

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *TRİHELİX* GEN AİLESİ
ÜYELERİNİN GENOM DÜZEYİNDE TANIMLANMASI VE ÇEŞİTLİ
ABİYOTİK STRESLER SIRASINDA İFADE PROFİLLERİ

Samet Can EKER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE *TRİHELİX* GEN AİLESİ ÜYELERİNİN GENOM DÜZEYİNDE TANIMLANMASI VE ÇEŞİTLİ ABİYOTİK STRESLER SIRASINDA İFADE PROFİLLERİ

Samet Can EKER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker BÜYÜK

Trihelix transkripsiyon faktörü ailesi, bitki büyüme ve gelişiminin düzenlenmesinde ve çeşitli abiyotik streslere yanıt vermede oldukça önemlidir. GT faktörleri olarak da adlandırılan *Trihelix* ailesi, korunmuş bir trihelix DNA bağlanma alanına sahip bitkiye özgü bir transkripsiyon faktörü gen ailesidir. Bu tez çalışmasında, fasulyede *Trihelix* genlerinin genom çapında tanımlanması ve detaylı biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. Genel olarak fasulye genomunda beş alt kategoride (GT-1, GT-2, GT γ , SH4 ve SIP1) sınıflandırılan toplamda 38 adet *Trihelix* geni (*PvTH*) olduğu tespit edilmiştir. Tanımlanan bu *PvTH*'lerin filogenetik ilişkileri, kromozomlar üzerindeki dağılımı, tandem ve segmental duplikasyon durumları, gen yapıları, promotor bölgelerinin analizleri, ekzon-intron yapıları, miRNA analizleri, kodladıkları proteinlerdeki korunmuş motiflerin belirlenmesi, proteinlerin tahmini üç boyutlu yapıları ve *Arabidopsis* ve soya ile sentenik ilişkilerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca RNAseq verilerine dayalı olarak tuz ve H₂O₂ ile ilişkili genlerin ifade analizleri yapılmış ve stres muamelesi sonrası qPCR analizi ile değişen mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Yapılan tez çalışma sonucunda bazı *PvTH* genlerinin tuz ve H₂O₂'ye karşı istatistiksel olarak anlamlı yanıtlar verdikleri belirlenmiştir ve bu genlerin strese karşı verilen cevapta rol oynayabileceği düşünülmüştür. Elde edilen bulgular literatür için yenidir ve fasulye genomunda *Trihelix* gen ailesinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Kasım 2022, 101 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Fasulye, *Trihelix* proteinleri, Biyoinformatik, Abiyotik Stres, Gen İfadesi

ABSTRACT

MSc Thesis

GENOME-WIDE IDENTIFICATION OF *TRIHILIX* GENE FAMILY MEMBERS IN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND EXPRESSION PROFILES DURING VARIOUS ABIOTIC STRESS

Samet Can EKER

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

Supervisor: Assoc. Prof. İlker BÜYÜK

The Trihelix family of transcription factors is very important in regulating plant growth and development and in responding to various abiotic stresses. The Trihelix family, also called GT factors, is a plant-specific transcription factor gene family with a conserved trihelix DNA binding domain. In this thesis, genome-wide identification and detailed bioinformatics analyzes of *Trihelix* genes in bean were performed. In general, a total of 38 *Trihelix* genes (*PvTH*) classified in five subcategories (GT-1, GT-2, GT γ , SH4 and SIP1) were found in the bean genome. Phylogenetic relationships of these identified *PvTHs*, their distribution on chromosomes, tandem and segmental duplication status, gene structures, analyzes of promoter regions, exon-intron structures, miRNA analyzes, determination of conserved motifs in the proteins they encode, predicted three-dimensional structures of proteins and syntenic relationships with *Arabidopsis* and soybean were analyzed. In addition, based on RNAseq data, the expression analyzes of salt and H₂O₂ genes were performed and the changing mRNA expression levels were examined by qPCR analysis after stress treatment. As a result of the thesis study, it was determined that some *PvTH* genes gave statistically significant responses to salt stress and H₂O₂, and it was thought that these genes might play a role in stress response. The findings are new to the literature and are thought to help a comprehensive understanding of the *Trihelix* gene family in the bean genome.

November 2022, 101 Pages

Key Words: Common bean, Trihelix proteins, Bioinformatics, Abiotic Stress, Gene Expression

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca, bilgi ve birikimleri yoluma ışık tutan, yürümeye çalıştığım bu yolda öneri ile bana çok değerli tavsiyeler veren ve gerek akademik gerekse günlük yaşantımı şekillendirmemde büyük rolü olan danışman hocam Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e, değerli görüş, öneri ve öğütleri ile beni destekleyen sayın hocam Prof. Dr. Emine Sümer ARAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca bana arkadaşlık eden değerli Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nın değerli üyelerine ve çalışmalarım sırasında bana her zaman destek olan değerli arkadaşım Aybüke OKAY'a,

Eğitim hayatım boyunca bana her konuda koşulsuz destek olan, bu günlere gelmemin en büyük sebebi olan, sevgisini ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen canım annem Birsal EKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Samet Can EKER
Ankara, Kasım 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	2
1.1.1 Fasulyenin tarihçesi	2
1.1.2 Fasulyenin sınıflandırılması	3
1.1.3 Fasulye bitkisinin üretimi ve ekonomik açıdan önemi	4
1.1.4 Fasulyenin besin içeriği	7
1.1.5 Fasulyede görülen hastalıklar	7
1.1.5.1 Bakteriyel hastalıklar.....	8
1.1.5.2 Mantar hastalıkları.....	9
1.1.5.3 Parazitik hastalıklar	10
1.1.5.4 Viral hastalıklar	10
1.2 Bitkide Stres.....	11
1.2.1 Bitkide stres olaylarına tepki	11
1.3 Tuz Stresi	12
1.3.1 ROS	13
1.3.2 ABA..	14
1.3.3 Tuz stresi sırasında hücre sinyalleri.....	14
1.4 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	15
1.5 Kuraklık Stresi	16
1.5.1 Bitkide kuraklık stresinin etkileri	16
1.5.2 Bitki büyümesi ve gelişmesi.....	17
1.5.3 Bitki ve su ilişkisi.....	17
1.5.4 Mineral alımı	18
1.6 Transkripsiyon Faktörleri.....	18
1.6.1 Trihelix transkripsiyon faktör ailesi	19

2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Bitkisinde Trihelix Proteinlerinin Tanımlanması	26
3.2 Trihelix Ailesi Filogenetik Analizler ve Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi	29
3.3 Trihelix Proteinleri Üç Boyutlu Modellemesi.....	32
3.4 Fasulye <i>Trihelix</i> Gen Ailesi Gen Duplikasyonları ve <i>A. thaliana</i> , <i>G.max</i> Türleri Fiziksel Haritanın Oluşturulması	32
3.5 Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi	34
3.6 Sinteni Analizi	35
3.7 MikroRNA'ların (miRNA) Tespiti ve Hedefleri olan Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin Belirlenmesi.....	36
3.8 Fasulye <i>Trihelix</i> Genleri <i>In Siliko</i> Gen İfade Analizi.....	36
3.9 Bitki Büyüme koşulları, Materyalleri ve Stres Uygulaması.....	36
3.10 Total RNA İzolasyonu	45
3.11 Komplementer DNA Sentezi	46
3.12 Primer Dizaynı	47
3.13 Real-Time PCR.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	49
4.1 Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin Biyoinformatiksel Analizi.....	49
4.2 Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı.....	52
4.3 Fasulye <i>Trihelix</i> Proteinlerinin Türler arası Filogenetik Analizi.....	52
4.4 Fasulye <i>Trihelix</i> Proteinlerinin Korunmuş Motif Bölgeleri	53
4.5 Fasulye <i>Trihelix</i> Proteinleri Üç Boyutlu Modellemeleri.....	56
4.6 Fasulye <i>Trihelix</i> Genleri İntron ve Ekzon Bölgeleri	56
4.7 <i>Trihelix</i> Genlerinin Segmental Gen Duplikasyonları	60
4.8 Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin <i>Arabidopsis thaliana</i> ve <i>Glycine max</i> 'deki Sinteni Analizi ve Birbirinden Ayrılma Oranları	61
4.9 <i>PvTH</i> Transkriptlerini Hedef Alan miRNAların Tanımlanması	65
4.10 Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin Promotor Bölge Analizi	66
4.11 Fasulyede <i>Trihelix</i> Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri.....	71
4.12 Fasulye <i>Trihelix</i> Genleri Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri.....	72
4.13 <i>PvTH</i> Genlerinin Tuz ve Kuraklık Stresi ile İfade Seviyeleri Değişimi	73

4.14 Total RNA İzolasyonu	75
4.15 cDNA İzolasyonu	78
4.16 Tuz Stresi Altında Fasulye Trihelix Genlerinin mRNA Düzeyleri.....	80
4.17 H ₂ O ₂ Uygulaması Altında Fasulye <i>Trihelix</i> Genlerinin mRNA Düzeyleri	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	83
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	101



SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık Olarak
°	Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
aa	Aminoasit
ACT	Aktin
BLAST	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
C	Santigrat
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Demir
gr	Gram
ha	Hektar
hg	Hektogram
Ka	Homolog Olmayan Değişim Oranı
kcal	Kilokalori
Ks	Homolog Değişim Oranı
L	Litre
M	molar
m	Metre
mg	Miligram
miRNA	MikroRNA
mM	Milimolar
mmol	Milimol

MYÖ	Milyon Yıl Önce
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pI	İzoelektrik etki değeri
RT-PCR	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
sn	Saniye
TF	Transkripsiyon Faktörü
Tm	Erime sıcaklığı
v	Hacim



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 2020 yılı kıtalararası fasulye ekim alanları dağılımı (ha)	5
Şekil 1.2 2020 yılı kıtalararası fasulye üretim miktarı dağılımı (ton).....	5
Şekil 1.3 2020 yılı kıtalararası fasulye tane verimi (hg/ha)	5
Şekil 1.4 2020 yılı uluslararası fasulye üretim miktarı	6
Şekil 1.5 2015-2020 yılı türkiye fasulye ekim alanı ve ürün miktarı.....	6
Şekil 3.1 PlantTFDB	26
Şekil 3.2 NCBI Blast.....	27
Şekil 3.3 Phytozome	28
Şekil 3.4 Expasy decrease redundancy	28
Şekil 3.5 ProtParam online biyoinformatik aracı	29
Şekil 3.6 Mega 7.0	30
Şekil 3.7 İTOL	30
Şekil 3.8 (GSDS2.0) online biyoinformatik aracı	31
Şekil 3.9 MEME online biyoinformatik aracı.....	31
Şekil 3.10 Phyre2	32
Şekil 3.11 TBtools basit Ka/Ks hesaplama	33
Şekil 3.12 PAL2NAL.....	33
Şekil 3.13 Tbtools	34
Şekil 3.14 Plantcare.....	35
Şekil 3.15 İTAK.....	35
Şekil 3.16 Elkoca, 150mM NaCl, 14/10/21	37
Şekil 3.17 Serra, 150mM NaCl, 14/10/21.....	38
Şekil 3.18 Kontrol, 150mM NaCl, 14/10/21.....	38
Şekil 3.19 Elkoca, 150mM NaCl, 16/10/21	39
Şekil 3.20 Serra, 150mM NaCl, 16/10/21.....	39
Şekil 3.21 Kontrol, 150mM NaCl, 16/10/21.....	40
Şekil 3.22 Elkoca, 150mM NaCl, 18/10/21	40
Şekil 3.23 Serra, 150mM NaCl, 18/10/21.....	41
Şekil 3.24 Kontrol, 150mM NaCl, 18/10/21.....	41
Şekil 3.25 Elkoca, 150mM NaCl, 21/10/21	42

Şekil 3.26 Serra, 150mM NaCl, 21/10/21.....	42
Şekil 3.27 Kontrol, 150mM NaCl, 21/10/21.....	43
Şekil 3.28 Elkoca, %2 H ₂ O ₂ , 10/11/21	43
Şekil 3.29 Serra, %2 H ₂ O ₂ , 10/11/21	44
Şekil 3.30 Kontrol, %2 H ₂ O ₂ , 10/11/21	44
Şekil 3.31 Elkoca, %2 H ₂ O ₂ , 11/11/21	45
Şekil 4.1 <i>Trihelix</i> genlerinin kromozomal dağılımı	52
Şekil 4.2 <i>Trihelix</i> proteinlerinin filogenetik sınıflandırması.....	53
Şekil 4.3 <i>Trihelix</i> proteinleri motif ve domain bölgeleri	54
Şekil 4.4 Proteinlerin üç boyutlu modellemeleri.....	56
Şekil 4.5 <i>PvTH</i> genlerinin ekzon-intron bölgeleri	57
Şekil 4.6 <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> ve <i>Glycine max</i> 'de <i>Trihelix</i> genlerinin ekzon-intron bölgeleri.....	58
Şekil 4.7 <i>PvTH</i> genlerinin segmental duplikasyonları.....	60
Şekil 4.8 <i>PvTH</i> genlerinin <i>Arabidopsis thaliana</i> Ve <i>Glycine max</i> arasındaki sinteni analizi.....	62
Şekil 4.9 <i>PvTH</i> 'yi hedefleyen miRNA'lar	66
Şekil 4.10 <i>PvTH</i> genleri promotor bölgeleri cis-acting elementler	70
Şekil 4.11 <i>PvTH</i> genleri doku-spesifik mRNA ekspresyon seviyeleri ısı haritası.....	73
Şekil 4.12 <i>PvTH</i> genlerinin tuz stresi altında ekspresyonlarını gösteren Isı haritası	74
Şekil 4.13 <i>PvTH</i> genlerinin kuraklık stresi altında ekspresyonlarını gösteren ısı haritası	75
Şekil 4.14 Serra ve Elkoca çeşitlerinin tuz stresi altında gen ifade seviyesi (* p- değeri < 0,05 ifade etmektedir).....	81
Şekil 4.15 Serra ve Elkoca çeşitlerinin H ₂ O ₂ stresi altında gen ifade seviyesi (* p- değeri < 0,05 ifade etmektedir).....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin sınıflandırılması.....	3
Çizelge 1.2 Fasulyenin besin içeriği (http://www.turkomp.gov.tr/food-206).....	7
Çizelge 3.1 cDNA sentezi reaksiyon koşulları	47
Çizelge 3.2 Primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları, baz sayısı ve GC oranı.....	47
Çizelge 3.3 Reaksiyon bileşenleri ve miktarları	48
Çizelge 3.4 Reaksiyon koşulları.....	48
Çizelge 4.1 <i>PvTH</i> genleri kataloğu	50
Çizelge 4.2 <i>PvTH</i> genlerinde tespit edilen duplikasyon olayları	61
Çizelge 4.3 <i>Phaseolus vulgaris</i> ve <i>Arabidopsis thaliana</i> ’da bulunan <i>Trihelix</i> gen duplikasyonları	62
Çizelge 4.4 <i>P. vulgaris</i> ve <i>G. max</i> ’de bulunan <i>Trihelix</i> gen duplikasyonlar	63
Çizelge 4.5 Gelişim ile ilgili elementler	67
Çizelge 4.6 Çevresel stresler ile ilgili elementler.....	67
Çizelge 4.7 Hormonlar ile ilgili elementler.....	67
Çizelge 4.8 Işığa duyarlı elementler.....	68
Çizelge 4.9 Promotor ile ilgili elementler	69
Çizelge 4.10 Bölge bağlama ile ilgili elementler	69
Çizelge 4.11 Diğer elementler.....	69
Çizelge 4.12 <i>PvTH</i> proteinlerinin hücre içi yerleşim yerleri	71
Çizelge 4.13 İzole edilen total RNA’ların saflık dereceleri ve miktarları (tuz stresi)	76
Çizelge 4.14 İzole edilen total RNA’ların saflık dereceleri ve miktarları (H ₂ O ₂)	76
Çizelge 4.15 Total RNA’lardan elde edilen cDNA’ların saflık dereceleri ve miktarları (tuz stresi).....	78
Çizelge 4.16 Total RNA’lardan elde edilen cDNA’ların saflık dereceleri ve miktarları (H ₂ O ₂).....	79

1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), *Fabaceae* ailesinin *Phaseolus* cinsinden Orta Amerika kökenli hem tarımsal hem de ekonomik açıdan oldukça önemli ve yüksek besin içeriği olan yıllık bir otsu bitkidir. Uzun süredir tarımı yapılan fasulye hem yeşil hem de kurutularak tüketilebilmesinin yanında işleme yan ürünlerinin yem olarak kullanılabilmesinden dolayı ekonomik açıdan oldukça değerlidir. Orta Amerika kökenli fasulye İspanyollar ve Portekizliler aracılığı ile Eski Dünya'ya tanıtılmıştır. Günümüzde Amerika ve Avrupa'da dahil olmak üzere Dünyanın birçok yerinde yetiştirilmektedir. Özellikle ekonomik nedenlerden ötürü daha pahalı beslenme kaynaklarını karşılayamayan bireylere besin kaynağı olarak özellikle gelişmekte olan ülkelerde oldukça önemlidir.

Dünya çapında tarım istatistiklerinin ana kaynağı olan FAOSTAT'ın (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database), istatistiksel bilgileri toplarken baklagil türleri arasında ayırım yapmadan birden fazla fasulye türünü kümelemesinden dolayı fasulyenin küresel düzeydeki gerçek değerini tahmin etmek zordur. Yılda yaklaşık 18.9 milyon ton üretimi olan fasulye üretiminin yaklaşık %66'sını Afrika ve Amerika karşılamaktadır (FAOSTAT, 2015).

Transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon sürecinde yer alan proteinlerdir. DNA bağlanma alanları ile belirli DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyon sürecini hızlandırma, yavaşlatma, baskılama gibi düzenleyici aktivitelerde bulunurlar. Bu düzenleme gen kontrolünün en yaygın halidir ve farklı hücre tiplerinde ekspresyonun düzenlenmesine izin verir. Bitkilerde 60'tan fazla transkripsiyon faktörü ailesi vardır (Riechmann vd., 2000). Bu transkripsiyon faktörlerinden birisi olan Trihelix transkripsiyon faktörleri (TTF) (Harveson ve Schwartz, 2007), ışık tepkisi için gerekli olan GT elementlerine spesifik olarak bağlanan proteinler olarak keşfedilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Trihelix* gen ailesinin bitki büyüme ve gelişmesinde ayrıca biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında rol oynadığına dair kanıtlar bulunmuştur (Kaplan-Levy vd., 2012).

Bu tez çalışmasında, *Trihelix* gen ailesi üyelerinin biyoinformatik araçlar kullanılarak tanımlanması ve karakterizasyonu, tuz stresi ve H₂O₂ uygulaması ile bağlantılı genlerin *in siliko* ifade profilleri ve iki farklı fasulye çeşidinin bu stresler karşısında mRNA ifade düzeylerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda *PvTH* ekspresyon düzeyleri, H₂O₂ ve tuz stresi altında RNAseq ve qRT-PCR verileri kullanılarak değerlendirilmesi ve *PvTH* genlerinin bu streslere yanıtlarındaki rolleri araştırılmıştır.

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)

Genellikle baklagil, bezelye veya fasulye ailesi olarak bilinen *Fabaceae* ailesi; tarımsal ve ekonomik açıdan oldukça önemli çiçekli bitkiler ailesidir. *Orchidaceae* ve *Asteraceae*'nin ardından tür sayısı bakımından üçüncü en büyük kara bitkisi ailesi olan bu aile yaklaşık olarak 765 cins ve 20.000 bilinen tür barındırır (Christenhusz ve Byng, 2016). Bu aileye mensup fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) dünya çapında tüketilen, yenilebilir tohumları ve kabukları olan baklagillerden biridir. Oldukça polimorfik, sıcak mevsim ve yıllık bir otsu bitkidir. 20-60 cm yüksekliğe ulaşabilen dik otsu çalılar ve 2-5 m uzunluğa ulaşabilen tırmanan sarmaşık olmak üzere iki fasulye türü vardır (Smoliak vd., 1990). Birçok ek kökü olan bir kazık kökü vardır. Çalı köklü türlerinde gövdeler oldukça ince, çok dallı ve tüylüdür. Yapraklar, uzun yeşil yaprak sapları üzerinde taşınır, yeşil veya mor renkli ve üç yapraklıdır (Wortmann vd., 2006). Baklalar 4 ila 12 tohum içerirler. Tohumlar 0.5-2 cm uzunluğunda olup, böbrek şeklinde ve çeşide bağlı olarak beyaz, kırmızı, yeşil, ten rengi, mor, gri ve siyah renkli olabilirler. Helozoni olarak adlandırılan dişi organ kıvrılmış bir biçimdedir ve polen tozlarını taşımakta görevli olan erkek organlar boru benzeri bir yapıya sahip olup dişi organı sarar bir pozisyonda bulunur. Bu durum baklagiller familyasına kendi kendine döllenme özelliği kazandırmıştır (Mızrak, 2020).

1.1.1 Fasulyenin tarihçesi

Linnaeus tarafından (Linnaeus, 1957) fasulyenin kökeni ilk olarak 1753 yılında Hindistan'a atanmıştır. Peru'daki Ancon mezarlarında bulunan korunmuş tarih öncesi fasulye tohumları analiz edildikten sonra fasulyenin Güney Amerika kökenli olduğu

anlaşılmıştır (Brücher, 1988). Fasulyenin ıslahı Mezoamerikan ve Andean gen havuzu olmak üzere iki gen havuzunun oluşumu ile sonuçlanmıştır (Bitocchi vd., 2017). Mezoamerikan gen havuzu Kolombiya ile Kuzey Meksika arasında uzanır ve Mezoamerika, Durango, Jalisco gen havuzu içerir. Andean gen havuzu Güney Peru'dan Kuzeybatı Arjantin'e uzanırken; Peru, Nueva Granada ve Şili olmak üzere üç adet gen havuzu ırkı içerir (Blair vd., 2006; Nadeem vd., 2018). Mezoamerikan gen havuzu Avrupa'ya ilk olarak 1506'da ardından Andean gen havuzu 1528 yılında ulaşmıştır (Nadeem vd., 2018). Anadolu'da ise 250 yıldır tüketildiği düşünülmektedir (Büyük, 2014). İspanyol ve Portekizliler tarafından Dünya'ya tanıtılmıştır. Şu anda Amerika, Avrupa, Afrika ve Asya'nın tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerinde yaygın ve önemli bir gıda ürünü olarak yetiştirilmektedir (Wortmann vd., 2006).

1.1.2 Fasulyenin sınıflandırılması

Fasulye *Fabales* takımının 751 cinse sahip *Fabaceae* ailesinin, *Faboideae* alt ailesine ait *Phaseolus* cinsine bağlı yaklaşık 19.500 türden biridir (Christenhusz ve Byng, 2016).

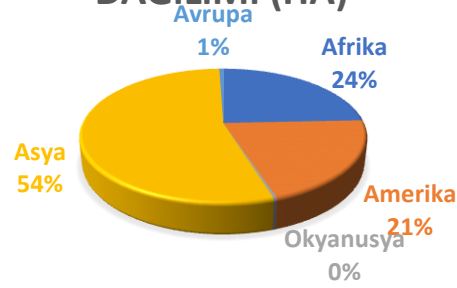
Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin sınıflandırılması

Domain	Eukaryota
Alem	Plantae
Bölüm	Tracheophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae
Cins	<i>Phaseolus</i> L.
Tür	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

1.1.3 Fasulye bitkisinin üretimi ve ekonomik açıdan önemi

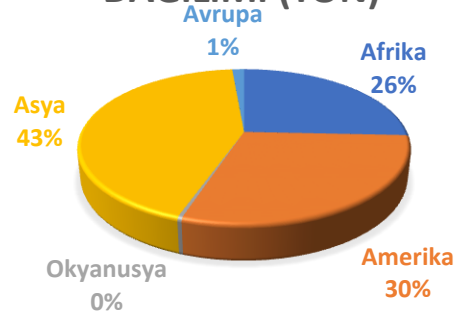
Hızlı bir şekilde artan Dünya'nın popülasyonu göz önüne alındığında özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki gıda talebini karşılamak için kolay ulaşılabilir ve ucuz besinler gün geçtikçe değer kazanmaktadır. Bu kategoride sayılabilecek yemeklik tane baklagiller, fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), bezelye (*Pisum sativum* L.), bakla (*Vicia faba* L.), börülce (*Vigna sinensis* L.), mercimek (*Lens culinaris*) ve nohut (*Cicer arietinum* L.) insan beslenmesinde önemli roller oynamaktadır. Bunların arasında fasulye en yüksek üretim değerine sahip ürün olarak öne çıkmaktadır. FAO 2020 verilerine göre, kuru fasulyenin ekim alanı Dünya çapında 34 milyon 801 bin 567 hektar iken üretimi 27 milyon 545 bin 942 ton, tane verimi ise 7915 hg/ha'dır. Yeşil fasulyede ise 1 milyon 579 bin 489 hektar alanda 23 milyon 276 bin 716 ton üretim gerçekleştirilmiştir ve tane verimi 147369 hg/ha'dır. Bu toplam miktar, kuru fasulyede 8 milyon 464 bin 13 hektar (yaklaşık %24,32) ve 7 milyon 74 bin 707 ton (yaklaşık %25,68) ile Afrika kıtasına (8359 hg/ha), 7 milyon 169 bin 372 hektar (yaklaşık %20,60) ve 8 milyon 105 bin 443 ton (yaklaşık %29,42) ile Amerika kıtasına (11306 hg/ha), 18 milyon 867 bin 971 hektar (yaklaşık %54,21) ve 11 milyon 880 bin 677 ton (yaklaşık %43,13) ile Asya kıtasına (6297 hg/ha), 188 bin 641 hektar (yaklaşık %0,54) ve 384 bin 948 ton (yaklaşık %1,39) ile Avrupa'ya (20406 hg/ha), 111 bin 570 hektar (yaklaşık %0,32) ve 100 bin 167 ton (yaklaşık %0,36) ile Okyanusya'ya (8978 hg/ha) dağılım göstermiştir. Türkiye'de (27147 hg/ha) ise 102 bin 963 hektar ve 279 bin 518 ton ile üretim yapılmıştır. Kıtalararası bir kıyaslama yapıldığında üretim alanı ve miktarı bakımından Asya kıtası en yüksek değerlere sahip iken tane verimi açısından başı Avrupa çekmektedir. Ülkeler skalasında Hindistan 5 milyon 460 bin ton üretim ile başı çekerken, ardından Brezilya, Myanmar, ABD, Çin, Tanzanya ve Meksika gelmektedir. Ekim alanları bakımından liste başında yine Hindistan varken ardından Myanmar, Brezilya ve Meksika gelmektedir.

2020 YILI KİTALARARASI FASULYE EKİM ALANLARI DAĞILIMI (HA)



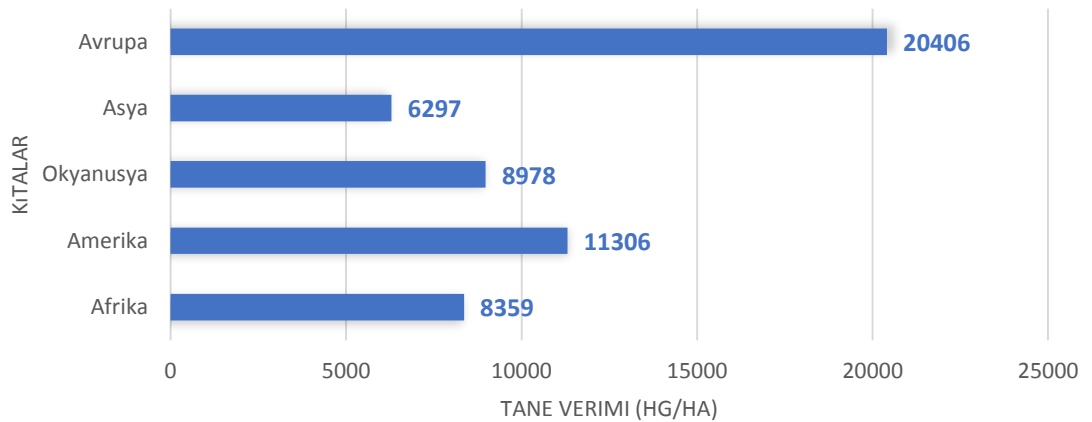
Şekil 1.1 2020 yılı kıtalararası fasulye ekim alanları dağılımı (ha)

2020 YILI KİTALARARASI FASULYE ÜRETİM MİKTARI DAĞILIMI (TON)

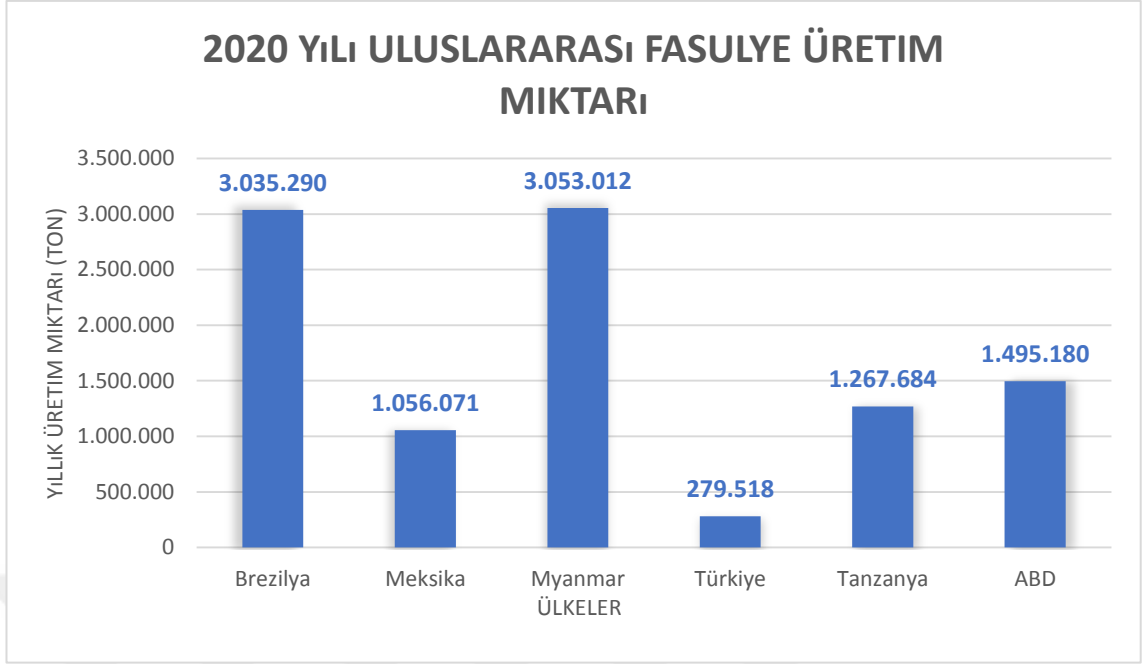


Şekil 1.2 2020 yılı kıtalararası fasulye üretim miktarı dağılımı (ton)

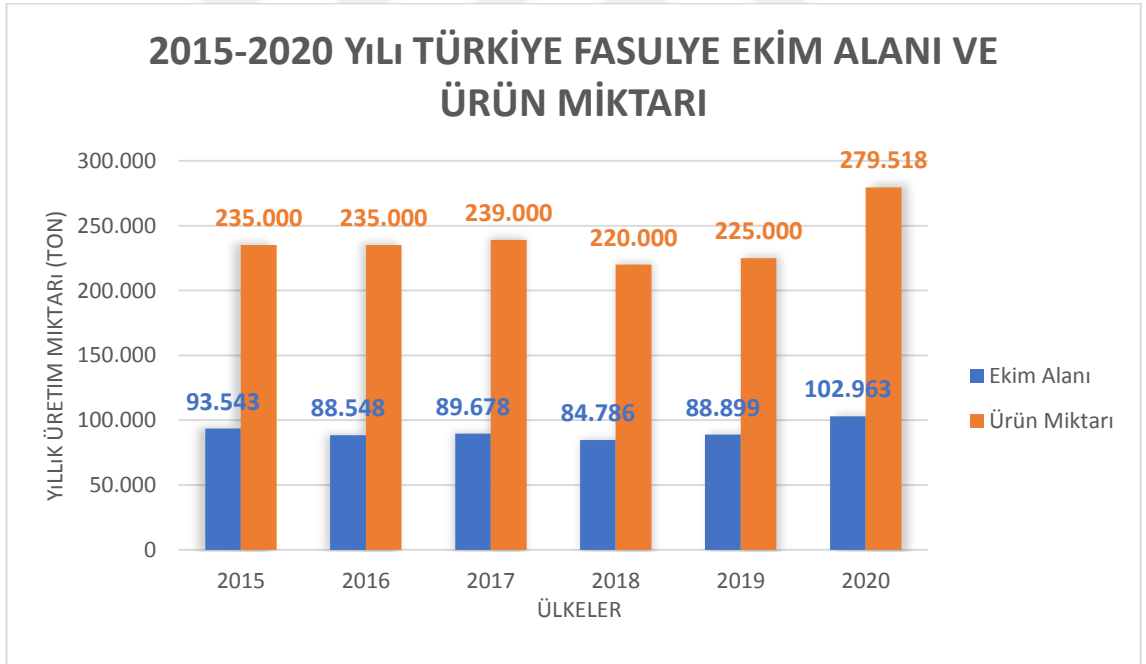
2020 YILI KİTALARARASI FASULYE TANE VERİMİ (HG/HA)



Şekil 1.3 2020 yılı kıtalararası fasulye tane verimi (hg/ha)



Şekil 1.4 2020 yılı uluslararası fasulye üretim miktarı



Şekil 1.5 2015-2020 yılı Türkiye fasulye ekim alanı ve ürün miktarı

1.1.4 Fasulyenin besin içeriği

Fasulye tanesine yapılan analizler sonucunda, tanelerin %16-25 protein, %52-76 karbonhidrat, %2-6 yağ, %14-19 lif ve %2.9-4.5 kül (inorganik maddeler) içerdđi gözlemlenmiştir. Aşağıdaki çizelgede (Çizelge 1. 2) 100 gr yenilebilir fasulye bitkisinin besin içeriği verilmiştir.

