iki kültürün tohumlarına yüzey sterilizasyon uygulanmıştır. Bu uygulama 5 dakika boyunca %5 (v/v) hipoklorit içeren bir solüsyon uygulamasıdır. Sterilizasyon aşamasını

takiben tohumlar çimlendirildikten sonra 0.2L ölçüsünde değiştirilmiş 1/10 Hoagland çözeltisi içeren hidroponik sistemde yetiştirilmiştir. Hoagland çözeltisi son konsantrasyonu 2 mM Ca, 10^{-6} M Mn, 4 mM NO_3 , $2 \cdot 10^{-7}$ M Cu, 1 mM Mg, 10^{-8} M NH_4 , 2 mM K, 10^{-6} M Zn, 0.2 mM P, 10^{-4} M Fe ve 10^{-6} M B olan makro ve mikro besinlerdir. Makro besinler K_2SO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve KCl iken mikro besinler H_3BO_3 , MnSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NH_4Mo , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içerir (Barac vd. 2004). Fasulye fideleri, 25 °C, %70 bağıl nem, $250 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fotosentetik foton akışı ve ışığın sağlandığı kontrollü bir iklimlendirme kabininde dışarıdan izole edilmiştir. Fasulye fideleri, iklimlendirme kabininde ilk üç yapraklı (trifoliat) aşamasına ulaştıktan sonra tuz stresi ile muamele işlemine geçilmiştir. 9 gün boyunca Hoagland çözeltisi ve 150 mM NaCl (orta tuzluluk stresi) ile tuz stresi uygulanmıştır (Şekil 3.20, 3.21). Stres muamelesinin dokuzuncu gün sonunda iki farklı fasulye çeşidinin yaprak dokuları qPCR reaksiyonları için anlam ifade eden üç biyolojik tekrarlı örneklem alınmıştır. Örnekler total RNA izolasyon işlemine kadar -80 °C'lik buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3.20 Zülbiye ve Yakutiye Kontrol Bitkileri



Şekil 3.21 Zülbiye ve Yakutiye Tuz Stresi Uygulanmış Bitkiler

3.11 Total RNA İzolasyonu

-80 °C’lik buzdolabında muhafaza edilen örnekler total RNA izolasyon işlemi için alındı. Total RNA izolasyonu için SV Total RNA Isolation (Promega) kiti kullanıldı.

Total RNA İzolasyon Protokolü:

1. Homojenize edilmiş bitki doku örnekleri bulunan her tüpe 175 µl Lysis Buffer (RLA + BME) eklendikten sonra 5-6 defa dikkatli bir şekilde ters düz edilerek karıştırıldı.
2. 350 µl Dilution Buffer (RDA, blue) eklendi ve 3-4 kez ters düz edilerek karıştırıldı.
3. Tüpler 12.000 RPM’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve üstte kalan lizat yeni bir tüpe aktarıldı.
4. Önceden hazırlanan %95’lik EtOH’dan 200 µl ekledikten sonra dikkatlice karıştırıldı. Lizatın temizlenmesi sağlandı.

5. Oluşan karışım membran filtre özelliğine sahip tüplere aktarıldı ve 12.000 RPM’de 1 dakika süresince santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan sıvı atıldı.
6. Membran filtresinin üzerine 600 µl RNA Wash Solution (RWA) eklendi ve 12.000 RPM’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
7. DNAaz inkübasyon solüsyonu bileşenleri ve Yellow Core tamponuna ait bileşenler çizelge 3.1 ‘de verilmiştir.

Çizelge 3.1 DNAaz Solüsyon Bileşenleri

Çözelti	Hacim	Yellow Core Buffer
Yellow Core Buffer	40 µl	*0.0225M Tris (pH 7.5)
MnCl ₂ , 0.09 M	5 µl	*1.125M NaCl
DNAse I	5 µl	*0.0025% yellow dye (w/v)

8. Membran üzerine hazırlanan DNAaz karışımından 50 µl eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika süresince inkübe edildi.
9. İnkübasyon işleminden sonra üzerine DNase Stop Solution (DSA + EtOH) eklendi.
10. DNAaz muamelesi sonrası, 600 µl RNA Wash Solution (RWA) eklendi ve tüpler 12.000 RPM’de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Tekrardan 250 µl RNA Wash Solution eklenip 12.000 RPM’de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Yeni elüsyon tüpü alındı ve üzerine 50 µl Nuclease – Free Water eklendikten sonra 12.000 RPM’de 1 dakika santrifüj edildi.
13. İzole edilen RNA örneklerinin kalite ve miktarını kantitatif olarak belirlemek için NanoDrop Lite UV-vis Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.
14. Son olarak örnekler -80 °C’lik bozdolabına kaldırıldı.

3.12 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

İzole edilen RNA'lar yapı bakımından tek zincirli olduğu için hassas ve kırılgandır. Hem bu özellikte olması açısından hem de qPCR reaksiyonlarında kullanırken ifade seviyesinin ölçümü açısından tamamlayıcı ipliğin olması gerekmektedir. Dolayısıyla izole edilmiş total RNA örneklerinden cDNA kütüphanesi oluşturmak için cDNA sentez kiti (iScript™ cDNA Synthesis Kit- Bio-Rad) kullanılmıştır. cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve reaksiyon başına kullanılan hacimler çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 cDNA Sentez Bileşenleri

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim (µl)
5x iScript Reaksiyon Karışım	4
iScript Ters Transkriptaz	1
Nükleaz olmayan su	12
RNA kalıbı	3

Reaksiyon son hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Termalcycler PCR cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları çizelge' 3.3 de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3 cDNA Sentez Reaksiyon Koşulları

Döngü	°C	Süre (dk)
Priming	25 °C	5
Reverse Transcription	46 °C	20
RT inactivation	95 °C	1
Opsiyonel	4 °C	Sınırsız

3.13 Primer Dizaynı

RNAseq verilerine bakarak *WOX-1*, *WOX-9*, *WOX-11*, *WOX-15* ve *WOX-16* genlerinin çalışılmasına karar verilmiştir. Housekeeping gen olarak *ACT* (Actin) geni kullanılmıştır. Çalışılan genlere ait diziler NCBI'dan temin edilmiş ve primer tasarımları 'Integrated DNA Technologies IDT, Primer Quest' programı ile yapılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Phvul-WOX Primerleri

Primer	Sekans (5'→3')	Primer uzunluğu (bç)	Bağlanma Sıcaklığı (T _m)
WOX-1 F	GGCAAGATCGAAGGGAAGAA	20	57 °C
WOX-1 R	GTGGGAGTACGAGGACTATGA	21	60 °C
WOX-9 F	GGATGGTGGGTGACAATGAA	20	57 °C
WOX-9 R	GTGGTGCAGTGTTGAGAGAA	20	57 °C
WOX-11 F	GGACACTGAGGTTGATTCTAAGG	23	61 °C
WOX-11 R	GAGTAGACTTGAGGGTTCTGAAAG	24	61 °C
WOX-15 F	GAGGCAGAGCATCATCAAGAA	21	58 °C
WOX-15 R	CAGATGGTGGCGTAAACAGATA	22	58 °C
WOX-16 F	ACGGAAAGATTGAAGGGAAGAA	22	57 °C
WOX-16 R	TGTGGGAGTTCGAGGACTAT	20	57 °C
ACT-F	TGCATACGTTGGTGATGAGG	20	57 °C
ACT-R	AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	20	59 °C

3.14 Real-Time PCR

Biyoinformatik analizleri yapılan *WOX-1*, *WOX-9*, *WOX-11*, *WOX-15* ve *WOX-16* genleri hedef gen olarak belirlenmiştir. Housekeeping gen olarak *ACT* (NCBI Entrez Gene ID: CV537379) geni belirlenmiştir. Reaksiyonda Sybr Green I boyası tercih edilmiş olup Roche Diagnostics Light Cycler® Nano cihazı kullanılmıştır. Real-time PCR'ın optimizasyonu için ön denemeler yapılmıştır. PCR etkinliğini saptamak ve hedeflenen gen bölgesine ait dizilerin çoğaltımının düzgün yapılıp yapılmadığını kontrol etmek için

Erime Eğrisi Grafiğine (T_m değerleri) bakılmıştır. qPCR bileşenleri ve koşulları çizelge 3.5, 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.5 qPCR Bileşenleri

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

Çizelge 3.6 qPCR Koşulları

Döngü	°C	Süre (s)
Ön denatürasyon	95 °C	30
Denatürasyon	95 °C	15
Bağlama/Uzama	60 °C	30
Melting Curve Analysis	60 °C → 95 °C	

} 40 döngü

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 WOX Genlerinin Biyoinformatik Analizleri

Baklagiller ailesinden olan fasulye genomunda yapılan analizler sonucu 18 adet WOX geni tanımlanmıştır. Belirlenen WOX genleri Latince isimlerinden esinlenerek *Phvul*-WOX şeklinde isimlendirilmiştir. WOX genlerinin kaçınıcı kromozomda bulunduğu, başlangıç ve bitiş noktaları, protein uzunlukları, izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları, kararsızlık indeksleri, hangi filogeni grubunda bulunduğu ve NCBI erişim numaraları şekil 4.1’de verilmiştir. Belirlenen WOX genlerinin amino asit uzunluğu 177-394 aminoasit (aa) aralığında değişim göstermektedir. Moleküler ağırlıklarının ise 20555,80-43105,09 DA arasında olduğu belirlenmiştir. İzoelektrik noktaları değerlendirildiğinde 10 tanesinin asidik karakterli, 8 tanesinin bazik karakterli olduğu görülmüştür. *Phvul*-WOX-12 geni hariç tüm genlerin kararsızlık indeksleri 50’nin üzerinde değere sahiptir.

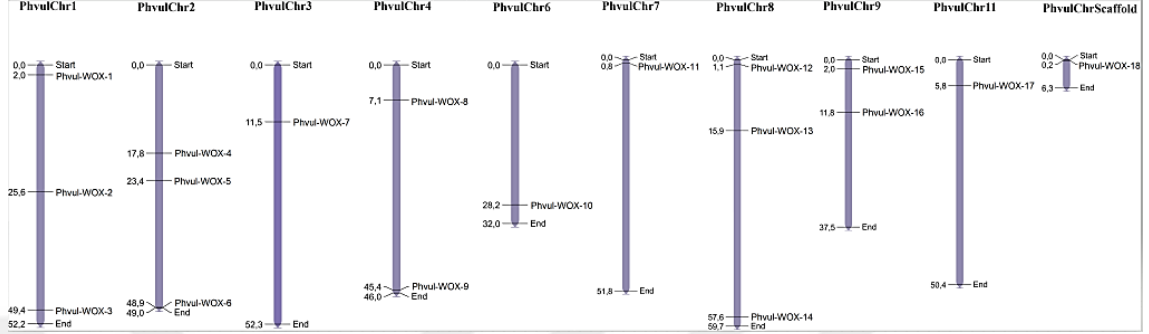
Protein Adı	Phytozome Veri Tabanı Tanımlayıcısı	Kromozom	Başlangıç Pozisyonu (bp)	Bitiş Pozisyonu (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Kararsızlık Endeksi	Kararlı veya Kararsız	Filogeni Grubu	NCBI Erişim No.
Phvul-WOX-1	Phvul.001G023600	1	1,974,828	1,976,841	234	9,01	26805,18	59,11	Kararsız	C2	XP_007160869.1
Phvul-WOX-2	Phvul.001G106700	1	25,567,127	25,569,535	280	6,71	30470,25	63,98	Kararsız	B	XP_007161896.1
Phvul-WOX-3	Phvul.001G241000	1	49,375,412	49,376,171	177	6,32	20555,80	51,1	Kararsız	C2	XP_007163521.1
Phvul-WOX-4	Phvul.002G095800	2	17,787,680	17,790,178	305	6,64	34426,31	60,97	Kararsız	C2	XP_007157754.1
Phvul-WOX-5	Phvul.002G109400	2	23,381,278	23,383,141	287	5,12	32175,02	64,83	Kararsız	C2	XP_007157924.1
Phvul-WOX-6	Phvul.002G329500	2	49,437,325	49,439,906	359	7,80	40911,73	53,45	Kararsız	C2	XP_007160532.1
Phvul-WOX-7	Phvul.003G073400	3	11,486,922	11,488,794	386	8,41	43105,09	52,48	Kararsız	B	XP_007153888.1
Phvul-WOX-8	Phvul.004G053700	4	7,148,441	7,150,811	274	6,34	30007,18	58,97	Kararsız	B	XP_007151517.1
Phvul-WOX-9	Phvul.004G151575	4	45,396,978	45,399,380	356	6,61	40529,05	64,49	Kararsız	C2	XP_007163960.1
Phvul-WOX-10	Phvul.006G179900	6	28,187,307	28,190,437	394	8,45	42913,13	54,72	Kararsız	B	XP_007148089.1
Phvul-WOX-11	Phvul.007G011600	7	823,841	826,817	276	5,90	31196,85	50,61	Kararsız	A	XP_007142723.1
Phvul-WOX-12	Phvul.008G014000	8	1,149,383	1,155,907	281	5,74	31921,51	48,42	Kararsız	A	XP_007139251.1
Phvul-WOX-13	Phvul.008G100800	8	15,908,285	15,909,390	203	8,21	23253,9	76,06	Kararsız	C2	XP_007140303.1
Phvul-WOX-14	Phvul.008G226100	8	57,590,552	57,591,559	183	8,93	21169,7	59,61	Kararsız	C2	XP_007141792.1
Phvul-WOX-15	Phvul.009G012200	9	2,041,007	2,042,431	216	6,00	24625,89	62,99	Kararsız	A	XP_007136031.1
Phvul-WOX-16	Phvul.009G066960	9	11,799,350	11,800,831	235	9,26	27053,8	67,05	Kararsız	C2	XP_007140278.1
Phvul-WOX-17	Phvul.011G064900	11	5,818,125	5,820,195	263	5,75	29752,75	64,62	Kararsız	C1	XP_007132075.1
Phvul-WOX-18	Phvul.L004443	scaffold_15	237,207	238,6269	223	9,07	25111,49	62,06	Kararsız	C1	XM_007150250.1

Şekil 4.1 *Phaseolus vulgaris* L. WOX Protein Kataloğu

4.2 Fasulyede WOX Genlerinin Kromozomal Dağılımı

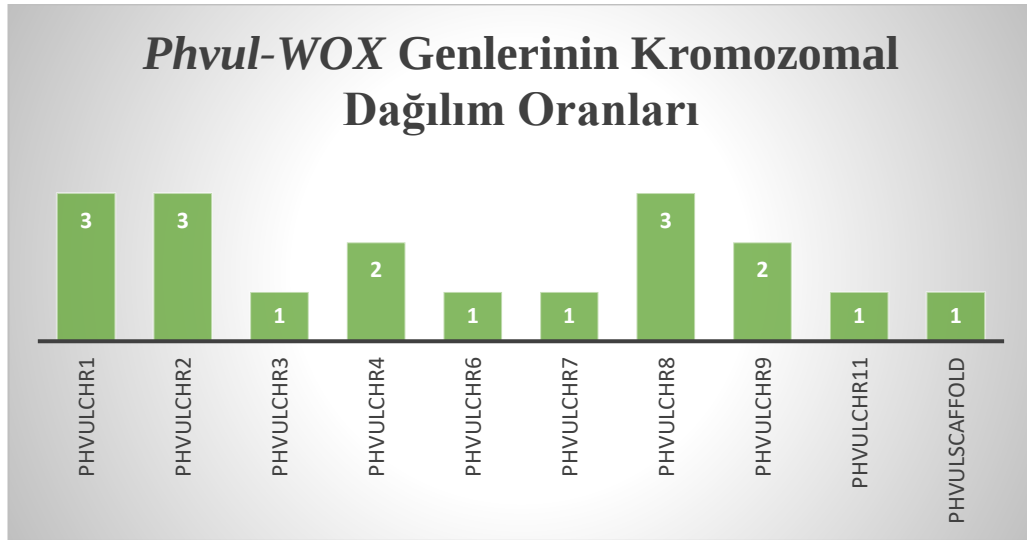
Mapchart programı kullanılarak tanımlanan WOX genlerinin kromozomal dağılımları ve dağılım oranları şekil 4.2’de verilmiştir. Kromozom 5 ve 10 haricinde diğer tüm kromozomlarda WOX genlerinin yerleşim gösterdiği görülmüştür. Fasulyede tanımlanan

WOX genlerinin başlangıç ve bitiş pozisyonları arası mesafeler incelendiğinde en yakın 1. kromozomda 49.375.412 – 49.376.171 baz çiftleri arasında bulunan *Phvul-WOX-3* geni, en uzak ise 6. kromozomda 28.187.307 – 28.190.437 baz çiftleri arasında bulunan *Phvul-WOX-10* genidir.