Çizelge 1.2 Fasulyenin besin içeriği (<http://www.turkomp.gov.tr/food-206>)

Bileşen	Birim	Miktar
Enerji	kcal	44
Su	g	87,58
Protein	g	2,20
Azot	g	0,35
Yağ	g	0,37
Karbonhidrat	g	6,99
Lif	g	2,08
Tuz	mg	4
Demir (Fe)	mg	1,09
Fosfor (P)	mg	62
Kalsiyum (Ca)	mg	61
Magnezyum (Mg)	mg	34
Potasyum (K)	mg	316
Sodyum (Na)	mg	1
Çinko (Zn)	mg	0,48
C vitamini	mg	16
Beta-karoten	µg	308
Lutein	µg	292

1.1.5 Fasulyede görülen hastalıklar

Fasulyede bakteri, mantar, parazit, virüs kaynaklı hastalıklar görölmektedir.

1.1.5.1 Bakteriyel hastalıklar

Fasulyede bakteriyel kaynaklı 4 farklı hastalık görülmektedir; bakteriyel kahverengi leke, bakteriyel solgunluk, yaygın bakteriyel yanıklık, hale yanıklığı.

Bakteriyel kahverengi leke, *Pseudomonas syringae* pv. nin neden olduğu bir hastalıktır. İlk olarak 1960'ların sonuna batı Nebraska'da görüntülenen bu hastalık günümüzde Güney Afrika dahil olmak üzere küresel olarak fasulyenin önemli bir hastalığıdır (Bradbury, 1986; Harveson ve Schwartz, 2007). Lezyonlar genellikle küçük, kahverengi ve daireseldir fakat lezyon boyutu değişiklik gösterebilir.

Bakteriyel solgunluk, bir gram-pozitif bakteri olan *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*'in sebep olduğu bir hastalıktır. Hastalık yaprakta bir dizi klorotik ve nekrotik bölge oluşturur ve buna bitki solgunluğu eşlik eder. Semptomlar öncelikle sarı bir hale içinde yaprakta meydana gelir. Hasta bitki soğuk gecelerde veya bulutlu ve yağışlı havalarda iyileşebilir (Osdaghi vd., 2020).

Yaygın bakteriyel yanıklık, *Xanthomonas axonopodis* pv.'nin neden olduğu bir hastalıktır. Yıkıcı bir hastalıktır ve Dünya çapında görülmektedir. Yapraklarda şiddetli enfeksiyonlarda bitki yanmış gibi görünür. Yaprığın yanı sıra kapsül, sap ve tohumda da görülebilir. Hastalık özellikle ıslak bitkilerin birbirine teması veya üstten sulama sırasında yayılır (Persley vd., 2010).

Hale yanıklığı, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* bakterisinin neden olduğu bir hastalıktır. Bakteri bitki yaralanmalarından ve doğal açıklıklardan bitkiyi enfekte eder. Enfeksiyon gelişim 20-23 derecede oldukça yüksektir. Bakteri yapraklarda küçük su lekelerine sebep olur. Lekeler giderek koyu kahverengiye döner ve sarı bir hale ile çevrilidir (Harveson ve Schwartz, 2007; Harveson, 2009).

1.1.5.2 Mantar hastalıkları

Fasulye bitkisinde genel olarak 4 çeşit mantar kaynaklı hastalık gözlenir; pas hastalığı, beyaz küf hastalığı, çökerten hastalığı ve antraknoz hastalığı.

Pas hastalığı: Fasulyede pas hastalığı çoğunlukla yaprak üzerinde küçük, dairesel kahverengi püstül oluşturur. Olgunlaşan püstüller pas sporlarını etrafa saçar. Sporlar rüzgar ve yağmur ile yayılır. Paslanmaya dayanıklı fasulye çeşitleri olmasına rağmen bu patojenin bilinen 250'den fazla ırkı olmasından dolayı bütün hepsine dirençli bir fasulye çeşidi yoktur (Hagedorn ve Inglis, 1986; Reiners ve Petzoldt, 2000).

Beyaz küf hastalığı: Beyaz küf hastalığının semptomları, gövde ve yapraklarda başlayan pamuksu küf kitlelerinin büyümesi ve etkilenen dokuların büzüşüp ölmesini içerir. Sklerotia olarak adlandırılan siyah mantar yapıları, enfekte olmuş gövde ve baklalarda görülür. Mantar toprakta kışı geçirir ve uzun yıllar toprakta kalabilir. Sporlar genellikle sabah saatlerinde rüzgar ile taşınır (Hagedorn ve Inglis, 1986).

Çökerten hastalığı: *Pythium* cinsi türler genellikle kök ve fideleri etkiler fakat bazı türler (*P. aphanidermatum*, *P. ultimum* and *P. Debaryanum*) yer üstündeki bitki kısımlarını da etkileyebilir. Hastalık ıslak yapraklar ve toprak kaynaklı sıçrayan sular ile taşınır. Enfekte baklalar pamuksu bir küf ile kaplanır (Damicone vd., 2012).

Antraknoz hastalığı: Antraknoz, fasulye bitkisinin tüm kısımlarını etkileyebilen ve koyu kahverengi lezyonlara sebep olan bir hastalıktır. Kabuklar üzerinde dairesel ve çökük lezyonlar oluşturur. Islak koşullar altında pembe jelatinimsi spor kütleleri oluşur. Bakladaki enfeksiyon tohumun renginin değişmesine sebebiyet verebilir. Enfeksiyon sıçrayan sular, böcekler, hayvanlar, insanlar ve kullanılan ekipmanlar ile taşınabilir (Harveson ve Schwartz, 2007).

1.1.5.3 Parazitik hastalıklar

Fasulyede, *Meloidogyne* spp. nematodları, istila altındaki tarlalarda %60'a varan verim kayıplarına neden olur. Kök-ur nematodları ile enfeksiyon bitkide nodülasyonu ve nitrojen fiksasyonunu baskılar (Kimenju vd., 1999).

1.1.5.4 Viral hastalıklar

Fasulyede hastalığa neden olan virüslerden birisi fasulye mozaik virüsüdür (BCMV). Bu virüs nedeni ile oluşan enfeksiyon, fasulye yaprakları üzerinde mozaik deseni oluşturur. Yapraklarda aşağı doğru bir büzülme ve kıvrılma meydana gelebilir. BCMV, enfekte olmuş yabancı otlarda ve tohumda konaklar ve yaygın olarak bitkiden bitkiye enfekte olmuş tohum veya mekanik dokunma yoluyla bulaşır (Lipa, 2005).

Fasulye altın mozaiği (BGM), fasulye altın mozaik virüsünün (BGMV) neden olduğu bir hastalıktır. Hastalık belirtileri, yapraklarda altın sarısı mozaikler, yaprak kıvrılması, bitkide bodurluk ve bakla bozulmasıdır. BGVM, beyaz sinekler tarafından bulaşır (Lipa, 2005).

Fasulye sarı mozaik virüsü (BYMV), fasulyenin çeşidine, çevresel faktörlere ve enfeksiyon anındaki büyüme aşamasına göre değişik semptomlar oluşturabilir. Fasulye sarı mozaiği (BYM) belirtileri genellikle yaprakta sarı ve yeşil mozaik alanlar oluşturur. Genellikle baklaları etkilemez ama bitkide bakla başına tohum sayısını azaltabilir (Lipa, 2005).

Kırmızı düğüm, tütün çizgi virüsünün (TSV) sebep olduğu ve genellikle Güneydoğu ABD ve Meksika'da sıkça görülen bir hastalıktır. Enfeksiyon belirtisi gövdedeki düğümlerin kızarmasıdır. Enfekte bitkilerde gövdedeki düğümler bükülüp kırılabilir (Lipa, 2005).

Salatalık mozaik virüsünün (CMV) neden olduğu salatalık mozaigi, mozaik renk değişikliğine ve yapraklarda ciddi bozulmalara yol açabilir. Baklalar kavisli ve benekli hale gelir. CMV, yaprak bitleri ve tohum tarafından taşınır (Lipa, 2005).

Yonca sarı damar virüsü (CYVV) bitkide sarı mozaige ve bitki boyunda küçülmeye neden olur. Bu virüs yaprak biti ile bulaşır ve baklagillerde ve bazı süs bitkilerinde konaklar (Lipa, 2005).

1.2 Bitkide Stres

Bitki stresi, bitkinin gelişimini, üretimini ve yaşam döngüsünü etkileyen herhangi bir dış faktör olarak tanımlanabilir. Çevresel veya biyolojik değişen herhangi bir dış faktörün etkisi bitkide homeostazi etkileyebilir. Bu değişiklikler biyolojik stres olarak tanımlanır. Bu stresler, değişen gen ekspresyonu, hücrel metabolizma, mahsul verimi, büyüme oranlarında değişiklik vb. gibi çeşitli bitki tepkilerine yol açarlar. Strese dayanıklı bitki türlerinde, strese uzun süre maruz kalmak bu strese karşı bir dayanıklılık gelişmesine yardımcı olabilir (Verma vd., 2013). Bitkide stres, biyotik stres ve abiyotik stres olmak üzere iki ana kategoriye ayrılabilir.

Biyotik stres canlı organizmalar, bakteriler, virüsler, nematodlar, böcekler ve yabani otlar tarafından bitkide oluşturulan strestir. Oluşturulan biyotik stres ile konakçı bitki besinlerden mahrum bırakılarak bitkinin ölümüne yol açabilir.

Abiyotik stres, kuraklık, su bolluğu, sıcaklık, soğukluk, radyasyon ve mekanik etkiler gibi çevresel faktörler dışında tuzluluk, mineral toksisitesi gibi maddelerin bitkide oluşturduğu strestir.

1.2.1 Bitkide stres olaylarına tepki

Bitkinin stres durumlarında tepkisi üç ana aşamada ele alınabilir; alarm aşaması, direnç aşaması ve tükenme aşaması. Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1988) bu aşamalara ek

olarak bitkide fizyolojik fonksiyonların kısmen veya tamamen yenilenmesine izin veren, ciddi hasarlar oluşmadan önce stresin ortadan kalkması ile meydana gelen rejenerasyon aşamasını eklemiştir.

Alarm aşaması: Bu aşamada katabolizma olayları anabolizma olaylarından daha fazla meydana gelir. Bitkide canlılık düşer ve bitkinin normal yaşamsal fonksiyonlarında aksamalar meydana gelir.

Direnç aşaması: Bitki bu aşamada stresle başa çıkmak için metabolik akışın yeni duruma adaptasyonu, onarım ve direnç mekanizmalarının aktivasyonu ve uzun vadeli morfolojik adaptasyonlar gibi mekanizmaları aktive eder.

Tükenme aşaması: Stres faktörünün devamlılığı ve güçlülüğü ile bitki giderek fizyolojisini ve canlılığını yitirir. Bu aşama sonunda bitki geri döndürülemez hasarlar alabilir veya aşama ölümle sonuçlanabilir.

Rejenerasyon aşaması: Stres faktörleri ortadan kaldırıldığı takdirde oluşan hasarlar kısmi veya tümüyle onarılabilir ve bitki optimal durumuna geri dönebilir (Lichtenthaler, 1988).

1.3 Tuz Stresi

Dünyanın gittikçe artan nüfusu ile birlikte gıda talebi de sürekli olarak artmaktadır. Tarım ürünlerine olan talep geçmişte arttığı gibi gelecekte de artmaya devam edecektir. Bu nedenle ekilebilir tarım arazilerinin sınırlılığı göz önüne alındığında ekilen mahsullerin verimliliği büyük önem taşımaktadır. Tuz stresi bitki verimliliğini etkileyen en büyük faktörlerden birisidir. Günümüzde 800 milyon hektardan fazla tarım arazisinin yüksek tuzluluktan etkilendiği düşünüldüğünde, tuz stresinin tarıma etkisi önemli ölçüde fazladır (Isayenkov, 2012). Tuzluluk, toprakta sodyum (Na^+), klor (Cl^-), kalsiyum (Ca^{2+}), magnezyum (Mg^{2+}), sülfat (S), bikarbonat (HCO_3^-) gibi suda çözünen iyonların toprakta zaman içerisinde birikmesi ile oluşur ve bu tarz topraklarda

yetiştirilen bitkilerin büyümesi ve gelişmesi olumsuz etkilenir (Lewis, 1984). Elektriksel iletkenliğe, pH'a, toplam çözünür tuz miktarına ve değiştirilen sodyum yüzdesine göre sınıflandırılan, tuzlu, asidik ve asidik-tuzlu olmak üzere üç ana tuzlu toprak türünden bahsedilmektedir (Ahmad vd., 2013).

Tuzluluğun bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerine rağmen bazı bitki türleri yüksek tuz ihtiva eden ortamlarda hayatta kalabilirler. Bu ortamlarda hayatta kalabilen bitkiler çeşitli savunma mekanizmaları kullanırlar. Tuz toleransına göre bitkiler glikofitler ve halofitler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadırlar (Flowers vd., 1977). Halofitler yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda büyüyebilirler. C4 fotosentez mekanizmasını kullanan halofitler terlemeyi ve su harcamasını azaltırlar (Isayenkov, 2012). Halofitlerin aksine çoğu tarım bitkisi tuzluluğa duyarlıdır. Yapılan çalışmalar çoğu halofit ve glikofitlerin birbirlerine benzer şekilde tuz stresine yanıt oluşturdıklarını göstermiştir (Hasegawa vd., 2000). Yine de glikofitler halofitler kadar etkili bir şekilde yanıt oluşturmazlar. Glikofitler üç ana mekanizma ile tuz stresine yanıt oluşturmazlar ve bu mekanizmalar hem ayrı ayrı hem de uyum içinde çalışabilirler. Bu mekanizmalar ile bitki toksik iyonların alımını engellemeye çalışır (Srivastava vd., 2015).

1.3.1 ROS

Bitkilerin tuz stresine maruz kalması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine sebep olmaktadır. Aşırı ROS üretimi bitkide, lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonu ve protein bozulmasına yol açabilir (Vinocur ve Altman, 2005; Pitzschke vd., 2006) . Yapılan çalışmalar, bitkilerde sinyal iletim molekülleri olarak ROS'un önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. ROS patojen enfeksiyonuna, programlanmış hücre ölümüne ve çevresel streslere verilen yanıtlara aracılık etmede önemli rol oynar (Torres ve Dangl, 2005). Tuz stresine bağlı ROS üretimi hücrede membran hasarına neden olur (Shalata vd., 2001) ve ROS miktarındaki bu artış, kloroplastta CO₂ konsantrasyonunda azalmaya neden olan stoma kapanmasından ve fotoinhibisyona neden olan NADP⁺ konsantrasyonunda azalmadan dolayı meydana gelir (Foyer ve Noctor, 2003).

1.3.2 ABA

Bitkilerdeki fizyolojik tepkiler arasında absisik asit (Hrabak vd., 2003) oldukça önemli bir role sahiptir. ABA, stres sırasında bitkinin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve hücrel süreçlerinde oldukça önemlidir. Bir stres hormonu olan ABA strese karşı verilen yanıtı hızlı bir şekilde eklenmesi ile bitkinin strese karşı dayanıklılığını arttırmada yardımcı olur. Fizyolojik fonksiyonların inhibisyonunun önlenmesi için, ABA üretimi hızlıca stres sinyalleri tarafından tetiklenmelidir. Stres kontrol altına alındıktan sonra normal bitki büyümesi ve fonksiyonlarının yeniden başlayabilmesi için ABA hızla parçalanmalı ve devre dışı bırakılmalıdır (Nakashima ve Yamaguchi-Shinozaki, 2013).

1.3.3 Tuz stresi sırasında hücre sinyalleri

Bitki hücreleri çevresel streslere maruz kaldıklarında çeşitli sinyal yollarından stres sinyalleri alırlar. Strese duyarlı bitki hormonları, sinyal dönüştürücüler ve düzenleyici transkripsiyonel moleküller gibi ikincil haberciler sinyal yolları aracılığı ile stres sinyallerini oluştururlar. Tuz stresine karşı erken tepki bitki hücrelerinde, apoplastik boşluktan ya da hücrenin iç depolarından Ca^{2+} salınımı ve sitozoldeki Ca^{2+} konsantrasyonunda meydana gelen ani artıştır. Ca^{2+} salınımı, siklik ADP riboz, NADP⁺, inositol polifosfatlar gibi liganda duyarlı iyon kanalları olan ikincil haberciler tarafından kontrol edilir. Bu moleküller bitki hücrelerinde Ca^{2+} salınımını sağlar (Schroeder vd., 2001).

Mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) mekanizması, bitki hücresinde ozmolit ve antioksidanların bir araya gelmesinden sorumludur. Kinazlar ve G-proteini gibi reseptörler MAPK yolağını aktive ederler (Kong vd., 2011).

Plazma zarı canlı hücre ile dış ortam arasında bir bariyer rolü oynar. Plazma zarındaki fosfolipidlerin görevi membranın ana omurgasını oluşturmak ve ikincil habercilerin üretimi için öncü görevi görmektir. Fosfolipazlar (PIP) sinyal iletiminde yer almanın

yanı sıra, sinyal kompleks moleküllerinin belirli bir konuma taşınması, birleştirilmesi gibi değişik görevlerde rol alırlar (Martin, 1998). PIP 2 hücrel iyon homeostazında rol alır. PI5K, PIP 2 üretiminde görev alan fosfatidilinositol 4-fosfat 5-kinazı (PIP5K) kodlayan genlerden birisidir (Mikami vd., 1998). Osmotik stres arttığında, PI5K geninin ekspresyonu artar ve doğal olarak PIP 2 üretimi de artar. PIP5K izoformlarının ekspresyonundaki artış, PIP 2'nin diasilgliserol ve inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) olmak üzere iki moleküle dönüşümünde katkıda bulunur. Diasilgliserol ve IP3, protein kinaz C'yi uyaran Ca^{2+} salımını tetikleyebilen ikincil habercilerdir (Chandna vd., 2013).

1.4 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Bitkilerde ROS üretimi hücrel oksidatif metabolizmanın bir sonucudur. Hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH) ve süperoksit radikal anyonu da (O_2^-) üretilen ROS ürünlerini dahildir. Bitkiler ROS'un potansiyel zararlarından korunmak için çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bu savunma mekanizmaları enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki başlık altında toplanabilir. ROS temizleme sistemi, katalaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz gibi enzimatik savunma sistemleri ve askorbat, glutatyon, karotenoid ve x-takoferol gibi enzimatik olmayan bileşenler bitkilerde bulunan potansiyel ROS zararlarına karşı bitkiyi koruyucu mekanizmalardır. (Kuźniak ve Urbanek, 2000).

H_2O_2 , potansiyel bir reaktif oksijen türüdür fakat serbest bir radikal değildir. Hidroksil radikali ve süperoksit ile karşılaştırıldığında bitki için görece daha güvenlidir. Öte yandan Fe^{2+} ile fenton reaksiyonu sebebiyle 2 OH'ye homolizi H_2O_2 'nin en yaygın toksisite etkisi olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra bitki hücrelnde bulunan Fe yaklaşık %80 oranında kloroplastta ihtiva edilir ve kloroplast hücrede bulunan iyi bir ROS kaynağıdır (Cheeseman, 2007).

Hücrede H_2O_2 'nin başlıca kaynakları kloroplast ve mitokondrilerin elektron taşıma zincirindeki hatalardır (Halliwell ve Gutteridge 1999). Ayrıca çeşitli çevresel streslere yanıt olarak bitkide H_2O_2 üretimi görülmüştür (Hernandez ve diğerleri, 1999). Örnek olarak Zlatev vd. (2006) kuraklık toleransının, antioksidan enzimlerdeki artışlarla

doğrudan ilişkili olduğunu, lipid peroksidasyonu ve H_2O_2 birikimi seviyeleriyle ise ters orantılı olduğunu bildirmiştir. Kuźniak ve Urbanek (2000), H_2O_2 'nin biyotik ve abiyotik stresler sırasında ikili bir rolü olduğunu ve H_2O_2 'nin aşırı biriktiğinde hücrenin bileşenleri üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğunu fakat bitki stres yanıtının ilk aşamalarında koruyucu stres yanıt mekanizmalarının indükleyicisi olarak hareket ettiğini rapor etmişlerdir.

1.5 Kuraklık Stresi

Bitkiler, bitki büyümesi ve gelişimini etkileyen, mahsul verimini düşüren çeşitli streslere maruz kalırlar. Bu stresler arasında bitkinin verimini en çok etkileyen streslerden birisi kuraklık stresidir. Tarımsal açıdan kuraklık, yağmur sıklığının azaldığı, ortalamanın altında yağış olduğu veya normalin üzerinde buharlaşmanın olduğu dönemdir (Rollins vd., 2013). Öte yandan toprakta yeterli miktarda su bulunmasına rağmen bitkinin suyu topraktan alamaması da kuraklık stresine sebep olur (Ashraf ve Ozturk, 2008). Su, odunsu olmayan bitkilerin biyokütlesinin yaklaşık %80-95'lik bir kısmını oluşturur ve bitki büyüme ve gelişmesi, metabolizması gibi bir çok açıdan önemli bir role sahiptir (Lisar vd., 2012). Bitkide su eksikliği ABA biyosentezini hızlandırır. Kuraklık stresi genellikle bitkide fizyolojik, ekolojik, morfolojik, moleküler ve biyokimyasal değişiklere yol açar (Shao vd., 2008; Farooq vd., 2009).

Bitkilerin su yetersizliğine tepkileri, eksikliğin uzunluğuna, bitkinin türüne, yaşına ve gelişim aşamasına göre değişiklik gösterebilir (Rao vd., 2006). Bitkiler kuraklık sırasında genel olarak su kaybını önlemeye ve hücrelere su girişini arttırarak normal hücre fonksiyonlarını devam ettirmeye çalışır (Farooq vd., 2012).

1.5.1 Bitkide kuraklık stresinin etkileri

Bitkide kuraklık stresinin belirtileri bitkinin türüne, büyüme koşullarına, gelişiminin hangi aşamada olduğuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Kuraklık stresinin uzunluğu, şiddeti, toprak özellikleri ve bitkinin gücü stres etkilerini

belirleyen faktörler arasındadır. Bazı durumlarda sıklıkla görülen semptomlara ek olarak dal çatlaması, gövde incilmesi, nekroz ve aşırı durumlarda bitki ölümü de görülebilir (Arbona vd., 2013; Sapeta vd., 2013).

1.5.2 Bitki büyümesi ve gelişmesi

Kuraklık bitki büyümesi ve gelişmesini önemli ölçüde azaltır (Shao vd., 2008). Bitki erken bir dönemde kuraklık stresi altında kalır ve bu stres çimlenmeyi etkilerse düşük tane verimine neden olabilir. Erken dönem kuraklığında bitkinin su alımının azalması, enerji arzının düşüşü ve enzim aktivelerindeki bozukluktan dolayı çimlenme olumsuz bir şekilde etkilenir (Okçu vd., 2005). Hücre büyümesi ve gelişmesi, hücrelerin büyümesi, bölünerek çoğalması ve farklılaşmasına bağlıdır. Bu olaylar turgor kaybı, enerji arzındaki düşüş ve enzim aktivitelerinin bozulması nedeniyle kuraklık stresinden etkilenir (Kiani vd., 2007). Stres koşullarında, stresin şiddeti, süresi ve zamanlaması ve stres sonrasında bitkinin tepkisi oldukça önemlidir.

Yaprak alanı indeksi (LAI) (Blair vd.), tarla koşullarında mahsullerin özümseme gücünü gösteren yaprak alanının zemin alanına oranıdır. Kuraklık stresi genel olarak bitkilerde LAI'yi azaltır. Yapılan çalışmada kuraklık stresi altında ayçiçeğinin LAI'sinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir (Hussain vd., 2009).

1.5.3 Bitki ve su ilişkisi

Bağıl su içeriği (RWC), stoma direnci, yaprağın sıcaklığı, terleme hızı ve yaprak su potansiyeli bitki ile su arasındaki ilişkiyi etkileyen önemli faktörlerdendir (Kirkham, 2005). Bitkide RWC azalması kuraklığın bitki üzerindeki en erken etkisidir (Farooq vd., 2009). RWC'nin düşüklüğü yapraktaki su potansiyelini azaltarak stoma kapanmasına sebebiyet verir. Yüksek stoma direnci terleme oranını düşürerek yaprağın sıcaklığının artmasına neden olur. Stoma kapanması yaprak sıcaklığını artırarak fotosentez, iyon alımını, solunum gibi metabolik fonksiyonların ve proteinler gibi makromolekül

sentezinin bozulmasına neden olur (Lisar vd., 2012; Bhargava ve Sawant, 2013; Sapeta vd., 2013).

1.5.4 Mineral alımı

Kuraklık stresi bitkide mineral alımını etkiler ve iyon homeostazını bozar (Akhtar ve Nazir, 2013). Kuraklık stresinden altında azalan su miktarı topraktaki besin miktarını sınırlayarak köklerdeki besin alımını azaltır ve doku konsantrasyonlarında azalmaya sebep olur (Farooq vd., 2009). Bitkilerde kuraklık stresinden dolayı mineral alımında önemli bir rol oynayan hücre zarının bozulması iyon homeostazının bozulmasına yol açar. Bu nedenle hücre zarının stabilitesi kuraklık direncinde önemli etkenlerden birisidir (Farooq vd., 2009; Lisar vd., 2012). Besin alımında yer alan enzim aktivitesinin kuraklık stresinden dolayı bozulması kuraklığın önemli etkilerinden birisidir. Örneğin fasulyede yaprak ve nodüllerdeki nitrat redüktazın aktivitesinin kuraklık stresi altında önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Ashraf ve Iram, 2005).

1.6 Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon, bir genin DNA dizisinden bir RNA transkripti üretimi ile sonuçlanan gen ekspresyonunun ilk adımıdır. Transkripsiyon faktörleri, gen düzenleyici bölgelerdeki belirli DNA dizilerine bağlanan ve transkripsiyonu kontrol eden spesifik bir protein sınıfıdır. Ökaryotik genomlarda tüm genlerin yaklaşık %3-10'luk kısmı transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerden oluşmaktadır (Kummerfeld ve Teichmann, 2006). Transkripsiyon faktörleri diğer proteinlerde bulunmayan spesifik özellikleri nedeniyle diğer proteinlerden ayrı bir sınıftır. Çiftler ve ağlar halinde çalışabilirler, dolaylı veya doğrudan DNA'ya bağlanabilirler ve bazıları ligand ve hormonlar ile etkileşime geçebilir (Yusuf vd., 2012). Ayrıca stres toleransının düzenlenmesi dahil hücrede değişik biyolojik süreçlerle ilişkilidirler (Shao vd., 2015).

1.6.1 Trihelix transkripsiyon faktör ailesi

Bitkilerde 60'tan fazla transkripsiyon ailesi bildirilmiştir (Riechmann vd., 2000). Bunlardan birisi de sadece bitkilerde bulunan Trihelix transkripsiyon faktör ailesidir. İlk olarak 1990'larda bezelyede (*Pisum sativum*) tanımlanmıştır. Işığa bağımlı ekspresyonu düzenlemek için *rbcS-3A* geninin promotor bölgesindeki 5'-G-Pu-(T/A)-AA-(T/A)-3' çekirdek dizisine bağlanır (Green vd., 1987). Işığa duyarlı GT elementlerine bağlandıklarından dolayı ilk olarak GT faktörleri olarak adlandırılmıştır. Tipik bir sarmal-döngü-sarmal-döngü-sarmal yapısına sahip olduklarından günümüzde trihelix olarak adlandırılmaktadır. Bu trihelix alanı Myb/SANT-LIKE DNA-bağlanma alanına benzediği belirlenmiştir (Nagano, 2000).

Arabidopsis'te yapılan bir çalışma 30 Trihelix transkripsiyon faktörü tanımlamış ve bunları Trihelix'in karakteristik korunan alanlarına göre GT-1, GT-2, GT γ , SH4 ve SIP1 olmak üzere 5 alt aileye sınıflandırmıştır (Kaplan-Levy vd., 2012).

GT-1: İlk olarak bezelyede (*Pisum sativum*) keşfedilen GT-1, ışıkla indüklenen *rbcS-3A* geninin promotorundaki GT elemanına spesifik olarak bağlanır (Green vd., 1987). *Arabidopsis*'te GT-1 bir transkripsiyonel aktivatördür (Le Gourrier vd., 1999). Her alt aile trihelix alanı içerse de GT-1 ve SH-4'te her trihelix alanının her alfa sarmalının dahili hidrofobik bölgesi bir triptofan kalıntısı içerir. GT-2 ve GT γ 'da üçüncü triptofanın yerini fenilalanin ve SIP1'de ise izolösin almıştır (Ayadi vd., 2004; Xie vd., 2009). GT-1 kanadındaki sıradışı bir gen, bir metallo- β -laktamaz-trihelix kimerasını kodlar. Trihelix dizisi C-terminalinde ortaya çıkar ve DNA bağlanma alanının dördüncü sarmalından hemen sonra biter (Kaplan-Levy vd., 2012).

GT-2: Pirincin *fitokrom A* genine (*phyA*) bağlanan DNA bağlama faktörü ilk olarak GT-1 transkripsiyon faktörü olarak düşünülmüş fakat sonrasında faktörün sekans bağlama tercihinin GT-1'den farklı olduğu görülmüş ve GT-2 olarak adlandırılmıştır. GT-2 her biri GT-1 ile ilişkili olan çift DNA bağlanma alanları taşımaktadır (Kaplan-Levy vd., 2012). Diğerlerine nazaran fazladan bir tane amfoterik alfa sarmal yapısı içerir. Transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapabilir (Ni vd., 1996).

SH4: Bu grubun üyelerinden biri genetik varyant aracılığı ile karakterize edilmiş pirinçteki *LOC_Os04g57530*'dur. Bu çekinik allel, hasattan önce olgun tohumların kaybını azaltır. Gen, parçalanmayan evcilleştirilmiş pirinç (*Oriza sativa* ssp. *indica*) ile parçalanmış bir vahşi tür (*Oryza nivara*) arasındaki bir çaprazın soyundan ayrılan nicel bir özellik lokusu olan SHATTERING4 (SH4) olarak klonlanmıştır (Li vd., 2006).

GT γ : Bu grubun işlevleri çok fazla araştırılmamıştır. Son zamanlarda yapılan araştırmada, pirinçte GT ailesi sistematik olarak araştırılmış ve bildirilen üyelere düşük benzerlik gösteren bir alt aileye mensup olan *OsGT γ* belirlenmiştir. *OsGT γ* üyelerinin protein dizileri, trihelix DNA bağlama yapısını oluşturduğu tahmin edilen ancak bilinen GT faktörlerinin trihelix DNA bağlama alanından farklı olan üç bölgede yüksek oranda korunduğu görülmüştür. Bu bulgular ışığında *OsGT γ* alt aile üyelerinin evrimsel süreçte GT faktör ailesinden ayrılıp özel bir alt dal oluşturduğu düşünülmektedir (Fang vd., 2010).

SIP1: Bu grubun ilk üyesi *Agrobacterium tumefaciens*'te 6b onkojenik proteinine bağlanarak tanımlanmış ve 6b etkileşimli protein1 (SIP1) olarak adlandırılmıştır (Kitakura vd., 2002). *Arabidopsis*'te SIP1 grubu ile yakından ilişkili iki genin, fidelerde ve erken embriyogenezde geç embriyo gelişim genlerini baskıladığı bildirilmiştir (Gao vd., 2009; Willmann vd., 2011).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son yıllarda birçok bitki için tüm genom dizileme çalışmaları yapılmış ve gen ailelerinin önemli işlevlere sahip olduğu belirlenmiştir. *Trihelix* gen ailesiyle ilgili çalışmalar da biyologların ilgisini çekmiş ve bu konuda araştırmalar yürütülmüştür (Fang vd., 2010; Kaplan-Levy vd., 2012)

Trihelix genlerinin bitki büyüme ve gelişmesinde önemli roller oynadığına dair kanıtlar vardır (Xi vd., 2012). Örneğin, *Arabidopsis PETAL LOSS (PTL)* genleri (GT-2 alt ailesi) taç yaprakların ve sepallerin gelişimini düzenlemektedir (Brewer vd., 2004).

Trihelix genleri biyotik ve abiyotik streslere yanıtlarda da kilit roller oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada pirinç geni *GTP-1*'in tuz stresine karşı direnci artırdığı, ABA muamelesi ve kuraklık stresi tarafından indüklendiği bildirilmiştir. Buna ek olarak, *GTγ-2* ve *GTγ-3* birçok abiyotik stres tarafından güçlü bir şekilde indüklenmiştir (Fang vd., 2010). Transgenik *Arabidopsis* bitkisinde ise *GmGT-2A* ve *GmGT-2B*'nin aşırı ekspresyonun, tuz, kuraklık ve donma streslerine toleransı artırabileceği gösterilmiştir (Xie vd., 2009).