Şekil 4.2 WOX Genlerinin Kromozomal Dağılımı

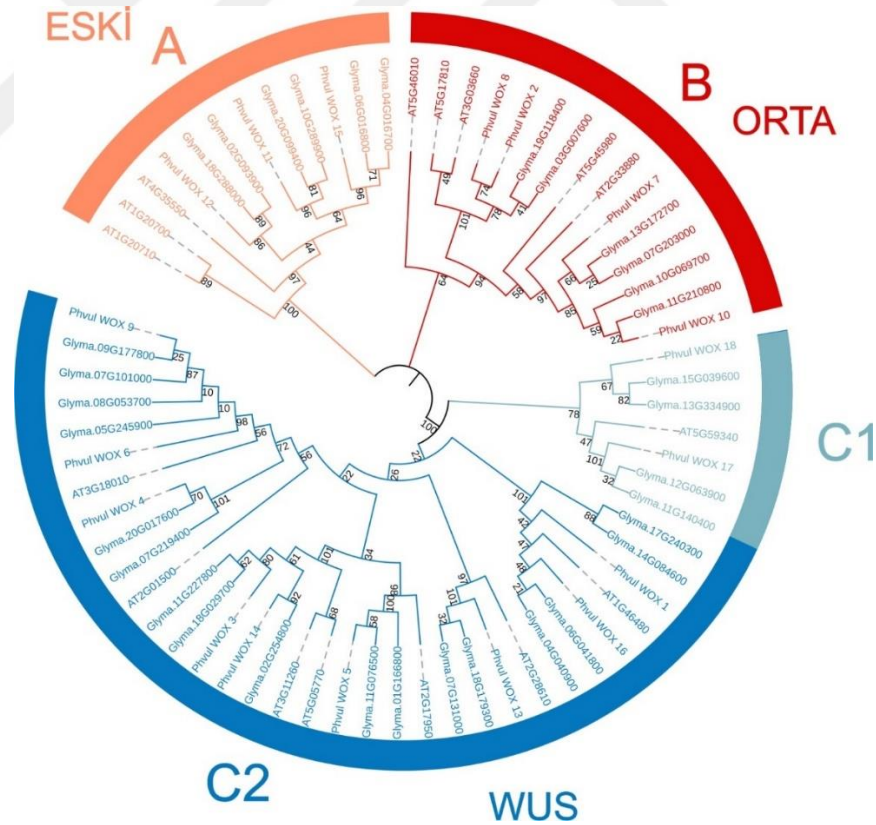
Fasulye genomunda tespit edilen *Phvul-WOX* genleri kromozomlar üzerinde aşağıda görüldüğü üzere dağınık bir yerleşim göstermiştir. *P. vulgaris* 'e ait 5 ve 10. kromozomlar hariç diğer tüm kromozomlarda *Phvul-WOX* genlerinin yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Chr1, Chr2 ve Chr8'in üçer, Chr4 ve Chr9'un ikişer, ChrScaffold'un birer ve kalan kromozomların (Chr3, Chr6, Chr7 ve Chr11) ise birer adet *Phvul-WOX* geni ihtiva ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 *Phvul-WOX* Genlerinin Kromozomal Dağılım Oranları

4.3 Fasulyede WOX Genlerinin Türler Arası Filogenetik Analizleri

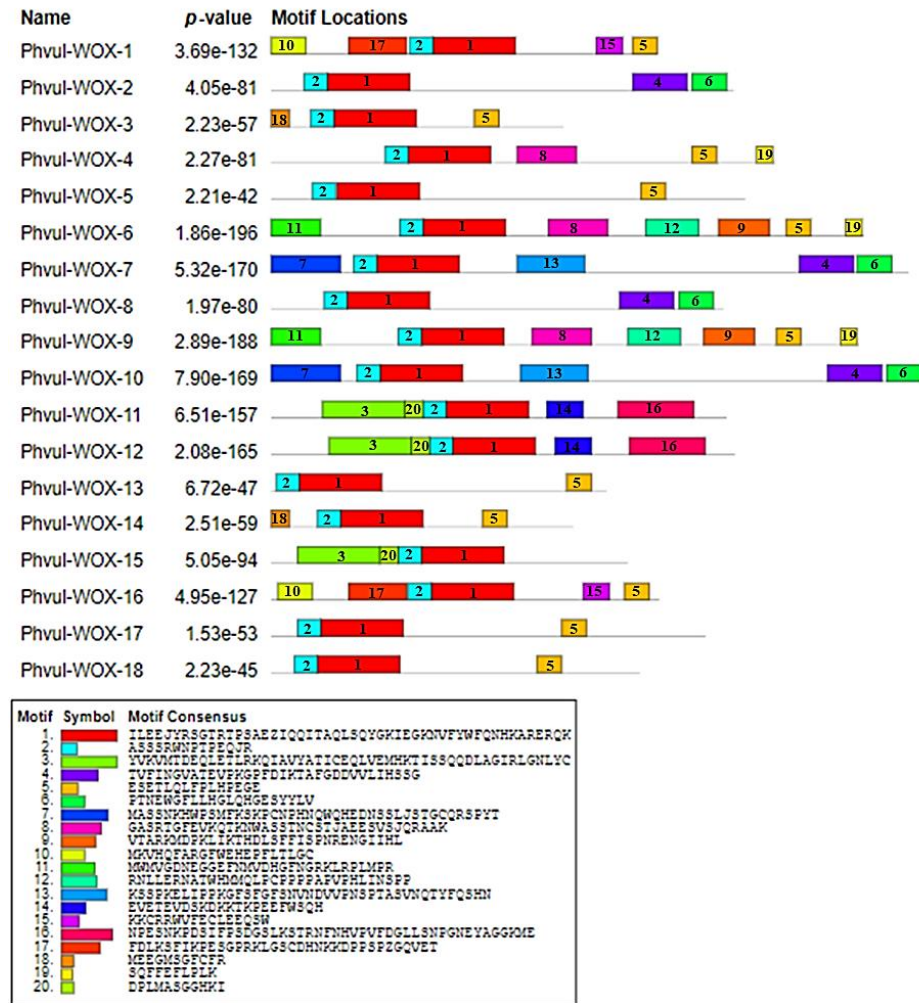
Phaseolus vulgaris, *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* türlerinde bulunan WOX genleri arasındaki evrimsel ilişkileri belirlemek, karşılaştırmalı filogenetik ağaç analizi yapmak amacıyla MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) programı kullanılmıştır. Bu analiz için Maximum Neighbour-Joining yaklaşımı kullanılmıştır. Diziler MEGA7’de ClustalOmega (Clustal W) ile hizalanıp, köklenmemiş filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Oluşturulan filogenetik ağaç görsel açıdan kolay anlaşılabilmesi için İTOL veri tabanı kullanılarak renklendirilmiştir. Karşılaştırmalı filogenetik ağaç analizlerine göre WOX genlerinin 3 ana gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4.4). Giriş kısmında da belirtildiği gibi WOX genleri WUS, eski ve orta olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaçta WUS sınıfına karşılık gelen C1+C2 grubu, orta sınıfa karşılık gelen B grubu ve eski (antik) sınıfa karşılık gelen ise A grubu olmaktadır.



Şekil 4.4 *Phvul*-WOX Genlerinin Filogenetik Ağacı

4.4 Fasulyede WOX Proteinlerinin Motif Bölgeleri

Oluşturulan filogenetik ağacın güvenilirliğini kontrol etme esasına dayanan MEME veri tabanı kullanımı, WOX proteinlerinin motif kompozisyonlarını içerir. Fasulyede 18 adet WOX proteinine ait ağırlıklı olarak 3 farklı korunmuş bölge belirlenmiştir. Benzer motif grupları WOX proteinleri arasında yapısal benzerliğin belirlenmesi için kolaylık sağlamaktadır. Yapılan analize göre benzer motif kalıplarını içeren proteinlerin filogenetik ağaçta aynı sınıfta olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). WOX proteinlerine karşılık gelen motiflerin e-değerleri, sayıları ve uzunlukları (aa) çizelge 4.1’de verilmiştir. ‘1 ve 2’ numaralı motifler ise bütün Phvul-WOX proteinlerinde yer almaktadır ve gen ailesinin tanımlayıcı motifleridir.



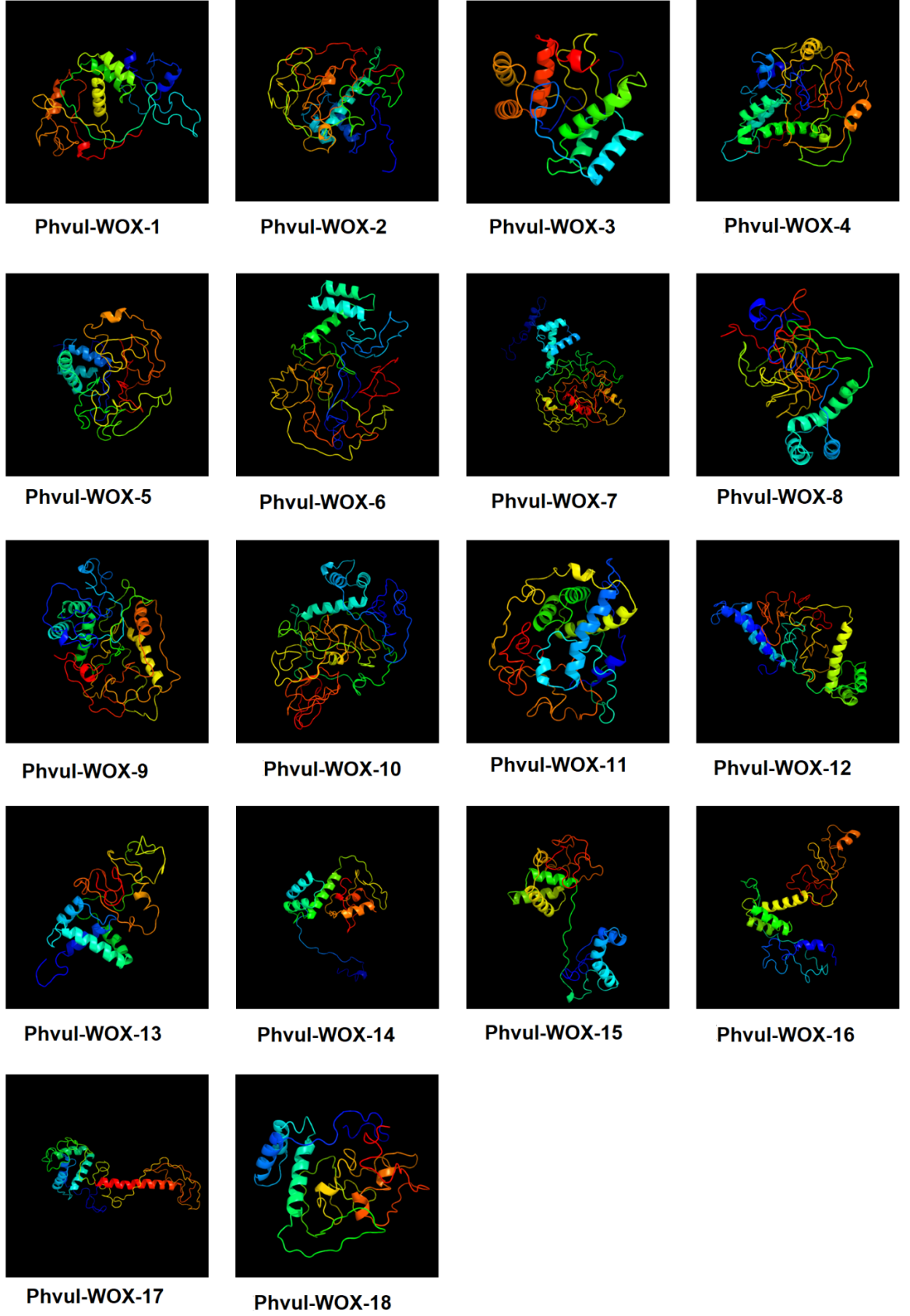
Şekil 4.5 Phvul-WOX Proteinlerinin Motif Bölgeleri

Çizelge 4.1 Phvul-WOX Proteinlerinin İçerdikleri Domainler

Domainler	E-değeri	Motif Sayıları	Genişlik (aa)
ILEEJYRSGTRTPSAEZIQITAQLSQYGKIEGKNVF YWFQNHKARERQK	1.2e-495	18	50
ASSSRWNPTPEQJR	6.2e-082	18	14
YVKVMTDEQLETLRKQIAVYATICEQLVEMHKTIS SQQDLAIGRLGNLYC	1.0e-045	3	50
TVFINGVATEVPKGPFDIKTAFGDDVVLHSSG	4.1e-030	4	33
ESETLQLFPLHPEGE	3.1e-026	11	15
PTNEWGFLHGLQHGESYYLV	9.6e-014	4	21
MASSNKHWPSPMFKSKPCPNHNQWQHEDNSSLJST GCQRSPYT	9.3e-012	2	42
GASRTGFEVKQTKNWASSTNCSTJAEESVSJQRAA K	6.5e-007	3	36
VTARKMDPKLIKTHDLSFFISPNRENGIIHL	1.3e-005	2	31
MKVHQFARGFWEHEPFLTLGC	1.1e-004	2	21
MWMVGDNEGGEFNMVDHGFNGRKLRLMPR	8.4e-008	2	30
RNLLERNATWHMMQLPCPPAPVPHLINSPP	2.7e-004	2	32
KSSPKELIPPKGFSFGFSNVNDVVPNSPTASVNQTY FQSHN	6.1e-003	2	41
EVETEVDSDKDKTKPEEFWSQH	2.1e-002	2	22
KKCRRWVFECLEEQSW	2.2e-002	2	16
NPESNKPDSIFPSDGLKSTRNFNHVPVFDGLLSNP GNEYAGGKME	8.8e-002	2	46
FDLKSFIKPESGRKLGSCDHNKKDPPSPZGQVET	3.9e-001	2	35
MEEGMSGFCFR	1.9e+000	2	11
SQFFEFLPLK	4.8e+000	3	10
DPLMASGGHKI	1.5e-001	3	11

4.5 Fasulyede WOX Proteinlerinin Homoloji Modellemesi

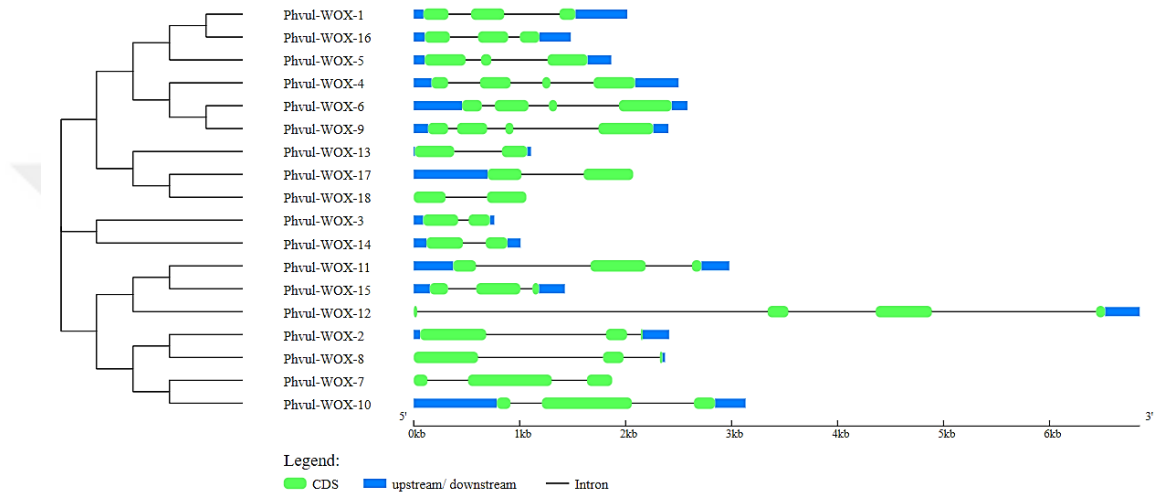
Phyre2 veri tabanı yardımıyla Protein Data Bank (PDB)'da bulunan WOX proteinleri ile BLASTP taraması yapılmış olup bu proteinlerin 3 boyutlu homoloji modellemesine ulaşılmıştır. Kullanılan veri tabanı ile WOX proteinlerinin yapı ve fonksiyon tahminlemesi saptanmıştır. Çalışmada saptanan proteinlerin 3 boyutlu homoloji modelleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 Phvul-WOX Proteinlerinin 3 Boyutlu Yapı Modellemeleri

4.6 Fasulyede WOX Genlerinin Ekzon ve İntron Bölgeleri

WOX proteinlerinin ekzon ve intron bölgelerini belirlemek için Gene Structure Display Server 2.0 veri tabanı kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucu, *Phvul*-WOX genlerinde toplamda 35 adet intron ve 53 adet ekzon tespit edilmiştir. Ekzon sayıları 2 ile 4 arasında, intronların 1 ile 3 arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 *Phvul*-WOX Genlerinin Ekzon İntron Bölgeleri

4.7 Fasulyede WOX Proteinlerinin Farklı Türdeki WOX Protein Ortologları

Ortolog genler, farklı organizmalarda yapı bakımından farklı ancak işlev ve fonksiyon bakımından benzer özellikler gösteren genler olarak adlandırılır (Fang vd. 2010). *Fabaceae* ailesinden olan *Phaseolus vulgaris* ve *Glycine max*'in genomlarında tanımlanan WOX genlerinin ortolog ilişkileri belirlenirken bir yandan da *Phaseolus vulgaris* genomunda tanımlanan WOX genleri ile *Brassicaceae* ailesinden olan *Arabidopsis thaliana* genomunda tanımlanan WOX genlerinin ortolog ilişkilerinin tespiti yapılmıştır. Kromozomal seviyede karşılaştırma esastır. Türler arası protein ortolog ilişkileri çizelge 4.2, 4.3'te verilmiştir.

Phaseolus vulgaris – *Arabidopsis thaliana* için Ka/Ks değerleri 0,0172 – 0,2294 arasında değişiklik gösterirken, *Phaseolus vulgaris* – *Glycine max* için 0,0114 – 0,5152 ’tür. *Arabidopsis thaliana* ile hesaplanan Ka/Ks değişim oranlarının ortalama değeri 0,15 olarak bulunurken, *Glycine max* ile hesaplanan Ka/Ks değişim oranlarının ortalama değeri ise 0,29 olarak bulunmuştur. Ks oranlarına göz atıldığında ise *Arabidopsis thaliana* ile hesaplanan ortalama Ks değeri 8,08 olduğu görülürken, *Glycine max* ile hesaplanan ortalama Ks değerinin 1,92 olduğu görülmüştür. Gen duplikasyon analizleri sonucunda *P. vulgaris*’in *A. thaliana*’dan evrimsel olarak ilk ayrılmanın 277 MYÖ, *G. max*’den ise 429 MYÖ olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.2 *P. vulgaris*-*A. thaliana* Gen Duplikasyonları

<i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i>						
Gen kodu	Kromozom	Gen Kodu	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>Phvul-WOX-2</i>	1	<i>AT5G17810</i>	2,17	0,44	0,2	16,75
<i>Phvul-WOX-3</i>	1	<i>AT5G05770</i>	1,88	0,43	0,22	14,5
<i>Phvul-WOX-5</i>	2	<i>AT2G17950</i>	5,75	0,49	0,08	44,25
<i>Phvul-WOX-6</i>	2	<i>AT3G18010</i>	36,01	0,61	0,01	277,05
<i>Phvul-WOX-10</i>	6	<i>AT5G45980</i>	9,65	0,48	0,05	74,27
<i>Phvul-WOX-10</i>	6	<i>AT2G33880</i>	2,62	0,42	0,16	20,21
<i>Phvul-WOX-14</i>	8	<i>AT5G05770</i>	3,76	0,34	0,09	28,96
<i>Phvul-WOX-14</i>	8	<i>AT3G11260</i>	4,46	0,37	0,08	34,3
<i>Phvul-WOX-15</i>	9	<i>AT1G20700</i>	3,09	0,52	0,16	23,77
<i>Phvul-WOX-17</i>	11	<i>AT5G59340</i>	8,7	0,52	0,06	66,96
<i>Phvul-WOX-18</i>	Scaffold	<i>AT5G59340</i>	10,84	0,65	0,06	83,41

Çizelge 4.3 *P. vulgaris*-*G. max* Gen Duplikasyonları

<i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Glycine max</i>						
Gen Kodu	Kromozom	Gen Kodu	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>Phvul</i> - <i>WOX-1</i>	1	<i>Glyma.06G041800</i>	0,57	0,15	0,26	4,4
<i>Phvul</i> - <i>WOX-1</i>	1	<i>Glyma.04G040900</i>	0,6	0,15	0,25	4,67
<i>Phvul</i> - <i>WOX-1</i>	1	<i>Glyma.14G084600</i>	0,25	0,07	0,29	1,92
<i>Phvul</i> - <i>WOX-1</i>	1	<i>Glyma.17G240300</i>	0,25	0,07	0,3	1,93
<i>Phvul</i> - <i>WOX-2</i>	1	<i>Glyma.03G007600</i>	0,45	0,14	0,32	3,5
<i>Phvul</i> - <i>WOX-2</i>	1	<i>Glyma.19G118400</i>	0,42	0,14	0,33	3,26
<i>Phvul</i> - <i>WOX-3</i>	1	<i>Glyma.02G254800</i>	1,11	0,24	0,22	8,55
<i>Phvul</i> - <i>WOX-3</i>	1	<i>Glyma.11G227800</i>	0,41	0,09	0,24	3,18
<i>Phvul</i> - <i>WOX-3</i>	1	<i>Glyma.18G029700</i>	0,45	0,08	0,19	3,52
<i>Phvul</i> - <i>WOX-4</i>	2	<i>Glyma.07G219400</i>	0,23	0,09	0,41	1,81
<i>Phvul</i> - <i>WOX-4</i>	2	<i>Glyma.20G017600</i>	0,26	0,11	0,43	2,05
<i>Phvul</i> - <i>WOX-5</i>	2	<i>Glyma.01G166800</i>	0,39	0,08	0,2	3,06
<i>Phvul</i> - <i>WOX-5</i>	2	<i>Glyma.11G076500</i>	0,38	0,06	0,15	2,92
<i>Phvul</i> - <i>WOX-6</i>	2	<i>Glyma.08G053700</i>	0,68	0,20	0,3	5,24
<i>Phvul</i> - <i>WOX-6</i>	2	<i>Glyma.05G245900</i>	0,22	0,04	0,21	1,69
<i>Phvul</i> - <i>WOX-7</i>	3	<i>Glyma.13G172700</i>	0,42	0,14	0,33	3,24
<i>Phvul</i> - <i>WOX-8</i>	4	<i>Glyma.19G118400</i>	0,63	0,26	0,41	4,86
<i>Phvul</i> - <i>WOX-8</i>	4	<i>Glyma.03G007600</i>	0,76	0,29	0,38	5,86
<i>Phvul</i> - <i>WOX-10</i>	6	<i>Glyma.07G203000</i>	1,02	0,25	0,24	7,86
<i>Phvul</i> - <i>WOX-10</i>	6	<i>Glyma.10G069700</i>	0,4	0,14	0,35	3,14
<i>Phvul</i> - <i>WOX-10</i>	6	<i>Glyma.11G210800</i>	0,38	0,12	0,33	2,94
<i>Phvul</i> - <i>WOX-10</i>	6	<i>Glyma.13G172700</i>	1,04	0,27	0,26	8,02
<i>Phvul</i> - <i>WOX-11</i>	7	<i>Glyma.02G093900</i>	1,1	0,22	0,19	8,51
<i>Phvul</i> - <i>WOX-11</i>	7	<i>Glyma.10G289900</i>	0,25	0,06	0,23	1,95
<i>Phvul</i> - <i>WOX-11</i>	7	<i>Glyma.20G099400</i>	0,22	0,05	0,22	1,72
<i>Phvul</i> - <i>WOX-12</i>	7	<i>Glyma.02G093900</i>	0,43	0,07	0,18	3,33
<i>Phvul</i> - <i>WOX-12</i>	8	<i>Glyma.10G289900</i>	1,44	0,19	0,13	11,11
<i>Phvul</i> - <i>WOX-12</i>	8	<i>Glyma.18G288000</i>	0,53	0,05	0,1	4,1
<i>Phvul</i> - <i>WOX-13</i>	8	<i>Glyma.07G131000</i>	0,33	0,12	0,38	2,56
<i>Phvul</i> - <i>WOX-13</i>	8	<i>Glyma.18G179300</i>	0,39	0,14	0,36	3,02
<i>Phvul</i> - <i>WOX-14</i>	8	<i>Glyma.11G227800</i>	0,9	0,16	0,18	6,99
<i>Phvul</i> - <i>WOX-14</i>	8	<i>Glyma.18G029700</i>	0,83	0,16	0,19	6,43
<i>Phvul</i> - <i>WOX-15</i>	9	<i>Glyma.06G016800</i>	0,37	0,06	0,18	2,87
<i>Phvul</i> - <i>WOX-15</i>	9	<i>Glyma.04G016700</i>	0,38	0,09	0,24	2,92
<i>Phvul</i> - <i>WOX-17</i>	11	<i>Glyma.07G131000</i>	55,88	0,63	0,01	429,86
<i>Phvul</i> - <i>WOX-17</i>	11	<i>Glyma.11G140400</i>	0,35	0,16	0,46	2,7
<i>Phvul</i> - <i>WOX-17</i>	11	<i>Glyma.12G063900</i>	0,3	0,14	0,47	2,33
<i>Phvul</i> - <i>WOX-17</i>	11	<i>Glyma.13G334900</i>	0,81	0,37	0,45	6,29
<i>Phvul</i> - <i>WOX-17</i>	11	<i>Glyma.15G039600</i>	0,83	0,37	0,45	6,42
<i>Phvul</i> - <i>WOX-18</i>	Scaffold	<i>Glyma.07G131000</i>	3,92	0,77	0,19	30,18
<i>Phvul</i> - <i>WOX-18</i>	Scaffold	<i>Glyma.11G140400</i>	1,07	0,45	0,41	8,3
<i>Phvul</i> - <i>WOX-18</i>	Scaffold	<i>Glyma.12G063900</i>	1,21	0,42	0,35	9,3
<i>Phvul</i> - <i>WOX-18</i>	Scaffold	<i>Glyma.13G334900</i>	0,57	0,29	0,51	4,42
<i>Phvul</i> - <i>WOX-18</i>	Scaffold	<i>Glyma.15G039600</i>	0,58	0,26	0,44	4,49
<i>Phvul</i> - <i>WOX-18</i>	Scaffold	<i>Glyma.18G179300</i>	2,66	0,77	0,29	20,52

4.8 Fasulyede WOX Genlerinin Gen Duplikasyonları

Duplikasyonlar farklı bitki türlerindeki WOX gen ailesinin varlığını göstermektedir. Genel çerçevede birbirleriyle benzer olan genlerin sebebini açıklayan gen duplikasyon olayları gen ailelerinin genişlemesi ve büyümesinde rol oynayan önemli faktörlerden biridir. Proteinlerde yeni fonksiyonların belirlenmesine aracılık ederek evrimsel ilişkilerin tespitini desteklemektedir. Gen duplikasyonları tandem ve segmental duplikasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Eğer ki gen duplikasyonları aynı kromozom üzerinde bulunuyorsa bu tandem duplikasyonu, aynı genin farklı alleli farklı kromozom üzerinde bulunuyorsa bu da segmental duplikasyon olarak adlandırılmaktadır (Clancy ve Shaw 2008). WOX genleriyle yapılan gen duplikasyon analiz sonuçlarına göre; 5 adet segmental duplikasyon bulunduğu tespit edilmiştir.

Gen duplikasyon olayları, evrimsel süreçte proteinlerin yeni fonksiyonel özellik kazanmasını sağlar (Kondrashov vd. 2002). WOX gen ailesi içerisinde evrimsel yayılmayı değerlendirmek amacı ile duplikasyon gösteren genlerin homolog özellikte olmayanlar için “Ka”, homolog özellikte olanlar “Ks” ve homolog olmayanın homolog olana bölümünü ifade eden “Ka/Ks” değişim oranları saptanmıştır (Çizelge 4.4). Ortolog analizinden de faydalanarak MYÖ değerleri hesaplanmıştır. Temel anlamda MYÖ değerleri, belirlenen WOX genlerinin kaç milyon yıl önce evrimleştiklerini gösteren değerlerdir.

Fasulyede duplike olan genler için Ka/Ks oranları 0,02 ile 0,37 arasında değişmektedir. Ks değerlerinin ortalaması 6,5 iken Ka değerlerinin tahmini 0,38’dir. Duplikasyon olan genlerdeki MYÖ değerlerinin ortalaması ise 50’dir.

Çizelge 4.4 *Phvul*-WOX Gen Duplikasyonları

Gen-1	Gen-2	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
<i>Phvul</i> -WOX-2	<i>Phvul</i> -WOX-8	0,72	0,27	0,37	5,61
<i>Phvul</i> -WOX-3	<i>Phvul</i> -WOX-14	0,84	0,24	0,28	6,5
<i>Phvul</i> -WOX-11	<i>Phvul</i> -WOX-12	1,31	0,2	0,15	10,07
<i>Phvul</i> -WOX-14	<i>Phvul</i> -WOX-16	28,46	0,8	0,02	218,9
<i>Phvul</i> -WOX-17	<i>Phvul</i> -WOX-18	1,17	0,41	0,37	9

4.9 Fasulyede WOX Genlerine Ait Promotor Bölgelerin Analizi

Promotor bölgeleri, transkripsiyonun başlayabilmesi için RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı, genin transkripsiyon başlangıç noktalarına yakın yerleşim gösteren bölgeler olarak tanımlanmaktadır (Juven-Gershon vd. 2008). Gen ekspresyonunun kontrolünü direkt olarak ele alan en önemli gen elemanlarıdır (Bılas vd. 2016). Bu tez çalışmasında fasulye genomunda tanımlanan *Phvul*-WOX genlerinin promotor bölgelerinde yerleşim gösteren cis-acting elementler analiz edilmiştir ve tespit edilen cis elementlere örnek olarak *Phvul*-WOX-1 geninin promotor bölgesi şekil 4.8’de sunulmuştur. Sonuç olarak *Phvul*-WOX genlerinin tamamında toplamda 81 adet cis elementi olduğu bulunmuştur (Şekil 4.9, 4.10). Bu cis elementleri fonksiyonlarına göre ışığa duyarlı elemanlar, hormona duyarlı elemanlar, çevresel stresle ilişkili elemanlar, gelişim ile ilgili elemanlar, promotor ile ilgili elemanlar, yer bağlama ile ilgili elemanlar ve diğer elemanlar olmak üzere 7 ana başlıkta toplanmıştır (Ding vd. 2016, Ma vd. 2020, Mallick vd. 2020, Çizelge 4.5-4.11).

```

>PlantCARE_30156
+ AATCCTCATA TGCTTCATTT GGCTAGTTTT AATACTTAAA AAAACTAATT TAATAGGCAT AAGAATTATA
- TTAGGAGTAT ACGAAGTAAA CGGATCAAAA TTATGAATTT TTTTGATTAA ATTATCCGTA TTCCTAAATT

+ GATTAAAAAA ACTGACTCCA CATGATTCCT ATATTATTC CATATATATT AAAAAATTC TCGAATTTTC
- CTAATTTTTT TGACTGAGGT GTACTAAGGG TATAATAAGG GTATATATAA TTTTAAAAAG AGCTTAAAAAG

+ TAAAAATTCa ATAAACAAAC ATCATTTCGG TTAGGCTCGT GAATGCCCTT CCGTAGATCG TCCTATGACC
- ATTTTAAAGT TATTGTTTTG TAGTAAAGCC AATCCGAGCA CTTACGGGAA GGCACTAGC AGGATACGG

+ TATGTAATCAT ATTCATCCCC TAAAGATTGT GGTTCCTTAG TTAATGCTTA GACTTCATTT CTAACAGTGG
- ATACATAGTA TAAGTAGGGG ATTCTAACA CCAAGGAATC AATTACGAAT CTGAAGTAAA GATTGTCACC

+ CTTATTCACA AGGTGCCCTT TAGTAAGTGT TTTAATATTT AATTAGTCAT AAACGACCA ATAAGTTTGA
- GAATAAGTGT TCCACGGGAA ATCATTACCA AAATTATAAA TTAATCAGTA TTGACTGGT TATTCAAACT

+ GACTGCACAT AAATAAATCA ACTAATTTTT GTTTTATTTA AAGCATTTTC AATAAACTAT AACAAGAAAA
- CTGACGTGTA TTTATTTTGT TGATTAAAAA CAAAATAAAT TTCTGAAAAA GTATTGATA TTGTTCTTTT

+ AATTGATCTC CTAATGTGG CTAAAGCTAA CTTTGTCAA CGCTCAGCAT TTTGGTCTAC CTCACGAAGT
- TTAACTAGAG GGTAGTACC GAATTCGATT GAAACAGTTT GCGAGTCTGA AAACCAAGATG GAGTGCTTCA

+ GTATAAGACT TTACCAAAATG ATTTAACAAT TTTATAATTG CAGCACTAAT GAGATTGTTT AATTCCTAAA
- CATATTCGTA AATGGTTTAC TAAATTGTTA AAATATTAAC GTCTGATTA CTCTAAACAA TTAAGAAATT

+ TTTATGTGGT AATAAATAT TTTTTCATG AATTAGATG TCCTTCCTTC TATTAGAGT TCAATTTTAA
- AAATACACCA TTATATTATA AAAAAAGTAC TAATATCTAC AGGAAGGAAG ATAATCTCAA AGTAAAAATT

+ TGACTTTATT TTATCTTGA TAGTAAATT TAAGAAAAGA TAGTTTAAAG AAAAAATATT TTTCTTTTCC
- ACTGAAATAA AATAAGAACT ATCATTTAAA ATTCTTTTCT ATCAAATTTCT CTTTATTATA AAAGAAAAGG

+ CACAAATATA TTACACTTCT CAGCAAACTT TACTTTTAAC AGATGCATTT CTTTCTTTAA GGGAAATAGA
- GTGTTTATAT AATGTGAAGA GTCTTTTGA ATGAAAAATTG TCTACGTAAA GAAAGAAATT CCCTTTATCT

+ GTAATTAAAT AGTTTGAAAT CAAATTAAAGA AAAAAAAATT AATATTGAAA TTAAGATGAA TAAATTTATA
- CAAATTAATA TCAAACTTTA GTTTAATCTT TTTTTTTAA TTATACTTT AATCTCACTT ATTTAATAT

+ ATTTTTTGT TATGGTTAAA TTTATAACAA GAGAGAGAG GGGGTGGAG AAGGATATTT CAACCAATGAA
- TAAAAAATAT ATACCAATTT AAATATTGTT CTCTCTCTCT CCCACCTCT TTTCTATAGA GTTGGTACTT

+ GTAAATAGGT AAGGTAAAAA AAAATATAGA AAATTATAAA ATTATAATAA AATAAAATAT AGAAAAATTAT
- CATTTTACCA TTCCATTTTA TTTTATATCT TTTAATATTT TAATATTATT TTATTTTATA TCTTTAATA

+ AAAATTATAA TAAAAATAAA TATAGAAAAT TATAAAATTA TAAATTTATT ACAATTTAGT TATATTTAAG
- TTTTAAATAT ATTTTATTTT ATATCTTTTA ATATTTTAAT ATTTTAATAA TGTTAAATCA ATATAAATTC

+ GACAAATGGA TAATTAGTGG TAAACTTATT ATTCGATACT ATATATTTTT ATTATTATTT ATTATTATTA