Arabidopsis thaliana'da *AST1*(*Arabidopsis* SIP1 clade *Trihelix1*)'in tuz ve ozmotik stres gibi abiyotik stresler ile ifadesinin indüklendiği gösterilmiştir. Bu indüklenmiş *AST1* proteininin, stomatal açıklık, K⁺ / Na⁺ homeostazisi, prolin biyosentezi, ROS süpürme ve *LEA*'lar gibi abiyotik stres toleransında yer alan genlerin ifadelerini düzenlemek için AGAG kutularına ve / veya GT2–5 motiflerine bağlandığı tespit edilmiştir. Bu genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimlerinde azaltılmış su kaybı, Na⁺ birikimi, K⁺ kaybının önlenmesi, yüksek prolin seviyesi, azalmış ROS birikimi ve yüksek *LEA* ekspresyonu dahil fizyolojik değişikliklere yol açarak hücre membranının stabilize edilmesi ve moleküler şaperonlar olarak stresin neden olduğu protein agregasyonunu önlemede rol oynadığı düşünülmüştür. Bu fizyolojik değişiklikler abiyotik stres toleransını iyileştirmiştir (Xu vd., 2018).

Yapılan başka bir çalışmada, *Triticum* ve *Brachypodium distachyon* Trihelix transkripsiyon faktörleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda *TaGT* ve *BdGT* genlerinin promotorlarında birçok cis-element tespit edilmiştir. Bu cis elementlerin çoğunun, bitki büyümesi / gelişimi ve abiyotik stres tepkisinde rol oynadığı belirlenmiştir (Wang vd., 2019).

Camellia sinensis üzerinde yapılan bir çalışmada, 10 adet *Trihelix* geni tanımlanmıştır. *Trihelix* ailesinin iki geninin ekspresyon seviyeleri, çeşitli abiyotik stresler altında önemli ölçüde değişmiştir. *GT1 - 3* ve *GT2 - 1*'in tuz stresine yanıt olarak ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Li vd., 2017).

Chrysanthemum morifolium'da yapılan bir çalışmada, 20 adet *Trihelix* geni karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda, *CmTH20*'nin ABA, NaCl, PEG ve yüksek sıcaklık işlemleriyle indüklendiği, *CmTH2* ve *CmTH14*'ün NaCl stresi, *CmTH11*, *CmTH12*, *CmTH15* ve *CmTH18*'in PEG muamelesi ile indüklendiği gösterilmiştir (A. Song vd., 2016).

Dendrobium officinale'de yapılan bir çalışmada 32 adet *Trihelix* geni (*DoGT*) belirlenmiştir. *DoGT* genlerinin promotorlarında birçok cis-etkili element tespit edilmiştir. Bu elementlerin birçoğunun bitki büyümesi / gelişimi ve abiyotik stres tepkisi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. *DoGT* genlerinin soğuk ile muameleden sonra önemli ölçüde yukarı - regüle / aşağı - regüle edildiği gösterilmiştir. Ayrıca *DoGT20* hariç tüm *DoGT* genlerinin stres tepkisi ile ilişkili olan MYB elementini ve buna ek olarak *DoGT15*'in düşük sıcaklık yanıt elemanı olan (LTR) içerdiği gösterilmiştir (Tong vd., 2021).

Fagopyrum tataricum üzerine yapılan çalışmada, 31 adet *FtTH* geni tanımlanmıştır. Çalışmanın sonucunda köklerde yüksek oranda ifade edilen dört *FtTH* geninin (*FtTH4*, *FtTH12*, *FtTH23*, *FtTH25*) kuraklık koşullarına adaptasyonda rol oynadığı düşünülmüştür. Ek olarak, *FtTH18*'in diğer dokulara göre en düşük meyvede ifade edildiği gözlenmiştir. *FtTH18* ve *FtTH23* ekspresyonunun azalmasıyla bu iki genin, meyvenin olgunlaşma ile alakalı genleri üzerindeki inhibe edici etkisinin azaldığı ve

meyvenin normal şekilde gelişmesini ve olgunlaşmasını sağlayan embriyojenez aşamasıyla, protein ve diğer depolama materyallerini biriktirdiği gözlenmiştir (Ma vd., 2019).

Glycine max'ta yapılan bir çalışmada 71 adet *Trihelix* geni tanımlanmıştır. Bu çalışmada tanımlanan bu genlerden 11 tanesinin su taşkını stresine yanıt verdiği bildirilmiştir. Strese yanıt veren bu genlerin tümünün en az 1 strese duyarlı cis elementi içerdiği tespit edilmiştir. *Glyma.19G190000* geninin ekspresyon seviyesinin su altında kalma durumuna göre önemli ölçüde indüklendiği bulunmuştur. Buna ek olarak soya fasulyesindeki 71 *Trihelix* geninden 31'inin ABA'ya duyarlı elementler içerdiği bildirilmiştir (W. Liu vd., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum* ve *Gossypium raimondii*'de *Trihelix* genleri tarafından kodlanan 102, 51 ve 51 protein tanımlanmıştır. Bu veriler ışığında *Gh_A05G2067*'nin kuraklık ve tuz stresi koşullarında yukarı regüle edildiğini gösterilmiştir. *Gh_A05G2067*'nin aşırı ifadesinin malondialdehit ve hidrojen peroksit seviyesini düşürüp reaktif oksijen türü enzimlerin aktivitesini arttırarak pamuğa kuraklık toleransı kazandırdığı gözlenmiştir. Ayrıca *Gh_A05G2067* susturulmuş pamuk bitkilerinin klorofil içeriği, nispi yaprak su içeriği, kesilmiş yaprak su kaybı ve hücre zarı stabilitesine ek olarak yüksek seviyelerde oksidan enzimler nedeniyle yüksek düzeyde oksidan hasarı sergilediği gözlenmiştir (Magwanga vd., 2019).

Zea mays üzerinde yapılan bir başka çalışmada, 59 adet *GT* faktörü tanımlanmıştır. Çalışma 59 *GT* faktöründen 17'sinin ifade seviyeleri kuraklık stresi altında artmış ve 3 tanesinin ifade seviyeleri ise azalmıştır. Su basması stresi altında ise 14 tanesinin mRNA ekspresyon seviyeleri artmıştır ki bu 14 *GT* faktöründen 8 tanesi kuraklık stresi altında seviyeleri artan 17 *GT* faktörü ile örtüşmüştür (Du vd., 2016).

Medicago truncatula'da yapılan bir çalışmada, 38 adet *GT* geni (*MtGT*) tanımlanmıştır. Tanımlanan bu genlerden *MtGT10*, *MtGT19*, *MtGT20*, *MtGT22* ve *MtGT33*, *M. truncatula*'da ABA, kuraklık ve tuz stresleri altında önemli derecede indüklenmiştir. Ayrıca çalışmaya göre, *MtGT12* çiçeklerde ve tohumda spesifik olarak eksprese edilmiş

ve *MtGT6* çiçek organlarını ve embriyo gelişimini etkileyebilecek seviyede, çiçekte yüksek ekspresyon göstermiştir (Xiqiang Liu vd., 2020).

Oryza sativa'da yapılan bir çalışmada, *OsGTγ-2*'nin tuzluluk, ABA, ozmotik ve oksidatif stresler tarafından köklerde, kılıfta, gövdelerde ve tohumda indüklenerek ifade edildiği bildirilmiştir. Ayrıca tuz stresi altında, *OsGTγ-2*'yi aşırı eksprese eden hatlarda tohum çimlenme oranı, fide büyümesi ve hayatta kalma oranında iyileşme gözlenmiştir. Buna ek olarak, CRISPR / Cas9 aracılı *OsGTγ-2* nakavt hatları tuza karşı duyarlı fenotipler göstermiştir (Xiaoshuang Liu vd., 2020).

Phyllostachys edulis'ta yapılan bir çalışmada, toplamda 35 adet *Trihelix* geni (*PeTTF*) tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda bu genlerin stres koşullarında bitki tepkilerinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Cheng vd., 2019).

Pogostemon cablin'de yapılan bir çalışmada, 16 adet *Trihelix* geni (*PatTH*) çalışılmıştır. Çalışmada tuzluluk, kuraklık ve soğuk koşullar dahil abiyotik stresler altında her *PatTH* geninin çalışılan stres koşullarından en az bir tanesine yanıt verdiği rapor edilmiştir. Ek olarak *PatGT-1*'in patchoulol sentezinde bir negatif regülatör olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir (Li vd. 2021).

Populus trichocarpa'da yapılan çalışmada, 56 adet *Trihelix* geni belirlenmiştir. Belirlenen genlerden çoğunun promotor bölgesinde stres ve fitohormon ile ilişkili cis-elementler saptanmıştır. Genlerin ekspresyon profilleri, bunların öncelikle yapraklarda ve köklerde ifade edildiğini göstermiştir. Kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon analizi ile de *Trihelix* gen ailesinin ozmotik, absisik asit, salisilik asit, metil jasmonat ve patojen enfeksiyonuna yanıt olarak önemli ölçüde indüklendiğini gösterilmiştir. Ayrıca *PtrGT10*, ozmotik yanıtta yer alan miR172d'nin hedef geni olarak tanımlanmıştır (Wang vd., 2016).

Solanum habrochaites'te *Trihelix* ailesine ait bir gen olan *ShCIGT*'nin çeşitli dokularda ifade edildiği ve ekspresyonunun çoklu abiyotik stresler ve ABA ile indüklendiği

gösterilmiştir. Ek olarak, *ShCIGT*'nin aşırı ekspresyonunun domateste soğuğa ve kuraklığa karşı dayanıklılığı arttırdığı ve transgenik bitkilerin ABA'ya karşı hassasiyetinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca *ShCIGT*'nin bitki büyümesini, metabolizmasını, gelişim ve stres mekanizmasını kontrol eden metabolik sinyal ağında bir enerji sensörü olan SnRK1 ile etkileşime girdiği bulunmuştur (Yu vd., 2018).

Triticum üzerine yapılan başka bir çalışmada, 94 adet buğday *Trihelix* geni tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların ışığında buğday *Trihelix* genlerinin evriminin ana itici gücünün gen duplikasyon olayları olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca ifade profillemesi analizi ile buğday *Trihelix* genlerinin başta tuz ve soğuk stresi olmak üzere birçok abiyotik strese yanıt verdiği rapor edilmiştir (Xiao vd., 2019).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinde Trihelix Proteinlerinin Tanımlanması

Fasulye bitkisinin biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. Fasulye bitkisindeki Trihelix proteinlerinin belirlenmesi için veri tabanı olarak PlantTFDB kullanılmıştır (Tian vd., 2020).

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)

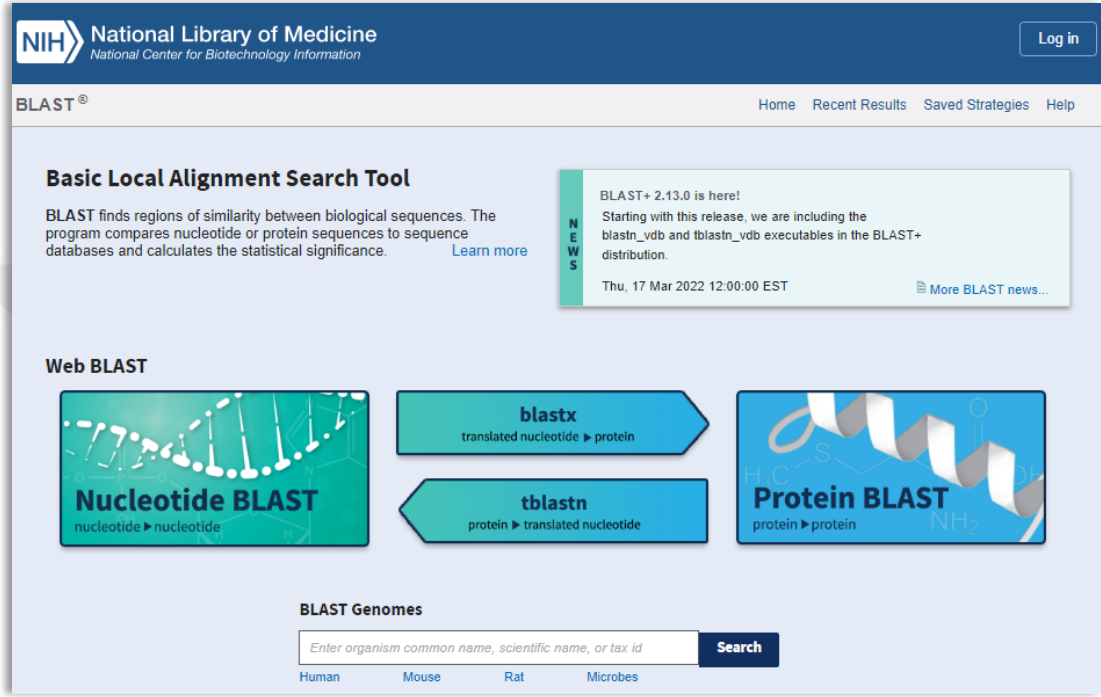
Quick links: *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Solanum lycopersicum*, *Zea mays*
Couldn't find the species interested? Please try the extended TF repertoires or identify TFs by the prediction server.

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)		

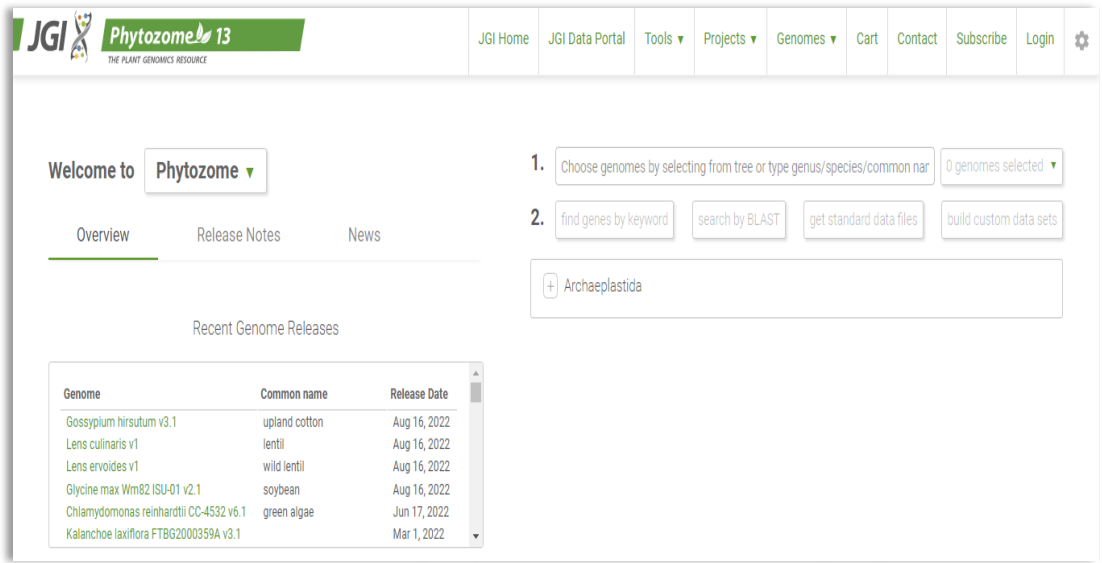
Şekil 3.1 Bitki transkripsiyon faktörleri veritabanı arayüzü (PlantTFDB)

PlantTFDB’den Trihelix transkripsiyon faktörlerine ait olan erişim numaraları ile genom, protein ve CDS dizileri Phytozome veri tabanından FASTA formatında elde edilmiştir. Elde edilen olası Trihelix dizileri NCBI ve Phytozome veri tabanları blast işlemi (blastp) yapılmıştır. Hidden Markov Modeli ile protein dizileri taranmıştır.

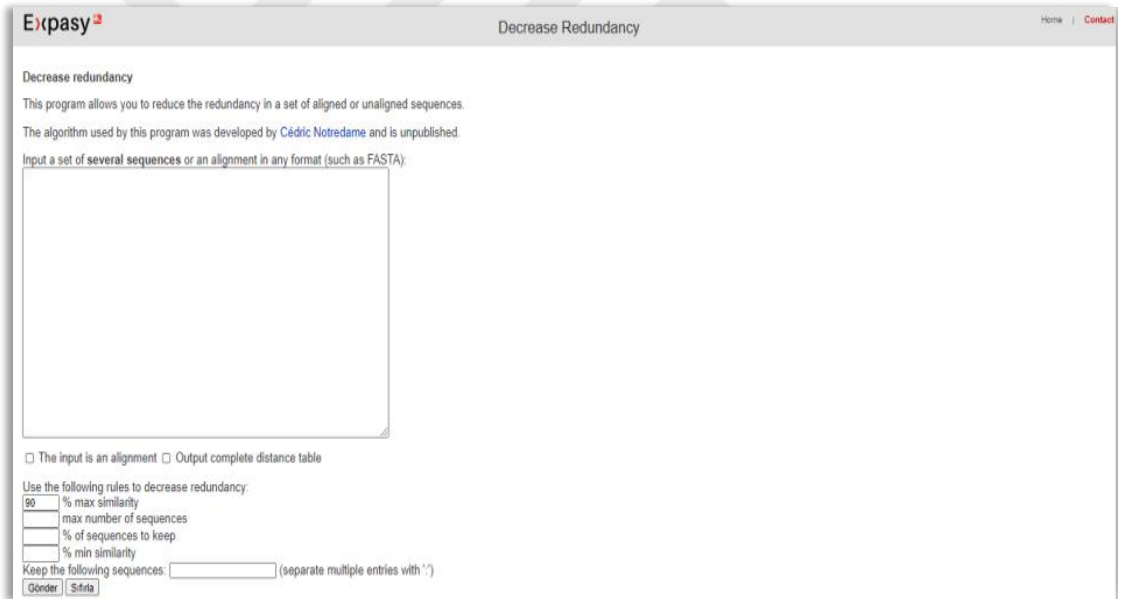


Şekil 3.2 NCBI blast veritabanı arayüzü

Pfam klanlar olarak bilinen, ilgili girdilerin üst düzey gruplarını oluşturur. Bir klan dizi, yapı veya profil-HMM benzerliği ile ilişkili olan bir pfam girdileri koleksiyonudur (Mistry vd., 2021). Tanımlanan *Trihelix* üyeleri arasında benzerlikleri kontrol etmek için ‘decrease redundancy’ veri tabanından yararlanılmıştır. *Trihelix* dizilerinin üzerinde bulundukları kromozom ve dizilerin konumları kaydedilmiştir.



Şekil 3.3 Phytozome veritabanı



Şekil 3.4 'Expasy Decrease Redundancy' online biyoinformatik aracı

Tanımlanan protein dizileri Expasy ProtparamTool aracılığı ile fiziksel ve kimyasal olarak tanımlanmıştır (Gasteiger vd., 2005). Proteinlerin pH aralığı, izoelektrik (pI) etki değerleri, moleküler ağırlık ve değişkenlik durumu belirlenmiştir.

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**):

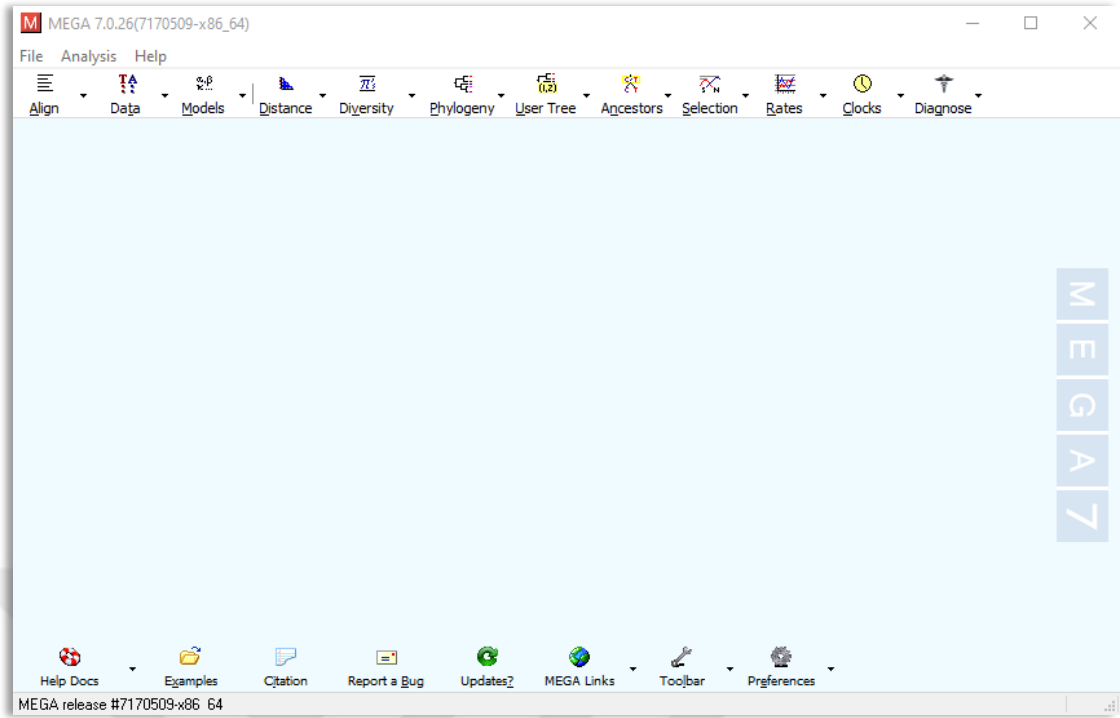
Or you can paste your own amino acid sequence (in one-letter code) in the box below:

Şekil 3.5 ProtParam online biyoinformatik aracı

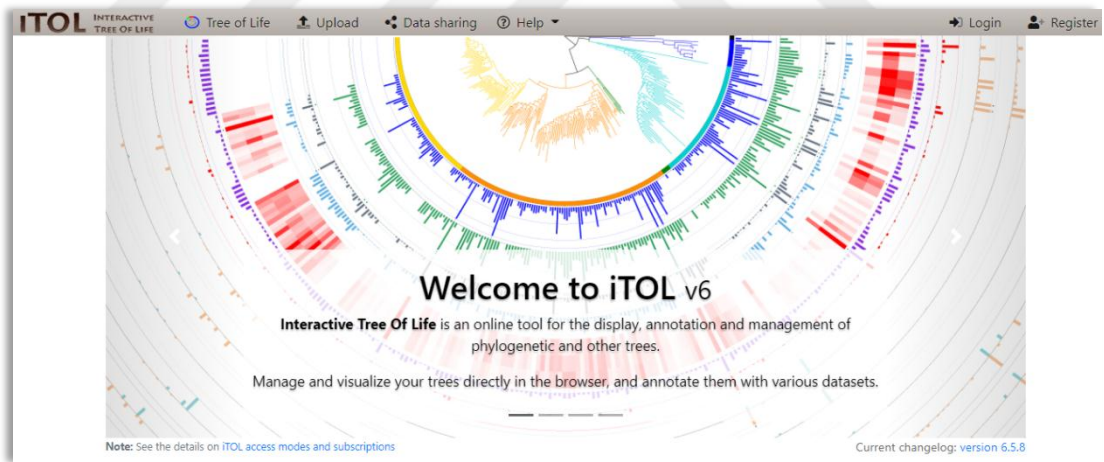
3.2 Trihelix Ailesi Filogenetik Analizler ve Korunmuş Motiflerinin Belirlenmesi

PvTH protein dizileri MEGA programında ClustalW ile hizalandı. Hizalamadan sonra elde edilen sonuçlar filogenetik ağaç çiziminde kullanıldı. MEGA v7 programında Maximum Likelihood yöntemi ile filogenetik ağaç elde edildi (Kumar vd., 2016). Interactive Tree of Life (iTOL) arayüzü yardımıyla ağaç renklendirildi (Letunic ve Bork, 2007).

Filogenetik ağacın verdiği sonucu doğrulamak için Gene Structure Display Server V2.0 (GSDS_{2.0}) yardımı ile ekzon-intron analizi yapıldı (Hu vd., 2015). Fasulye *Trihelix* genlerinin ekzon-intron bölgelerini belirten görsel oluşturuldu.



Şekil 3.6 'Mega 7.0' filogenetik analiz yazılımı



Şekil 3.7 'iTOL' online biyoinformatik aracı

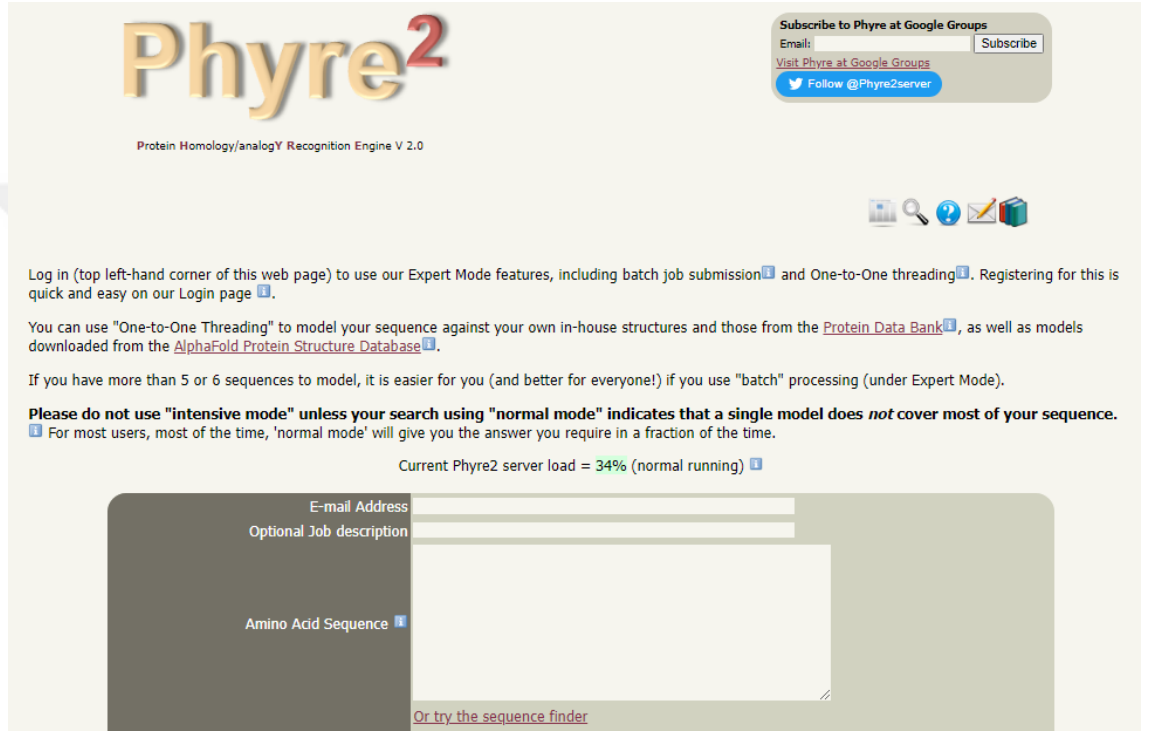
Şekil 3.8 (GSDS_{2.0}) online biyoinformatik aracı

Trihelix proteinlerinin korunmuş motif analizi yapıldı. Motif analizi MEME (Multiple EM For Motif Elicitation Tool) veri tabanı ile yapıldı (Bailey vd., 2015). Genişlikleri 2 ila 299 arasında olan motifler analiz edilmiştir.

Şekil 3.9 MEME online biyoinformatik aracı

3.3 Trihelix Proteinleri Üç Boyutlu Modellemesi

Trihelix protein dizileri ile Phyre2 veri tabanı yardımı ile olası 3 boyutlu protein yapıları belirlenmiştir (Kelley vd., 2015). Elde edilen protein modellerinden güvenilir bulunan homoloji modelleri gösterilmiştir.



Phyre2

Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0

Subscribe to Phyre at Google Groups

Email: Subscribe

Visit Phyre at Google Groups

Follow @Phyre2server

Log in (top left-hand corner of this web page) to use our Expert Mode features, including batch job submission and One-to-One threading. Registering for this is quick and easy on our Login page.

You can use "One-to-One Threading" to model your sequence against your own in-house structures and those from the Protein Data Bank, as well as models downloaded from the AlphaFold Protein Structure Database.

If you have more than 5 or 6 sequences to model, it is easier for you (and better for everyone!) if you use "batch" processing (under Expert Mode).

Please do not use "intensive mode" unless your search using "normal mode" indicates that a single model does *not* cover most of your sequence.

For most users, most of the time, 'normal mode' will give you the answer you require in a fraction of the time.

Current Phyre2 server load = 34% (normal running)

E-mail Address

Optional Job description

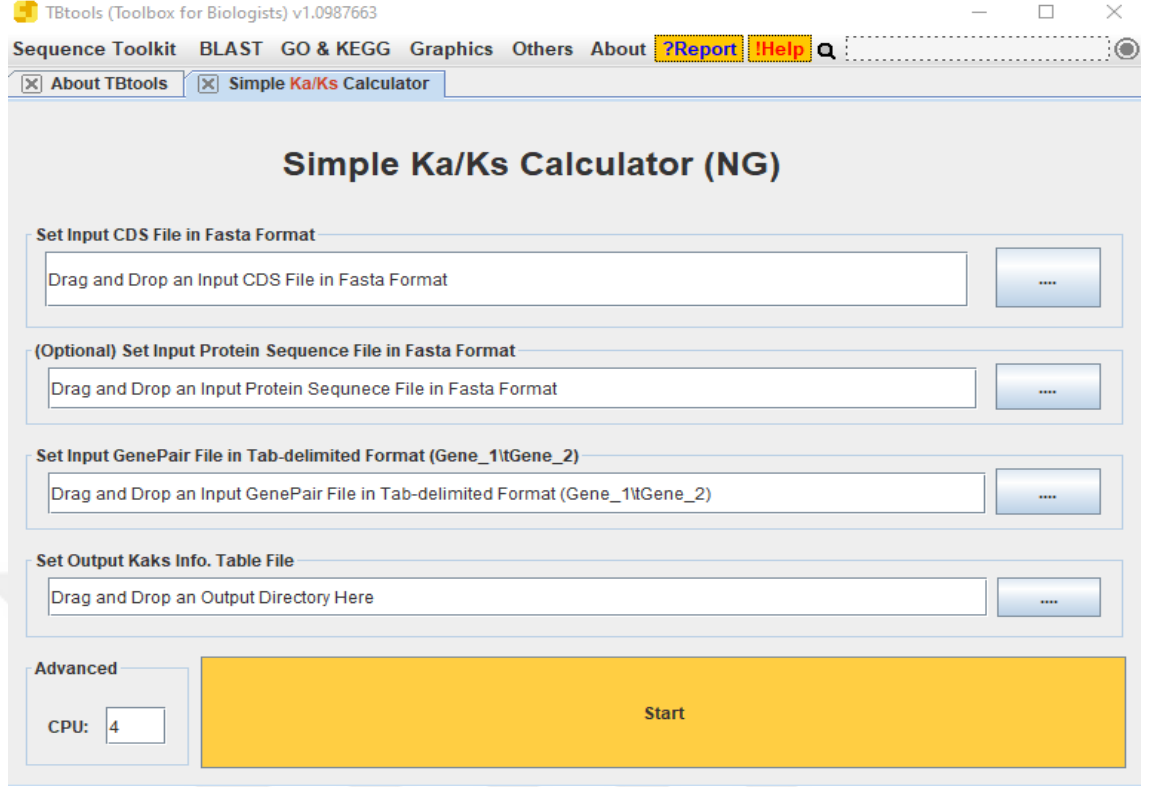
Amino Acid Sequence

Or try the sequence finder

Şekil 3.10 Phyre2 online biyoinformatik aracı

3.4 Fasulye *Trihelix* Gen Ailesi Gen Duplikasyonları ve *A. thaliana*, *G.max* Türleri Fiziksel Haritanın Oluşturulması

Fasulye, *G. max* ve *A. thaliana* arasında harita oluşturulması için Phytozome veri tabanından peptid dizileri alınmıştır. Alınan peptid dizilerine blast (blastp) yapılmıştır. *Trihelix* gen ailesinin fasulye ve diğer iki tür arasındaki gen duplikasyonları Plant Genome Duplication Database (PGDD) veri tabanı ile belirlenmiştir. Fasulye *Trihelix* genlerinin homolog gen ve homolog olmayan gen değişim oranları TBtools programı çoklu dizi hizalaması ile saptanmıştır.



Şekil 3.11 TBtools basit Ka/Ks hesaplama aracı

PAL2NAL veri tabanı ile Trihelix proteinlerinin aminoasit dizileri ve bu proteinlerin orijinal komplementleri bulunmuştur. Ks, Ka ve evrimsel zorlama değerleri bu yolla belirlenmiştir (Suyama vd., 2006). Duplikasyon oluşum zamanı MYÖ cinsinden $T = Ks / 2\lambda$ ($\lambda = 6.5E-9$) formülüyle elde edilmiştir.