```

+		
+		
+		AAGAA-motif
+		ABRE
+		ABRE3a
+		ABRE4
+		ARE
+		AT~TATA-box
+		Box 4
+		CAAT-box
+		CAT-box
+		G-box
+		GCN4_motif
+		GT1-motif
+		LTR
+		MYB
+		MYB-like sequence
+		MYC
+		Myc
+		STRE
+		TATA
+		TATA-box
+		TCA
+		Unnamed_4
+		WUN-motif
+		circadian

Şekil 4.8 *Phvul*-WOX-1 Geninin Promotor Bölgeleri

	WOX-1	WOX-2	WOX-3	WOX-4	WOX-5	WOX-6	WOX-7	WOX-8	WOX-9	WOX-10	WOX-11	WOX-12	WOX-13	WOX-14	WOX-15	WOX-16	WOX-17	WOX-18
AAGAA-motif	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	
GCN4 motif	✓						✓					✓						
CCAAT-box					✓							✓	✓	✓			✓	
CAT - box	✓	✓		✓		✓	✓									✓		✓
O2-site			✓	✓						✓	✓		✓	✓				
circadian	✓									✓								
HD-Zip3				✓														
HD-Zip1					✓													
MBSI								✓	✓				✓		✓			
AC-1													✓		✓			
ARE	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓		✓		✓
TC-rich-repeats		✓			✓		✓			✓	✓			✓				
W box				✓				✓			✓	✓				✓		
MBS			✓									✓	✓			✓		✓
LTR	✓		✓		✓						✓	✓	✓	✓			✓	✓
WUN-motif	✓	✓	✓	✓	✓		✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Box S																		
ABRE	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓		✓
ABRE3a	✓			✓	✓				✓	✓	✓		✓	✓		✓		
ABRE4	✓			✓	✓				✓	✓	✓	✓				✓		
ERE		✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
P-box				✓	✓	✓		✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓
GARE-motif				✓		✓			✓	✓			✓		✓	✓		
TGACG-motif		✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓
TGA-element			✓	✓	✓				✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓
CGTCA-motif		✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓
TCA-element				✓				✓	✓	✓	✓		✓	✓				✓
TATC-box				✓								✓		✓			✓	✓
AE-box		✓		✓						✓				✓	✓		✓	✓
ACE				✓		✓		✓		✓			✓					
Box 4	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
G-box	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓
G-Box			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓			
GATA - motif			✓	✓	✓	✓		✓										
GC-motif		✓												✓				
chs-CMA2a							✓											
chs-CMA1a									✓		✓							✓
chs-CMA2b														✓				

Şekil 4.9 *Phvul*-WOX Genlerinin Promotor Bölgeleri -1

	WOK_1	WOK_2	WOK_3	WOK_4	WOK_5	WOK_6	WOK_7	WOK_8	WOK_9	WOK_10	WOK_11	WOK_12	WOK_13	WOK_14	WOK_15	WOK_16	WOK_17	WOK_18
I-box		✓	✓			✓	✓	✓		✓			✓	✓				
L-box		✓						✓									✓	
Box III			✓			✓		✓										
Sp1								✓		✓					✓			
Lamp - element					✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓
GT1 - motif	✓		✓	✓	✓			✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MRE			✓	✓			✓	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TCCC motif				✓			✓	✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓
TCT - motif		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓							
GA - motif										✓								
Gap - box											✓						✓	
Unnamed_4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
ATCT - motif			✓	✓				✓				✓					✓	
CTAG motif												✓		✓				
Myb		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Myc	✓	✓	✓	✓		✓	✓					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
STRE	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
as-1		✓	✓	✓		✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓			✓	
CARE			✓			✓			✓			✓					✓	
WRE3		✓	✓	✓		✓	✓		✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYB recognition site					✓								✓	✓				
AP-1						✓			✓									
Myb binding site		✓		✓		✓	✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
TCA	✓	✓		✓		✓	✓						✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYB like sequence	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
DRE core						✓												
plant AP-2 like						✓												
ACTCATCT sequence								✓										
AACA motif																	✓	
DRE1						✓					✓							
AT-TATA box	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CAAT-box	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TATA	✓		✓	✓	✓				✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓
TATA-box	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
A-box						✓	✓			✓								
CCGTC box						✓	✓			✓								
CCGTC motif						✓	✓			✓								
Unnamed_1				✓	✓	✓	✓		✓	✓			✓				✓	
AT-rich element				✓	✓					✓							✓	✓
Unnamed_6							✓		✓			✓	✓		✓	✓		✓
AT-rich sequence	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYB																		✓

Şekil 4.10 *Phvul*-WOX Genlerinin Promotor Bölgeleri -2

Çizelge 4.5 Işığa Duyarlı Elemanların Fonksiyonları

IŞIĞA DUYARLI ELEMENLAR	Fonksiyonlar
AE - box	Işık yanıtı için bir modülün parçası
ACE	Işık duyarlılığında rol alır
Box 4	Işık duyarlılığında yer alan korunmuş bir DNA zincirinin parçası
G - Box	Işık duyarlılığında rol alır
G - box	Işık duyarlılığında rol alır
GATA - motif	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
GC - motif	Anoksik spesifik indüklenebilirlikte görevli bir eleman
chs-CMA1a	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
chs-CMA2a	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
chs-CMA2b	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
I - box	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
L - box	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
Box II	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
Sp - 1	Işığa duyarlı eleman
Lamp element	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
GT1 - motif	Işığa duyarlı eleman
MRE	Işık duyarlılığına dahil olan MYB bağlama bölgesi
TCCC - motif	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
TCT - motif	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
GA - motif	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
Gap - box	Işığa duyarlı bir elemanın parçası
ATCT-motif	Işık duyarlılığında yer alan korunmuş bir DNA zincirinin parçası

Çizelge 4.6 Hormona Duyarlı Elemanların Fonksiyonları

HORMONA DUYARLI ELEMENLAR	Fonksiyonlar
ABRE	Absisik asit tepkisinde rol alır
ABRE3a	Absisik asit tepkisinde rol alır
ABRE4	Absisik asit tepkisinde rol alır
ERE	Etilen tepkisinde rol oynar
P-box	Giberellin duyarlı eleman
GARE motif	Giberellin duyarlı eleman
TGACG - motif	MeJa duyarlılığında görev alır
TGA - element	Oksin duyarlı eleman
TCA - element	Salisilik asit duyarlılığında yer alır
CGTCA - motif	MeJa duyarlılığında görev alan cis etkili düzenleyici eleman
TATC-box	Giberellin duyarlılığında görev alan cis etkili eleman

Çizelge 4.7 Çevresel Stresle İlişkili Elemanların Fonksiyonları

ÇEVRESEL STRESLE İLİŞKİLİ ELEMANLAR	FONKSİYONLAR
ARE	Anaerobik indüksiyonda görev alan cis düzenleyici eleman
TC-rich-repeats	Savunma ve strese duyarlılıkta görev alır
W box	Yaralama ve patojen yanıtında sorumlu
MBS	Kuraklığa neden olan MYB bağlama bölgesi
LTR	Düşük sıcaklık tepkisinde rol alır
WUN- motif	Yaraya duyarlı eleman
MYC	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
Box S	Yaralama ve patojen yanıtında sorumlu
MYB	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık

Çizelge 4.8 Promotor İle İlgili Elemanların Fonksiyonları

PROMOTOR İLE İLGİLİ ELEMANLAR	FONKSİYONLAR
AT~TATA-box	Promotor bölgelerde ortak cis-etkili eleman
CAAT - box	Promotor ve enhancer bölgelerde ortak cis-etkili eleman
TATA	Promotor ve enhancer bölgelerde ortak cis-etkili eleman
TATA - box	Transkripsiyon başlangıcında -30 civarında öz promotor eleman
A - box	Cis etkili düzenleyici eleman
CCGTCC - box	Meristeme özgü aktivasyonla alakalı cis-etkili düzenleyici eleman
CCGTCC - motif	Meristeme özgü aktivasyonla alakalı cis-etkili düzenleyici eleman

Çizelge 4.9 Gelişimle İlgili Elemanların Fonksiyonları

GELİŞİM İLE İLGİLİ ELEMANLAR	FONKSİYONLAR
AAGAA-motif	Endosperm ifadesinde görev alır
GCN4_motif	Endosperm ifadesinde görev alır
CCAAT-box	MYBHv1 bağlama bölgesi
CAT - box	Meristem ifadesinde görev alır
O2-site	Zein metabolizması regülasyonunda görev alır
circadian	Sirkadiyen kontrolde görev alır
AC-I	Ksileme özgü ifade de rol alır

Çizelge 4.10 Yer Bağlama İle İlgili Elemanların Fonksiyonları

YER BAĞLAMA İLE İLGİLİ ELEMANLAR	FONKSİYONLAR
Unnamed_1	60K protein bağlama yeri
AT-rich element	AT açısından zengin DNA bağlayıcı proteinin bağlanma bölgesi (ATBP-1)
Unnamed_6	SEF4 faktörü bağlama yeri
AT-rich sequence	maksimal elicitor aracılı aktivasyon için eleman (2 kopya)
CCAAT-box	MYBHv1 bağlama bölgesi
HD-Zip 3	Protein bağlama bölgesi
HD-Zip 1	Protein bağlama bölgesi
MBSI	MYB bağlanma bölgesinde bulunur. Ayrıca flavonoid biyosentetik gen regülasyonunda görev alır.

Çizelge 4.11 Diğer Elemanların Fonksiyonları

DİĞER ELEMANLAR	FONKSİYONLAR
Unnamed_4	Bilinmiyor
CTAG-motif	Cis etkili düzenleyici eleman
Myb	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
Myc	Bilinmiyor
STRE	Strese duyarlı eleman
as - 1	Strese duyarlı genlerin ekspresyonunu düzenlemek
CARE	Cis-etkili düzenleyici eleman
WRE3	Yaraya duyarlı eleman
MYB recognition site	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
AP - 1	Metallere duyarlı eleman
Myb-binding site	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
TCA	Bilinmiyor
MYB-like sequence	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
DRE core	Kuraklık tepkisinde rol alır
plant_AP-2-like	Yüksek transkripsiyon seviyesi sağlamakla görevli
ACTCATCCT sequence	Kuraklık tepkisinde rol alır
AACA-motif	Endosperm spesifik negatif ifadede rol alır
DRE1	Dehidrasyona duyarlı

4.10 Fasulyede Tanımlanan WOX Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri

Fasulyede bulunan WOX proteinlerinin hücre içi yerleşimleri çizelgede belirtildiği gibidir. WoLF SORT veri tabanından elde edilen bulgular ışığında Phvul-WOX-10 proteini hariç tüm proteinlerin mitokondri, kloroplast, sitoplazma gibi 14 farklı noktada yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Horton vd. 2007, Çizelge 4.12). Phvul-WOX-10 proteini diğerlerine göre 20 farklı noktada yerleşim göstermiştir.

Çizelge 4.12 Phvul-WOX Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimi

Proteinler	Hücre İçi Yerleşim	
	Wolf PSPOT	TargetP
Phvul-WOX-1	çek: 13, h.z: 1	M 0.600/4
Phvul-WOX-2	çek: 12, klo: 1, sito: 1	0.887/2
Phvul-WOX-3	çek: 14	0.885/2
Phvul-WOX-4	çek: 14	C 0.612/5
Phvul-WOX-5	çek: 13, klo: 1	0.797/3
Phvul-WOX-6	çek: 13, klo: 1	0.692/4
Phvul-WOX-7	çek: 10, sito: 2, klo: 1, pero: 1	C 0.799 /2
Phvul-WOX-8	çek: 13, klo: 1	0.883/2
Phvul-WOX-9	çek: 13, klo: 1	0.866/2
Phvul-WOX-10	çek: 9.5, sito_çek: 6, mito: 2, sito: 1.5, klo: 1	C 0.669/4
Phvul-WOX-11	çek: 7, sito: 5, klo: 1, cysk: 1	0.647/5
Phvul-WOX-12	çek: 9, klo: 1, sito: 1, h.z: 1, extr: 1, pero: 1	0.828/3
Phvul-WOX-13	çek: 9, sito: 2, h.z: 1, ekst: 1, cysk: 1	0.484/4
Phvul-WOX-14	çek: 13, h.z: 1	C 0.631/5
Phvul-WOX-15	çek: 10, klo: 1, sito: 1, extr: 1, cysk: 1	0.902/2
Phvul-WOX-16	çek: 9, mito: 3, h.z: 2	0.453/4
Phvul-WOX-17	golg: 5, sito: 3, klo: 1, çek: 1, mito: 1, h.z: 1, kof: 1, E.R.: 1	0.924/2
Phvul-WOX-18	çek: 7, klo: 3, pero: 2, sito: 1, extr: 1	0.547/4

Çek: Çekirdek; H.z.: Hücre zarı; Klo: Kloroplast; Sito: Sitoplazma; Pero: Peroksizom; Sito_Çek: Sitoplazma_Çekirdek; Mito: Mitokondri; Cysk: Sistein sentaz; Extr: Hücre dışı bölge; Golg: Golgi; Kof: Koful; E.R.: Endoplazmik retikulum.

4.11 MikroRNA'ların Analizi

miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotitten oluşan mRNA hedeflerinin kararlılığını veya translasyon potansiyelini değiştiren, transkripsiyon sonrası gen regulasyonunda önemli roller oynayan kısa, kodlamayan RNA'lardır (O'Brien vd. 2018). Günümüze dek yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların stres tepkisine aracılık etmek gibi görevler üstlendiği tespit edilmiştir (Leung ve Sharp 2010).

Phvul-WOX mikroRNA analizinden elde edilen sonuçlara göre toplam 56 bitki türünde 397 adet miRNA ailesi tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre en çok gen hedefleyen miRNA, miR167'dir. Jodder ve ark. (2018) tarafından domates üzerinde yapılan bir çalışmada miR167'nin farklı streslere karşı alternatif mekanizmalar geliştirdiği kanıtlanmıştır. Aynı zamanda çalışmada transgenik tütün bitkisi de kullanılarak çeşitli biyotik streslere karşı miR167 regulasyonunun farklı işleme mekanizmalarına sahip olduğu anlaşılmıştır (Jodder vd. 2018).

Çalışmamıza göre, tuz stresi ile ilişkili miRNA'lar ve hedeflenme sıklıklarına göre seçilen *Phvul*-WOX-9, *Phvul*-WOX-15 ve *Phvul*-WOX-16 genlerinin RNAseq dataaları ile uyumlu olduğu görülmüştür ve qPCR analizleri yapılarak değerlendirilmiştir. Bu üç *Phvul*-WOX genlerini hedefleme sıklıklarına göre; miR396'nın yapılan çalışmalar sonucunda bitki büyümesi ve gelişmesi ile strese karşı hayati bir direnç sergilediği görülmektedir (Yuan vd. 2019).

Gao ve ark. (2010) çeltik üzerine yaptıkları bir çalışmada miR396'nın aşırı ifadesinin tuz ve alkali stres toleransı ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır (Gao vd. 2010). Pegler ve ark. (2019) ise bitkiler üzerindeki iklim değişikliklerini ve miRNA'ların etkilerini değerlendirmek üzere yaptıkları bir çalışmada miR156 ve miR169'un tuz stresi ve çeşitli abiyotik stresler ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Pegler vd. 2019). Ayrıca miR171'in de tuz stresi ile ilişkisi açıklanmıştır (Stief vd. 2014; Kang vd. 2020; Vakilian 2020; Wang vd. 2020b).

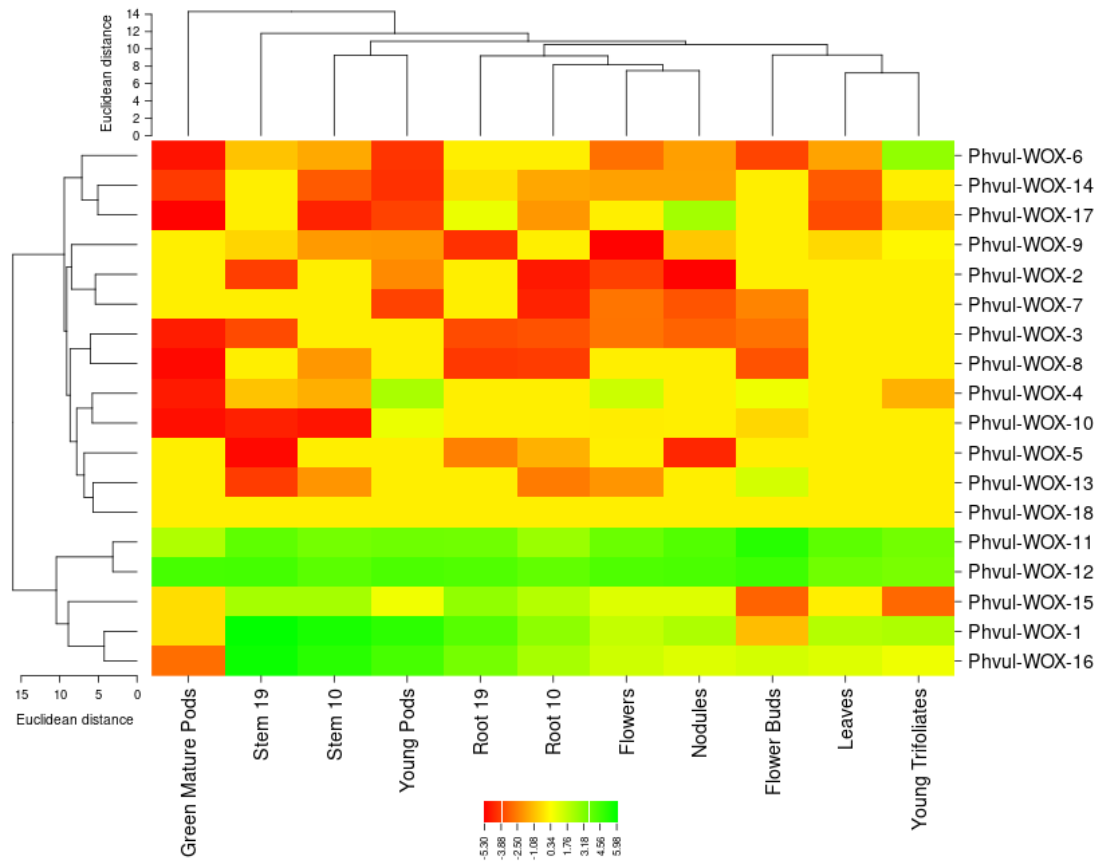
4.12 Sinteni Analizi

P. vulgaris ile *G. max* ve *A. thaliana* ‘da yapılan sinteni analizleri şekildeki gibidir. *P. vulgaris* ile *A. thaliana* bitkileri arasında sintenik ilişki tespit edilmiştir. WOX -17 ve -18 genlerinin AT5G59340 geniyle; WOX -15 geninin AT1G20700 geniyle; WOX -3 ve -14 genlerinin AT3G11260 ve AT5G05770 genleriyle; WOX -10 geninin AT2G33880 ve AT5G45980 genleriyle; WOX -6 geninin AT3G18010 geniyle; WOX -5 geninin AT2G17950 geniyle ve WOX -2 geninin AT5G17810 geni ile ortolog olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

P. vulgaris ile *G. max* türleri arasında da sintenik ilişkiler tespit edilmiştir. Özellikle yoğun olarak WOX-1 geni *Glyma.17G240300*, *Glyma.04G040900* ve *Glyma.06G041800* genleriyle; WOX-6 geni *Glyma.08G053700* ve *Glyma.05G245900* genleriyle; WOX-11 geni *Glyma.20G099400* ve *Glyma.10G289900* genleriyle; WOX-17 geni *Glyma.15G039600*, *Glyma.13G334900*, *Glyma.12G063900*, *Glyma.11G140400* ve *Glyma.07G131000* genleriyle; WOX-18 geni *Glyma.13G334900* geni ile ortolog olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca WOX -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12, -13, -14 ve -15 genlerinin de *G. max* türüne ait genlerle ortologları bulunmaktadır (Şekil 4.12). Aynı zamanda yapılan türler arası karşılaştırmalar ile synteny analysis sonuçlarının birbirini desteklediği ve doğrular nitelikte olduğu görülmüştür.

4.13 Fasulye WOX Genlerine Ait Doku-Spesifik mRNA Seviyelerinin Belirlenmesi

Fasulye WOX gen ailesinin dokuya özgü mRNA seviyelerinin tespiti için oluşturulan ısı grafiği yeşil olgun tohumlar, gövde 19, gövde 10, genç tohumlar, kök 19, kök 10, çiçekler, nodüller, çiçek tomurcukları, yapraklar ve genç üç yapraklılar olarak Phytozome veri tabanındaki FPKM (Fragments Per Kilobase Million) verileri kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan grafiğe göre *Phvul-WOX* -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -13, -14 ve -17 genlerinin mRNA ifade seviyelerinin bazı dokular hariç genel anlamda düşük olduğu belirlenmiştir. *Phvul-WOX* -1, -11, -12, -15 ve -16. genlerinin ise bazı dokular hariç diğer tüm dokulardaki mRNA ifade seviyesinin yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.13).

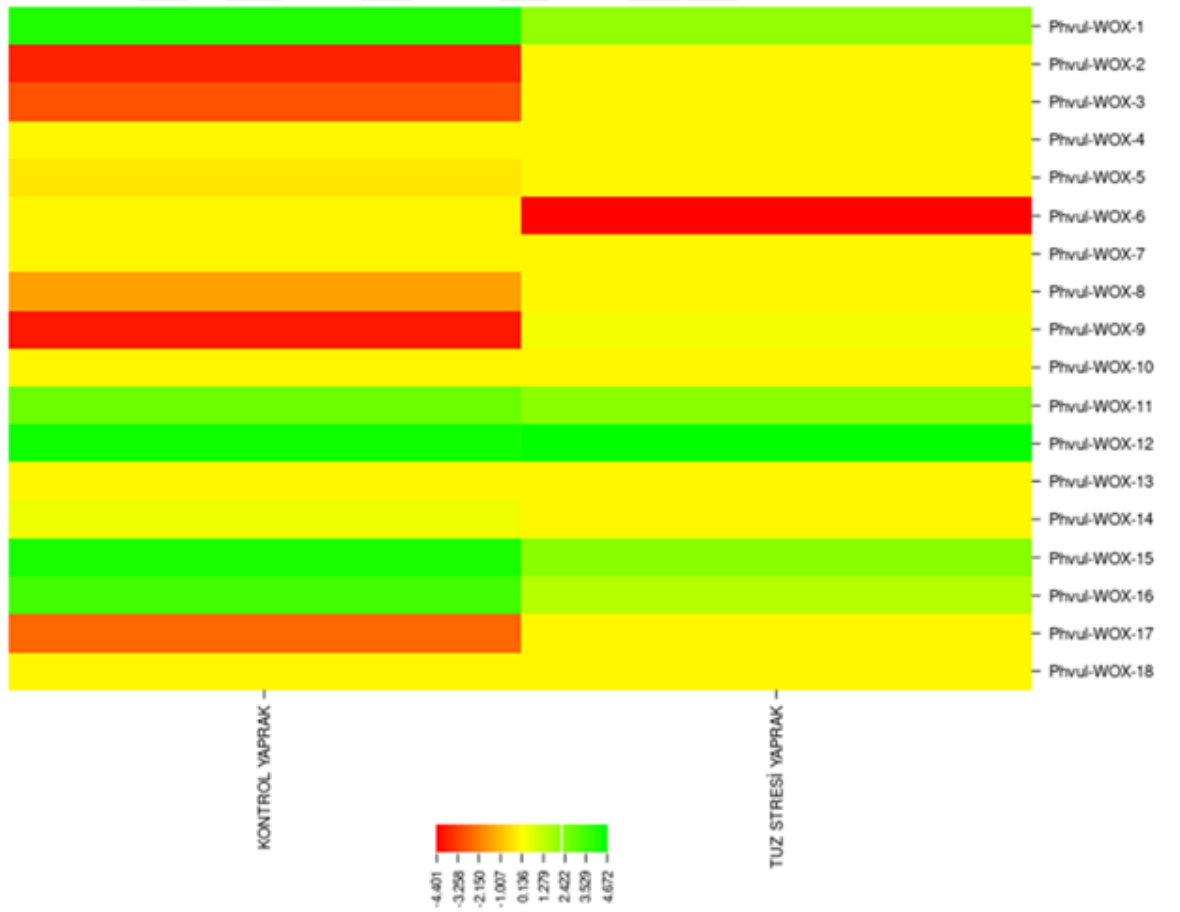


Şekil 4.13 *Phvul-WOX* Genlerinin Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri

Isı haritasını oluşturmak için PermutMatrix yazılımı ile ortalama ifade değerlerinin log2 dönüşümü kullanılmıştır. Stem 19: Ekimden 19 gün sonra; Stem 10: Ekimden 10 gün sonra; Root 19: Ekimden 19 gün sonra; Root 10: Ekimden 10 gün sonra

4.14 Fasulyede Tuz Stresi İle İlişkili WOX Genlerinin *İn Siliko* İfade Analizi

Fasulye WOX genlerinin tuz stresine ilişkin *in silico* ifade analizinin tespiti SRA (Sequences Read Archive) veri tabanından elde edilen SRR957668 ve SRR957667 kodlu tuz stresi uygulanmış yaprak ve kontrol yaprak RNAseq verileri kullanılarak görsel açıdan anlaşılır hale getirilmiştir. RNAseq verisinin analizinden elde edilen RPKM değerleriyle oluşturulan heatmap grafiğine göre bazı *Phvul*-WOX genlerinin ifade seviyeleri tuz stresi uygulaması ile farklılaştığı gözlenmiştir. Bu kapsamda tuz stresi uygulaması altında ifade seviyesinde artış gözlenen genler *Phvul*-WOX-2, -3, -5, -8, -9 ve -17'dir. Stres altında kontrole göre ifadesinde düşüş meydana gelen genler ise *Phvul*-WOX-1, -6, -11, -15 ve -16'dır. Kalan 7 adet genin ifade seviyesinde ise strese bağlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 *Phvul*-WOX Genlerinin *İn Siliko* İfade Seviyeleri

4.15 Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu SV Total RNA Isolation (Promega) kiti ile yapılmış olan ürünlerin kalitesi, saflık ve örnek miktarlarının tayini Thermo Nanospectrometer 2000 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin A_{260}/A_{280} değeri ~2.1 olmalıdır. Üç biyolojik tekrar ile izole edilen RNA örneklerinin Nanodrop ölçüm sonuçları çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 RNA İzolasyon Nanodrop Ölçüm Sonuçları

ÖRNEKLER	SAFLIK MİKTARI (A_{260}/A_{280})	ÖRNEK MİKTARI (ng/ μ l)
RNA-1 (Stres)	2.08	1430,1 ng/ μ l
RNA-2 (Stres)	2.11	1400,6 ng/ μ l
RNA-3 (Stresi)	2.17	1820,2 ng/ μ l
RNA-4 (Stres)	2.09	1452,9 ng/ μ l
RNA-5 (Stres)	2.01	298,2 ng/ μ l
RNA-6 (Stres)	2.07	342,3 ng/ μ l
RNA-7 (Kontrol)	2.18	1304,1 ng/ μ l
RNA-8 (Kontrol)	2.15	1547,3 ng/ μ l
RNA-9 (Kontrol)	2.09	2355,2 ng/ μ l
RNA-10 (Kontrol)	2.14	1832,0 ng/ μ l
RNA-11 (Kontrol)	2.16	1870,5 ng/ μ l
RNA-12 (Kontrol)	2.08	2250,0 ng/ μ l

4.16 cDNA sentezi

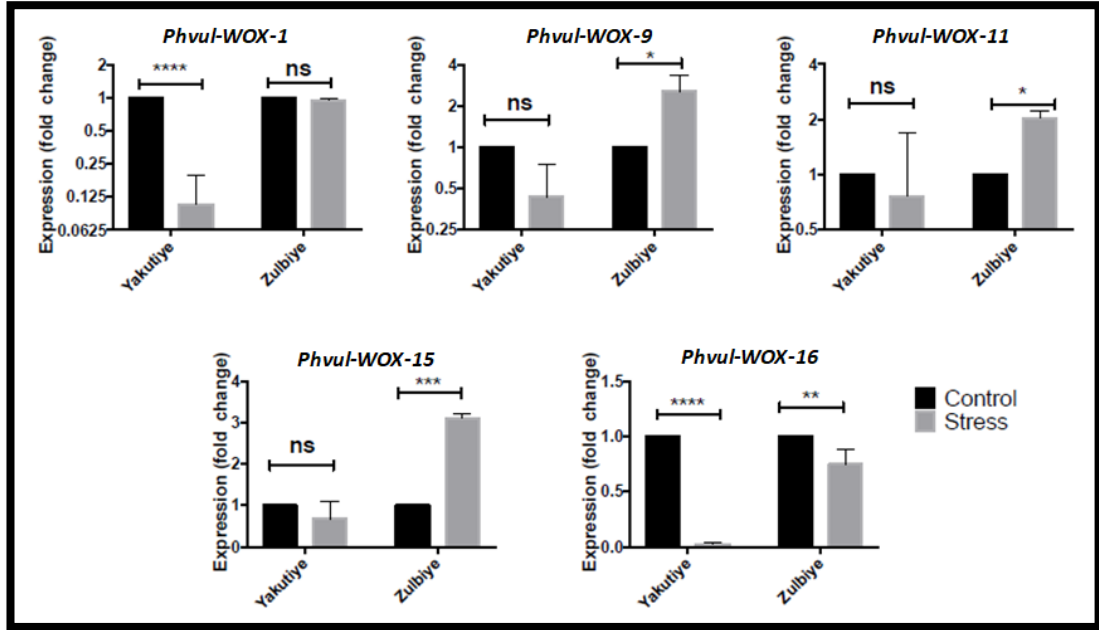
İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA kütüphanesi oluşturmak için iScript™ cDNA Synthesis Kit- Bio-Rad cDNA sentez kiti kullanılmıştır. cDNA sentezi sonunda örnekler 1/5 oranında seyreltilmiştir. Ürünlerin saflık ve örnek miktarlarını Thermo Nanospectrometer 2000 cihazı ile ölçülerek saptanmıştır. cDNA örneklerinin saflık miktarı ~1.8 olmalıdır. cDNA sentezi nanodrop sonuçları çizelge 4.14’te verilmiştir.