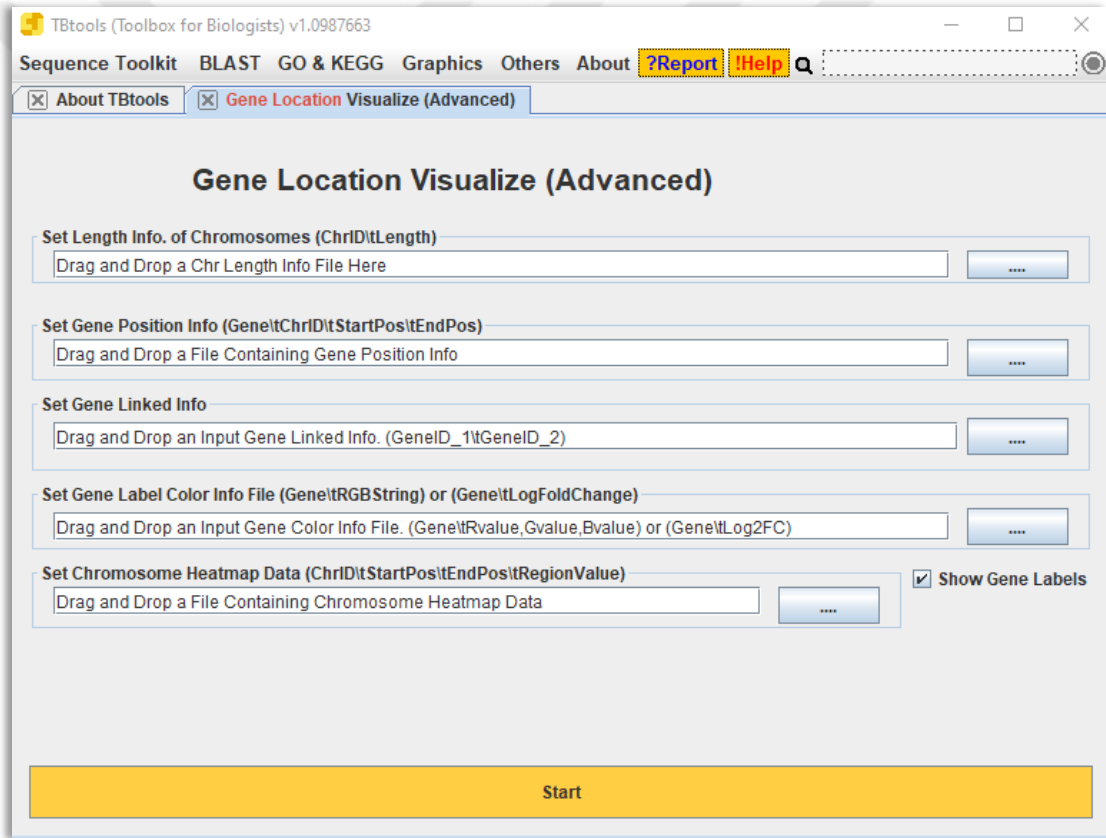


Şekil 3.12 PAL2NAL online biyoinformatik aracı

3.5 Fasulye *Trihelix* Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi

Fasulyede tanımlanan *Trihelix* genleri, başlangıç ve bitiş pozisyonları aracılığı ile TBTools programı kullanılarak, kromozom dağılımları gösterilmiştir.

Phytozome veri tabanı yardımı ile genlerin 1300 baz çifti gerisi promotor bölgesi olarak belirlenmiştir. PlantCARE veri tabanı yardımı ile promotor bölgelerindeki cis elementlerine ulaşılmıştır. Bulunan cis elementlerinin literatürdeki isimleri ve fonksiyonları çizelge halinde görselleştirilmiştir.



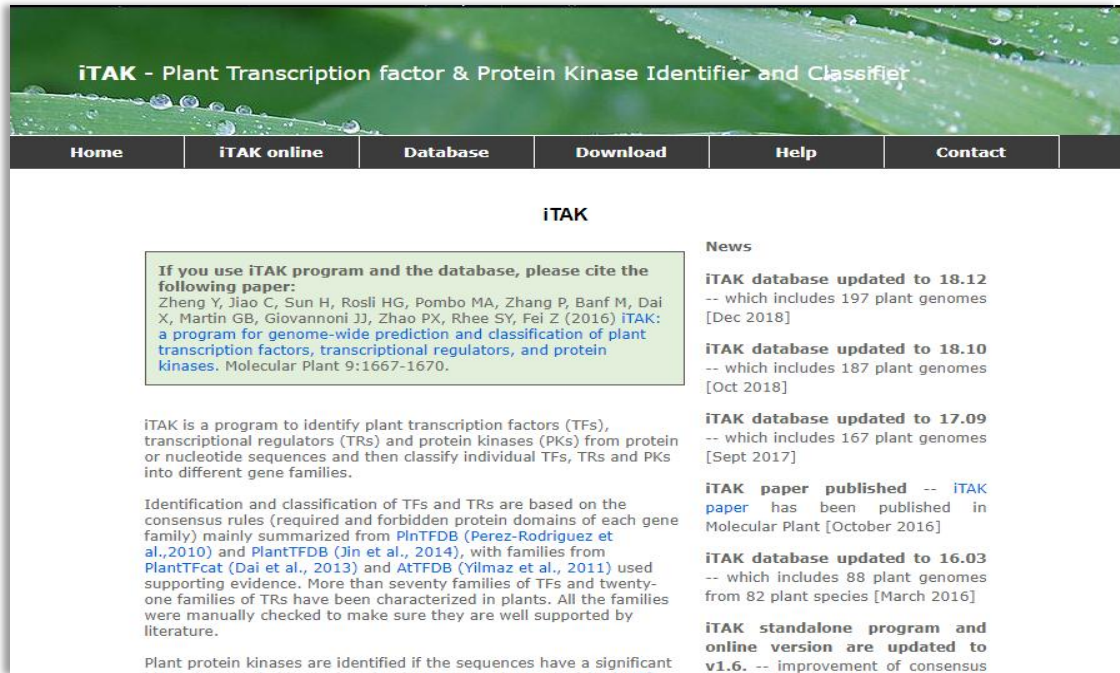
Şekil 3.13 TBtools aracılığı ile gen lokasyonlarının belirlenmesi



Şekil 3.14 Plantcare online biyoinformatik aracı

3.6 Sinteni Analizi

Sinteni, benzer gen bloklarının yakın zamanda farklılaşan birden farklı türün genomlarında bulunma durumu olarak açıklanabilir. Bu benzerlik gösteren genlere ortolog adı verilmiştir (Fitch, 1970). *A.Thaliana*, *G.max* ve *P.vulgaris*'de bulunan *Trihelix* genlerinin sinteni analizi TBtools programı kullanılarak görselleştirilmiştir.



Şekil 3.15 iTAK online biyoinformatik aracı

3.7 MikroRNA'ların (miRNA) Tespiti ve Hedefleri olan Fasulye *Trihelix* Genlerinin Belirlenmesi

CDS fasulye *Trihelix* genleri ve bitki mRNA'ları psRNATarget Server ile hizalanmıştır. Hizalama ile hedeflenen genlere ve miRNA erişim numaralarına ulaşılmıştır. Fasulye miRNA dizileri miRBase v22.0 veri tabanından elde edilmiştir. miRNA'nın hedef gen homologlarının güvenilirliğini doğrulamak için EST (NCBI) dizilerine karşı blastlama (blastx) yapılmıştır.

3.8 Fasulye *Trihelix* Genleri *In Siliko* Gen İfade Analizi

Trihelix mRNA ifade seviyelerine Phytozome veri tabanından ulaşılmıştır. Illumina RNA-seq verileri Sequence Read Archive'den elde edilmiştir. CLC-Genomics programı ile veriler normalize edilerek birleştirilmiştir (Sequencing, 2011). Hedef gen bölgesinin doku spesifik mRNA ifade seviyeleri ve RPKM ifade değerleri log2 formunda kare matrisler şeklinde kaydedilmiştir. TBtools programının yardımı ile ifade seviyeleri görselleştirilmiştir.

3.9 Bitki Büyüme koşulları, Materyalleri ve Stres Uygulaması

Yapılan çalışmada Erzurum Üniversitesi'nden temin edilen 'Elkoca' ve 'Serra' türü fasulyeler kullanılmıştır. Kültivarların tohumlarına yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Tohumlar 5 dakika süre ile %5 (v/v) hipoklorit içeren solüsyonlarda bekletilmiştir. Tohumlar çimlendirildikten sonra hidroponik sistemde, 0.2 L ölçüsünde 1/10 Hoagland çözeltisinde yetiştirilmiştir. Hoagland çözeltisi, son konsantrasyonu 10^{-6} M Mn, 2 mM Ca, 4 mM NO₃, $2 \cdot 10^{-7}$ M Cu, 10^{-8} M NH₄, 1 mM Mg, 2 mM K, 10^{-6} M Zn, 0.2 mM P, 10^{-6} M B ve 10^{-4} M Fe olan makro ve mikro besinlerden oluşmaktadır. Makro besinler KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, K₂SO₄, Ca(NO₃)₂·4H₂O ve KCl içerirken, mikro besinler H₃BO₃, MnSO₄, NH₄Mo, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O içermektedir (Barac vd., 2004). Fasulye fideleri, %70 bağıl nem, 25 °C, 250 mmol m⁻²s⁻¹ fotosentetik foton akışı ve ışığın sağlandığı dışarıdan izole bir şekilde kontrollü iklimlendirme kabini

büyütülmüştür. Fasulye fideleri trifolat aşamasına ulaştığında NaCl veya H₂O₂ ile muamele edilme aşamasına geçilmiştir. 150mM NaCl (orta seviye tuzluluk stresi) ve Hoagland çözeltisi 7 gün boyunca uygulanmış ve örnekler alınmış, H₂O₂ uygulaması için fideler iklimlendirme kabininde 7 gün büyütüldükten sonra %2'lik H₂O₂ ve Hoagland çözeltisi 1 gün boyunca uygulanmış 0, 12 ve 24. saatlerde örnekler alınmıştır. Örnekler qPCR reaksiyonları için iki farklı fasulye çeşidinin yaprak, gövde ve köklerinden 3 biyolojik tekrarlı alınmıştır. Toplanan örnekler -80°C'lik buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.16 Elkoca, 150mM NaCl, 14/10/21



Şekil 3.17 Serra, 150mM NaCl, 14/10/21



Şekil 3.18 Kontrol, 150mM NaCl, 14/10/21



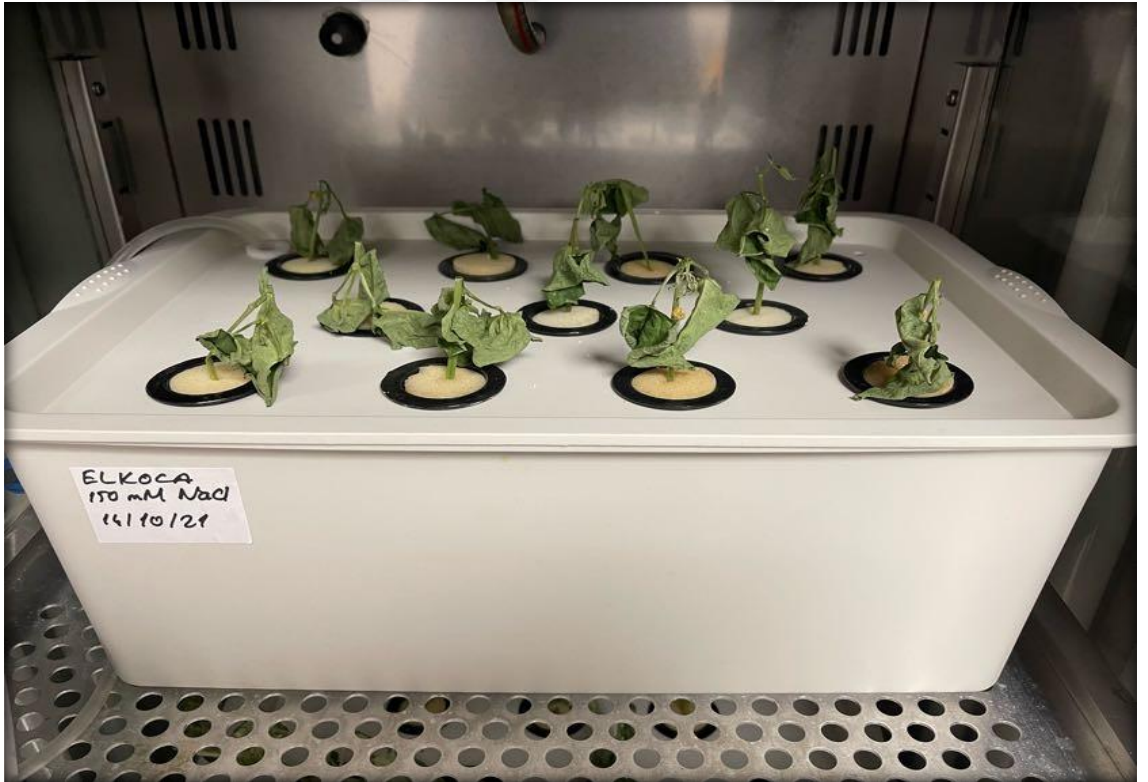
Şekil 3.19 Elkoca, 150mM NaCl, 16/10/21



Şekil 3.20 Serra, 150mM NaCl, 16/10/21



Şekil 3.21 Kontrol, 150mM NaCl, 16/10/21



Şekil 3.22 Elkoca, 150mM NaCl, 18/10/21



Şekil 3.23 Serra, 150mM NaCl, 18/10/21



Şekil 3.24 Kontrol, 150mM NaCl, 18/10/21



Şekil 3.25 Elkoca, 150mM NaCl, 21/10/21



Şekil 3.26 Serra, 150mM NaCl, 21/10/21



Şekil 3.27 Kontrol, 150mM NaCl, 21/10/21



Şekil 3.28 Elkoca, %2 H₂O₂, 10/11/21



Şekil 3.29 Serra, %2 H₂O₂, 10/11/21



Şekil 3.30 Kontrol, %2 H₂O₂, 10/11/21



Şekil 3.31 Elkoca, %2 H₂O₂, 11/11/21

Şekil 3.32 Serra, %2 H₂O₂, 11/11/21

3.10 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için FavorPrep™ Plant Total Mini Kit'i kullanılmıştır. -80 °C'lik buzdolabında saklanan örnekler çıkartıldıktan sonra zaman kaybetmeksizin sıvı azot içinde tutulmuştur. Sıvı azotun içindeki tüplerden bir miktar (yaklaşık 100 mg) örnek alınarak eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

FavorPrep™ plant total mini kit protokolü

1. 100 mg'a kadar bitki örneği sıvı nitrojen altında ince bir toz haline getirilir ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
2. Toz halindeki örneğe 500 µl FARB Buffer (β-ME eklenmiş) eklenir ve kuvvetlice vortekslenir. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.
3. Toplama Tüpüne bir Filtre Kolonu yerleştirilir ve numune karışımı Filtre Kolonuna aktarılır. 1 dakika boyunca tam hızda (~ 18.000 x g) santrifüjlenir.
4. Süpernatant Toplama Tüpünden yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve süpernatantın hacmi ayarlanır.
5. 1 hacim (aktarılan süpernatant miktarı) %70 RNaz içermeyen etanol eklenir ve vorteksleyerek iyice karıştırılır.

6. Bir Toplama Tüpüne bir FARB Mini Sütunu yerleştirilir ve etanol eklenen numune karışımı (herhangi bir çökelti dahil) FARB Mini Sütununa aktarılır. 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenir, alta akan sıvı atılır ve FARB Mini Sütunu Toplama Tüpüne geri konur.
7. FARB Mini Sütuna 500 µl Yıkama Tamponu 1 eklenir, tam hızda 1 dakika santrifüjlenir. Alta akan sıvı atılır ve FARB Mini Sütunu Toplama Tüpüne geri getirilir.
8. FARB Mini Sütuna 750 µl Wash Buffer 2 eklenir, tam hızda 1 dakika santrifüjlenir. Alta akan sıvı atılır ve FARB Mini Sütunu Toplama Tüpüne geri getirilir. Bu adım iki kere yapılır.
9. FARB Mini Sütunu kurutmak için FARB Mini Sütunu tam hızda 3 dakika daha santrifüjlenir.
10. FARB Mini Sütunu bir Elüsyon Tüpüne yerleştirilir.
11. FARB Mini Sütununun membran merkezine 30 ~ 50 µl RNaz içermeyen ddH₂O eklenir. FARB Mini Sütunu 1 dakika boyunca dik tutulur.
12. RNA'yı ayırtmak için FARB Mini Sütunu 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenir. Elde edilen RNA -80 °C'de muhafaza edilir.

3.11 Komplementer DNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar qPCR reaksiyonları için cDNA eldesinde kullanılmıştır. cDNA sentezi için iScript™ cDNA synthesis kit'i kullanılmıştır. Total miktar 10 µl alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Reaksiyon başına; 5x iScript Reaction mix (2 µl), iScript Reverse Transcriptase (0,5 µl), ddH₂O ve RNA örneği kullanılmıştır. ddH₂O ve RNA miktarı toplamı, reaksiyon toplamını 10 µl'ye tamamlayacak şekilde oranlandırılmıştır. Oranlandırma sırasında Nanodrop ölçümleri baz alınarak tüpteki RNA miktarının 500 µl'yi geçmemesine özen gösterilmiştir. NanoPCR cihazı ile çizelge 3.1'de belirtilen koşullarda cDNA sentezi yapılmıştır.

Çizelge 3.1 cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Döngü	°C	Süre(dk)
Primer Bağlanması	25 °C	5
Ters Transkripsiyon	46 °C	20
RT inaktivasyonu	95 °C	1
Bekleme	4 °C	-

3.12 Primer Dizaynı

PvTH-17, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-28*, ve *PvTH-30* genleri için seçilmiş ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (RT-PCR) kullanılmak üzere seçilen genlerin dizilerine NCBI veri tabanından ulaşılmıştır. Integrated DNA Technologies IDT, Primer Quest programı kullanılarak genlere uygun primer tasarımları yapılmıştır. Housekeeping geni olarak *ACT* (Actin) geni kullanılmıştır. Tasarlanan primerlerin GC%, T_m değerleri ve hairpin oluşturma ihtimalleri göz önüne alınarak en uygun primerler seçilmiştir.

Çizelge 3.2 Primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları, baz sayısı ve GC oranı

Primer Adı	Primer Yönü	Baz Dizisi	Baz Sayısı	T _m (°C)	GC (%)
<i>PvTH-17</i>	İleri	TTCCTTCCTCCTCCAACTCT	20	57	50
	Geri	TTCTCACTGCTGGCTCTAATG	21	58	48
<i>PvTH-24</i>	İleri	CTGATGATGGGTCGGAATCAA	21	58	48
	Geri	GGTGCCGTTTCCTCCTTCTT	19	57	53
<i>PvTH-25</i>	İleri	TGGTTGAAGAAGCAGCAAATA AG	23	57	39
	Geri	CTCCATTTCTGTCCACCTACTG	22	60	50
<i>PvTH-28</i>	İleri	CCTCACCAACTCCACTAACTTT	22	58	45
	Geri	ACTGTTGCTCTTTCTCCTCTTC	22	58	45
<i>PvTH-30</i>	İleri	CTGGGATGGTAGGAGTGGATAA	22	60	50
	Geri	GTGTCATGGTGTGGAGCATAG	21	60	52
<i>PvACT</i>	İleri	TGCATACGTTGGTGATGAGG	20	57	50
	Geri	AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	20	59	55

3.13 Real-Time PCR

Transkriptom veri analizi baz alınarak seçilen genler, ‘real time’ PCR sistemi (Magnetic Induction Cycler) ve iTaq Universal SYBR Green Supermix kiti kullanılarak reaksiyona sokulmuş ve gen ifade analizlerine bakılmıştır. Reaksiyon sonunda erime eğrisi analizine bakılarak doğru DNA bölgesinin çoğaltıldığı teyit edilmiştir. Reaksiyon bileşenleri (Çizelge 3. 3) ve koşulları (Çizelge 3. 4) aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl
İleri Primer (10 µM)	0.5 µl
Geri Primer (10 µM)	0.5 µl
cDNA	1 µl
Reaksiyon Su ile 10 µl’ye tamamlanır	

Çizelge 3.4 Reaksiyon koşulları

Döngü	°C	Süre (sn)
Ön denatürasyon	95 °C	30
Denatürasyon	95 °C	15
Bağlama/Uzama	60 °C	30
Erime Eğrisi Analizi	60 °C → 95 °C	

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Fasulye *Trihelix* Genlerinin Biyoinformatiksel Analizi

Fasulye genomunda yapılan araştırmalar sonucunda 38 adet *Trihelix* geni tanımlanmıştır. Tanımlanan *Trihelix* genleri *PvTH* şeklinde isimlendirilmiştir. *PvTH* genlerinin protein uzunlukları, kromozom lokasyonları, başlangıç ve bitiş noktaları, moleküler ağırlıkları, izoelektrik noktaları, kararsızlık indeksleri, NCBI veri tabanı erişim numaraları ve kararsızlık indeksleri gösterilmiştir. Tespit edilen *PvTH* genlerinin moleküler ağırlıkları 30096.12-111500.20 Da arasında ve protein uzunlukları ise 260-996 aminoasit (aa) arasında değişmekte olduğu belirlenmiştir. *PvTH*-26, *PvTH*-29 ve *PvTH*-35'in kararlı geri kalan genlerin kararsız yapıda olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 *PvTH* genleri kataloğu

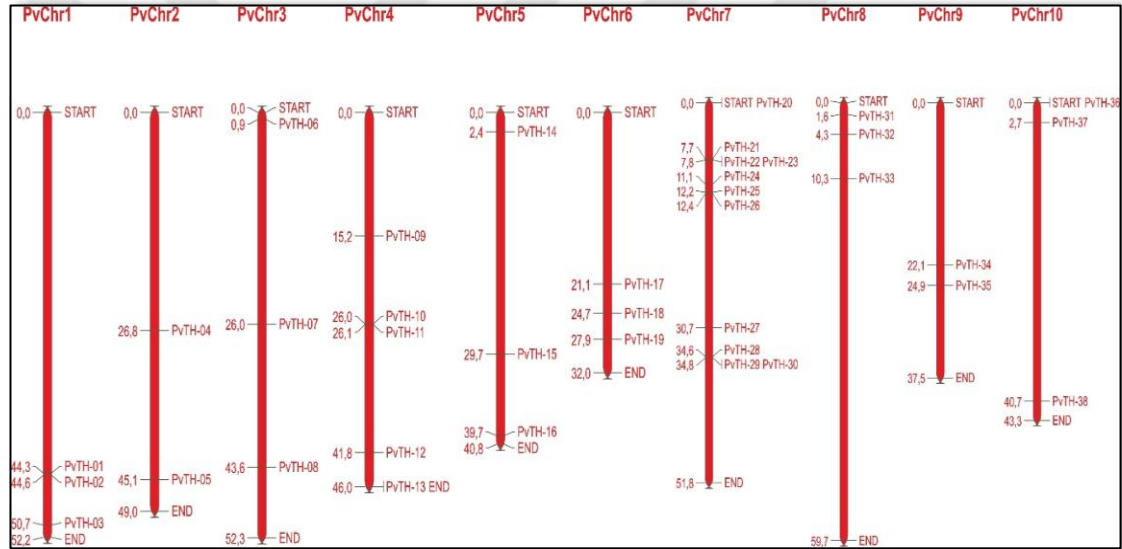
ID	<i>P. vulgaris</i> Genomic Database Identifier	Physical position on <i>P. vulgaris</i> genome			Protein length (aa)	pI	Molecular weight (Da)	Instability index	Stable or unstable	Aliphatic index	GRAVY	NCBI Accession No.
		Chr	Start position (bp)	End Position (bp)								
PvTH-01	Phvul.001G185100.1	01	44,308,938	44,310,877	450	6.28	51846.89	59.03	unstable	57.38	-1.102	XP_007162836.1
PvTH-02	Phvul.001G187000.1	01	44,553,396	44,557,032	592	6.32	68096.08	54.91	unstable	48.85	-1.126	XP_007162858.1
PvTH-03	Phvul.001G258700.1	01	50,722,964	50,727,180	377	5.83	43075.53	52.11	unstable	66.76	-0.775	XP_007163722.1
PvTH-04	Phvul.002G126400.1	02	26,790,124	26,792,477	309	8.66	36335.79	66.06	unstable	57.15	-1.115	XP_007158125.1
PvTH-05	Phvul.002G281800.1	02	45,089,209	45,091,293	359	6.51	40517.74	57.47	unstable	66.49	-0.764	XP_007159959.1
PvTH-06	Phvul.003G007800.1	03	874,675	878,670	340	8.22	38333.55	64.78	unstable	67.38	-0.932	XP_007153114.1
PvTH-07	Phvul.003G097500.1	03	25,960,292	25,961,173	293	9.42	33062.69	53.64	unstable	60.27	-0.855	XP_007154189.1
PvTH-08	Phvul.003G209600.1	03	43,551,306	43,567,487	870	8.76	96885.44	40.28	unstable	87.52	-0.351	XP_007155530.1
PvTH-09	Phvul.004G095500.1	04	15,201,865	15,205,284	442	6.17	50753.47	48.63	unstable	57.08	-1.054	XP_007152028.1
PvTH-10	Phvul.004G095400.1	04	26,024,033	26,027,620	656	5.40	72575.65	65.95	unstable	57.27	-0.954	XP_007152027.1
PvTH-11	Phvul.004G095200.1	04	26,146,363	26,149,196	590	5.48	67136.46	53.08	unstable	51.92	-1.094	XP_007152025.1
PvTH-12	Phvul.004G124000.1	04	41,830,727	41,835,277	996	7.80	111500.20	57.10	unstable	69.59	-0.579	XP_007152366.1
PvTH-13	Phvul.004G161800.1	04	46,644,777	46,648,326	354	4.60	40924.74	50.82	unstable	49.86	-1.188	XP_007152813.1
PvTH-14	Phvul.005G025700.1	05	2,355,502	2,357,966	349	9.31	38695.34	59.73	unstable	65.16	-0.952	XP_007148925.1
PvTH-15	Phvul.005G095000.1	05	29,681,647	29,685,749	300	9.69	34005.92	63.97	unstable	48.93	-1.030	XP_007149737.1
PvTH-16	Phvul.005G171600.1	05	39,731,440	39,733,216	400	4.81	45586.93	47.87	unstable	53.65	-1.130	XP_007150667.1
PvTH-17	Phvul.006G100300.1	06	21,071,389	21,074,209	568	6.20	64796.82	66.90	unstable	54.42	-1.068	XP_007147154.1
PvTH-18	Phvul.006G139200.1	06	24,651,584	24,653,954	329	6.06	37809.28	66.93	unstable	66.14	-1.055	XP_007147613.1
PvTH-19	Phvul.006G176000.1	06	27,873,398	27,878,482	301	5.16	34015.83	66.03	unstable	61.66	-0.937	XP_007148047.1

Çizelge 4.1 PvTH genleri kataloğu (devam)

PvTH-20	Phvul.007G000400.1	07	17,530	20,526	356	6.94	39649.55	62.13	unstable	70.96	-0.843	XP_007142589.1
PvTH-21	Phvul.007G079600.1	07	7,728,356	7,735,040	450	6.27	51421.22	46.34	unstable	60.18	-1.041	XP_007143533.1
PvTH-22	Phvul.007G079700.2	07	7,750,522	7,753,812	649	5.82	71789.20	64.64	unstable	65.05	-0.825	XP_007143536.1
PvTH-23	Phvul.007G079800.1	07	7,797,107	7,800,617	635	5.64	71489.66	58.93	unstable	59.50	-0.954	XP_007143537.1
PvTH-24	Phvul.007G100500.1	07	11,123,138	11,125,248	342	9.23	38928.46	75.23	unstable	64.77	-1.049	XP_007143775.1
PvTH-25	Phvul.007G104900.1	07	12,238,955	12,241,683	517	5.90	59282.82	51.79	unstable	59.65	-0.931	XP_007143826.1
PvTH-26	Phvul.007G105700.1	07	12,445,645	12,449,910	482	6.92	52373.71	34.19	stable	75.71	-0.380	XP_007143835.1
PvTH-27	Phvul.007G186700.1	07	30,651,110	30,653,869	587	6.87	67151.82	58.76	unstable	60.27	-1.016	XP_007144820.1
PvTH-28	Phvul.007G222800.1	07	34,622,921	34,626,679	599	6.04	69360.44	52.63	unstable	51.97	-1.152	XP_007145244.1
PvTH-29	Phvul.007G224400.2	07	34,800,273	34,805,482	487	6.81	53265.77	37.09	stable	71.91	-0.426	XP_007145266.1
PvTH-30	Phvul.007G224600.1	07	34,820,651	34,822,821	473	6.33	54549.65	61.79	unstable	52.30	-1.219	XP_007145268.1
PvTH-31	Phvul.008G019400.1	08	1,614,718	1,618,764	325	5.31	35835.89	49.25	unstable	70.34	-0.782	XP_007139321.1
PvTH-32	Phvul.008G049300.1	08	4,300,945	4,302,616	316	9.63	35030.59	58.32	unstable	51.65	-0.838	XP_007139673.1
PvTH-33	Phvul.008G098300.1	08	10,263,988	10,266,543	285	6.97	34431.83	57.52	unstable	45.23	-1.329	XP_007140273.1
PvTH-34	Phvul.009G147500.1	09	22,052,654	22,055,682	514	6.58	58890.97	59.74	unstable	64.12	-0.993	XP_007137690.1
PvTH-35	Phvul.009G167400.1	09	24,880,344	24,890,596	871	8.59	96180.81	36.28	stable	86.44	-0.403	XP_007137930.1
PvTH-36	Phvul.010G000200.1	10	41,404	43,165	271	6.65	32237.22	55.61	unstable	52.66	-1.204	XP_007133883.1
PvTH-37	Phvul.010G018700.1	10	2,726,413	2,728,242	260	7.03	30096.12	51.29	unstable	70.27	-0.849	XP_007134090.1
PvTH-38	Phvul.010G126400.1	10	40,736,173	40,738,519	375	9.66	40737.45	50.80	unstable	60.19	-0.919	XP_007135401.1

4.2 Fasulye *Trihelix* Genlerinin Kromozomal Dağılımı

Trihelix genlerinin kromozom dağılımları TBtools programı kullanılarak gösterilmiştir. *Trihelix* genlerinin kromozom 11 haricinde diğer bütün kromozomlarda bulunduğu belirlenmiştir. En kısa diziye sahip *Trihelix* geni 3. kromozomda bulunan *PvTH-07*, en uzun diziye sahip *Trihelix* geni yine 3. kromozomda bulunan *PvTH-08*'dir. En fazla *Trihelix* geni 11 adet ile kromozom 7'de bulunur. *Trihelix* genleri fasulye kromozomunda Chr2 ve Chr9'da ikişer; Chr1, Chr3, Chr5, Chr6, Chr8 ve Chr10'da üçer; Chr4'te beş ve Chr7'de on bir adet olacak şekilde bir dağılım göstermektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *Trihelix* genlerinin kromozomal dağılımı

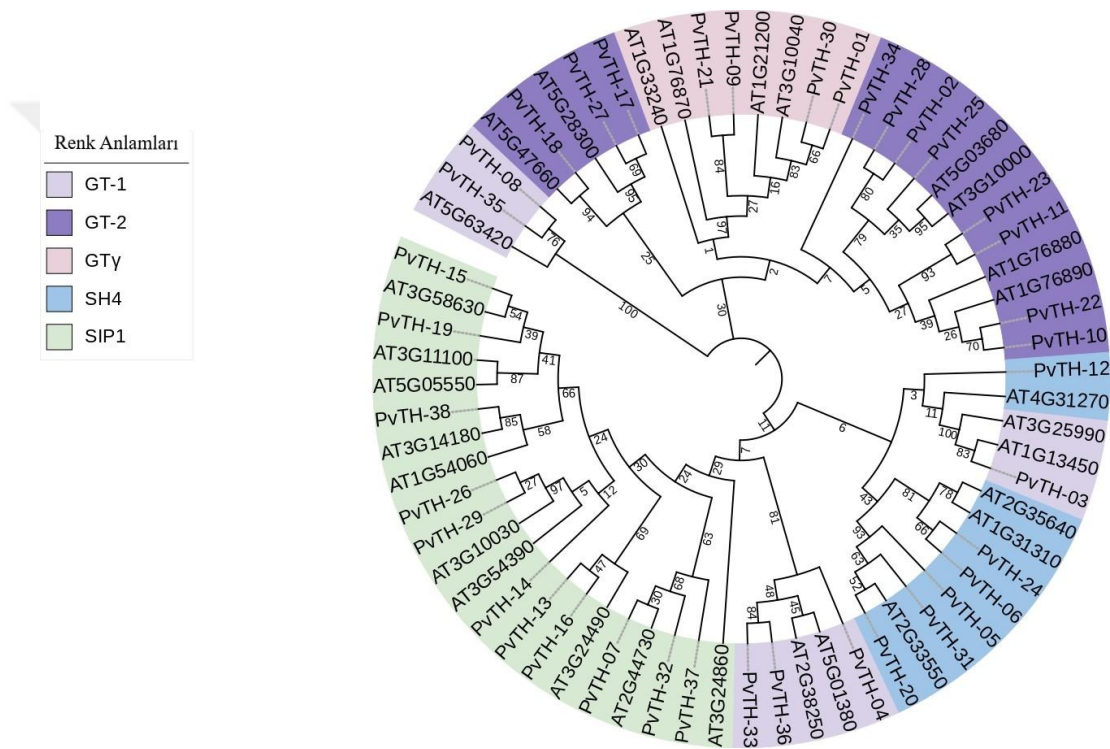
4.3 Fasulye *Trihelix* Proteinlerinin Türler arası Filogenetik Analizi

Filogenetik ağaç analizine göre PvTH proteinleri GT-1, GT-2, GT γ , SIP1 ve SH4 olmak üzere 5 farklı sınıfta sınıflandırılmıştır (Şekil 4.3).