Çizelge 4.14 cDNA Sentezi Nanodrop Ölçüm Sonuçları

ÖRNEKLER	SAFLIK MİKTARI (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	ÖRNEK MİKTARI (ng/ µl)
cDNA-1 (Stres)	1.85	210,9 ng/ µl
cDNA-2 (Stres)	1.79	229,1 ng/ µl
cDNA-3 (Stres)	1.87	251,6 ng/ µl
cDNA-4 (Stres)	1.85	221,2 ng/ µl
cDNA-5 (Stres)	1.84	246,2 ng/ µl
cDNA-6 (Stres)	1.83	246,1 ng/ µl
cDNA-7 (Kontrol)	1.85	244,7 ng/ µl
cDNA-8 (Kontrol)	1.85	225 ng/ µl
cDNA-9 (Kontrol)	1.84	226,3 ng/ µl
cDNA-10 (Kontrol)	1.85	222,4 ng/ µl
cDNA-11 (Kontrol)	1.85	225,1 ng/ µl
cDNA-12 (Kontrol)	1.85	234,1 ng/ µl

4.17 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılan Fasulye Çeşitlerinde WOX Genlerinin mRNA Düzeyleri

Phvul-WOX genlerinin rollerini keşfetmek için 9 günlük bir süre boyunca 150 mM tuz stresine maruz bırakılmıştır. RNAseq verilerine dayanarak belirlenen genlerin primerleri tasarlanarak qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar şekil 4.15'te gösterilen grafikler olarak verilmiştir. *Phvul-WOX* 'un olası gen ifade farklılıklarını belirlemek için biri toleranslı (Yakutiye) diğeri hassas (Zülbiye) iki adet fasulye çeşidi kullanarak qPCR analizleri yapılmıştır. qPCR reaksiyonlarına göre; Yakutiye çeşidinde tüm genlerin ifade seviyeleri kontrole göre düşüş gösterirken, bu düşüşlerin istatistiki olarak anlamlılık ifade ettiği genler *Pvul-WOX-1* ve *Pvul-WOX-16* iken, diğer genlerin kontrole göre ifade seviyelerinde gözlenen düşüşler anlamlılık teşkil etmediği saptanmıştır. Bunun aksine Zülbiye bitkisinde *Phvul-WOX-9*, *Phvul-WOX-11* ve *Phvul-WOX-15* genlerinin ifade seviyelerinin tuz stresine bağlı istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenirken, Diğer *Phvul-WOX-1* geni tuz stresinden etkilenmez, *Pvul-WOX-16* geni ifade seviyesinde tuz stresi ile birlikte istatistiki olarak anlamlı fakat göreceli olarak az düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 150 mM NaCl Stresine Maruz Bırakılan Fasulye Çeşitlerinde WOX Genlerinin mRNA Düzeyleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler sesil doğaları gereği çevreleriyle devamlı olarak etkileşim halinde olan canlılardır. Etkileşim kurduğu etmenlerin bazılarının faydaları olduğu kadar zararları da yadsınamaz. Larcher (1995), bitkilerin bu etkileşimler çerçevesinde karşı karşıya kaldığı faktörleri biyotik ve abiyotik faktörler olarak ikiye ayırmıştır. Biyotik faktörler; bitkilerin, bazı mikroorganizmaların (bakteri, fungus ve virüs), antropogenik origin (toprak kirlenmesi, agrokimyasal, yangın vb.) ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan stres faktörleri iken, abiyotik faktörler; sıcaklık, su, radyasyon, minerallerin eksikliği-fazlalığı ve birtakım mekanik etkiler sonucu oluşan stres faktörleridir (Larcher 1995).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında *Phaseolus vulgaris* türünde bulunan *WOX* gen ailesinin birtakım biyoinformatik veri tabanları ve programlar kullanılarak genom boyutunda tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fasulye genomunda toplam 18 adet *WOX* geni tespit edilmiş olmakla birlikte isimlendirilmeleri '*Phvul-WOX*' şeklinde yapılmıştır. *WOX* gen ailesinin daha önce farklı türlerde genom düzeyinde tanımlanması ve karakterizasyonu için gerçekleştirilen çalışmalarda bugüne dek Haecker ve ark. (2004) *Arabidopsis thaliana*'da 12, Zhang ve ark. (2010) *Arabidopsis thaliana*'da 15, *Populus trichocarpa*'da 12, *Zea mays*'da 21, *Oryza sativa*'da 13 ve *Sorghum bicolor*'da 11, Hedman ve ark. (2013) kozalaklı *Picea abies*'de 11, Rahman ve ark. (2017) *Ananas comosus* L.'de 10, Hao ve ark. (2019) *Glycine max*'de 33, Wang ve ark. (2019a) *Camellia sinensis*'de 18, Li ve ark. (2019) *B. rapa*'da 25, *B. oleracea*'da 29 ve *B. napus*'ta 52, Tang ve ark. (2020) *Physic nut*'da 12, Li ve ark. (2020a) *Olyra latifolia*'da 12, *Raddia guianensis*'da 9, *Guadua angustifolia*'da 18, *Phyllostachys edulis*'da 27 ve *Bonia amplexicaulis*'da 26, Gu ve ark. (2020) *Cucumis sativus*'da 11, Li ve arkadaşları (2020b) *Triticum aestivum*'da 14 *WOX* geni tanımlanmıştır (Haecker vd. 2004, Zhang vd. 2010, Hedman vd. 2013, Rahman vd. 2017, Hao vd. 2019, Wang vd. 2019a, Li vd. 2019, Tang vd. 2020, Li vd. 2020a, Gu vd. 2020, Li vd. 2020b).

WOX genlerinin kromozom dağılımları 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 ve 11 şeklindedir. 3, 6, 7 ve 11. kromozomlarda birer, Scaffold kromozomunda birer, 4 ve 9. kromozomlarda ikişer, 1, 2 ve 8. kromozomlarda üçer adet *Phvul*-WOX geni bulunmaktadır.

Fasulyede tanımlanan WOX proteinlerinin uzunlukları 177 ile 394 amino asit, moleküler ağırlıkları 20.5 ile 43.1 kDa, izoelektrik noktalarının hem asidik hem de bazik bölgede bulunduğu ve 5,12 ile 9,26 arasında değiştiği görülmüştür. *Cucumis sativus*'da WOX proteinlerinin uzunlukları 130 ile 387 aminoasit, moleküler ağırlıkları 14.66 ile 41.11 kDa, izoelektrik noktalarının ise 5,54 ile 10,08 arasında belirlenmiştir (Gu vd. 2020). *Glycine max*'de WOX proteinlerinin uzunlukları 174 ile 403 amino asit, moleküler ağırlıklarının 20.08 ile 43.91, izoelektrik noktalarının ise 5,58 ile 10,07 arasında belirlenmiştir (Hao vd. 2019). *Jatropha curcas*'da WOX proteinlerinin uzunlukları 190 ile 410 amino asit, moleküler ağırlıklarının 21.7 ile 45.2 kDa, izoelektrik noktalarının ise 5,15 ile 9,51 arasında belirlenmiştir (Tang vd. 2020). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda WOX proteinlerinin hem asidik ve bazik karaktere hem de değişen büyüklüklerde boyutlara sahip olabileceği söylenebilir.

WOX gen ailesinde oluşturulan filogenetik ağaçların WUS (modern), orta (intermediate) ve eski (antik) olmak üzere üç sınıfa ayrıldığı belirlenmiştir. *P. vulgaris*, *A. thaliana* ve *G. max* türlerinde bulunan WOX genlerinin akrabalık ve evrimsel yakınlığını belirlemek amacıyla filogenetik ağaç oluşturulmuştur. *Phvul*-WOX genlerinin de oluşturulan filogenetik ağaçta aynı şekilde üç sınıfa ayrıldığı tespit edilmiştir. *Phvul*-WOX -1, -3, -4, -5, -6, -9, -13, -14, -16, -17 ve -18 genlerinin WUS sınıfı, *Phvul*-WOX -2, -7, -8 ve -10 genlerinin orta sınıfı ve *Phvul*-WOX -11, -12 ve -15 genlerinin ise antik sınıfı oluşturduğu saptanmıştır. *Picea abies*'de (Hedman vd. 2013), *Nicotiana tobacum*'da (Zhou vd. 2018), *Pinus pinaster*'da (Alvarez vd. 2018) *Glycine max*'de (Hao vd. 2019), *Camellia sinensis*'de (Wang vd. 2019a), *Juglans regia* L.'de (Chang vd. 2020), *Triticum aestivum*'da (Li vd. 2020b), *Bambusoideae* ailesinde (Li vd. 2020a), *Cucumis sativus* L.'de (Gu vd. 2020), *Apostasia shenzhenica*'da (Ramkumar vd. 2020), *Jatropha curcas*'da (Tang vd. 2020) gerçekleştirilen filogenetik analizlerde de WOX gen ailesi üyelerinin WUS, orta ve eski olmak üzere 3 grup altında kümelendiği saptanmıştır.

Korunmuş bölgeleri tespit etmek için MEME veri tabanı kullanılarak WOX proteinlerinin taşıdıkları motifler belirlenmiştir. *Phvul-WOX* gen ailesinde saptanan 20 farklı korunmuş bölge (motif) belirlenmiştir. Bu motiflerden 3 tanesi ağırlıktadır. Motif sayıları çoğunlukla 1, 2 ve 5. motiflerin olduğu, diğer motiflerin ise 4'ten aşağıda bir miktara sahip olduğu tespit edilmiştir. Motiflerin amino asit uzunlukları 10 ile 50 arasında değişiklik göstermektedir. *Camelia sinensis*'de 6 farklı motifin 2 tanesi (Wang vd. 2019a), *Glycine max*'de 10 farklı motifin 3 tanesi (Hao vd. 2019), *Salix suchowensis*'de 20 farklı motifin 3 tanesi (Wang vd. 2019b), *Juglans regia* L.'de 10 farklı motifin 3 tanesi (Chang vd. 2020) ağırlıktadır.

Yapılan çalışmalar; gen duplikasyon olayları birbirleriyle benzer olan genlerin açıklanmasını sağlayarak, gen ailelerinin genişlemesi ve büyümesinde önemli faktörlerin başında geldiğini bildirmektedir (Cannon vd. 2004). Bir gen ailesindeki genlerin çoklu kopyaları, bütün genom tandem ve segmental duplikasyonlarının sağladığı esneklik nedeniyle gelişebilir. WOX proteinleri için gen duplikasyon çalışmalarının yapıldığı pek çok yayın mevcuttur (Wang vd. 2019b, Hao vd. 2019, Ramkumar vd. 2020). Belirlenen gen ailesinin genişlemesini tanımlamak için Darwinian pozitif seçiminin, genlerin ayrışmasında ve çoğaltılmasındaki ilişkisine bakılmıştır. Bu ilişkiyi yorumlamak için benzer olmayan (K_a) ve benzer (K_s) değişim oranları (K_a/K_s), tandem-segmental duplikasyona uğramış gen çiftleri ve ortolog gen çiftleri için hesaplanmıştır. Duplike olmuş WOX genlerinin K_a/K_s oranlarının <1 güçlü saflaştırıcı seçim baskısı altında oldukları öngörülmüştür.

Gen duplikasyonlarının önemli fonksiyonlarından bir diğeri ise proteinlerde yeni fonksiyonların evrimini sağlamasıdır (Kondrashov vd. 2002). Fasulye genomunda segmental duplikasyon tespit edilen genlerin homolog olmayan (K_a), homolog olan (K_s) ve K_a/K_s değişim oranları hesaplanarak, WOX gen ailesi içerisindeki evrimsel yayılmalar değerlendirilmeye çalışılmıştır. Farklı türler arasında gerçekleşen gen duplikasyonlarının da değişim oranları saptanmıştır. *P. vulgaris*'deki WOX genlerinin ortologu olan *A. thaliana*'dan ilk ayrılmanın *Phvul-WOX-6* geni tarafından olduğu ve 277 MYÖ önce başladığı, en sonki ayrılmanın ise *Phvul-WOX-3* geni tarafından olduğu ve 14,5 MYÖ gerçekleştiği saptanmıştır. *P. vulgaris*'deki WOX genlerinin bir diğer ortologu *G.*

max'den ilk ayrılmanın *Phvul-WOX-17* geni tarafından olduğu ve 429 MYÖ önce başladığı, en sonki ayrılmanın ise *Phvul-WOX-6* geni tarafından olduğu ve 1,69 MYÖ gerçekleştiği saptanmıştır. *Phvul-WOX* genlerinin segmental duplikasyonları incelendiğinde ilk gen ayrılmasının 28 MYÖ gerçekleştiği ve *WOX-16* ile *WOX-14* genleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, fasulye genomunun *WOX* genleri bakımından kuvvetli bir seleksiyona uğradığı yorumunu getirebilir.

Phaseolus vulgaris türünde 81 adet cis element tespit edilmiş olup ışığa duyarlı elemanlar, hormona duyarlı elemanlar, çevresel stresle ilişkili elemanlar, gelişim ile ilgili elemanlar, promotor ile ilgili elemanlar, yer bağlama ile ilgili elemanlar ve diğer elemanlar olmak üzere 8 ana başlık altında toplanmıştır. Diğer çalışmalarda; *Glycine max*'de 53 (Hao vd. 2019), *Juglans regia* L.'de 37 (Chang vd. 2020), *Pyrus bretschneideri*, *Prunus persica*, *Prunus mume* ve *Fragaria vesca* türlerinde 55 (Cao vd. 2017) ve *Camellia sinensis*'de 23 (Wang vd. 2019a) adet cis element tespit edilmiştir. Fasulyede tespit edilen cis elementler diğer türlere nazaran sayıca daha fazladır.

Hedeflenen *Phvul-WOX-1*, *Phvul-WOX-9*, *Phvul-WOX-11*, *Phvul-WOX-15* ve *Phvul-WOX-16* genlerinin miR156, miR159, miR169, miR171, miR319 ve miR396 ailelerinin tuz stresi ile ilişkisi hem transkriptom hem de qPCR verilerine göre değerlendirilmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalara göre; hedeflenen *WOX* genlerine ait miR156, miR159, miR169, miR171, miR319 ve miR396 ailelerinin tuz stresine yanıt verdiği tespit edilmiştir (Buyuk vd. 2016, Büyük vd. 2019). Buradan sonuçla miRNA'ların hedeflenen *WOX* gen ailesinin düzenlenmesinde oldukça önemli roller oynadığını göstermiştir.

Bu tez çalışmasında; 150 mM tuz stresi uygulanmış 2 farklı fasulye bitkisinde tuz stresi ile ilişkili olduğu düşünülen *WOX* gen ailesinin birtakım biyoinformatik veri tabanları ve programlarının kullanımı ile detaylı analizi ve bu yolla belirlenen genlerin yapraktaki mRNA ifade seviyelerinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Çalışılan çeşitlerin biyokimyasal ve moleküler özelliklerinden de faydalanılmak suretiyle hedeflenen genlerin tuz stresine karşı oluşturduğu ifade seviyeleri karşılaştırılmıştır. Belirlenen gen ailesinin tuz stresine karşı nasıl bir cevap oluşturacağı qRT-PCR tekniği kullanılarak bakılmıştır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışılan *WOX* genlerinin ifade seviyelerinin tuz stresine bağlı olarak kontrole göre farklılaştığı gözlenmektedir. Ayrıca bu farklılaşmanın strese karşı dayanımları farklı olan iki farklı fasulye çeşidi arasında da belirgin şekilde değişiklik gösterdiği göze çarpmaktadır. 150 mM NaCl stresi uygulamasına bağlı olarak çalışılan tüm genlerin ifade seviyeleri Yakutiye çeşidinde kontrole göre düşüş gösterirken, bu düşüşlerin istatistiki olarak anlamlılık ifade ettiği genler ise *Phvul-WOX-1* ve *Phvul-WOX-16*'dır. Diğer genlerin ifade seviyelerindeki kontrole göre gözlenen düşüşler istatistiki olarak anlamlı bulunmadığı için, Yakutiye bitkisinde bu genlerin ifade seviyelerinin tuz stresinden etkilenmediği düşünülmektedir.

Ancak Zülbiye bitkisinde bu durum daha farklı olarak karşımıza çıkmaktadır. Zülbiye bitkisinde Yakutiye bitkisinin aksine *Phvul-WOX-9*, *Phvul-WOX-11* ve *Phvul-WOX-15* genlerinin ifade seviyelerinin tuz stresine bağlı istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmektedir. Diğer taraftan *Phvul-WOX-1* geni tuz stresinden etkilenmez iken, *Phvul-WOX-16* geni ifade seviyesinde tuz stresi ile birlikte istatistiki olarak anlamlı fakat göreceli olarak az düşüş tespit edilmiştir. Strese karşı dayanımları farklı olan iki fasulye çeşidinde çalışılan genlerin ifade seviyelerinin de farklı profiller sergiliyor olması, *Phvul-WOX* genlerinin tuz stresine karşı olan cevapta ve adaptasyonda rol oynayabileceğini gözler önüne sermektedir (Şekil 4.16).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında;

- (1) *Phaseolus vulgaris* türüne ait *WOX* genlerinin biyoinformatik veri tabanları ve programlarla tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- (2) Hedeflenen genlerin iki farklı fasulye çeşidine tuz stresi muamelesi sonrası mRNA ifade değişimleri incelenmiştir.
- (3) Belirlenen genlerin birtakım araçlar ve qPCR verileri sonrası tuz stresi ile ilişkisinin olduğu kanısına varılmıştır.

Abiyotik stresle mücadele kapsamında ilgili genler ve mekanizmaların aydınlatılması bitki biyoteknolojisi sahasında yapılması beklenen çalışmalar arasındadır. Abiyotik stresle mücadele etmek ve transgenik ürünlerin oluşturulabilmesi için stresten sorumlu genlerin tanımlanması, karakterizasyonu ve ifade düzeylerinin tespiti gerekmektedir. Buradan hareketle gerçekleştirilen tez çalışmasında embriyonik modelleme ve embriyonik gelişim, kök hücre bakımı, organ oluşumu, tohum oluşumu ve izole edilen doku ve organların yenilenmesi gibi bitki hücresi için oldukça önemli WOX gen ailesi detaylı bir biçimde incelenmekle birlikte belirlenen üyelerin tuz stresine karşı oluşturduğu cevaplar değerlendirilmiştir. *Phaseolus vulgaris* türünde ilk defa yürütülen bu çalışma, bitki biyoteknolojisi ve moleküler biyoloji sahalarında araştırma yapan bilim insanlarına literatür için önemli bir kaynak oluşturabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Almeida DM, Oliveira MM, Saibo NJM. 2017. Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genet Mol Biol* 40: 326–345.
- Alvarez, J. M., Bueno, N., Cañas, R. A., Avila, C., Cánovas, F. M., & Ordás, R. J. 2018. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in *Pinus pinaster*: New insights into the gene family evolution. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 304-318.
- Amarowicz R, Pegg RB. 2008. Legumes as a source of natural antioxidants. *Eur J Lipid Sci Technol*. 110:865-878.
- Amin, I., Rasool, S., Mir, M. A., Wani, W., Masoodi, K.Z., Ahmad, P. 2020. Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: a molecular approach, *Physiologia Plantarum*, 10.1111/ppl.13185, 0, 0.
- An Y, Yang XX, Zhang L, Zhang J, Du B, Yao L, Li XT, Guo C. 2020. Alfalfa MsCBL4 enhances calcium metabolism but not sodium transport in transgenic tobacco under salt and saline–alkali stress. *Plant Cell Rep* 24: 1–5
- Anonim 2020a. Fasulye Yetiştiriciliği. MEB Web Sitesi: <http://hbogm.meb.gov.tr/>. Erişim Tarihi: 07.11.2020.
- Anonim 2020b. TÜİK Web Sitesi: <https://www.tuik.gov.tr/>. Erişim Tarihi: 08.11.2020.
- Anonim 2020c. Türkomp Web Sitesi: <http://www.turkomp.gov.tr/>. Erişim tarihi: 08.11.2020.
- Anonymous. 2020. FAOSTAT Web Sitesi: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Erişim Tarihi: 08.11.2020.
- Arroyo-Herrera A, Gonzalez AK, Moo RC, Quiroz-Figueroa F, Loyola- Vargas V, Rodriguez-Zapata L, Burgeff D'Hondt C, Suárez-Solís VM, Castano E. 2008. Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora*, causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 94:171–180.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., . . . Gasteiger, E. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, 40(W1), W597-W603.
- Aune D, De Stefani E, Ronco A, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Acosta G, et al. 2009. Legume intake and the risk of cancer: a multisite case-control study in Uruguay. *Cancer Causes Control*.20:1605-1615.

- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., Li, W.W. 2006. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.*, 34: W369-W373.
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., ... & van der Lelie, D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology*, 22(5), 583-588.
- Basu S, Kumar A, Benazir I, Kumar G. 2020. Reassessing the role of ion homeostasis for improving salinity tolerance in crop plants. *Physiol Plant*.
- Berglund-Brücher, O. & Brücher, H. 1976. The South American wild bean (*Phaseolus aborigineus* Burk.) as ancestor of the common bean. *Economic Botany* 30(3), 257-272.
- Bhargava S, Sawant K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*. 2013; 132:21–32.
- Bilas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K., & Kononowicz, A. K. (2016). Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 269-287.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G. & Papa, R. 2012. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(14), 788-796.
- Blair, M.W., Giraldo, M.C., Buendia, H.F., Tovar, E., Duque, M.C. & Beebe, S.E. 2006. Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 113(1), 100-109.
- Bouchabké-Coussa O, Obellianne M, Linderme D, Montes E, Maia- Grondard A, Vilaine F, Pannetier C. 2013. Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured in vitro. *Plant Cell Rep* 32:675–686
- Bray, E. A. 2001. *Plant Response to Water-deficit Stress*. e LS.
- Brivanlou, A. H., & Darnell, J. E. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, 295(5556), 813-818.
- Brown, J., Pirrung, M., & McCue, L. A. (2017). FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*, 33(19), 3137-3139.
- Brücher, H. 1988. The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. In *Genetic resources of Phaseolus beans* (pp. 185-214). Springer, Dordrecht.

- Burkart, A. & Brücher, H. 1953. *Phaseolus aborigineus* Burkart, die mutmassliche andine Stammform der Kulturbohne. *Theoretical and Applied Genetics* 23(3), 65-72
- Buyuk I, Inal B, Ilhan E, Tanriseven M, Aras S, Erayman M. 2016. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean. *Mol Biol Rep* 43:1251–1266.
- Büyük, İ., 2014, Tuz Ve Kuraklık Stresi Altında Geliştirilmiş Farklı Fasulye (*Phaseolus Vulgaris* L.) Çeşitlerinde Lea-3 Geni mRNA İfade Seviyelerinin Kantitatif Real-Time Pcr Yöntemiyle İncelenmesi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 133s.
- Büyük, İ., İlhan, E., Şener, D. et al. 2019. Genome-wide identification of CAMTA gene family members in *Phaseolus vulgaris* L. and their expression profiling during salt stress. *Mol Biol Rep* 46, 2721–2732.
- Cannon, S.B., Mitra, A., Baumgarten, A. et al. 2004. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 4, 10.
- Cao, Y., Han, Y., Meng, D., Li, G., Li, D., Abdullah, M., ... & Cai, Y. 2017. Genome-wide analysis suggests the relaxed purifying selection affect the evolution of WOX genes in *Pyrus bretschneideri*, *Prunus persica*, *Prunus mume*, and *Fragaria vesca*. *Frontiers in genetics*, 8, 78.
- Chaitanya, K.V., Rama Krishna, Ch., Venkata Ramana, G. and Khasim Beebi, S.K. 2014. Salinity Stress and Sustainable Agriculture- A Review. *Agri. Reviews*. 35 (1): 34-41.
- Chan, K.X., Phua, S.Y., Crisp, P., McQuinn, R., and Pogson, B.J. 2016. Learning the languages of the chloroplast: retrograde signaling and beyond. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 25–53.
- Chang, Y., Song, X., Zhang, Q., Liu, H., Bai, Y., Lei, X., & Pei, D. 2020. Genome-Wide Identification of WOX Gene Family and Expression Analysis during Rejuvenational Rhizogenesis in Walnut (*Juglans regia* L.). *Forests*, 11(1), 16.
- Che-Othman, M.H., Millar, A.H., and Taylor, N.L. 2017. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants. *Plant Cell Environ.* 40, 2875–2905.
- Chen SK, Kurdyukov S, Kereszt A, Wang XD, Gresshoff PM, Rose RJ. 2009. The association of homeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula*. *Planta* 230:827–840
- Chen, R., Xu, N., Yu, B., Wu, Q., Li, X., Wang, G., & Huang, J. 2020. The WUSCHEL-related homeobox transcription factor OsWOX4 controls the primary root elongation by activating OsAUX1 in rice. *Plant Science*, 298, 110575.

- Cheng, S., Huang, Y., Zhu, N., & Zhao, Y. 2014. The rice WUSCHEL-related homeobox genes are involved in reproductive organ development, hormone signaling and abiotic stress response. *Gene*, 549(2), 266-274.
- Christenhusz, M. J. M.; Byng, J. W. 2016. "The number of known plants species in the world and its annual increase". *Phytotaxa*. 261 (3): 201–217.
- Clancy, S., & Shaw, K. M. (2008). DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders.
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2), W155-W159.
- Dai A. 2012. Drought under global warming: a review. *Wires Clim Chg*. 2:45–65.
- De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., ... & Casquero, P. A. (2015). Common bean. In *Grain Legumes* (pp. 1-36). Springer, New York, NY.
- Deshpande, U. S.; Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., Deshpande, S. S., Eds. 1991. Legumes. In *Foods of Plant Origin*; AVI Books, Van Nostrand Reinhold: New York.
- Dillard, H. R and Legard, D. E. 1991. Bacterial diseases of beans. Fact Sheet Page: 729.5. Cornell University Cooperative Extension.
- Ding, A., Marowa, P. & Kong, Y. 2016. Genome-wide identification of the expansin gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Mol Genet Genomics* 291, 1891–1907.
- Edreva, A., I. Yordanov, R. Kardjieva, E. Gesheva, 1998. Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biol. Plant.*, 41,185-191.
- Ekinci, A. S. 1976. Özel Sebzeçilik. 2. Baskı. s:315.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols*, 2(4), 953.
- Fang, G., Bhardwaj, N., Robilotto, R., & Gerstein, M. B. (2010). Getting started in gene orthology and functional analysis. *PLoS Comput Biol*, 6(3), e1000703.
- Flowers, T.J.; Colmer, T.D. 2015. Plant salt tolerance: Adaptations in halophytes. *Ann. Bot.* 115, 327–331.
- Fraile-Escanciano A, Kamisugi Y, Cuming AC, Rodríguez-Navarro A, Benito B. 2010. The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in planta. *New Phytol* 188: 750–761

- Freyre, R., Rios, R., Guzman, L., Debouck, D.G. & Gepts, P. 1996. Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp. (Fabaceae) in Bolivia. *Economic Botany* 50(2), 195-215.
- Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Li, Y., Cai, H., . . . Zhu, Y. (2010). Over-expression of osa-MIR396c decreases salt and alkali stress tolerance. *Planta*, 231(5), 991-1001.
- Garden-Robinson, J. 2019. All about beans. North Dakota State University. 16s.
- Gentry, H.S. 1969. Origin of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Economic Botany* 23(1), 55-69.
- Goodstein, D. M., S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R. D. Hayes, J. Fazo, T. Mitros, W. Dirks, U. Hellsten, N. Putnam & D. S. Rokhsar. 2012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40(D1), D1178-D1186.
- Grime JP. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *Am Nat* 111:1169–1194.
- Gu, R., Song, X., Liu, X. et al. 2020. Genome-wide analysis of CsWOX transcription factor gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Sci Rep* 10, 6216.
- Guo, A., Zhu, Q., Chen, X., Luo, J. 2007. GSDS: a gene structure display server. *Yi Chuan= Hereditas*, 29 (8): 1023-1026.
- Güler NS, Saglam A, Demiralay M, Kadioglu A. 2012. Apoplastic and symplastic solute concentrations contribute to osmotic adjustment in bean genotypes during drought stress. *Turk J Biol* 36:151–160.
- Gülümser, A. 2016. Dünyada ve Türkiye’de Yemeklik Dane Baklagillerin Durumu, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi. 292-298.
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T. 2004. Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 131(3):657-68.
- Hagedorn, D. J. and Inglis, D. A. 1986. Handbook of bean diseases. A3374. University of Wisconsin-Extension.
- Hao Q, Zhang L, Yang Y, Shan Z, Zhou XA. 2019. Genome-Wide Analysis of the WOX Gene Family and Function Exploration of GmWOX18 in Soybean. *Plants (Basel)*. 8(7):215.
- Harbison, C.T., Gordon, G.T., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W. et al. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome *Nature*, 431.

- He, X., Zhu, L., Xu, L. et al. 2016. GhATAF1, a NAC transcription factor, confers abiotic and biotic stress responses by regulating phytohormonal signaling networks. *Plant Cell Rep* 35, 2167–2179.
- Hedman, H., Zhu, T., von Arnold, S. et al. 2013. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEBOX gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *BMC Plant Biol* 13, 89.
- Hegay, S. 2013. Diversity of Beans grown in Kyrgyzstan and Marker-aided Breeding for Resistance to Bean Common Mosaic Virus and Anthracnose, Doctoral Thesis No. 2013:35 Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Science
- Hernández, J.A.; Almansa, M.S. 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea plants. *Physiol. Plant.* 115, 251–257.
- Hirt H, Shinozaki K, editors. 2004. Plant responses to abiotic stress. Germany: Springer.
- Hiz, M.C., Canher, B., Niron, H., Turet, M. 2014. Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. *PLoS ONE* 9: e92598
- Holland, B.; Welch, A. A.; Unwin, I. D.; Buss, D. H.; Paul, A. A.; Southgate, D. A. T. 1991. McCance and Widdowson's The Composition of Foods, 5th ed.; The Royal Society of Chemistry: Letchworth, U.K.
- Hong, J. C. 2016. General aspects of plant transcription factor families. In *Plant transcription factors* (pp. 35-56). Academic Press.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W585-W587.
- Ilhan E, Buyuk I, Inal B. 2018. Transcriptome—scale characterization of salt responsive bean TCP transcription factors. *Gene* 642:64–73.
- Inal B, Buyuk I, Ilhan E, Aras S. 2017. Genome-wide analysis of *Phaseolus vulgaris* C2C2-YABBY transcription factors under salt stress conditions. *3 Biotech* 7(5):302.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Somasundaram R, Panneerselvam R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol.* 11:100–5.
- Jan, S. U., Jamil, M., Bhatti, M. F., & Gul, A. 2019. Hallmark Attributes of Plant Transcription.

- Jenkins DJA, Kendall CWC, Augustin LSA, Mitchell S, Sahye-Pudaruth S, Mejia SB, et al. 2012. Effect of legumes as part of a low glycemic index diet on glycemic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med*.
- Jha, P., Ochatt, S.J. & Kumar, V. 2020. WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling. *Plant Cell Rep* 39, 431–444.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Kong, L., Luo, J., & Gao, G. (2016). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic acids research*, gkw982.
- Jodder, J., Das, R., Sarkar, D., Bhattacharjee, P., & Kundu, P. (2018). Distinct transcriptional and processing regulations control miR167a level in tomato during stress. *RNA biology*, 15(1), 130-143.
- Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., Theisen, J. W., & Kadonaga, J. T. (2008). The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription. *Current opinion in cell biology*, 20(3), 253-259.
- Kadioğlu, A. 2004. *Plant Physiology, Practice Guide*. Trabzon, Turkey
- Kang, T., Yu, C.-Y., Liu, Y., Song, W.-M., Bao, Y., Guo, X.-T., . . . Zhang, H.-X. (2020). Subtly manipulated expression of ZmMiR156 in tobacco improves drought and salt tolerance without changing the architecture of transgenic plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1664.
- Kaplan, L. 1956. The cultivated beans of the prehistoric Southwest. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 43(2), 189-251.
- Kaplan, L., & MacNeish, R. S. 1960. Prehistoric bean remains from caves in the Ocampo region of Tamaulipas, Mexico. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 19(2), 33-56.
- Kaplan, L. & Lynch, T.F. 1999. Phaseolus (Fabaceae) in archaeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Colombian agriculture. *Economic Botany* 53(3), 261-272.
- Keleş, D. 2015. Fasulye Yetiştiriciliği, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü.
- Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C. et al. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10, 845–858.
- Kondrashov, F. A., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. 2002. Selection in the evolution of gene duplications. *Genome biology*, 3(2), 1-9.

- Kong D, Hao Y, Cui H. 2016. The WUSCHEL related homeobox protein WOX7 regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 9:261–270.
- Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. 2006. DBD: a transcription factor prediction database *Nucleic Acids Res.*, 34.
- Kwak, M., & Gepts, P. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theoretical Applied Genetics*, 118, 979-992
- Lanza E, Hartman TJ, Albert PS, Shields R, Slattery M, Caan B, et al. 2006. High dry bean intake and reduced risk of advanced colorectal adenoma recurrence among participants in the polyp prevention trial. *J Nutr.* 136:1896-1903.
- Larcher, W. 1987. Streß bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 74: 158–167.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, 506, Berlin.
- Latchman, D.S. 1997. Transcription factors: an Overview *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29.
- Leathwood P, Pollet P. 1998. Effects of slow release carbohydrates in the form of bean flakes on the evolution of hunger and satiety in man. *Appetite*.10(1):1-11.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., . . . Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Letunic, I., Bork, P. 2011. Interactive tree of life v2: Online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.*, 39: W475- W478.
- Leung, A. K., & Sharp, P. A. 2010. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell*, 40(2), 205-215.
- Levine, M., Tjian, R. 2003. Transcription regulation and animal diversity *Nature*, 424.
- Levitt, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vol. 1. Academic Press. New York.
- Levitt, J. 1972. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, New York.
- Li J, Long Y, Qi G-N, Xu Z-J, Wu W-H, Wang Y. 2014. The Os-AKT1 channel is critical for K⁺ uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex. *Plant Cell* 26: 3387–3402.