Segmental duplikasyon gösteren *PvTH-33-PvTH-36*, *PvTH-08-PvTH-35* genlerinin proteinleri filogenetik ağaçta GT-1 grubunda ve birbirleri ile aynı dallarda olduğu, *PvTH-02-PvTH-25*, *PvTH-02-PvTH-28*, *PvTH-11-PvTH-22* ve *PvTH-17-PvTH-27*

genlerinin proteinleri GT-2 grubunda birbirleri ile aynı dallarda, *PvTH-05-PvTH-31* geninin proteini SH4 grubunda aynı dalda, *PvTH-15-PvTH-19* geninin proteini SIP1 grubunda aynı dalda, *PvTH-09-PvTH-21* geninin proteini GT γ grubunda aynı dalda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).

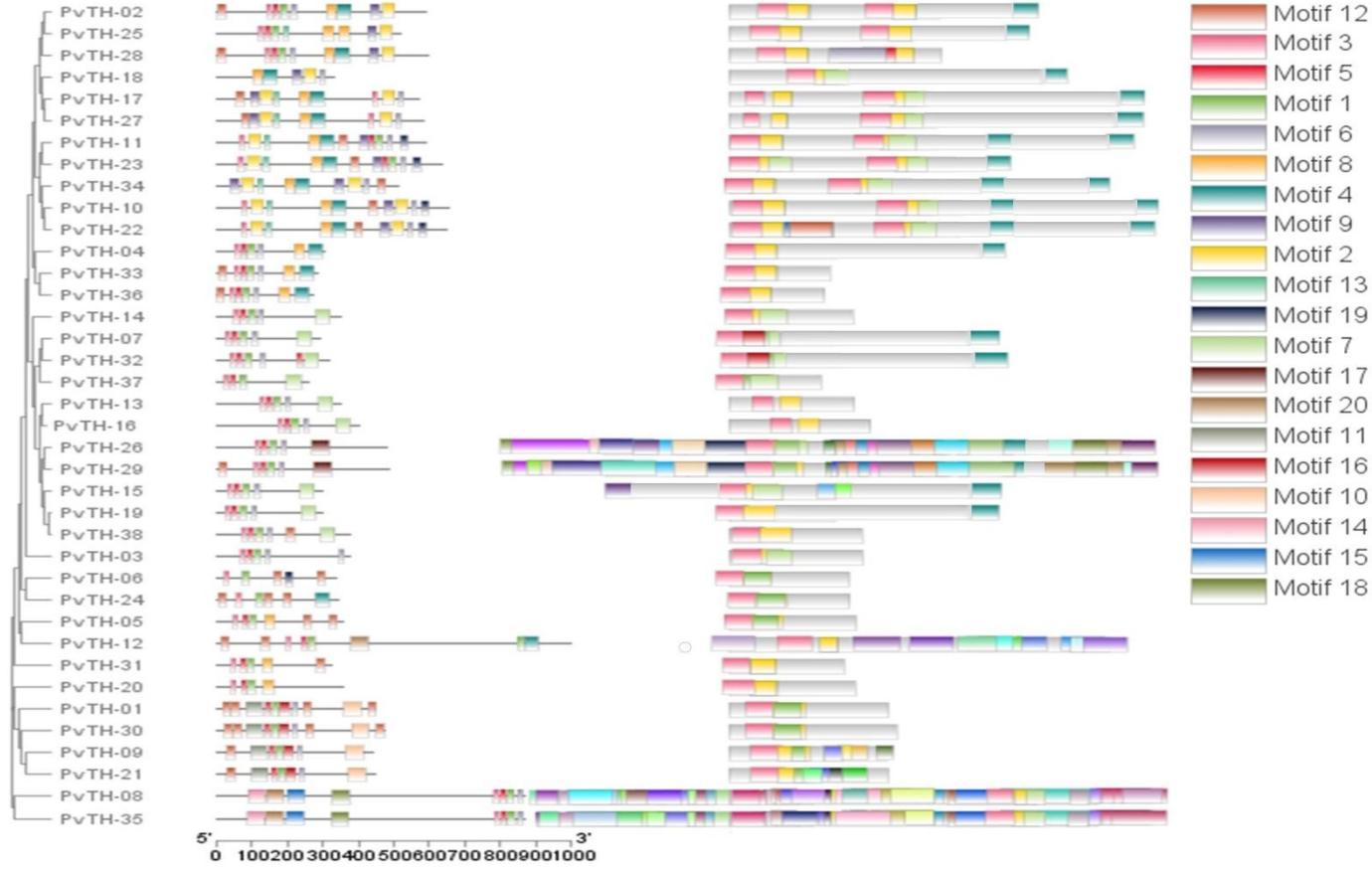
Segmental duplikasyon gösteren genlerin proteinlerinin aynı grupta ve dalda olması, *PvTH* genlerinin evrimini anlamak için yapılan bu filogenetik ağaç analizinin güvenilir veriler verdiğini göstermektedir.



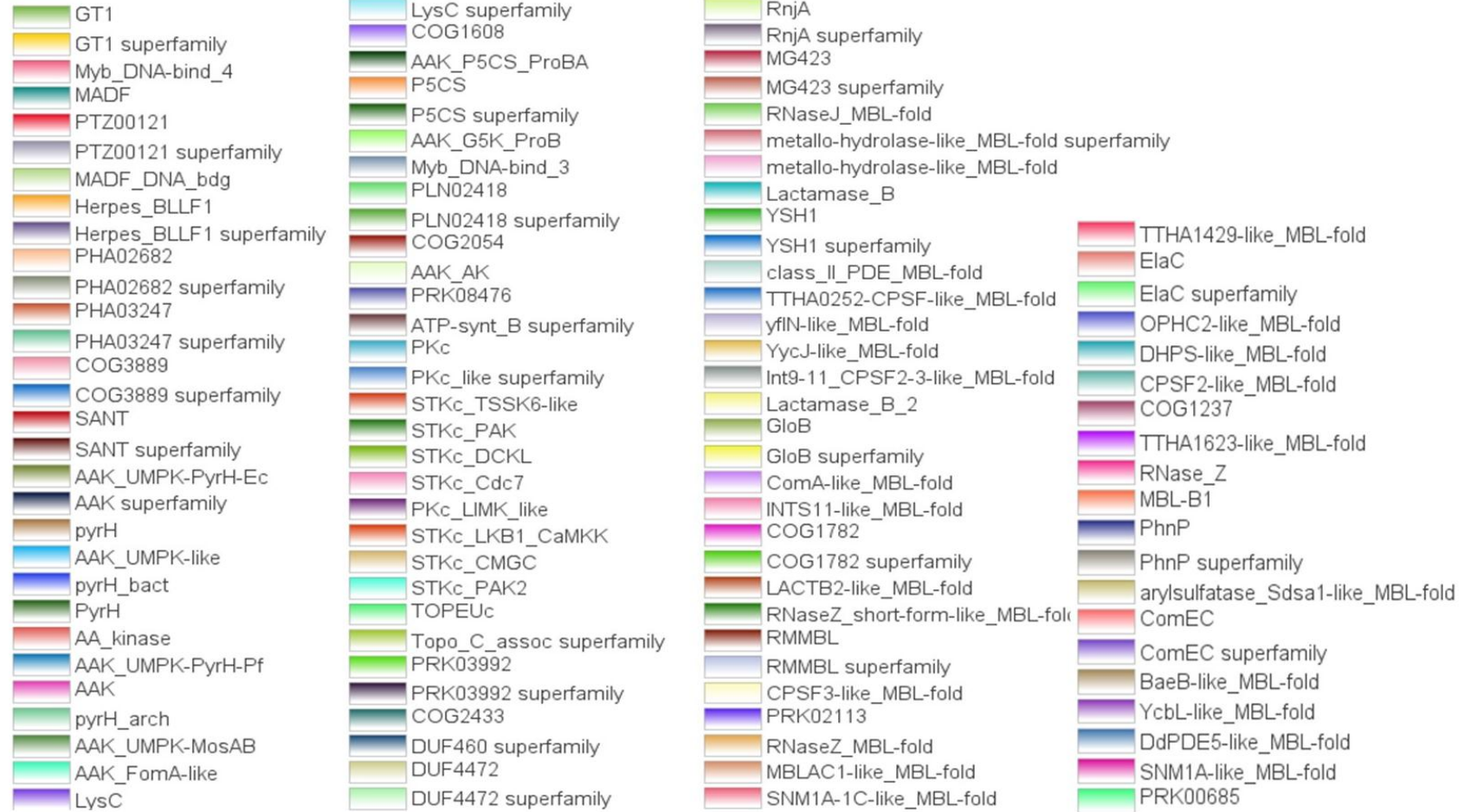
Şekil 4.2 Trihelix proteinlerinin filogenetik sınıflandırması

4.4 Fasulye Trihelix Proteinlerinin Korunmuş Motif Bölgeleri

Trihelix proteinlerinin korunmuş motiflerini tespit etmek için TBtools programı ile motif kompozisyonları görselleştirilmiştir. Yapılan analizler ile benzer motif kalıplarını içeren proteinleri kodlayan genlerin filogenetik ağaç analizinde aynı grupta ve konum olarak birbirleri ile aynı dalda veya yakın dallarda oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.3).



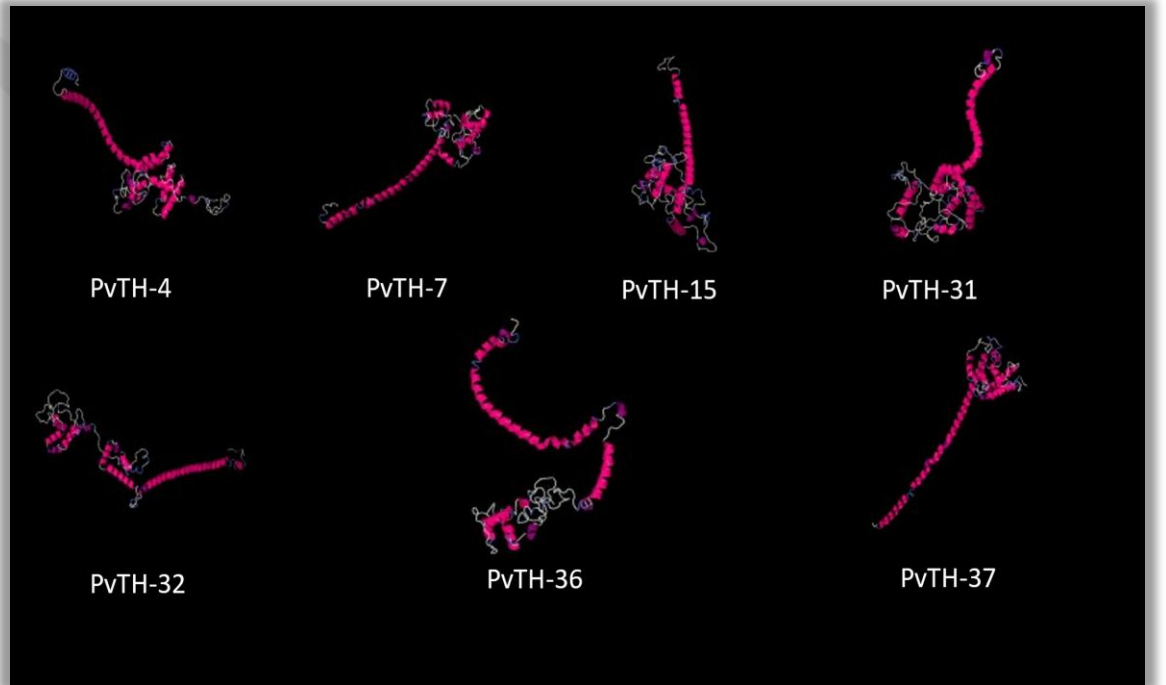
Şekil 4.3 Trihelix proteinleri motif ve domain bölgeleri



Şekil 4.3 Trihelix proteinleri motif ve domain bölgeleri (devam)

4.5 Fasulye Trihelix Proteinleri Üç Boyutlu Modellemeleri

Seçilen fasulye Trihelix proteinlerinin amino asit dizileri Protein Data Bank’da (PDB) taranmış ve blastp taraması yapılmıştır. Phyre2 veri tabanı aracılığıyla bu proteinlerin 3 boyutlu modellemesi yapılmıştır. Proteinlerin homoloji modellemeleri şekil 4.4’de gösterilmiştir. Ortaya çıkan homoloji modellemesinin sonucunda %90 ve üzeri güvenilirlikte olan sonuçlar baz alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre alfa yapısının hakim olduğu anlaşılmıştır.

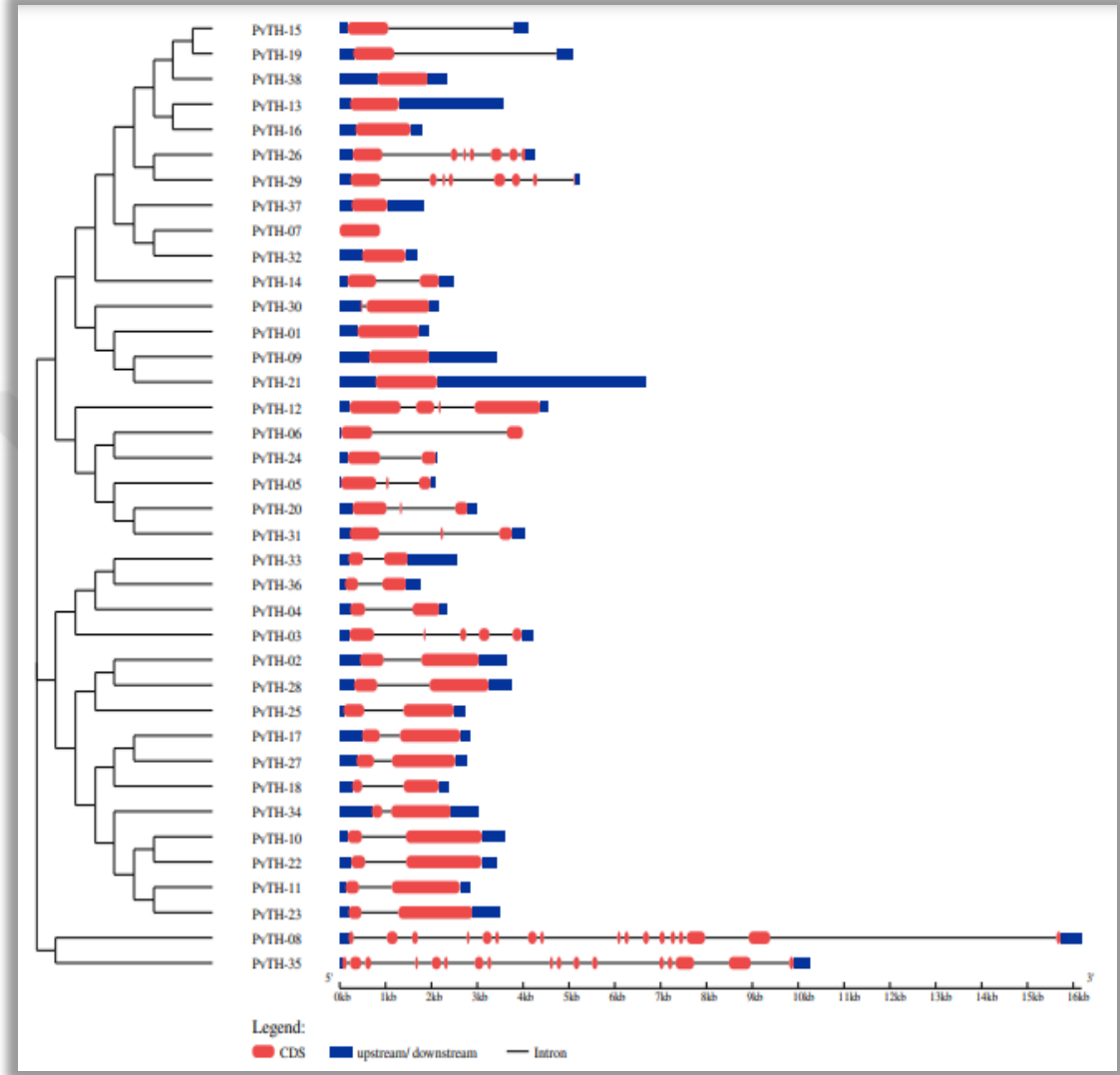


Şekil 4.4 Proteinlerin üç boyutlu modellemeleri

4.6 Fasulye *Trihelix* Genleri İntron ve Ekzon Bölgeleri

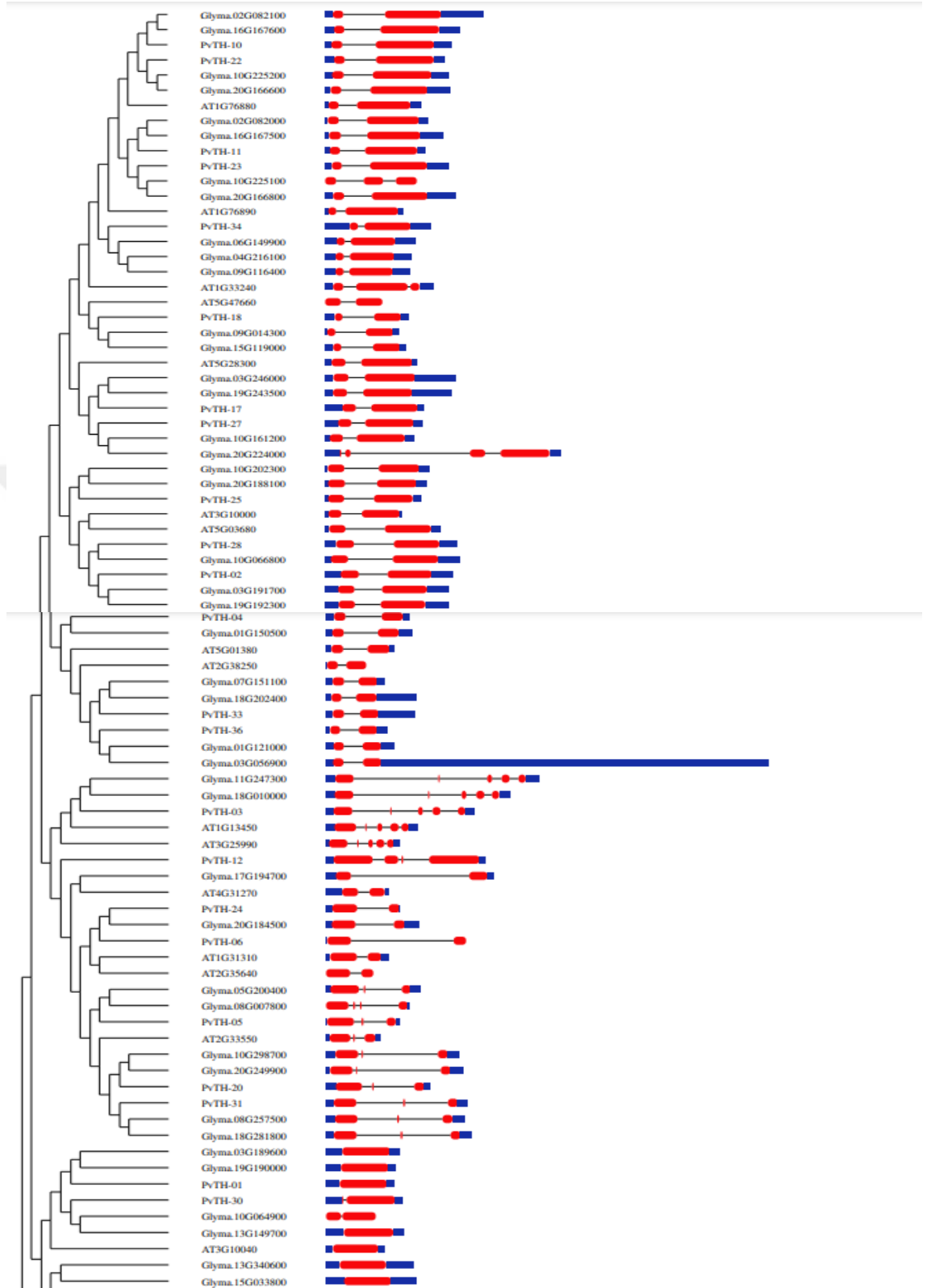
Gene Structure Display Server 2.0 veri tabanı fasulye *Trihelix* genlerinin intron ve ekzon bölgelerini belirlemek için kullanılmıştır. *PvTH-01*, *PvTH-07*, *PvTH-09*, *PvTH-13*, *PvTH-16*, *PvTH-21*, *PvTH-32*, *PvTH-37* ve *PvTH-38* genlerinin intron içermediği, *PvTH-07*’nin sadece ekzondan oluştuğu gözlemlenmiştir. Tüm *PvTH* genlerinin toplamda 113 adet ekzon ve 78 adet intron içerdiği belirlenmiştir. Filogenetik ağaçta da

birbirine en yakın olan *PvTH-08* ve *PvTH-35* genlerinin sırasıyla 17 ve 16 adet ile en çok intron içeren genler olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5).

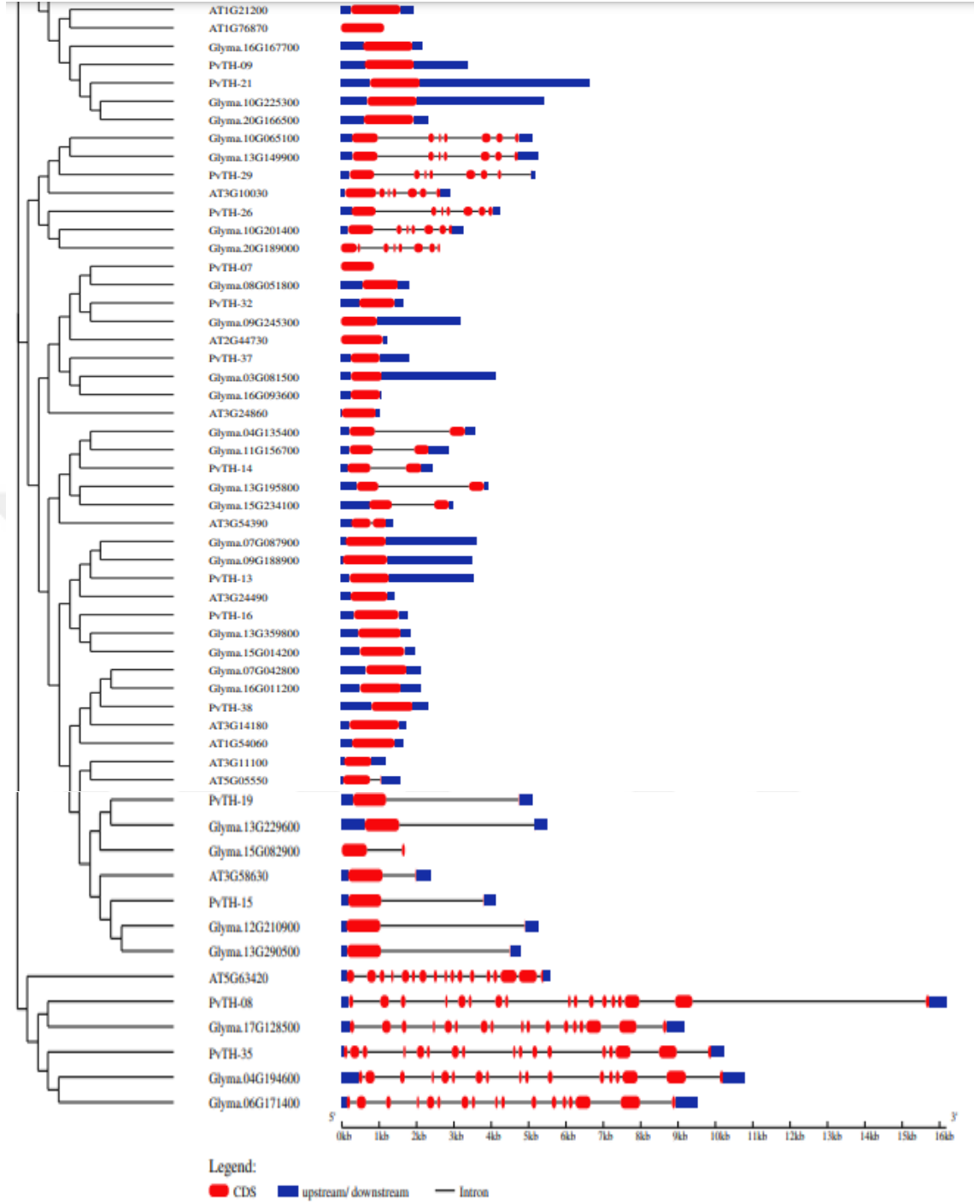


Şekil 4.5 *PvTH* genlerinin ekzon-intron bölgeleri

Phaseolus vulgaris L. *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* Trihelix gen yapılarına birlikte bakıldığında, filogenetik olarak birbirine yakınlık gösteren genlerin gen yapılarının da birbirine benzediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



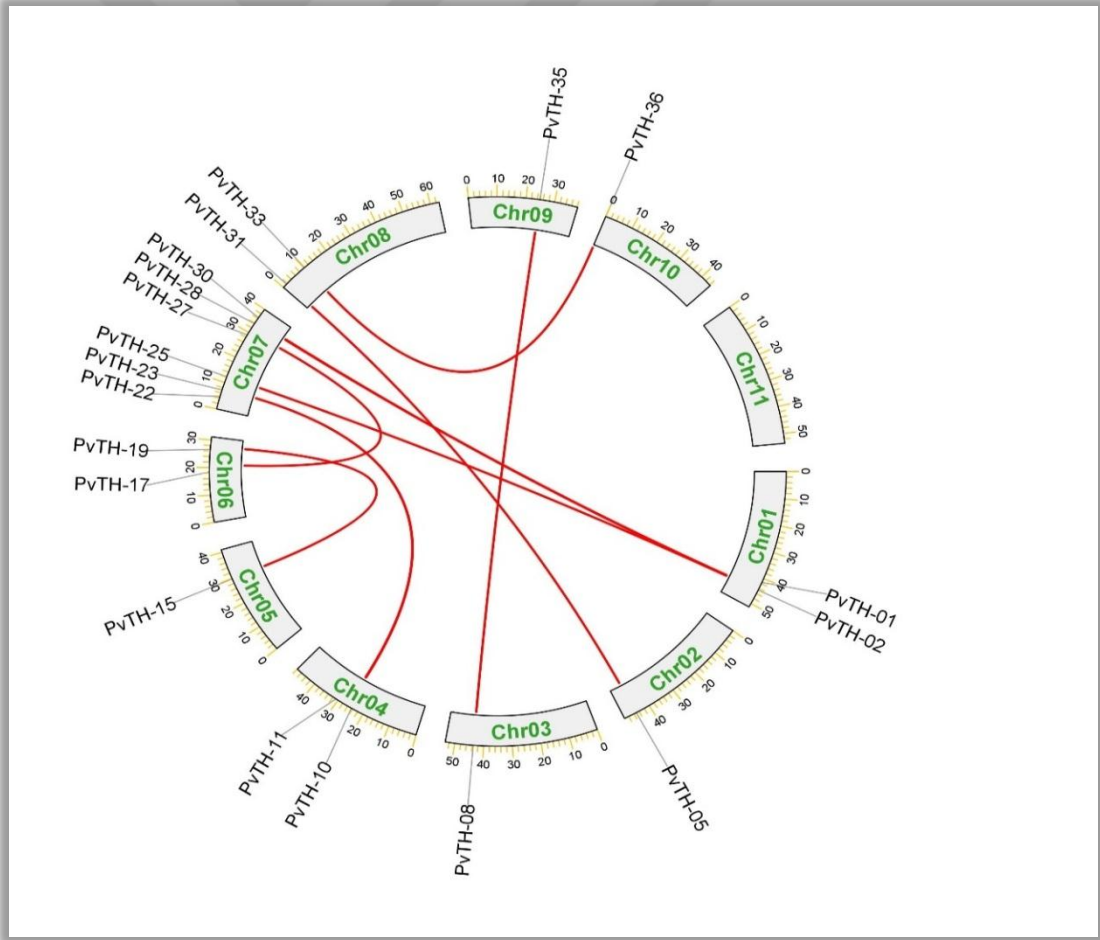
Şekil 4.6 *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max*'de *Trihelix* genlerinin ekzon-intron bölgeleri



Şekil 4.6 *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max*'de *Trihelix* genlerinin ekzon-intron bölgeleri (devam)

4.7 Trihelix Genlerinin Segmental Gen Duplikasyonları

Gen duplikasyonları, genlerin sayısının artmasında ve çeşitlenmesinde önemli bir role sahiptir. Homolog olmayan genler (Ka), homolog genler (Ks) ve Ka/Ks oranları gen evrimini anlamakta oldukça yardımcı olmakta ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen analizler neticesinde fasulye *Trihelix* genlerinin 8 adet segmental duplikasyon olayı içerdiği herhangi bir tandem duplikasyonu içermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Üzerinde herhangi bir *Trihelix* geni bulunmayan kromozom 11 hariç bütün kromozomlarda segmental duplikasyon bölgelerine rastlanmıştır. *PvTH* genlerinin ortalama Ka oranının 8,39; Ks oranının 11,52; Ka/Ks oranının ise 0,72 olduğu belirlenmiştir. Bu veriler ile yapılan değerlendirmeler sonunda segmental duplikasyon olaylarının ortalama 88,68 MYÖ olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Çizelge 4.2).



Şekil 4.7 *PvTH* genlerinin segmental duplikasyonları

Çizelge 4.2 *PvTH* genlerinde tespit edilen duplikasyon olayları

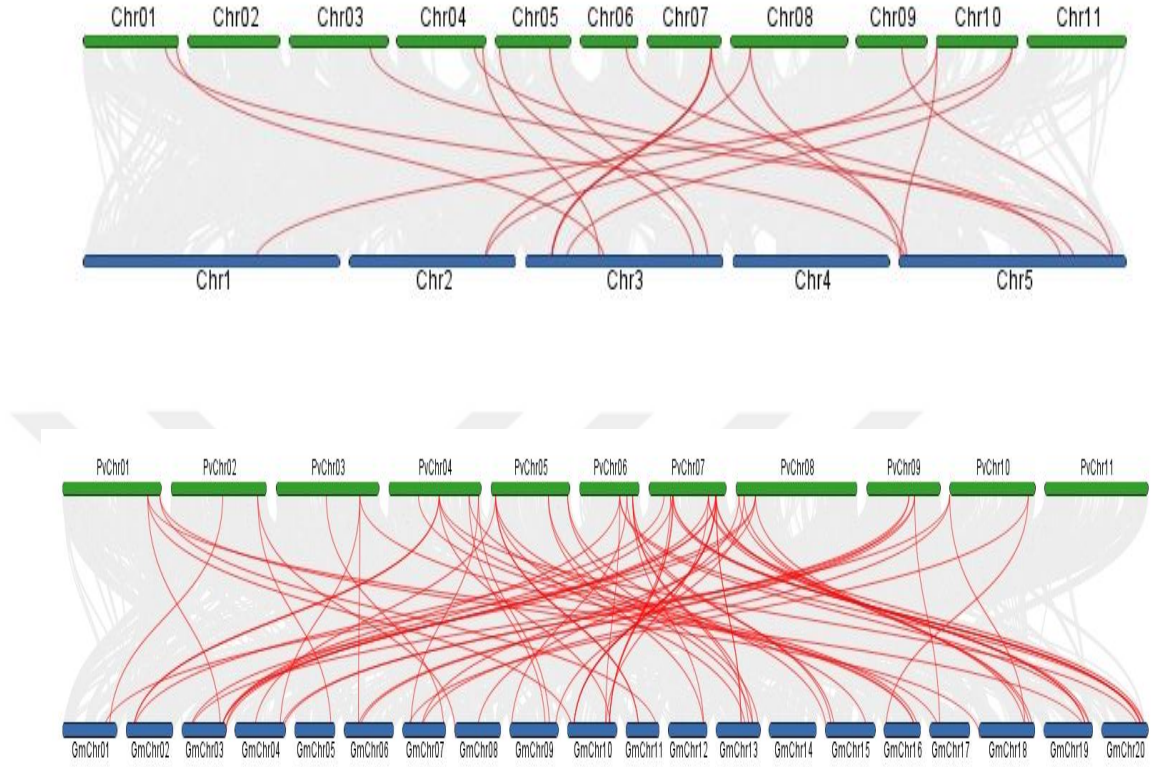
Gen-1	Gen-2	Ka	Ks	MYÖ
PvTH-02	PvTH-28	16,172	7,357	56,59231
PvTH-02	PvTH-25	4,782	31,816	244,7385
PvTH-05	PvTH-31	5,02	22,697	174,5923
PvTH-08	PvTH-35	12,591	0,62	4,769231
PvTH-23	PvTH-11	0,166	8,61	66,23077
PvTH-15	PvTH-19	3,163	14,793	113,7923
PvTH-17	PvTH-27	23,708	10,122	77,86154
PvTH-36	PvTH-33	9,932	7,75	59,61538

4.8 Fasulye *Trihelix* Genlerinin *Arabidopsis Thaliana* ve *Glycine max*'deki Sinteni Analizi ve Birbirinden Ayrılma Oranları

Farklı organizmalarda bulunan, atasal kökeni aynı, türleşme sürecinde ayrılmış fakat yapısal ve işlevsel benzerlikleri bulunan genler ortolog genler olarak adlandırılmaktadır (Fitch, 1970). Sinteni terimi ilk kez fonksiyon olarak benzer ve aynı kromozom üzerinde bulunan homolog genler olarak tanımlanmıştır (Nadeau ve Taylor, 1984). Günümüzde ise sinteni terimi ortolog genler için kullanılmaya başlanmış ve fonksiyondan ziyade dizilerin benzerliğine dayandırılmıştır (McCouch, 2001).

Fasulye ile *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* arasındaki sintenik ilişkiler araştırılmıştır. Gri çizgiler kromozomlar arasındaki bütün ortolog genleri temsil ederken kırmızı çizgiler *Trihelix* genleri arasındaki ortolog ilişkileri temsil etmektedir. Fasulye ile *Glycine max* arasındaki ortolog ilişkinin *Arabidopsis thaliana*'ya göre çok daha fazla olduğu görülmüştür. *A. thaliana* ile 15 farklı *PvTH* geninde 18 adet ortolog ilişki bulunmuştur. *G. max* ile *PvTH-06*, *PvTH-10*, *PvTH20* ve *PvTH-23* hariç diğer bütün *PvTH* genleri arasında toplamda 90 adet ilişki bulunmuştur (Şekil 4.8). Ka, Ks değerleri ve Ka/Ks değişim oranları genlerin evrimini anlamak için kullanılırlar. $Ka/Ks > 1$ ise pozitif, $Ka/Ks < 1$ ise negatif ve $Ka/Ks \approx 1$ ise nötr seleksiyon olduğu söylenebilmektedir (Hurst, 2002). Yapılan hesaplamalar sonucunda fasulye *Trihelix* geninin ortologlarının bulunduğu *A.thaliana*'da Ka/Ks değeri 0,08, *G.max* için Ka/Ks değeri 0,20 olarak bulunmuştur. *PvTH* genlerinin *A.thaliana*'daki ortologları ile ilk

ayrılma zamanının 367,13 MYÖ (Çizelge 4.3), *G.max*'taki ortologlarıyla ise 33,08 MYÖ olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).



Şekil 4.8 *PvTH* genlerinin *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* arasındaki sinteni analizi

Çizelge 4.3 *Phaseolus vulgaris* ve *Arabidopsis thaliana*'da bulunan *Trihelix* gen duplikasyonları

Gen (Pv)	Gen (At)	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
PvTH-02	AT5G03680	3,7715	0,502	0,1331	29,01
PvTH-03	AT3G25990	3,1646	0,2112	0,0668	24,34
PvTH-08	AT5G63420	2,0448	0,1889	0,0924	15,73
PvTH-12	AT5G51800	3,7407	0,3862	0,1032	28,77
PvTH-13	AT3G24490	14,1541	0,3615	0,0255	108,88
PvTH-14	AT3G54390	2,5046	0,2751	0,1098	19,27
PvTH-15	AT3G58630	2,5254	0,4273	0,1692	19,43
PvTH-18	AT5G47660	42,4062	0,5748	0,0136	326,20
PvTH-27	AT5G28300	2,413	0,5587	0,2316	18,56
PvTH-29	AT3G10030	4,0591	0,261	0,0643	31,22
PvTH-30	AT3G10040	3,3467	0,4208	0,1257	25,74

Çizelge 4.3 *Phaseolus vulgaris* ve *Arabidopsis thaliana*'da bulunan *Trihelix* gen duplikasyonları (devam)

PvTH-33	AT5G01380	14,0699	0,3601	0,0256	108,23
PvTH-33	AT2G38250	6,6212	0,3275	0,0495	50,93
PvTH-35	AT5G63420	2,081	0,2051	0,0986	16,01
PvTH-36	AT5G01380	8,7956	0,3767	0,0428	67,66
PvTH-36	AT2G38250	8,0823	0,3089	0,0382	62,17
PvTH-38	AT3G14180	47,7271	0,3309	0,0069	367,13
PvTH-38	AT1G54060	10,2735	0,4711	0,0459	79,03

Çizelge 4.4 *P. vulgaris* ve *G. max*'de bulunan *Trihelix* gen duplikasyonları

Gen(Pv)	Gen(Gm)	Ks	Ka	Ka/Ks	MYÖ
PvTH-01	Glyma,03G189600	0,4634	0,0814	0,1756	3,56
PvTH-01	Glyma,10G064900	1,5026	0,1927	0,1282	11,56
PvTH-01	Glyma,13G149700	1,5866	0,1777	0,112	12,20
PvTH-01	Glyma,19G190000	0,4272	0,0675	0,1581	3,29
PvTH-02	Glyma,03G191700	0,2909	0,049	0,1686	2,24
PvTH-02	Glyma,10G066800	0,7637	0,2636	0,3452	5,87
PvTH-02	Glyma,19G192300	0,2993	0,0562	0,1876	2,30
PvTH-03	Glyma,11G247300	0,3705	0,0187	0,0505	2,85
PvTH-03	Glyma,18G010000	0,397	0,0221	0,0557	3,05
PvTH-04	Glyma,01G150500	0,3084	0,0623	0,2019	2,37
PvTH-05	Glyma,08G007800	0,5746	0,1138	0,1981	4,42
PvTH-05	Glyma,05G200400	0,622	0,1039	0,1671	4,78
PvTH-07	Glyma,07G254500	0,811	0,0637	0,0785	6,24
PvTH-08	Glyma,06G171400	0,6954	0,1287	0,1851	5,35
PvTH-08	Glyma,04G194600	0,699	0,1211	0,1733	5,38
PvTH-08	Glyma,17G128500	0,2331	0,0434	0,1863	1,79
PvTH-09	Glyma,10G225300	0,6567	0,1112	0,1693	5,05
PvTH-09	Glyma,16G167700	0,4198	0,1537	0,3662	3,23
PvTH-09	Glyma,20G166500	0,7117	0,1076	0,1512	5,47
PvTH-11	Glyma,02G082000	0,2581	0,1188	0,4603	1,99
PvTH-11	Glyma,10G225100	0,885	0,2392	0,2702	6,81
PvTH-11	Glyma,16G167500	0,2876	0,1055	0,367	2,21
PvTH-11	Glyma,20G166600	2,7335	0,4437	0,1623	21,03
PvTH-12	Glyma,09G149700	0,4372	0,0547	0,1252	3,36
PvTH-12	Glyma,16G201100	0,4411	0,0602	0,1364	3,39
PvTH-13	Glyma,07G087900	0,5981	0,0715	0,1196	4,60
PvTH-13	Glyma,09G188900	0,7603	0,0829	0,109	5,85
PvTH-14	Glyma,04G135400	0,3138	0,105	0,3345	2,41
PvTH-14	Glyma,13G195800	1,1886	0,1899	0,1598	9,14

Çizelge 4.4 *P. vulgaris* ve *G. max*'de bulunan *Trihelix* gen duplikasyonları (devam)

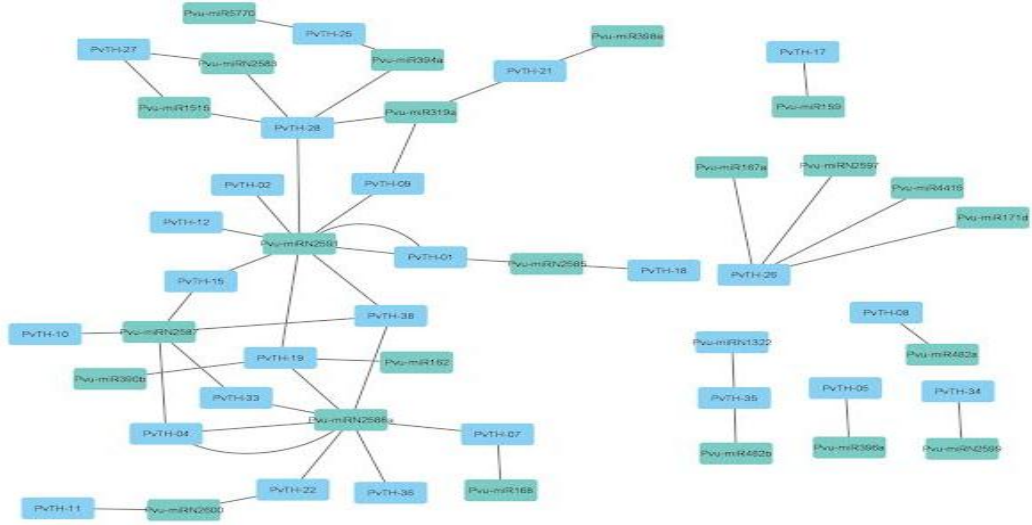
PvTH-14	Glyma,15G234100	1,1735	0,1983	0,169	9,03
PvTH-15	Glyma,12G210900	0,5933	0,0827	0,1393	4,56
PvTH-15	Glyma,13G290500	0,5071	0,0851	0,1678	3,90
PvTH-15	Glyma,13G229600	2,977	0,3919	0,1316	22,90
PvTH-16	Glyma,13G359800	0,3626	0,0802	0,2212	2,79
PvTH-16	Glyma,15G014200	0,4341	0,0867	0,1997	3,34
PvTH-17	Glyma,03G246000	0,2968	0,1303	0,439	2,28
PvTH-17	Glyma,10G161200	1,1217	0,3044	0,2714	8,63
PvTH-17	Glyma,19G243500	0,3321	0,1356	0,4083	2,55
PvTH-17	Glyma,20G224000	1,0162	0,2864	0,2818	7,82
PvTH-18	Glyma,09G014300	0,282	0,071	0,2519	2,17
PvTH-18	Glyma,15G119000	0,2351	0,0897	0,3816	1,81
PvTH-19	Glyma,12G210900	1,9456	0,3488	0,1793	14,97
PvTH-19	Glyma,13G229600	0,5002	0,0298	0,0597	3,85
PvTH-19	Glyma,13G290500	1,5257	0,4005	0,2625	11,74
PvTH-19	Glyma,15G082900	0,791	0,1104	0,1396	6,08
PvTH-21	Glyma,10G225300	0,2951	0,0407	0,1378	2,27
PvTH-21	Glyma,16G167700	0,8672	0,198	0,2283	6,67
PvTH-21	Glyma,20G166500	0,315	0,0415	0,1316	2,42
PvTH-22	Glyma,02G082000	2,4052	0,4243	0,1764	18,50
PvTH-22	Glyma,10G225100	4,2999	0,5006	0,1164	33,08
PvTH-22	Glyma,16G167500	2,1334	0,4506	0,2112	16,41
PvTH-22	Glyma,20G166600	0,3822	0,1024	0,2679	2,94
PvTH-24	Glyma,10G206000	0,3954	0,0268	0,0679	3,04
PvTH-24	Glyma,20G184500	0,6952	0,1211	0,1742	5,35
PvTH-25	Glyma,10G202300	0,3332	0,1056	0,3169	2,56
PvTH-25	Glyma,19G192300	3,9235	0,5693	0,1451	30,18
PvTH-25	Glyma,20G188100	0,3281	0,0837	0,2551	2,52
PvTH-26	Glyma,10G201400	0,2125	0,0684	0,3216	1,63
PvTH-26	Glyma,20G189000	0,2156	0,1048	0,4861	1,66
PvTH-27	Glyma,03G246000	1,1308	0,298	0,2635	8,70
PvTH-27	Glyma,10G161200	0,4598	0,1383	0,3009	3,54
PvTH-27	Glyma,19G243500	1,1366	0,3389	0,2982	8,74
PvTH-27	Glyma,20G224000	0,3084	0,109	0,3534	2,37
PvTH-28	Glyma,03G191700	0,7858	0,1944	0,2474	6,04
PvTH-28	Glyma,10G066800	0,4062	0,1294	0,3186	3,12
PvTH-28	Glyma,19G192300	0,7065	0,2079	0,2942	5,43
PvTH-29	Glyma,10G065100	0,2855	0,0615	0,2155	2,20
PvTH-29	Glyma,13G149900	0,2744	0,0589	0,2148	2,11
PvTH-30	Glyma,03G189600	1,8242	0,2256	0,1237	14,03
PvTH-30	Glyma,10G064900	0,3858	0,11	0,2852	2,97
PvTH-30	Glyma,13G149700	0,4202	0,0848	0,2017	3,23

Çizelge 4.4 *P. vulgaris* ve *G. max*'de bulunan *Trihelix* gen duplikasyonları (devam)

PvTH-30	Glyma,19G190000	1,578	0,2152	0,1364	12,14
PvTH-31	Glyma,08G257500	0,4039	0,0668	0,1653	3,11
PvTH-31	Glyma,18G281800	0,3554	0,0571	0,1608	2,73
PvTH-32	Glyma,09G245300	1,0511	0,0865	0,0823	8,09
PvTH-32	Glyma,18G248000	1,6291	0,2666	0,1636	12,53
PvTH-33	Glyma,18G202400	0,6156	0,068	0,1105	4,74
PvTH-33	Glyma,07G151100	0,4777	0,0605	0,1266	3,67
PvTH-34	Glyma,06G149900	0,6092	0,142	0,2331	4,69
PvTH-34	Glyma,04G216100	0,6181	0,1327	0,2147	4,75
PvTH-35	Glyma,06G171400	0,268	0,0509	0,19	2,06
PvTH-35	Glyma,04G194600	0,2761	0,055	0,1993	2,12
PvTH-35	Glyma,17G128500	0,6158	0,1288	0,2091	4,74
PvTH-36	Glyma,07G151100	1,0787	0,1159	0,1074	8,30
PvTH-36	Glyma,03G056900	0,3999	0,0719	0,1797	3,08
PvTH-36	Glyma,01G121000	0,4837	0,0488	0,101	3,72
PvTH-36	Glyma,18G202400	1,2373	0,1139	0,092	9,52
PvTH-37	Glyma,16G093600	0,7777	0,1116	0,1435	5,98
PvTH-38	Glyma,07G042800	0,3716	0,0452	0,1217	2,86
PvTH-38	Glyma,16G011200	0,4202	0,0548	0,1304	3,23

4.9 *PvTH* Transkriptlerini Hedef Alan miRNAların Tanımlanması

miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda olan, gelişim ve sinyal yollarında gen ekspresyonunu düzenlemede rol alan ve kodlama yapmayan endojen RNA molekülleridir (Wani vd., 2020). miRNA'lar stres koşulları altında bitkilerde hedef mRNA'lara bağlanarak gen ifadesini düzenlerler (Seo vd., 2017). Bu çalışmada *PvTH* genlerini hedefleyen miRNA'lar belirlenmiştir. *PvTH-17* transkriptini 1, *PvTH-28* transkriptini 5, *PvTH-25* transkriptini 6 adet miRNA'nın hedeflediği belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 *PvTH*'yi hedefleyen miRNA'lar

4.10 Fasulye *Trihelix* Genlerinin Promotor Bölge Analizi

Promotor bölgesi, transkripsiyonun başlaması için gereken, RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için spesifik bölgeler içeren, genin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın yerlerde konumlanmış bölgelerdir (Juven-Gershon vd., 2008). Fasulye genomunda tanımlanan *Trihelix* genlerinin promotor bölgesinde yerleşen cis-acting elementler PlantCare veri tabanı ile analiz edilmiş ve TBtools programı ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.10). *PvTH* genlerinde 51 adet (41 adet işlevi iyi bilinen) cis-acting element bulunmuştur. Bu elementler çevresel strese duyarlı elementler, hormonlar ile ilgili elementler, gelişim ile ilgili elementler, ışığa duyarlı elementler, promotor ile ilgili elementler, bölge bağlama ile ilgili elementler, biyotik stres ile ilgili elementler ve diğer elementler başlıkları altında toplanmıştır.

Çizelge 4.5 Gelişim ile ilgili elementler

GELİŞİM İLE İLGİLİ ELEMENTLER	
O2-site	Zein metabolizması düzenlemesinde yer alan cis etkili düzenleyici element
CAT-box	Meristem ifadesi ile ilgili cis etkili düzenleyici element
GCN4_motif	Endosperm ekspresyonunda yer alan cis düzenleyici element
HD-Zip 1	Palizat mezofil hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayan element
circadian	Sirkadiyen kontrolünde yer alan cis etkili düzenleyici element

Çizelge 4.6 Çevresel stresler ile ilgili elementler

ÇEVRESEL STRESLER İLE İLGİLİ ELEMENTLER	
ARE	Anaerobik indüksiyon için gerekli olan cis etkili düzenleyici element
MBS	Kuraklık ile bağlantılı MYB bağlanma bölgesi
LTR	Düşük sıcaklıkta yanıt vermede yer alan cis etkili element
TC-rich repeats	Savunma ve stres tepkisinde yer alan cis etkili element
Unnamed__5	SEF1 faktör bağlanma bölgesi

Çizelge 4.7 Hormonlar ile ilgili elementler

HORMONLAR İLE İLGİLİ ELEMENTLER	
ABRE	Absisik asit tepkisinde yer alan cis-etkili element
P-box	Giberellin duyarlı element
CGTCA-motif	MeJA'ya yanıt vermede yer alan cis etkili düzenleyici element
TGACG-motif	MeJA'ya yanıt vermede yer alan cis etkili düzenleyici element
TGA-element	Oksin duyarlı element
TGA-box	Oksin duyarlı elementin bir parçası
TCA-element	Salisilik asit tepkisinde rol oynayan cis etkili element

Çizelge 4.8 Işığa duyarlı elementler

IŞIĞA DUYARLI ELEMENTLER	
Box II	Işığa duyarlı elementin bir parçası
G-box	Işığa tepki vermede yer alan cis etkili düzenleyici element
G-Box	Işığa tepki vermede yer alan cis etkili düzenleyici element
GA-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
TCT-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
GT1-motif	Işığa duyarlı element
3-AF1 binding site	Işığa duyarlı element
GATA-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
chs-CMA2a	Işığa duyarlı elementin bir parçası
Box 4	Işığa tepki verme ile ilgili korunmuş bir DNA modülünün parçası
chs-CMA1a	Işığa duyarlı elementin bir parçası
CAG-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
AE-box	Işığa duyarlı modülün bir parçası
TCCC-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
MRE	Işığa tepki veren MYB bağlama bölgesi
4cl-CMA2b	Işığa duyarlı element
AAAC-motif	Işığa duyarlı element
Gap-box	Işığa duyarlı elementin bir parçası

Çizelge 4.9 Promotor ile ilgili elementler

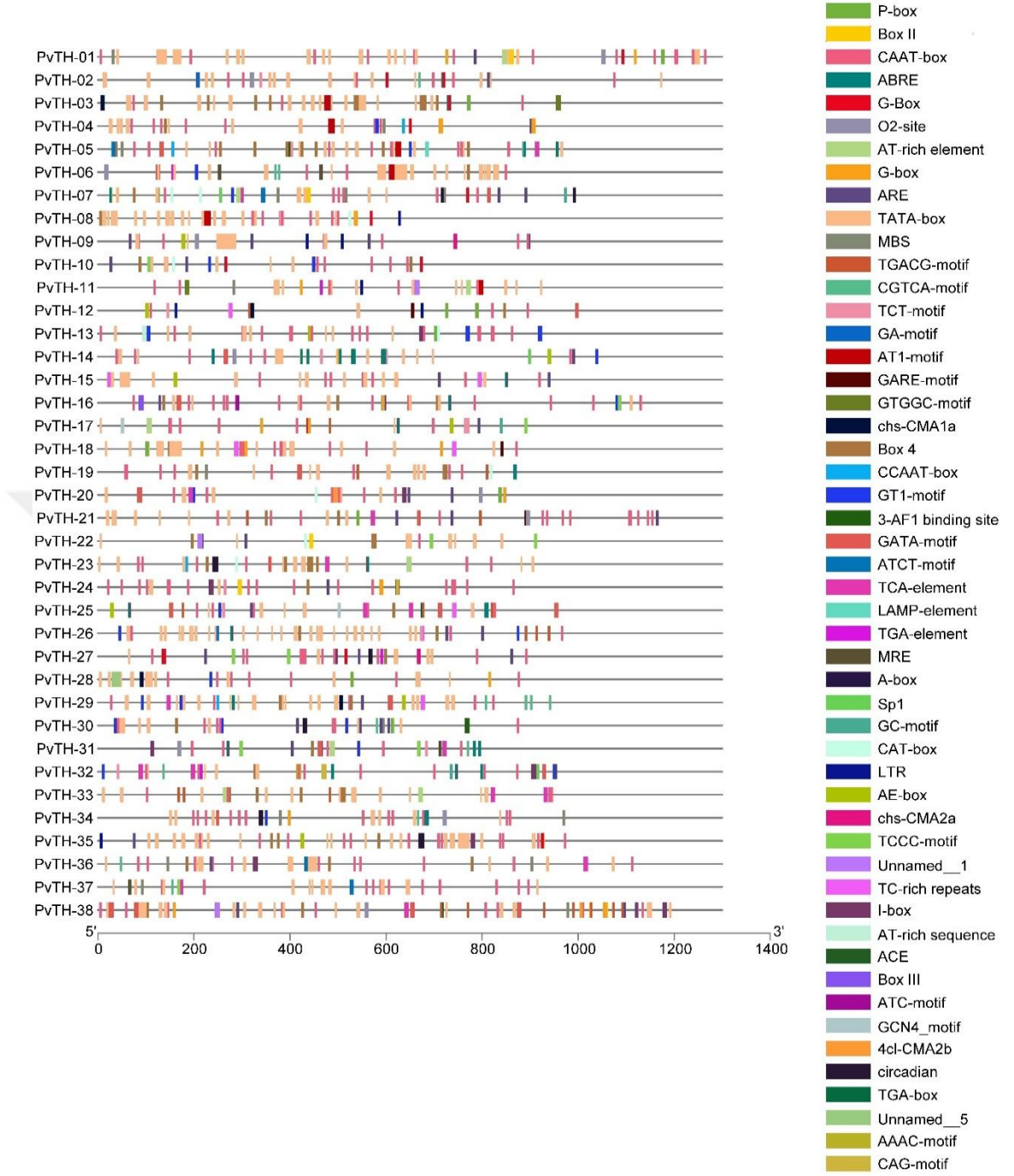
PROMOTOR İLE İLGİLİ ELEMENTLER	
CAAT-box	Promotor ve güçlendirici bölgelerde cis etkili element
TATA-box	Transkripsiyon başlangıcının yaklaşık -30'u civarında çekirdek promotor elementi

Çizelge 4.10 Bölge bağlama ile ilgili elementler

BÖLGE BAĞLAMA İLE İLGİLİ ELEMENTLER	
AT-rich element	AT açısından zengin DNA bağlama proteininin (ATBP-1) bağlanma bölgesi
Unnamed__1	60K protein bağlama bölgesi

Çizelge 4.11 Diğer elementler

DİĞER ELEMENTLER	
GARE-motif	Giberellin duyarlı eleman
GC-motif	Anoksik spesifik indüklenbilirlikte yer alan arttırıcı benzeri element



Şekil 4.10 *PvTH* genleri promotor bölgeleri cis-acting elementler

4.11 Fasulyede Trihelix Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri

Fasulye Trihelix proteinlerinin hücre içindeki dağılımı WoLFPSORT veri tabanı yardımı ile bulunmuştur. PvTH-06 7 farklı yer ile en fazla farklı yerde yerleşim gösteren proteindir. Proteinlerin hücre içi yerleşim yerleri çizelge 4.12’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 PvTH proteinlerinin hücre içi yerleşim yerleri

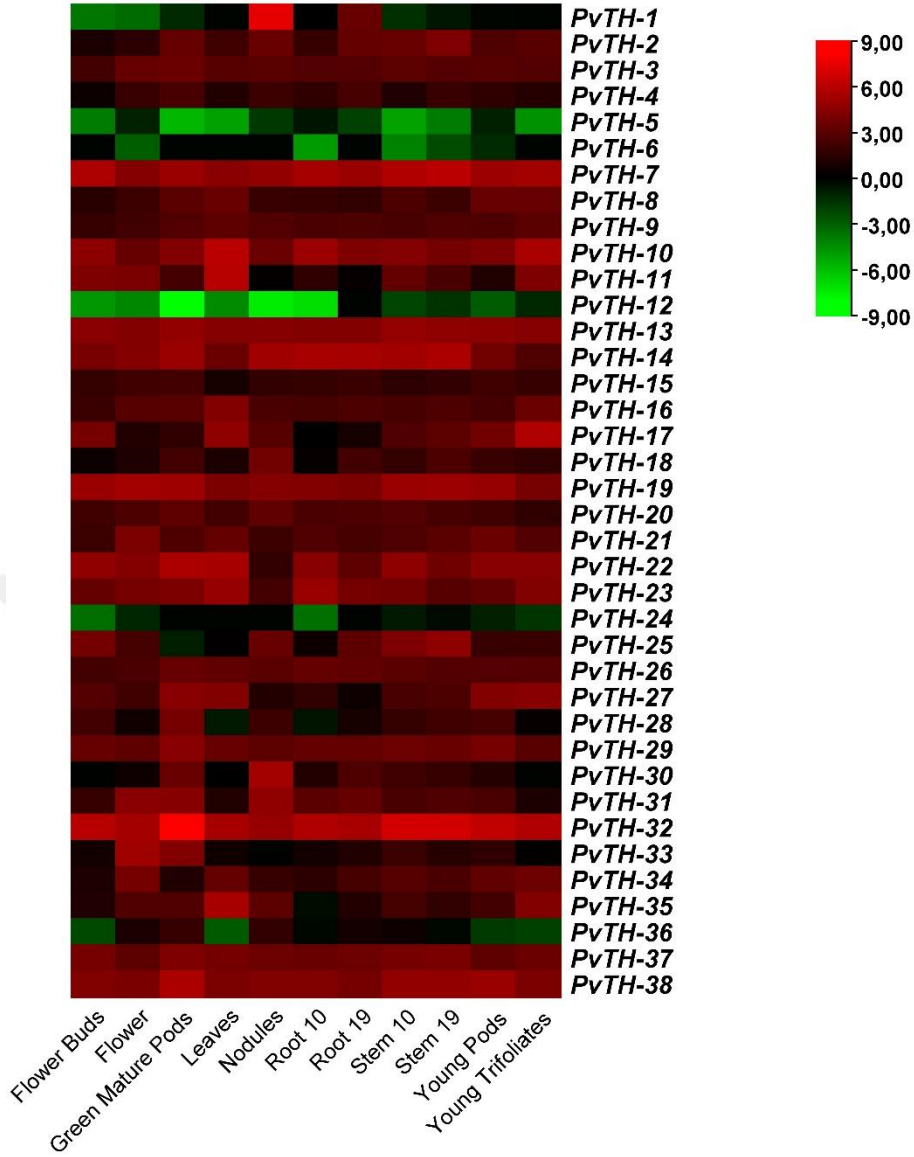
Proteinler	Hücre içi yerleşim yerleri
PvTH-01	nucl: 14
PvTH-02	nucl: 14
PvTH-03	cyto: 8, nucl: 2, cysk: 2, plas: 1
PvTH-04	nucl: 13
PvTH-05	nucl: 13
PvTH-06	nucl: 5, cyto: 2, golg: 2, chlo: 1, mito: 1, plas: 1, vacu: 1
PvTH-07	chlo: 6, nucl: 6, extr: 1, E.R.: 1
PvTH-08	chlo: 8, mito: 4, nucl: 1
PvTH-09	nucl: 14
PvTH-10	nucl: 10, cyto: 4
PvTH-11	nucl: 14
PvTH-12	nucl: 4.5, vacu: 3, cysk_nucl: 3, chlo: 2, plas: 2, mito: 1
PvTH-13	nucl: 13
PvTH-14	nucl: 13
PvTH-15	nucl: 14
PvTH-16	nucl: 13
PvTH-17	nucl: 14
PvTH-18	nucl: 12, chlo: 1
PvTH-19	nucl: 5.5, mito: 5, nucl_plas: 4, plas: 1.5, chlo: 1
PvTH-20	nucl: 9.5, cyto_nucl: 6, cyto: 1.5, mito: 1, plas: 1
PvTH-21	nucl: 14
PvTH-22	nucl: 13
PvTH-23	nucl: 14
PvTH-24	nucl: 14
PvTH-25	nucl: 14
PvTH-26	nucl: 11, cyto: 1, plas: 1
PvTH-27	nucl: 13
PvTH-28	nucl: 13
PvTH-29	nucl: 7, chlo: 4, plas: 1, vacu: 1
PvTH-30	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5
PvTH-31	nucl: 5, chlo: 2, cyto: 2, plas: 2, cysk: 2
PvTH-32	nucl: 8, chlo: 5
PvTH-33	nucl: 12, cyto: 1

Çizelge 4.12 PvTH proteinlerinin hücre içi yerleşim yerleri (devam)

PvTH-34	nucl: 14
PvTH-35	chlo: 12, cyto: 2
PvTH-36	nucl: 9, cyto: 3, chlo: 2
PvTH-37	mito: 8, nucl: 3, cyto: 3
PvTH-38	nucl: 14

4.12 Fasulye *Trihelix* Genleri Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri

Phytozome veri tabanından alınan fasulye *Trihelix* genlerinin mRNA seviyeleri ile oluşturan ısı grafiği ile genç trifolit, genç tohum, gövde 19, gövde 10, kök 19, kök 10, nodül, yaprak, yeşil yetişkin tohum, çiçek ve çiçek tomurcuğunda dokuya özgü mRNA seviyeleri görselleştirilmiştir. Oluşturulan grafiğe göre, bu dokularda *PvTH-05* ve *PvTH-12* mRNA seviyelerinin çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. *PvTH-06* ve *PvTH-24*'ün yeşil yetişkin tohum, yaprak, nodül ve kök 19'da orta-düşük düzey seviyelerde diğer dokularda ise düşük düzeylerde ifade olduğu belirlenmiştir. *PvTH-01*'in kök 19'da yüksek ve nodülde çok yüksek düzeyde ifade olduğu, *PvTH-32*'nin bütün dokularda yüksek düzeyde mRNA seviyeleri gösterdiği gözlemlenmiştir. Diğer genlerin bütün dokularda orta-yüksek düzeylerde ifade olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11).



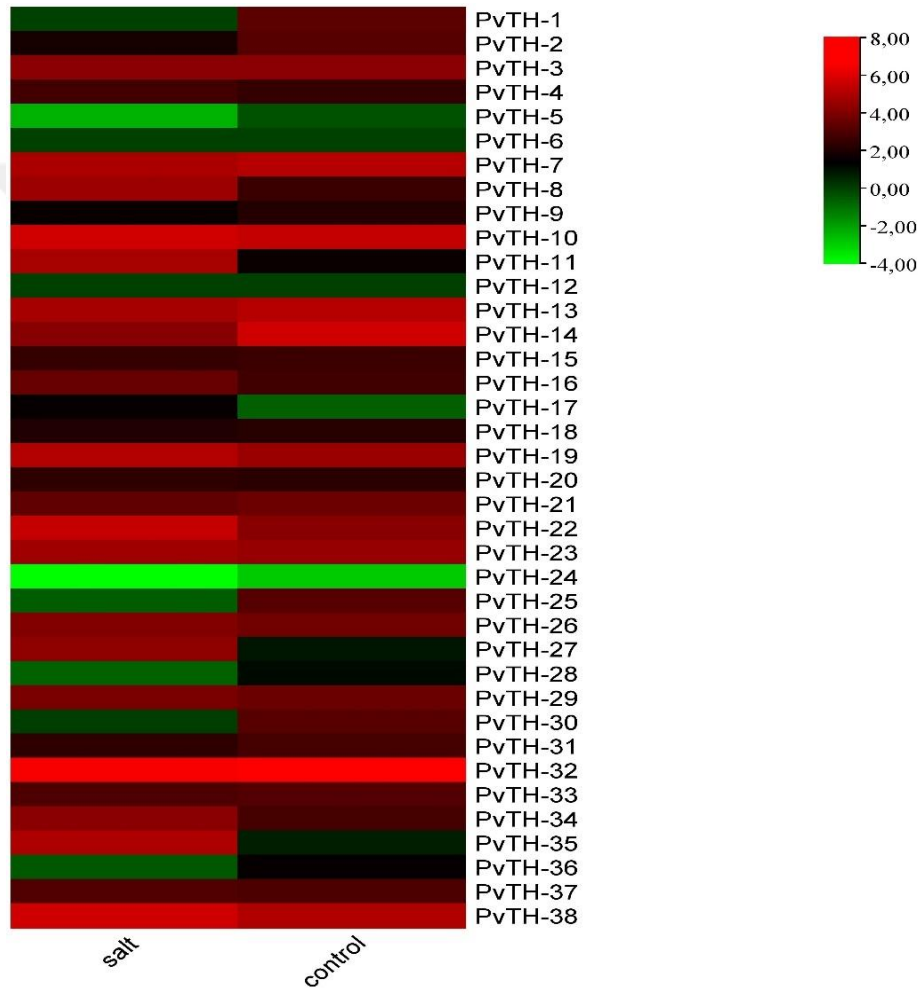
Şekil 4.11 *PvTH* genleri doku-spesifik mRNA ekspresyon seviyeleri ısı haritası

Isı haritası için TBtools programı kullanılmıştır. Analiz için ifade değerlerinin ortalamasının log2'si alınmıştır. Stem 19 ve Root 19 ifadeleri ekimden 19 gün sonra, Stem 10 ve Root 10 ifadeleri; ekimden 10 gün sonrayı belirtmektedir.