- Li, M., Wang, R., Liu, Z. et al. 2019. Genome-wide identification and analysis of the WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family in allotetraploid *Brassica napus* reveals changes in WOX genes during polyploidization. *BMC Genomics* 20, 317.
- Li, X., Li, J., Cai, M., Zheng, H., Cheng, Z., & Gao, J. 2020a. Identification and Evolution of the WUSCHEL-Related Homeobox Protein Family in *Bambusoideae*. *Biomolecules*, 10(5), 739.
- Li, Z., Liu, D., Xia, Y., Li, Z., Jing, D., Du, J., ... & Zhang, G. 2020b. Identification of the WUSCHEL-Related Homeobox (WOX) Gene Family, and Interaction and Functional Analysis of TaWOX9 and TaWUS in Wheat. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1581.
- Lichtenthaler, H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology*, 148(1-2), 4-14.
- Lin, H., Niu, L., McHale, N. A., Ohme-Takagi, M., Mysore, K. S., & Tadege, M. 2013. Evolutionarily conserved repressive activity of WOX proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 366-371.
- Liu, J.X., and Howell, S.H. 2016. Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytol.* 211, 418–428.
- Liu X, Cai S, Wang G, Wang F, Dong F, MakM, Holford P, Ji J, Salih A, Zhou M. 2017. Halophytic NHXs confer salt tolerance by altering cytosolic and vacuolar K⁺ and Na⁺ in *Arabidopsis* root cell. *Plant Growth Regul*, 82(2): 333–351.
- Liu, C., Wang, B., Li, Z., Peng, Z., & Zhang, J. 2018. TsNAC1 is a key transcription factor in abiotic stress resistance and growth. *Plant physiology*, 176(1), 742-756.
- Lynch, M., Conery, J.S. 2003. The evolutionary demography of duplicate genes. *J Struct Funct Genomics* 3:35–44.
- Ma, L., Zhang, H., Sun, L., Jiao, Y., Zhang, G., Miao, C., and Hao, F. 2012. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *J. Exp. Bot.* 63, 305–317.
- Ma Y, Dias MC and Freitas H. 2020. Drought and Salinity Stress Responses and Microbe-Induced Tolerance in Plants. *Front. Plant Sci.* 11:591911.
- Madhava Rao KV, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K, editors. 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. the Netherlands: Springer.
- Mallick, B., Pradhan, S. K., Parmeswaran, C., Naresh, P., & Acharya, G. C. 2020. Genome Wide Analysis and Characterization of Heat Shock Transcription Factors (Hsfs) in French Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.).

- McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. 1984a. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, 37(2), 403-408.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A., & Gehring, W. J. 1984b. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308(5958), 428-433.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33, 453–467.
- Minh-Thu P, Kim JS, Chae S, Jun KM, Lee GS, Kim DE, Cheong JJ, Song SI, Nahm BH, Kim YK. 2018. A WUSCHEL Homeobox transcription factor, OsWOX13, enhances drought tolerance and triggers early flowering in rice. *Mol Cells* 41:781–798.
- Mukherjee, K., Brocchieri, L., & Bürglin, T. R. 2009. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Molecular biology and evolution*, 26(12), 2775-2794.
- Munns, R.; Termaat, A. 1986. Whole plant response to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 143–160.
- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M. 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat Biotechnol* 30: 360–364.
- Nam, J., & Nei, M. 2005. Evolutionary change of the numbers of homeobox genes in bilateral animals. *Molecular biology and evolution*, 22(12), 2386-2394.
- Nimbolkar, P.K., J. Bajeli, A. Tripathi, A.K. Chaubey, and N.M. Kanade. 2020. Mechanism of salt tolerance in fruit crops: a review. *Agric. Rev.* 41(1), 25-33.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.
- Orlowska A, Kepczynska E. 2018. Identification of polycomb repressive Complex1, trithorax group genes and their simultaneous expression with WUSCHEL, WUSCHEL-related Homeobox5 and SHOOT MERISTEMLESS during the induction phase of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 134:345–356.
- Otting, G., Qian, Y. Q., Billeter, M., Müller, M., Affolter, M., Gehring, W. J., & Wüthrich, K. 1990. Protein–DNA contacts in the structure of a homeodomain–DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *The EMBO journal*, 9(10), 3085-3092.

- Palovaara, J., Hallberg, H., Stasolla, C. and Hakman, I. 2010. Comparative expression pattern analysis of WUSCHEL-related homeobox 2 (WOX2) and WOX8/9 in developing seeds and somatic embryos of the gymnosperm *Picea abies*. *New Phytologist*, 188: 122-135.
- Parida, A.K.; Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324–349.
- Pegler, J. L., Oultram, J. M., Grof, C. P., & Eamens, A. L. (2019). Profiling the abiotic stress responsive microRNA landscape of *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 8(3), 58.
- Pennington, J.A. T.; Young, B. 1990. Iron, zinc, copper, manganese, selenium and iodine in foods from the United States total diet study. *J. Food Comp. Anal.* 3, 166-184.
- Pérez-Rodríguez, P., Riano-Pachon, D. M., Corrêa, L. G. G., Rensing, S. A., Kersten, B., & Mueller-Roeber, B. 2010. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D822-D827.
- Plett D, Safwat G, Gilliam M, Møller IS, Roy S, Shirley N, Jacobs A, Johnson A, Tester M. 2010. Improved salinity tolerance of rice through cell type-specific expression of AtHKT1; 1. *PloS one* 5: e12571
- Rahdari P, Hoseini SM. 2012. Drought stress: a review. *Intl J Agron Plant Prod.* 3:443–6.
- Rahman, Z.u., Azam, S.M., Liu, Y. et al. 2017. Expression Profiles of Wuschel-Related Homeobox Gene Family in Pineapple (*Ananas comosus* L). *Tropical Plant Biol.* 10, 204–215.
- Ramkumar, T. R., Kanchan, M., & Sembi, J. K. 2020. Genome wide characterization of WUSCHEL-related homeobox (WOX) gene family in *Apostasia shenzhenica*, a Primeval Orchid. *Plant Science Today*, 7(2), 164-171.
- Rana RM, Rehman SU, Ahmed J, Bilal M. 2013. A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Asian J Agric Biol.* 1:29–37.
- Rao, K.V.M., Raghavendra, A.S. and Janardhan, K. 2005. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, 1–14, Netherlands.
- Reece-Hoyes, J. S., Deplancke, B., Shingles, J., Grove, C. A., Hope, I. A., & Walhout, A. J. 2005. A compendium of *Caenorhabditis elegans* regulatory transcription factors: a resource for mapping transcription regulatory networks. *Genome biology*, 6(13), R110.

- Rengasamy, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia, *Journal of Experimental Botany*, Volume 57, Issue 5.
- Robinson, A., Griffiths JF, A., Dobzhansky, T. et al. 2019. <https://www.britannica.com/science/heredity-genetics> Erişim tarihi: 11.12.2020.
- Rupps, A., Rascke, Rümmler, M. et al. 2016. Identification of putative homologs of *Larix decidua* to BABYBOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL-related HOMEBOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta* 243, 473-488.
- Sadia B, Baloch IA, Bazai ZA, Barozai MY, Noor W, Qambrani SS. 2020. Computational identification and annotation of salt stress responsive genes in *Solanum melongena* L. *Pure App Biol* 9: 132–139
- Salehi-Lisar SY, Motafakkerazad R, Hossain MM, Rahman IMM. 2012. Water stress in plants: causes, effects and responses, water stress. In: Ismail Md. Mofizur Rahman, editor. InTech.
- Salehi-Lisar S.Y., Bakhshayeshan-Agdam H. 2016. Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. In: Hossain M., Wani S., Bhattacharjee S., Burritt D., Tran LS. (eds) *Drought Stress Tolerance in Plants*, Vol 1. Springer, Cham.
- Schmutz J., McClean PE., Mamidi S., Wu GA., Cannon S., Grimwood J., Jenkins J., Shu S., Song Q., Chavarro C., Torres-Torres M., Geffroy V., Moghaddam SM., Gao D., Abernathy B., Barry K., Blair M., Brick MA., Chovatia M., Gepts P., Goodstein DM., Gonzales M., Hellsten U., Hyten DL., Jia G., Kelly JD., Kudrna D., Lee R., Richard MM., Miklas PN., Osorno JM., Rodrigues J., Thareau V., Urrea CA., Wang M., Yu Y., Zhang M., Wing RA., Cregan PB., Rokhsar DS and Jackson SA. 2014. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46: 707-713.
- Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R., and Forster, R.L. 2005. *Compendium of bean diseases*. Second edition. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Selye, H. 1936. A syndrome produced by various nucuous agents. *Nature* 138: 32–34.
- Shao, H., Wang, H., and Tang, X. 2015. NAC transcription factors in plant Multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front. Plant Sci.* 6:902.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. 2015. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In *Multiple sequence alignment methods* (pp. 105-116). Humana Press, Totowa, NJ.

- Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Sequencing, H. (2011). CLC Genomics Workbench. In: Workbench.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W.-R., & Bäurle, I. (2014). Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell*, 26(4), 1792-1807.
- Suo, J., Zhao, Q., David, L., Chen, S., and Dai, S. 2017. Salinity response in chloroplasts: insights from gene characterization. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1011.
- Suyama, M., Torrents, D., Bork, P. 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.*, 34: W609-W612.
- Takagi, Y., Kornberg, R.D. 2006. Mediator as a general transcription factor *J. Biol. Chem.*, 281.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28 (10): 2731-2739.
- Tang, X.; Mu, X.; Shao, H.; Wang, H.; Brestic, M. 2015. Global plant-responding mechanisms to salt stress: Physiological and molecular levels and implications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 35, 425–437.
- Tang, Y., Li, H., Guan, Y., Li, S., Xun, C., Dong, Y., Huo, R., Guo, Y., Bao, X., Pei, E., Shen, Q., Zhou, H., & Liao, J. 2020. Genome-Wide Identification of the Physic Nut WUSCHEL-Related Homeobox Gene Family and Functional Analysis of the Abiotic Stress Responsive Gene JcWOX5. *Frontiers in genetics*, 11, 670.
- Torres, R.I.G., Villalobos, R.A., Solís, E.G. & Debouck, D.G. 2004. Wild common bean in the Central valley of Costa Rica: ecological distribution and molecular characterization. *Agronomía Mesoamericana* 15 (2), 145-153.
- Tvorogova VE, Lebedeva MA, Lutova LA. 2015. Expression of WOX and PIN genes during somatic and zygotic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Russ J Genet* 51:1189–1198.
- Tvorogova VE, Fedorova YA, Potsenkovskaya EA, Kudriashov AA, Efremova EP, Kvitkovskaya VA, Wolabu TW, Zhang F, Tadege M, Lutova LA. 2019. The WUSCHEL-related Homeobox transcription factor MtWOX9-1 stimulates somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 138:517–527

- Vakilian, K. A. (2020). Machine learning improves our knowledge about miRNA functions towards plant abiotic stresses. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.
- van der Graaff, E., Laux, T. & Rensing, S.A. 2009. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol* 10, 248.
- Van Horn, L., McCoin, M., Kris-Etherton, P. M., Burke, F., Carson, J. A. S., Champagne, C. M., ... & Sikand, G. 2008. The evidence for dietary prevention and treatment of cardiovascular disease. *Journal of the American dietetic association*, 108(2), 287-331.
- Vavilov, N.I. 1931. The problem of the origin of the world's agriculture in the light of the latest investigations. *Science at the cross roads: papers presented to the International congress of the history of science and technology held in London from June 20th to July 3rd, 1931 by the delegates of the U.S.S.R.*
- Venn BJ, Mann JI. 2004. Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 58:1443-1461.
- Viola, I. L., & Gonzalez, D. H. 2016. Structure and evolution of plant homeobox genes. In *Plant Transcription Factors* (pp. 101-112). Academic Press.
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., & Hake, S. 1991. The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family. *Nature*, 350(6315), 241-243.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.*, 93 (1): 77-78.
- Walhout, A.J.M. 2006. Unraveling transcription regulatory networks by protein-DNA and protein-protein interaction mapping *Genome Res.*, 16.
- Wang S, Meckling KA, Marcone MF, Kakuda Y, Tsao R. 2011. Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *J Agric Food Chem*. 59:960-968.
- Wang, H., Wang, H., Shao, H., & Tang, X. 2016. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Frontiers in plant science*, 7, 67.
- Wang, Y., Berkowitz, O., Selinski, J., Xu, Y., Hartmann, A., and Whelan, J. 2018. Stress responsive mitochondrial proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic. Biol. Med.* 122, 28–39.
- Wang, P., Guo, Y., Chen, X. et al. 2019a. Genome-wide identification of WOX genes and their expression patterns under different hormone and abiotic stress treatments in tea plant (*Camellia sinensis*). *Trees* 33, 1129–1142.

- Wang, X., Bi, C., Wang, C. et al. 2019b. Genome-wide identification and characterization of WUSCHEL-related homeobox (WOX) genes in *Salix suchowensis*. *J. For. Res.* 30, 1811–1822.
- Wang, L. Q., Li, Z., Wen, S. S., Wang, J. N., Zhao, S. T., & Lu, M. Z. 2020a. WUSCHEL-related homeobox gene PagWOX11/12a responds to drought stress by enhancing root elongation and biomass growth in poplar. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1503-1513.
- Wang, Y., Feng, C., Zhai, Z., Peng, X., Wang, Y., Sun, Y., . . . Zhu, S. (2020b). The Apple microR171i-SCARECROW-LIKE PROTEINS26. 1 Module Enhances Drought Stress Tolerance by Integrating Ascorbic Acid Metabolism. *Plant physiology*, 184(1), 194-211.
- Weinstein, J. N., Myers, T. G., O'Connor, P. M., Friend, S. H., Fornace, A. J., Kohn, K. W., . . . Anderson, N. L. (1997). An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *science*, 275(5298), 343-349.
- Yang, Z., Nielsen, R. 2000. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol Biol Evol* 17:32–43.
- Yang, Z.H., 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.*, 24 (8): 1586-1591.
- Yang, Y. & Guo, Y. 2018. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt stress responses. *New Phytol.* 217, 523–539.
- Yeken, M, Çiftçi, V, Çancı, H, Özer, G, Kantar, F. 2019. Türkiye'nin Batı Anadolu Bölgesi'nden Toplanan Yerel Fasulye Genotiplerinin Morfolojik Karakterizasyonu. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5 (1), 124-139.
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dai, S., Ding, Z., and Xia, G. 2020. How plant hormones mediate salt stress responses. *Trends Plant Sci.*
- Yuan, S., Zhao, J., Li, Z., Hu, Q., Yuan, N., Zhou, M., . . . Li, S. (2019). MicroRNA396-mediated alteration in plant development and salinity stress response in creeping bentgrass. *Horticulture research*, 6(1), 1-13.
- Zhang, Y., & Skolnick, J. 2005. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic acids research*, 33(7), 2302-2309.
- Zhang, X., Zong, J., Liu, J., Yin, J. and Zhang, D. 2010. Genome-Wide Analysis of WOX Gene Family in Rice, Sorghum, Maize, Arabidopsis and Poplar. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 1016-1026.
- Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, JK., Shabala, S. 2020. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *The Innovation*.

- Zheng W, Zhang X, Yang Z, Wu J, Li F, Duan L, Liu C, Lu L, Zhang C, Li F. 2014. AtWuschel promotes formation of the embryogenic callus in *Gossypium hirsutum*. PLoS ONE 9: e87502
- Zheng, Y., Jiao, C., Sun, H.H., Rosli, H.G., Pombo, M.A., Zhang, P.F., Banf, M., Dai, X.B., Martin, G.B., Giovannoni, J.J., Zhao, P.X., Rhee, S.Y., Fei, Z.J. 2016. iTAK: A program for genomewide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. Mol. Plant., 9 (12): 1667-1670.
- Zhou, X., Guo, Y., Zhao, P., & Sun, M. X. 2018. Comparative analysis of WUSCHEL-related homeobox genes revealed their parent-of-origin and cell type-specific expression pattern during early embryogenesis in tobacco. Frontiers in plant science, 9, 311.
- Zhu, T., Moschou, P. N., Alvarez, J. M., Sohlberg, J. J., & von Arnold, S. 2014. Wuschel-related homeobox 8/9 is important for proper embryo patterning in the gymnosperm Norway spruce. Journal of experimental botany, 65(22), 6543–6552.
- Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH. 2002. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to embryonic transition in Arabidopsis. Plant J 30:349–359