4.13 *PvTH* Genlerinin Tuz ve Kuraklık Stresi ile İfade Seviyeleri Değişimi

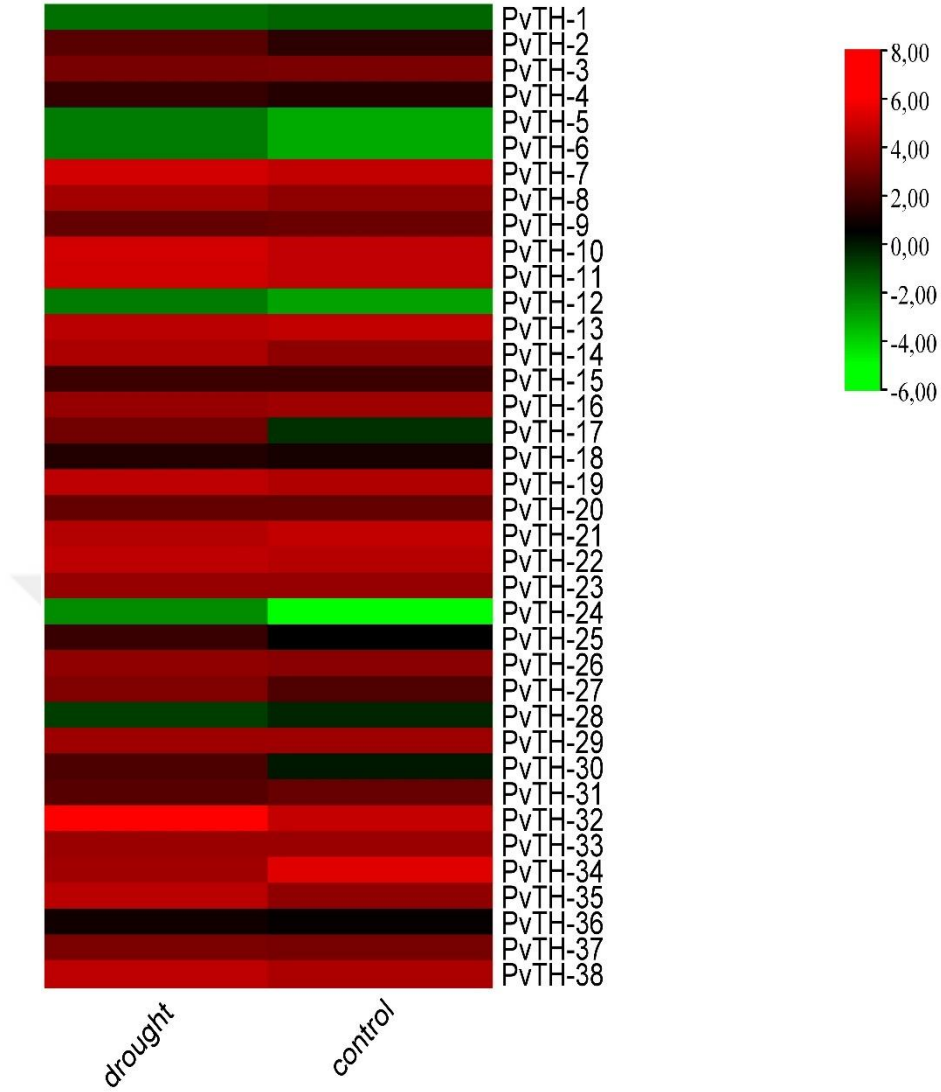
Fasulye *Trihelix* genlerinin tuz ve kuraklık stresine ilişkin ifade analizi tespiti RNAseq verileri kullanılarak görselleştirilmiştir. Verilerin analizinden elde edilen RPKM (reads

per kilobase per million mapped reads) değerleri aracılığıyla oluşturulan ısı haritasına göre bazı *PvTH* genlerinin ifade seviyeleri tuz ve kuraklık stresi karşısında değişiklik göstermiştir. Tuz stresi uygulaması altında *PvTH-01*, *PvTH-25*, *PvTH-28*, *PvTH-30*, *PvTH-36*, *PvTH-02*, *PvTH-05*, *PvTH-09*, *PvTH-14* ve *PvTH-31* ifade seviyeleri düşüş gösterirken, *PvTH-08*, *PvTH-11*, *PvTH-16*, *PvTH-17*, *PvTH-19*, *PvTH-22*, *PvTH-27*, *PvTH-34*, *PvTH-35* ve *PvTH-38*’ de artış gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *PvTH* genlerinin tuz stresi altında ekspresyonlarını gösteren ısı haritası

Kuraklık stresi uygulaması altında ise *PvTH-01*, *PvTH-28*, *PvTH-34* genlerinin ifade seviyelerinde düşüş gözlenirken, *PvTH-02*, *PvTH-04*, *PvTH-05*, *PvTH-06*, *PvTH-08*, *PvTH-10*, *PvTH-11*, *PvTH-12*, *PvTH-14*, *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-27*, *PvTH-30*, *PvTH-32*, *PvTH-35* ve *PvTH-38*’de ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 *PvTH* genlerinin kuraklık stresi altında ekspresyonlarını gösteren ısı haritası

4.14 Total RNA İzolasyonu

FavorPrepTM Total RNA Mini Kit ile RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen RNA'lar kalite ve miktar tayini için Thermo Nano Spectrometer Lite cihazı ile taranmıştır. İzole RNA örneklerinin optimal $A_{260/280}$ değerleri ~2.1'dir. Üç biyolojik tekrar barındıran RNA örneklerinin ölçümleri çizelge 4.13 (Tuz stresi) ve çizelge 4.14'te (H_2O_2) verilmiştir.

Çizelge 4.13 İzole edilen total RNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (Tuz stresi)

ÖRNEK RNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)	ÖRNEK RNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)
ESY-1	2,07	126,4	EKY-1	2,14	131,2
ESG-1	2,03	106	EKG-1	2,11	306
ESK-1	2,12	70	EKK-1	2,14	70,4
ESY-2	2,03	32,3	EKY-2	2,13	161,6
ESG-2	2,09	86,9	EKG-2	2,16	277,6
ESK-2	2,13	113,2	EKK-2	2,1	175,7
ESY-3	2,07	101,9	EKY-3	2,18	224,3
ESG-3	2,13	132,5	EKG-3	2,17	156,1
ESK-3	2,11	53,3	EKK-3	2,10	117,7
SSY-1	2,03	86	SKY-1	2,12	220,9
SSG-1	2,1	56,1	SKG-1	2,15	194
SSK-1	2,15	123,8	SKK-1	2,16	211,7
SSY-2	2,08	249,7	SKY-2	2,13	213
SSG-2	2,12	197,4	SKG-2	2,19	167
SSK-2	2,09	112,2	SKK-2	2,15	124,9
SSY-3	2,1	428	SKY-3	2,16	209,9
SSG-3	2,02	49,7	SKG-3	2,14	231,4
SSK-3	1,98	116,6	SKK-3	2,14	122,9

ESY: Elkoca Stres Yaprak, ESG: Elkoca Stres Gövde, ESK: Elkoca Stres Kök, SSY: Serra Stres Yaprak, SSG: Serra Stres Gövde, SSK: Serra Stres Kök, EKY: Elkoca Kontrol Yaprak, EKG: Elkoca Kontrol Gövde, EKK: Elkoca Kontrol Kök, SKY: Serra Kontrol Yaprak, SKG: Serra Kontrol Gövde, SKK: Serra Kontrol Kök.

Çizelge 4.14 İzole edilen total RNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (H₂O₂)

ÖRNEK RNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)	ÖRNEK RNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)
SSY-1 _(24h)	2,16	198,2	ESY-1 _(12h)	2,15	196,2
SSG-1 _(24h)	1,89	129,5	ESG-1 _(12h)	2,18	595,9
SSK-1 _(24h)	1,92	45,6	ESK-1 _(12h)	2,05	99,6

Çizelge 4.14 İzole edilen total RNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (H₂O₂) (devam)

SSY-2 _(24h)	2,16	240,2	ESY-2 _(12h)	2,15	246,1
SSG-2 _(24h)	2,02	271,5	ESG-2 _(12h)	2,17	256,8
SSK-2 _(24h)	1,94	51,7	ESK-2 _(12h)	2,09	140,6
SSY-3 _(24h)	2,16	342,1	ESY-3 _(12h)	2,15	111,4
SSG-3 _(24h)	2,07	232,1	ESG-3 _(12h)	2,16	415,3
SSK-3 _(24h)	1,95	55,5	ESK-3 _(12h)	2,05	134
ESY-1 _(24h)	2,14	82	SKY-1	2,16	394,7
ESG-1 _(24h)	2,15	283,7	SKG-1	2,17	414,7
ESK-1 _(24h)	1,95	50,4	SKK-1	2,12	86,8
ESY-2 _(24h)	2,09	69,3	SKY-2	2,16	341,7
ESG-2 _(24h)	2,15	215,7	SKG-2	2,16	402,1
ESK-2 _(24h)	1,92	48,3	SKK-2	2,16	656
ESY-3 _(24h)	2,17	103,4	SKY-3	2,16	308,8
ESG-3 _(24h)	1,94	96,3	SKG-3	2,15	257,4
ESK-3 _(24h)	1,82	27,7	SKK-3	2,17	106,6
SSY-1 _(12h)	2,15	116,9	EKY-1	2,17	200,3
SSG-1 _(12h)	2,11	162,5	EKG-1	2,17	330,6
SSK-1 _(12h)	2,04	144,4	EKK-1	2,17	460,4
SSY-2 _(12h)	2,15	155,3	EKY-2	2,17	355
SSG-2 _(12h)	2,14	270,2	EKG-2	2,16	276,2
SSK-2 _(12h)	2,05	135,4	EKK-2	2,18	493,2
SSY-3 _(12h)	2,16	165,7	EKY-3	2,16	365
SSG-3 _(12h)	2,16	319	EKG-3	2,17	171,2
SSK-3 _(12h)	2,05	130,6	EKK-3	2,16	427,5

(12h): 12 saat stres uygulaması sonunda alınan örnekler; (24h): 24 saat stres uygulaması sonunda alınan örnekler

4.15 cDNA İzolasyonu

İzole edilen, saflık ve miktar tayini yapılan total RNA'dan cDNA eldesi için iScript™ cDNA Sentez kiti (BioRad-Almanya) kullanılmıştır. cDNA sentezi sonunda ürünlerin saflık ve miktar tayini Thermo Nanospectrometer Lite cihazı ile yapılmıştır. Saflık miktarı ~1.8, cDNA örnekleri için optimal değerdir. Nanodrop ölçümleri çizelge 4.15 (Tuz stresi) ve çizelge 4.16'da (H₂O₂) verilmiştir. Ölçümlerden çıkan sonuçlara göre kullanılacak cDNA'lar qPCR'da kullanılmak üzere ~250 ng miktarına seyretilmiştir.

Çizelge 4.15 Total RNA'lardan elde edilen cDNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (Tuz stresi)

ÖRNEK cDNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)	ÖRNEK cDNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)
ESY-1	1.89	1235.7	EKY-1	1.89	1055.1
ESG-1	1.90	1235.7	EKG-1	1.92	1540.2
ESK-1	1.91	1375.6	EKK-1	1.92	601.4
ESY-2	1.81	970.7	EKY-2	1.92	1554.5
ESG-2	1.92	1478.1	EKG-2	1.92	1428.4
ESK-2	1.92	1655.7	EKK-2	1.92	1503.8
ESY-3	1.91	1323.3	EKY-3	1.92	1560
ESG-3	1.91	1187.4	EKG-3	1.90	1076.6
ESK-3	1.91	1303.4	EKK-3	1.91	1366.8
SSY-1	1.91	1514.8	SKY-1	1.90	1435.4
SSG-1	1.91	947	SKG-1	1.92	1588.3
SSK-1	1.91	1292	SKK-1	1.92	1569.2
SSY-2	1.92	1513.3	SKY-2	1.92	1542.7
SSG-2	1.92	1429.6	SKG-2	1.92	1601.1
SSK-2	1.99	1344.9	SKK-2	1.91	1236.5
SSY-3	1.92	1486	SKY-3	1.91	1274.2
SSG-3	1.82	1347	SKG-3	1.93	1462.1
SSK-3	1.90	1250.1	SKK-3	1.91	1306.5

Çizelge 4.16 Total RNA’lardan elde edilen cDNA’ların saflık dereceleri ve miktarları (H₂O₂)

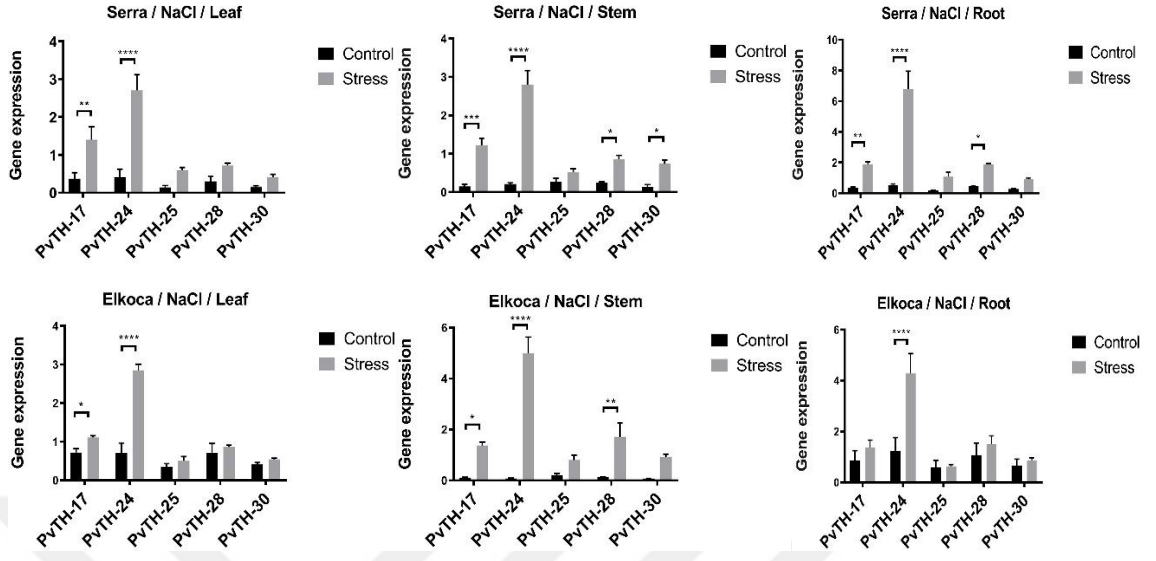
ÖRNEK cDNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)	ÖRNEK cDNA	SAFLIK (A260/280)	MİKTAR (ng/μl)
SSY-1 _(24h)	1.91	1284.2	ESY-1 _(12h)	1.92	1344.6
SSG-1 _(24h)	1.90	1315.5	ESG-1 _(12h)	1.92	1485.5
SSK-1 _(24h)	1.89	1079.8	ESK-1 _(12h)	1.91	1290.7
SSY-2 _(24h)	1.91	1295.5	ESY-2 _(12h)	1.91	1356.9
SSG-2 _(24h)	1.94	1336.4	ESG-2 _(12h)	1.92	1421.4
SSK-2 _(24h)	1.90	1326.7	ESK-2 _(12h)	1.91	1388.2
SSY-3 _(24h)	1.95	1378.5	ESY-3 _(12h)	1.92	1437.4
SSG-3 _(24h)	1.91	1323.1	ESG-3 _(12h)	1.91	1378.8
SSK-3 _(24h)	1.90	1322.1	ESK-3 _(12h)	1.91	1395.5
ESY-1 _(24h)	1.91	1343.5	SKY-1	1.90	1079.9
ESG-1 _(24h)	1.91	1302.2	SKG-1	1.91	1107.9
ESK-1 _(24h)	1.90	1334.3	SKK-1	1.90	1126.4
ESY-2 _(24h)	1.91	1262.5	SKY-2	1.86	1175.9
ESG-2 _(24h)	1.91	1275.9	SKG-2	1.91	1163.7
ESK-2 _(24h)	1.90	1263.5	SKK-2	1.91	1128.1
ESY-3 _(24h)	1.91	1294.7	SKY-3	1.91	1043.8
ESG-3 _(24h)	1.90	1202.1	SKG-3	1.91	1162.4
ESK-3 _(24h)	1.89	1240.4	SKK-3	1.91	1145.8
SSY-1 _(12h)	1.91	1348.1	EKY-1	1.91	1125.2
SSG-1 _(12h)	1.92	1393.9	EKG-1	1.91	1088.2
SSK-1 _(12h)	1.88	1445.7	EKK-1	1.90	1143.7
SSY-2 _(12h)	1.92	1431.5	EKY-2	1.91	1123
SSG-2 _(12h)	1.91	1331.2	EKG-2	1.91	1157.7
SSK-2 _(12h)	1.92	1459.9	EKK-2	1.91	1134.6
SSY-3 _(12h)	1.93	1594.8	EKY-3	1.91	1147.4
SSG-3 _(12h)	1.92	1412.9	EKG-3	1.91	1133.9
SSK-3 _(12h)	1.92	1446.5	EKK-3	1.90	1127.9

4.16 Tuz Stresi Altında Fasulye *Trihelix* Genlerinin mRNA Düzeyleri

PvTH genlerinin fasulye bitkisinde tuz stresi altında rollerini aydınlatmak için bitkilere 7 gün boyunca 150mM NaCl stresi uygulanmıştır. 7. günün sonunda bitkilerden 3 biyolojik tekrar olacak şekilde örnekler alınmıştır. RNAseq verilerine dayanarak seçilen 5 adet gene özgü (*PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-28*, *PvTH-30*) primerler tasarlanmış ve qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sırasında iki adet fasulye çeşidi (Elkoca ve Serra) kullanılmıştır. Yapılan qPCR analizlerine göre iki fasulye çeşidinin dokularında (kök, gövde, yaprak) seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan analizler ile bu artışların istatistiki anlamlı dereceleri de değerlendirilmiştir.

Serra bitkisinin tuz stresine karşı yaprak dokusunda ekspresyon seviyeleri artan *PvTH-17* ve *PvTH-24* genlerinin istatistiksel açıdan anlam teşkil ettiği, gövde dokusunda ekspresyon artışı gösteren *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-28* ve *PvTH-30* genlerinin anlamlı bir artış gösterdiği, kök dokusunda ise *PvTH-17*, *PvTH-24* ve *PvTH-28* genlerinin istatistiki derecede anlamlı artışlar gösterdiği gözlemlenmiştir.

Bunun yanı sıra Elkoca bitkisinde tuz stresi sonrası yaprak dokusunda *PvTH-17* ve *PvTH-24* genlerinin; gövde dokusunda *PvTH-17*, *PvTH-24* ve *PvTH-28* genlerinin; kök dokusunda sadece *PvTH-24* geninin anlamlı bir ekspresyon ifade artışı gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında Serra bitkisinde *PvTH-17* ve *PvTH-24* genlerinin tuz stresine karşı 3 dokuda da güçlü bir ekspresyon artışı sergilediği görülmüştür. Elkoca bitkisinde *PvTH-17* ve *PvTH-24* genlerinin stres etkisinde ekspresyon seviyelerinin arttığı, 3 ayrı dokuda da *PvTH-24*'ün ekspresyon seviyesinin güçlü bir şekilde yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.14).



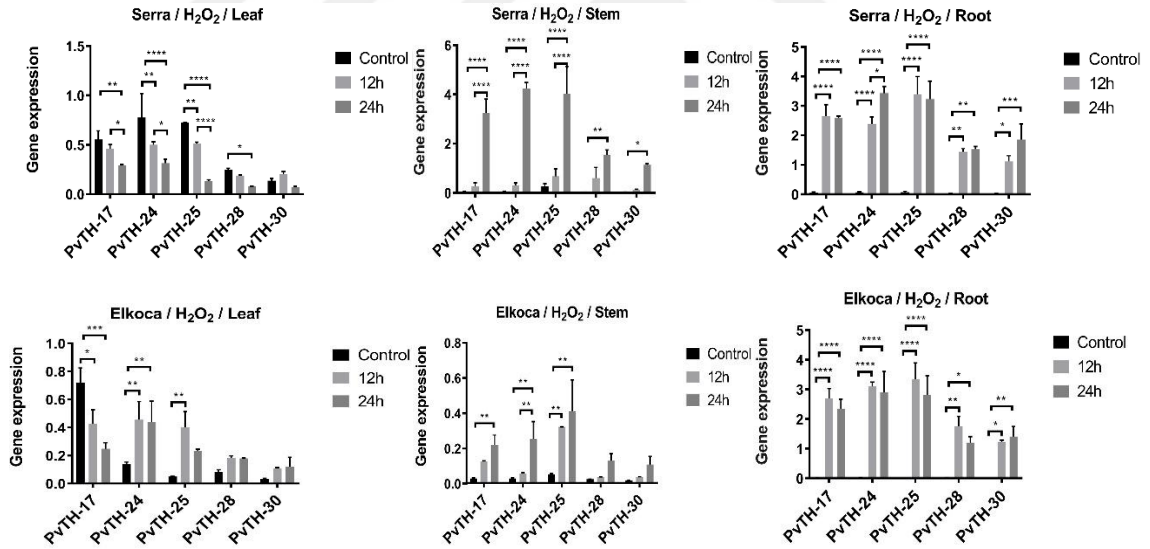
Şekil 4.14 Serra ve Elkoca çeşitlerinin tuz stresi altında gen ifade seviyesi (*' p- değeri < 0,05 ifade etmektedir)

4.17 H₂O₂ Uygulaması Altında Fasulye *Trihelix* Genlerinin mRNA Düzeyleri

Fasulye bitkilerine H₂O₂ uygulamak için bitkiler 7 gün Hoagland sıvısı içinde yetiştirildikten sonra H₂O₂ uygulanmaya başlanmış ve 0, 12, 24. Saatlerde 3 biyolojik tekrarlı örnekler alınmıştır. Alınan örnekler qPCR analizine tabi tutulmuştur.

qPCR analiz sonuçlarına göre H₂O₂ altında Serra yaprak dokusunda; kontrol-12. saat örneklerinde *PvTH-24* ve *PvTH-25* genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş, kontrol-24. saat örneklerinde *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-28* ekspresyon seviyelerinde istatistiksel açıdan anlamlı düşüş, 12-24. saat örnekleri arasında *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25* genlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Serra gövde dokusunda; kontrol-12. saat örnekleri arasında belirlenen genlerin hiçbirinde anlamlı bir ekspresyon farkı gözlemlenmezken, kontrol-24. saat örneklerinde *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-28* ve *PvTH-30* istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. 12. saat-24. saat örneklerine bakıldığında *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25* genlerinin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Serra kök dokularında; kontrol-12. saat ve

kontrol-24. saat örneklerinde *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-28*, *PvTH-30* ekspresyon seviyeleri anlamlı bir artış göstermiş, 12-24. saat örneklerinde ise sadece *PvTH-24*'ün anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Elkoca yaprak dokusunda; kontrol-12. saat örneklerinde *PvTH-17*'de anlamlı bir düşüş gözlemlenirken, *PvTH-24* ve *PvTH-25* ekspresyon seviyeleri artmış, kontrol-24. saat örneklerinde *PvTH-17*'de anlamlı düşüş ve *PvTH-24* ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olmuştur. Elkoca gövde dokusunda; kontrol- 12. saat örneklerinde sadece *PvTH-25*'te anlamlı bir artış, kontrol-24. saat örneklerinde ise *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25* genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış olmuştur. 12. saat-24. saat örneklerinde sadece *PvTH-24*'te anlamlı bir artış gözlenmiştir. Elkoca kök dokusunda; kontrol-12. saat ve kontrol-24. saat örneklerinde *PvTH-17*, *PvTH-24*, *PvTH-25*, *PvTH-28*, *PvTH-30*'da anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. 12. saat- 24. saat örneklerinde herhangi bir anlamlı artış veya düşüş gözlemlenmemiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Serra ve Elkoca çeşitlerinin H_2O_2 stresi altında gen ifade seviyesi (*' p-değeri < 0,05 ifade etmektedir)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Besin zincirinin en altında yer alan bitkiler, ham besin maddesi üretme yetenekleri ile besin zincirinin temelini oluşturan bir etkidir. Dünya popülasyonunun büyük çoğunluğunun ana besin kaynağı olan bitkiler insanlık için yadsınamaz bir öneme sahiptirler. Tarihsel açıdan bakıldığında bol gıda üretimine sahip olan ulusların büyüme ve gelişme oranlarının diğer uluslara göre daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir (Shao vd., 2009). Bu açıdan bakıldığında ülkelerin gelişmesi için kendi besinini üretmesinin önemli bir unsur olduğu anlaşılmaktadır. Çevresel ve iklimsel faktörler üretimi yapılan besinlerin ürün kalitelerini ve verimini etkilemektedir. Nüfusun bu denli hızlı arttığı bir dünyada ekim alanlarının gitgide azalması ve besine olan talebin ise doğal olarak artmasından dolayı daha küçük alanlarda daha fazla verim elde edebilmek önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Fasulye bitkisi günümüzde bitkisel besin kaynakları arasında önemli role sahip bir baklagil türüdür. Büyük kitlelerin besin ihtiyacının giderilmesinde oldukça önemli olan fasulyenin çevresel faktörlerden dolayı veriminin azalmasının önüne geçebilmek için bitkinin savunma mekanizmalarının aydınlatılması ve bunların üzerine çalışılması bir gerekliliktir.

Trihelix genleri bitkinin büyüme ve gelişiminde önemli rolleri bulunan, biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında kilit roller üstlenen bir TF ailesidir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda, *Arabidopsis* (n=30) (Kaplan-Levy vd., 2012), *Camellia sinensis* (n=10) (Li vd., 2017), *Chrysanthemum morifolium* (n=20) (A. Song vd., 2016), *Dendrobium officinale* (n=32) (Tong vd., 2021), *Fagopyrum tataricum* (n=31) (Ma vd., 2019), *Glycine max* (n=71) (W. Liu vd., 2020), *Gossypium hirsutum* (n=102) *Gossypium arboreum* (n=51) ve *Gossypium raimondii* (n=51) (Magwanga vd., 2019), *Zea mays* (n=59) (Du vd., 2016), *Medicago truncatula* (n=38) (Xiqiang Liu vd., 2020), *Phyllostachys edulis* (n=35) (Cheng vd., 2019), *Pogostemon cablin* (n=16) (Li vd., 2021), *Populus trichocarpa* (n=56) (Wang vd., 2016), *Triticum aestivum* (n=94) (Xiao vd., 2019) *Trihelix* geni belirlenmiştir. *Phaseolus vulgaris* L. bitkisi üzerinde yaptığımız

alışmalar doğrultusunda ise 38 adet *Trihelix* geni tanımlanarak karakterize edilmiştir ve bunlar *PvTH-1*'den *PvTH-38*'e kadar isimlendirilmiştir.

Fizikokimyasal özellikleri belirlenen PvTH proteinlerinin içerdikleri amino asit sayısında (260 aa (*PvTH-37*) ile 996 aa (*PvTH-12*)) ciddi farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca moleküler ağırlıklarının da 30 kDa (*PvTH-37*) ile 111.5 kDa (*PvTH-12*) arasında büyük bir farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. Benzer şekilde Xiao vd. (2019) tarafından buğday üzerinde yapılan bir çalışmada da buğdayda tanımlanan Trihelix proteinlerinin 197-851 amino asit kalıntısı aralığında büyük uzunluk farklılıklarına sahip olduğu ve benzer şekilde moleküler ağırlıkları (21.6-94.4 kDa) arasında da ciddi farklar olduğu belirlenmiştir (Xiao vd., 2019). Pirinç üzerinde yapılan bir çalışmada da benzer şekilde Trihelix proteinlerinin 266-882 amino asit kalıntısı aralığında değiştii ve moleküler ağırlıklarının ise 28.62-97.37 kDa arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Li vd., 2019).

Kromozom lokasyonları incelendiğinde kromozom 11 haricinde tüm *P. vulgaris* kromozomlarında *PvTH* genlerinin eşit sayıda olmamak suretiyle dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Ma vd. (2019) tarafından *Fagopyrum tataricum* üzerinde yapılan bir diğer çalışmada 31 adet *FtTH* geninin kromozomlar üzerine eşit dağılmadığı görölmektedir. Soyadaki bir başka çalışmada da tanımlanan 71 adet *Trihelix* geninin kromozomlar üzerinde eşit dağılmadığı ve 20 kromozomdan 19'unda *Trihelix* geninin yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (W. Liu vd., 2020).

Trihelix proteinlerinin evrimsel ilişkilerini ve filogenetik yakınlıklarını anlamak için ayrıntılı bir analiz yapılmıştır ve Trihelix proteinleri filogenetik ağaçta 5 ana gruba ayrılmıştır. Buna göre GT-1 grubu filogenetik ağaçta birbirinden uzak 3 ayrı bölgede yer almaktadır. GT-2 ve SIP1 grubu 11 adet ile en fazla PvTH barındıran gruplardır. Mısır üzerinde yapılan bir çalışmada benzer şekilde GT-1 grubunun filogenetik ağaçta iki ayrı bölgede yer aldığı rapor edilmiştir. Mısır bitkisinde de bu çalışma ile benzer şekilde SIP1'in en fazla üyeye sahip grup olduğu belirtilmiştir (Du vd., 2016). *Gossypium arboreum* üzerinde yapılan bir çalışmada GT-1 grubunda bulunan Trihelix proteinleri filogenetik ağaçta iki ayrı konumda gösterilmiştir (Mo vd., 2019). *Fagopyrum tataricum* üzerinde yapılan bir çalışmada GT-2 Trihelix proteinleri

filogenetik ağaçta iki ayrı yerde belirtilmiştir (Ma vd., 2019). Görüldüğü üzere bu çalışmada çizilen filogenetik ağaç ile elde edilen bulgular literatür ile uyumludur.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında PvTH proteinlerinde toplamda 110 adet domain tespit edilmiştir. En fazla domain barındıran proteinler PvTH-08, PvTH-26, PvTH-29, PvTH-35 proteinleridir.

Myb_DNA_bind 4 ve GT1superfamily domainlerinin bütün Trihelix proteinlerinde bulunduğu belirlenmiştir. GT1 domaininin ise PvTH-13, PvTH-15, PvTH-16 ve PvTH-38 (SIP1 kategorisinde yer alırlar) proteinleri hariç diğer tüm proteinlerde bulunduğu, SANT ve SANTsuperfamily domainlerinin filogenetik ağaçta aynı dalda yer alan PvTH-07 ve PvTH-32 hariç diğer proteinlerde bulunmadığı belirlenmiştir. Filogenetik ağaçta birbirine yakınlık gösteren proteinlerin korunmuş domain ve motif analizinde de birbirlerine benzer oldukları görülmüştür. *Chrysanthemum morifolium* üzerinde yapılan çalışmada Trihelix proteinlerinin çoğunun bu çalışma ile benzer şekilde Myb_DNA_bind domaini içerdiği belirtilmiştir (A. Song vd., 2016). Domates üzerinde yapılan bir başka çalışmada tüm Trihelix proteinlerinin Myb/SANT-like domaini içerdiği ifade edilmiştir (Yu vd., 2015).

Bir genin yapısı genin kodlama potansiyeli ile ilişkilidir. Genin yapısındaki intronlar ise gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve protein çeşitliliğinin artırılmasında önemli yapılardır (Jo ve Choi, 2015). Gerçekleştirilen analizler doğrultusunda *PvTH* genlerinin ekzon-intron yapıları belirlenmiş olup 9 *PvTH* geninin hiç intron içermediği bulunmuştur. Li vd. (2022) tarafından *Chenopodium quinoa* üzerinde yapılan bir başka çalışmada da benzer şekilde 5 *CqTH* geninde hiç intron bulunmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca *PvTH-07* geninin yalnızca ekzon barındırdığı, UTR ve intron bölgesi içermediği görülmektedir. Benzer şekilde Li vd. (2019) tarafından *Oryza sativa*'da *Trihelix* gen ailesi üzerinde yapılan bir başka çalışmada da 2 genin (*OsMSL30* – *OsMSL-32*) yalnızca ekzon barındırdığı, UTR ve intron bölgesi içermediği belirlenmiştir. *A. thaliana* üzerinde yapılan bir çalışmada ise *Trihelix* gen ailesi üyelerinden *AT1G76870* geninin yalnızca ekzon bulundurduğu belirlenmiştir (Yasmeen vd., 2016). Görüldüğü üzere *PvTH* genlerinin tespit edilen fiziksel yapıları literatür ile uyumludur.

Yapılan analizler doğrultusunda *PvTH* genleri arasında 8 çift segmental duplikasyon görülmekte iken, tandem duplikasyona rastlanılmamıştır. W. Liu vd. (2020) tarafından *Glycine max* üzerine yapılan çalışmada benzer şekilde 13 çift segmental duplikasyon görülürken, tandem duplikasyon olayı tanımlanmamıştır. Domates üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise 14 çift segmental duplikasyon belirlenmiş ve tandem duplikasyon olayı görülmemiştir (Yu vd., 2015). *PvTH* genlerinin Ka/Ks oranı 0,72 olarak hesaplanmıştır. Bu genlerin Ka/Ks oranının 1'den küçük olmasından yola çıkılarak *PvTH* genlerinin negatif seleksiyona uğradığı söylenebilmektedir. Benzer şekilde W. Liu vd. (2020) tarafından *G.max* üzerinde yapılan çalışmada belirlenen duplikasyonların da negatif seleksiyona uğramış olabileceği belirtilmiştir. *Brassica rapa* üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise duplikasyona uğramış *BraTH* gen çiftlerinin negatif seleksiyona uğradığı bulunmuştur. Buğday ve *Brachypodium distachyon* üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise *Trihelix* gen ailesinin bu türlerde evrim sırasında güçlü bir negatif seleksiyona uğradığı ifade edilmiştir (Wang vd., 2019).

Sinteni analizi ortolog genlerin evrimsel ilişkilerini araştırmak ve işlevsel olarak ilişkileri belirlemek için kullanılabilen oldukça yararlı bir yöntemdir. Fasulye ile *A.thalina* ve *G.max* arasındaki sintenik ilişkiler araştırılmıştır. *PvTH* genleri göz önüne alındığında *A. thaliana* ile 15 farklı *PvTH* geninde 18 adet ortolog ilişki, *G. max* ile *PvTH-06*, *PvTH-10*, *PvTH20* ve *PvTH-23* hariç diğer bütün *PvTH* genlerinde toplamda 90 adet ilişki bulunmuştur.

miRNA'lar stres koşullarında bitkilerde hedef mRNA'lara bağlanarak gen ifadesini düzenlerler. Bu çalışmada, *PvTH* genlerini hedefleyen miRNA'lar belirlenmiştir. *PvTH-17*'yi 1, *PvTH-28*'i 5, *PvTH-25*'i 6 miRNA'nın hedeflediği belirlenmiştir. *PvTH-17*'yi hedefleyen miR319, *PvTH-25*'i hedefleyen miRNA171 ve *PvTH-28*'i hedefleyen miR319'in tuz stresine yanıtta rol oynadıkları bilinmektedir (Büyük vd., 2019). *Arabidopsis* 'te miRNA171'in tuz, soğuk ve kuraklık stresi altında yukarı-regüle olarak abiyotik stresler sırasında rol oynamış olabileceği belirtilmiştir (Liu, 2008). *Solanum tuberosum* üzerinde yapılan bir çalışmada miR171'in kuraklık stresi yanıtında rol aldığı belirtilmiştir (Hwang vd., 2011). *PvTH-28*'i hedefleyen miR319a'nın daha önce *A.thaliana* ' da yaprak büyüme ve gelişmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Nag vd., 2009). Hedefi *PvTH-25* ve *PvTH-28* olan miR394'ün ise *A.thaliana*'da soğuk stresi

yanıtı ile ilgili olduğu bulunmuştur (J. B. Song vd., 2016). Yapılan bir çalışmaya göre miRNA167'nin embriyonik ve tohum gelişiminin maternal kontrolünde önemli bir rolü olduğu ifade edilmiştir (Yao vd., 2019).

Fasulye *Trihelix* genlerinin promotor bölgelerindeki cis-elementler analiz edilmiştir. Sonuçlar, bütün *PvTH* genlerinin en az bir adet ışığa duyarlı element ve çevresel stresler ile ilişkili element içerdiğini göstermiştir. Genel olarak *PvTH* promotor bölgelerinde çevresel stresler ile bağlantılı olan düşük sıcaklık ile ilgili element (LTR) (%13,15), anaerobik yanıt ile ilgili element (ARE) (%60,52), kuraklık ile bağlantılı element (MBS) (%28,94) tespit edilmiştir. Hormonlar ile bağlantılı olan absisik asit tepkisinde yer alan element (ABRE) (%71,05), metil jasmonat yanıtında yer alan elementler (CGTCA-motif, TGACG-motif) (%49,99), etilen yanıtında yer alan element (ERE) (%57,89) belirlenmiştir. Ayrıca ışığa duyarlı elementler olan G-box, box 4, GT1-motif, GATA motif, TCT-motif vd. bulunmuştur. Benzer şekilde Cheng vd. (2019) *Phyllostachys edulis Trihelix* genlerinin promotor bölgelerinde genel olarak ABRE, CGTCA-motif, TGACG-motif, ARE, MBS, ERE, GT1-motif ve G-box elementlerinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Soya fasulyesinde yapılan bir çalışmada *Trihelix* genlerinin %94.37'sinin en az bir ışığa duyarlı cis-element içerdiği belirtilmiştir (W. Liu vd., 2020).

PvTH proteinlerinin hücre içi yerleşim yerleri analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda *PvTH*-35 dışında bütün proteinlerin çekirdekte bulunduğu belirlenmiştir. *PvTH*-35'in sadece kloroplast ve sitoplazmada yerleşim yaptığı görülmüştür. 11 adet *PvTH* proteininin kloroplastta bulunduğu belirlenmiştir. 20 adet *PvTH* proteini ise sadece çekirdekte konumlanmıştır. 11 adet *PvTH* proteini sitozolde ve 6 adet *PvTH* proteinin de mitokondride bulunduğu belirlenmiştir. *Phyllostachys edulis* üzerinde yapılan bir çalışmada 19 *Trihelix* proteininin çekirdek, 11 proteinin kloroplast, 3 proteinin mitokondri ve bir proteinin ise sitozolde konumlandığı rapor edilmiştir (Cheng vd., 2019). Soya üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise 3 *Trihelix* proteini dışında bütün proteinlerin çekirdekte, diğer 3 proteinin ise kloroplastta konumlandığı bildirilmiştir (W. Liu vd., 2020). *Oryza sativa* üzerinde yapılan başka bir çalışmada 29 *Trihelix* proteininin çekirdek, 10 proteinin kloroplast ve 2 proteinin peroksizomda yerleşim gösterdiği belirtilmiştir (Li vd., 2019). Song vd. (2016) *Arabidopsis*'te bulunan

30 Trihelix proteininden 13 adetinin çekirdekte, 6 proteinin çekirdek ile birlikte hücrenin diğer bölümlerinde ve 9 proteinin hücrenin diğer bölümlerinde konumlandığını belirtmiştir. Tong vd. (2021) *Dendrobium officinale*'de bulunan Trihelix proteinlerinin büyük çoğunluğunun çekirdekte ve kalan proteinlerin ise kloroplast, hücre zarı, peroksizom gibi hücrenin çeşitli kısımlarında konumlandığını belirtmişlerdir.

PvTH genlerinin çeşitli dokulardaki dokuya özgü mRNA seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, *PvTH-05*, *PvTH-06* ve *PvTH-12* mRNA seviyelerinin diğer genlere göre nispeten daha düşük olduğunu göstermiştir. *PvTH-32* ise diğer genlere nazaran bütün dokularda yüksek mRNA seviyesine sahiptir. *PvTH-01* ise nodüllerde ifade seviyesi çok yüksek iken çiçek ve çiçek tomurcuğunda düşük ifade seviyeleri sergilemektedir. Bütün genlerin bütün dokularda eksprese olduğu belirlenmiştir. *PvTH* genlerinin çoğu bütün dokularda görece düşük olmayan ekspresyon seviyelerine sahiptir. Fakat *PvTH-05*, *PvTH-06*, *PvTH-12* ve *PvTH-24* diğer genlere nazaran daha düşük mRNA seviyelerine sahiptir. Bu dört gen SH4 alt kategorisinde bulunurlar. SH4 kategorisindeki diğer 2 gen (*PvTH-20* ve *PvTH-31*) bu dört gen kadar düşük ekspresyon seviyeleri göstermemiştir. Benzer şekilde Li vd. (2019) pirinç *Trihelix* genlerinin pirinçte 4 farklı dokuda (kök, gövde, yaprak ve kabuk) eksprese olduğunu fakat ekspresyon seviyelerinin değişiklik gösterdiğini raporlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, neredeyse bütün genlerin yapraklarda yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve köklerde hiçbir genin yüksek ekspresyon göstermediğini belirtmişlerdir. Cheng vd. (2019) dev bambu bitkisindeki çoğu *Trihelix* geninin yaprak, genç yaprak ve salkımda oldukça yüksek mRNA seviyesine sahip olduğunu göstermiştir. Xiao vd. (2019) buğdayda çeşitli dokularda ekspresyon gösteren *Trihelix* genlerinin aynı kategoride yer alan genler arasında aynı ekspresyon seviyelerinin olmadığı fakat homolog genlerin benzer mRNA seviyelerine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

PvTH genlerinin tuz ve H₂O₂ ile ilişkili olduğu düşünülmüş çeşitli uygulamalar ile *PvTH* genlerinin detaylı analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Serra bitkisinde *PvTH-17* ve *PvTH-24* genlerinin tuz stresine karşı 3 dokuda da güçlü bir ekspresyon artışı sergilediğini göstermiştir. Elkoca bitkisinde *PvTH-17* ve *PvTH-24* genlerinin stres etkisinde ekspresyon seviyelerinin arttığı, 3 ayrı dokuda da *PvTH-24*'ün ekspresyon seviyesinin güçlü bir şekilde yükseldiği görülmüştür. Bu bulgular ışığında, tuz stresi

altında, Serra çeşidinde *PvTH-17* ve *PvTH-24*, Elkoca çeşidinde ise *PvTH-24*'ün tuz stresi yanıtında önemli bir rolü olabileceği düşünülmektedir. H_2O_2 altında ise seçilen genlerin ilk olarak kök dokularında strese yanıt olarak ilk 12 saatlik periyotta artış gösterdiği, gövde dokularında ilk 12 saatte artışın başladığı ve 12. saatten sonra artışın giderek arttığı görülmektedir. Yaprak dokularında ise *PvTH-17* geni ifade seviyesi her iki çeşitte de düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar H_2O_2 'ye karşı *PvTH* genlerinin yanıtta rol oynadığı hipotezini destekler niteliktedir. Benzer şekilde buğday üzerinde yapılan çalışmada *TaGT-42* geninin $NaCl$ ve H_2O_2 karşısında ekspresyon seviyesinin arttığı raporlanmıştır (Xiao vd., 2019). Yapılan bir çalışmada soya *Trihelix* geni, *GmGT-2A* (*Glyma.04G216100*) tuz stresi karşısında yukarı-regüle olduğu ve *GmGT-2A*'nın yüksek ekspresyonu bitkinin tuz stresine karşı toleransını geliştirdiği belirtilmiştir (Xie vd., 2009). Soya üzerine yapılan başka bir çalışmada 3 *Trihelix* geninin (*Glyma.03G189600*, *Glyma.13G149700* ve *Glyma.19G190000*) tuz stresi tarafından indüklendiği belirtilmiştir (W. Liu vd., 2020). *Medicago truncatula*' da yapılan bir çalışmada tuz stresi altında 13 *Trihelix* geni (*MtGT*) yukarı-regüle olurken, 8 *MtGT* geninin aşağı-regüle olduğu belirtilmiştir (Xiqiang Liu vd., 2020). Xiao vd. (2019), buğday *Trihelix* geni olan *TaGT-42*'nin H_2O_2 ve tuz stresi altında, köklerde ekspresyon ifade seviyesinin arttığını belirtmiştir. Li vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada pirinç *Trihelix* genlerinin (*OsMSL*) çeşitli abiyotik stresler karşısında ekspresyon seviyeleri incelenmiş ve altı *OsMSL*'nin çoklu stres uygulamaları karşısında indüklendiği belirtilmiştir. Bu genlerin ekspresyon seviyeleri H_2O_2 karşısında diğer streslere nazaran önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada domates üzerinde yapılan çalışmada tanımlanan 36 adet *Trihelix* geninden (*SIGT*) 6 tanesinin tuz stresi altında yukarı-regüle olduğu belirlenmiştir (Yu vd., 2015).

Yapılan bu tez çalışması sonucunda işlevleri tanımlanan genlerin fasulye bitkisinde tuz ve H_2O_2 yanıtında rol alan genlerin belirlenmesinde, bitki toleransının iyileştirilmesinde, ıslah çalışmalarında ve bu strese dayanıklı türlerin geliştirilmesinde aday genler olabilecek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Azooz, M., & Prasad, M. (2013). Salt stress in plants. *He {delberg: Spr*
{nger.
- Akhtar, I., & Nazir, N. (2013). Effect of waterlogging and drought stress in plants. *International Journal of water resources and environmental sciences*, 2(2), 34-40.
- Arbona, V., Manzi, M., de Ollas, C., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4885-4911. https://mdpi-res.com/d_attachment/ijms/ijms-14-04885/article_deploy/ijms-14-04885.pdf?version=1403145883
- Ashraf, M., & Iram, A. (2005). Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(6), 535-546.
- Ashraf, M., & Ozturk, M. (2008). *Salinity and water stress: improving crop efficiency* (Vol. 44). Springer Science & Business Media.
- Ayadi, M., Delaporte, V., Li, Y.-F., & Zhou, D.-X. (2004). Analysis of GT-3a identifies a distinct subgroup of trihelix DNA-binding transcription factors in Arabidopsis. *Febs Letters*, 562(1-3), 147-154.
- Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. (2015). The MEME suite. *Nucleic acids research*, 43(W1), W39-W49.
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J. V., Vangronsveld, J., & van der Lelie, D. (2004). Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature biotechnology*, 22(5), 583-588.
- Bhargava, S., & Sawant, K. (2013). Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*, 132(1), 21-32.
- Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M. L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G., & Papa, R. (2017). Beans (*Phaseolus* ssp.) as a model for understanding crop evolution. *Frontiers in plant science*, 722.
- Blair, M. W., Giraldo, M., Buendia, H., Tovar, E., Duque, M., & Beebe, S. E. (2006). Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 113(1), 100-109. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00122-006-0276-4.pdf>

- Bradbury, J. F. (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB international.
- Brewer, P. B., Howles, P. A., Dorian, K., Griffith, M. E., Ishida, T., Kaplan-Levy, R. N., Kilinc, A., & Smyth, D. R. (2004). PETAL LOSS, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the Arabidopsis flower.
- Brücher, H. (1988). The wild ancestor of Phaseolus vulgaris in South America. In *Genetic resources of Phaseolus beans* (pp. 185-214). Springer.
- Büyük, İ. (2014). *Tuz ve kuraklık stresi altında geliştirilmiş farklı fasulye (Phaseolus vulgaris L.) çeşitlerinde lea-3 geni mrna ifade seviyelerinin kantitatif real-time pcr yöntemiyle incelenmesi* Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara].
- Büyük, İ., İlhan, E., Şener, D., Özsoy, A. U., & Aras, S. (2019). Genome-wide identification of CAMTA gene family members in Phaseolus vulgaris L. and their expression profiling during salt stress. *Molecular biology reports*, 46(3), 2721-2732.
- Chandna, R., Azooz, M., & Ahmad, P. (2013). Recent advances of metabolomics to reveal plant response during salt stress. *Salt stress in plants*, 1-14.
- Cheeseman, J. M. (2007). Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant stress*, 1(1), 4-15.
- Cheng, X., Xiong, R., Yan, H., Gao, Y., Liu, H., Wu, M., & Xiang, Y. (2019). The trihelix family of transcription factors: functional and evolutionary analysis in Moso bamboo (Phyllostachys edulis). *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-20.
- Christenhusz, M. J., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201–217.
- Damicone, J. P., Olson, J. D., & Kahn, B. A. (2012). Cultivar and fungicide effects on Pythium leak of snap bean. *Plant health progress*, 13(1), 17.
- Du, H., Huang, M., & Liu, L. (2016). The genome wide analysis of GT transcription factors that respond to drought and waterlogging stresses in maize. *Euphytica*, 208(1), 113-122.
- Fang, Y., Xie, K., Hou, X., Hu, H., & Xiong, L. (2010). Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(2), 157-169.
- FAOSTAT, F. (2015). FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home>. In: E.
- Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. (2012). Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress*, 1-33.

- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In *Sustainable agriculture* (pp. 153-188). Springer.
- Fitch, W. M. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic zoology*, 19(2), 99-113.
- Flowers, T., Troke, P., & Yeo, A. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, 28(1), 89-121.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
- Gao, M.-J., Lydiate, D. J., Li, X., Lui, H., Gjetvaj, B., Hegedus, D. D., & Rozwadowski, K. (2009). Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*, 21(1), 54-71.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.
- Green, P. J., Kay, S. A., & Chua, N.-H. (1987). Sequence- specific interactions of a pea nuclear factor with light- responsive elements upstream of the rbcS- 3A gene. *The EMBO Journal*, 6(9), 2543-2549.
- Hagedorn, D. J., & Inglis, D. (1986). Handbook of bean diseases. *Publication- University of Wisconsin, Cooperative Extension Service*.
- Halliwell B, Gutteridge J (1999) Free Radicals in Biology and Medicine (3rd Edn), Oxford University Press, Oxford, 936 pp
- Harveson, R. (2009). Common bacterial blight of dry beans in Nebraska. *University of Nebraska-Lincoln Extension. Institute of Agriculture and Natural Resources Extension Publication G*, 1956-1959.
- Harveson, R. M., & Schwartz, H. F. (2007). Bacterial diseases of dry edible beans in the central high plains. *Plant health progress*, 8(1), 35.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499.
- Hermíndez, J.A., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, J.J., Sevilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* 141: 241-251.

- Hrabak, E. M., Chan, C. W., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., & Sussman, M. R. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology*, 132(2), 666-680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167006/pdf/1320666.pdf>
- Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hurst, L. D. (2002). The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends in genetics: TIG*, 18(9), 486-486.
- Hussain, M., Malik, M., Farooq, M., Khan, M., Akram, M., & Saleem, M. (2009). Exogenous glycinebetaine and salicylic acid application improves water relations, allometry and quality of hybrid sunflower under water deficit conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(2), 98-109.
- Hwang, E.-W., Shin, S.-J., Yu, B.-K., Byun, M.-O., & Kwon, H.-B. (2011). miR171 family members are involved in drought response in *Solanum tuberosum*. *Journal of Plant Biology*, 54(1), 43-48.
- Isayenkov, S. (2012). Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. *Cytology and Genetics*, 46(5), 302-318.
- Jo, B.-S., & Choi, S. S. (2015). Introns: the functional benefits of introns in genomes. *Genomics & informatics*, 13(4), 112.
- 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.
- Kaplan-Levy, R. N., Brewer, P. B., Quon, T., & Smyth, D. R. (2012). The trihelix family of transcription factors—light, stress and development. *Trends in plant science*, 17(3), 163-171.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.
- Kiani, S. P., Talia, P., Maury, P., Grieu, P., Heinz, R., Perrault, A., Nishinakamasu, V., Hopp, E., Gentzbittel, L., & Paniego, N. (2007). Genetic analysis of plant water status and osmotic adjustment in recombinant inbred lines of sunflower under two water treatments. *Plant Science*, 172(4), 773-787.
- Kimenju, J., Karanja, N., & Macharia, I. (1999). Plant parasitic nematodes associated with common bean in Kenya and the effect of Meloidogyne infection on bean nodulation.

- Kirkham, M. (2005). Principles of soil and plant water relations Elsevier. *Burlington, MA*, 555.
- Kitakura, S., Fujita, T., Ueno, Y., Terakura, S., Wabiko, H., & Machida, Y. (2002). The protein encoded by oncogene 6b from *Agrobacterium tumefaciens* interacts with a nuclear protein of tobacco. *The Plant Cell*, 14(2), 451-463.
- Kong, X., Pan, J., Zhang, M., Xing, X., Zhou, Y., Liu, Y., Li, D., & Li, D. (2011). ZmMKK4, a novel group C mitogen- activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*, 34(8), 1291-1303.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kummerfeld, S. K., & Teichmann, S. A. (2006). DBD: a transcription factor prediction database. *Nucleic acids research*, 34(suppl_1), D74-D81.
- Kuźniak, E., & Urbanek, H. (2000). The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(2), 195-203.
- Le Gourrierc, J., Li, Y. F., & Zhou, D. X. (1999). Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT- 1 may be through interaction with TFIIA–TBP–TATA complex. *The Plant Journal*, 18(6), 663-668.
- Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127-128.
- Lewis, D. H. (1984). *Storage carbohydrates in vascular plants: distribution, physiology and metabolism* (Vol. 19). CUP Archive.
- Li, C., Zhou, A., & Sang, T. (2006). Rice domestication by reducing shattering. *science*, 311(5769), 1936-1939.
- Li, H., Huang, W., Liu, Z.-W., Wu, Z.-J., & Zhuang, J. (2017). Trihelix family transcription factors in tea plant (*Camellia sinensis*): identification, classification, and expression profiles response to abiotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(10), 1-11.
- Li, J., Chen, X., Zhou, X., Huang, H., Wu, D., Shao, J., Zhan, R., & Chen, L. (2021). Identification of trihelix transcription factors in *Pogostemon cablin* reveals PatGT-1 negatively regulates patchoulol biosynthesis. *Industrial Crops and Products*, 161, 113182.
- Li, J., Zhang, M., Sun, J., Mao, X., Wang, J., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Zhen, Z., & Zhao, H. (2019). Genome-wide characterization and identification of trihelix

- transcription factor and expression profiling in response to abiotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *International journal of molecular sciences*, 20(2), 251.
- Lichtenthaler, H. K. (1988). In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In *Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing* (pp. 129-142). Springer.
- Linnaeus, C. (1957). *Species Plantarum: A Facsimile of the First Edition 1753*. Adlard & Son for the Ray Society.
- Lipa, J. J. (2005). *Compendium of Bean Diseases*. 2nd Edition. APS Press – The American Phytopathological Society, St. Paul, USA. 109 pp. ISBN 0-89054-327-5. Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R., Forster, R.L. 2005 [journal article]. *Journal of Plant Protection Research*, 45(3), 180. <http://www.plantprotection.pl/Compendium-of-Bean-Diseases-2nd-Edition-APS-Press-The-American-Phytopathological,94340,0,2.html>
- Lisar, S., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. (2012). Causes, effects and responses. *Water stress*, 25(1), 33.
- Liu, H. (2008). H, Tian X, Li Y- J, Wu C- A, Zheng C- C. *Microarray- based analysis of stress- regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14, 836-843.
- Liu, W., Zhang, Y., Li, W., Lin, Y., Wang, C., Xu, R., & Zhang, L. (2020). Genome-wide characterization and expression analysis of soybean trihelix gene family. *PeerJ*, 8, e8753.
- Liu, X., Wu, D., Shan, T., Xu, S., Qin, R., Li, H., Negm, M., Wu, D., & Li, J. (2020). The trihelix transcription factor OsGTγ-2 is involved adaption to salt stress in rice. *Plant molecular biology*, 103(4), 545-560.
- Liu, X., Zhang, H., Ma, L., Wang, Z., & Wang, K. (2020). Genome-wide identification and expression profiling analysis of the Trihelix gene family under abiotic stresses in *Medicago truncatula*. *Genes*, 11(11), 1389.
- Ma, Z., Liu, M., Sun, W., Huang, L., Wu, Q., Bu, T., Li, C., & Chen, H. (2019). Genome-wide identification and expression analysis of the trihelix transcription factor family in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *BMC Plant Biology*, 19(1), 1-15.
- Magwanga, R. O., Kirungu, J. N., Lu, P., Yang, X., Dong, Q., Cai, X., Xu, Y., Wang, X., Zhou, Z., & Hou, Y. (2019). Genome wide identification of the trihelix transcription factors and overexpression of Gh_A05G2067 (GT- 2), a novel gene contributing to increased drought and salt stresses tolerance in cotton. *Physiologia Plantarum*, 167(3), 447-464.

- Martin, T. (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 231-264.
- McCouch, S. R. (2001). Genomics and synteny. *Plant physiology*, 125(1), 152-155.
- Mikami, K., Katagiri, T., Iuchi, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). A gene encoding phosphatidylinositol- 4- phosphate 5- kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 15(4), 563-568. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1046/j.1365-313X.1998.00227.x?download=true>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L., Tosatto, S. C., Paladin, L., Raj, S., & Richardson, L. J. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic acids research*, 49(D1), D412-D419.
- Mızrak, G. (2020). *FASULYE YETİŞTİRİCİLİĞİ*. Gürbüz Mızrak.
- Mo, H., Wang, L., Ma, S., Yu, D., Lu, L., Yang, Z., Yang, Z., & Li, F. (2019). Transcriptome profiling of *Gossypium arboreum* during fiber initiation and the genome-wide identification of trihelix transcription factors. *Gene*, 709, 36-47.
- Nadeau, J. H., & Taylor, B. A. (1984). Lengths of chromosomal segments conserved since divergence of man and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(3), 814-818.
- Nadeem, M. A., Habyarimana, E., Çiftçi, V., Nawaz, M. A., Karaköy, T., Comertpay, G., Shahid, M. Q., Hatipoğlu, R., Yeken, M. Z., & Ali, F. (2018). Characterization of genetic diversity in Turkish common bean gene pool using phenotypic and whole-genome DArTseq-generated silicoDArT marker information. *PloS one*, 13(10), e0205363. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6181364/pdf/pone.0205363.pdf>
- Nag, A., King, S., & Jack, T. (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22534-22539.
- Nagano, Y. (2000). Several features of the GT-factor trihelix domain resemble those of the Myb DNA-binding domain. *Plant physiology*, 124(2), 491-494.
- Nakashima, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant cell reports*, 32(7), 959-970.
- Ni, M., Dehesh, K., Tepperman, J. M., & Quail, P. H. (1996). GT-2: in vivo transcriptional activation activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity. *The Plant Cell*, 8(6), 1041-1059.

- Okçu, G., Kaya, M. D., & Atak, M. (2005). Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish journal of agriculture and forestry*, 29(4), 237-242.
- Osdaghi, E., Young, A. J., & Harveson, R. M. (2020). Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular plant pathology*, 21(5), 605-621. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7170776/pdf/MPP-21-605.pdf>
- Persley, D., Cooke, T., & House, S. (2010). *Diseases of vegetable crops in Australia*. Csiro Publishing.
- Pitzschke, A., Forzani, C., & Hirt, H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1757-1764.
- Rao, K., Raghavendra, A., & Reddy, K. (2006). *Physiology and molecular biology of stress tolerance*. Springer.
- Reiners, S., & Petzoldt, C. H. C. (2000). *Integrated crop and pest management guidelines for commercial vegetable production*.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O., & Samaha, R. (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *science*, 290(5499), 2105-2110.
- Rollins, J., Habte, E., Templer, S., Colby, T., Schmidt, J., & Von Korff, M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of experimental botany*, 64(11), 3201-3212. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733145/pdf/ert158.pdf>
- Sapeta, H., Costa, J. M., Lourenco, T., Maroco, J., van der Linde, P., & Oliveira, M. M. (2013). Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 76-84.
- Schroeder, J. I., Kwak, J. M., & Allen, G. J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410(6826), 327-330. <https://www.nature.com/articles/35066500.pdf>
- Seo, J., Jin, D., Choi, C.-H., & Lee, H. (2017). Integration of MicroRNA, mRNA, and protein expression data for the identification of cancer-related MicroRNAs. *PloS one*, 12(1), e0168412.
- Sequencing, H. (2011). CLC Genomics Workbench. In: Workbench.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., & Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt- tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to

salt- dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 487-494.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1034/j.1399-3054.2001.1120405.x?download=true>

- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Panneerselvam, R., & Shao, M.-A. (2009). Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants—biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. *Critical reviews in biotechnology*, 29(2), 131-151.
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Jaleel, C. A., & Zhao, C.-X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes rendus biologies*, 331(3), 215-225.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069108000048?via%3Dihub>
- Shao, H., Wang, H., & Tang, X. (2015). NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Frontiers in plant science*, 6, 902.
- Smoliak, S., Ditterline, R., Scheetz, J., Holzworth, L., Sims, J., Wiesner, J., Baldrige, D., & Tibke, G. (1990). Common bean. *Montana State University, Animal and Range Sciences Extension Service, Forage extension program, Bozeman, USA*.
- Song, A., Wu, D., Fan, Q., Tian, C., Chen, S., Guan, Z., Xin, J., Zhao, K., & Chen, F. (2016). Transcriptome-wide identification and expression profiling analysis of chrysanthemum trihelix transcription factors. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 198.
- Song, J. B., Gao, S., Wang, Y., Li, B. W., Zhang, Y. L., & Yang, Z. M. (2016). miR394 and its target gene LCR are involved in cold stress response in Arabidopsis. *Plant Gene*, 5, 56-64.
- Srivastava, A. K., Srivastava, S., Lokhande, V. H., D'Souza, S. F., & Suprasanna, P. (2015). Salt stress reveals differential antioxidant and energetics responses in glycophyte (*Brassica juncea* L.) and halophyte (*Sesuvium portulacastrum* L.). *Frontiers in Environmental Science*, 3, 19.
- Suyama, M., Torrents, D., & Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W609-W612.
- Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Jin, J., & Gao, G. (2020). PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic acids research*, 48(D1), D1104-D1113.

- Tong, Y., Huang, H., & Wang, Y. (2021). Genome-Wide Analysis of the Trihelix Gene Family and Their Response to Cold Stress in *Dendrobium officinale*. *Sustainability*, 13(5), 2826.
- Torres, M. A., & Dangl, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 397-403.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526605000750?via%3Dihub>
- Verma, S., Nizam, S., & Verma, P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 1* (pp. 25-49). Springer.
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current opinion in biotechnology*, 16(2), 123-132.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166905000236?via%3Dihub>
- Wang, C., Wang, Y., Pan, Q., Chen, S., Feng, C., Hai, J., & Li, H. (2019). Comparison of Trihelix transcription factors between wheat and *Brachypodium distachyon* at genome-wide. *BMC genomics*, 20(1), 1-14.
- Wang, Z., Liu, Q., Wang, H., Zhang, H., Xu, X., Li, C., & Yang, C. (2016). Comprehensive analysis of trihelix genes and their expression under biotic and abiotic stresses in *Populus trichocarpa*. *Scientific Reports*, 6(1), 1-15.
- Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Tripathi, P., Shah, T., Ramakrishna, C., Aglawe, S., & Mangrauthia, S. K. (2020). miRNA applications for engineering abiotic stress tolerance in plants. *Biologia*, 75(7), 1063-1081.
- Willmann, M. R., Mehalick, A. J., Packer, R. L., & Jenik, P. D. (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 155(4), 1871-1884.
- Wortmann, C., Brink, M., & Belay, G. (2006). *Phaseolus vulgaris* L.(common bean). *Record from PROTA4U*. Brink, M. & Belay, G.(Editors). *PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale)*, Wageningen, Netherlands.
- Xi, J., Qiu, Y., Du, L., & Poovaiah, B. (2012). Plant-specific trihelix transcription factor AtGT2L interacts with calcium/calmodulin and responds to cold and salt stresses. *Plant Science*, 185, 274-280.
- Xiao, J., Hu, R., Gu, T., Han, J., Qiu, D., Su, P., Feng, J., Chang, J., Yang, G., & He, G. (2019). Genome-wide identification and expression profiling of trihelix gene family under abiotic stresses in wheat. *BMC genomics*, 20(1), 1-14.

- Xie, Z.-M., Zou, H.-F., Lei, G., Wei, W., Zhou, Q.-Y., Niu, C.-F., Liao, Y., Tian, A.-G., Ma, B., & Zhang, W.-K. (2009). Soybean Trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis. *PLoS one*, 4(9), e6898.
- Xu, H., Shi, X., He, L., Guo, Y., Zang, D., Li, H., Zhang, W., & Wang, Y. (2018). Arabidopsis thaliana trihelix transcription factor AST1 mediates salt and osmotic stress tolerance by binding to a novel AGAG-box and some GT motifs. *Plant and Cell Physiology*, 59(5), 946-965.
- Yao, X., Chen, J., Zhou, J., Yu, H., Ge, C., Zhang, M., Gao, X., Dai, X., Yang, Z.-N., & Zhao, Y. (2019). An essential role for miRNA167 in maternal control of embryonic and seed development. *Plant physiology*, 180(1), 453-464.
- Yasmeen, E., Riaz, M., Sultan, S., Azeem, F., Abbas, A., Riaz, K., & Ali, M. A. (2016). Genome-wide analysis of trihelix transcription factor gene family in Arabidopsis thaliana. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53(2).
- Yu, C., Cai, X., Ye, Z., & Li, H. (2015). Genome-wide identification and expression profiling analysis of trihelix gene family in tomato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(4), 653-659.
- Yu, C., Song, L., Song, J., Ouyang, B., Guo, L., Shang, L., Wang, T., Li, H., Zhang, J., & Ye, Z. (2018). ShCIGT, a Trihelix family gene, mediates cold and drought tolerance by interacting with SnRK1 in tomato. *Plant Science*, 270, 140-149.
- Yusuf, D., Butland, S. L., Swanson, M. I., Bolotin, E., Ticoll, A., Cheung, W. A., Cindy Zhang, X. Y., Dickman, C. T., Fulton, D. L., & Lim, J. S. (2012). The transcription factor encyclopedia. *Genome biology*, 13(3), 1-25.
- Zlatev ZS, Lidon FC, Ramalho JC, Yordanov IT (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* 50, 389-394