

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***EXPANSİN* GEN AİLESİNİN FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE
BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU VE ABİYOTİK STRES İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve Nur ŞANLI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EXPANSİN GEN AİLESİNİN FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) BİTKİSİNDE BİYOİNFORMATİK KARAKTERİZASYONU VE ABİYOTİK STRES İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve Nur ŞANLI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker BÜYÜK

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi protein içeriği bakımından zengindir. Bundan dolayı insan beslenmesi için oldukça önemli bir kaynaktır. Ülkemizde tarımı ağırlıklı olarak İç Anadolu Bölgesinde yapılmaktadır. *Expansin*'ler ise bitkinin büyüüp gelişmesinde rol oynayan ve çeşitli hormon yollarında yer alan bir gen ailesidir. *Expansin* gen ailesinin *P. vulgaris* genomunda tanımlanması, karakterizasyonu ve biyoinformatik analizleri bu çalışma ile ilk kez gerçekleştirilmiştir. *Expansin* gen ailesi 4 alt aileye ayrılmaktadır. Bunlar α -*expansin* (EXPA), β -*expansin* (EXPB), α -benzeri *expansin* (EXLA) ve β -benzeri (EXLB) *expansin*dir. Yapılan bu çalışmada *P. vulgaris* 'e ait 30 adet *Expansin* (*PvEXP*) geni tanımlanarak isimlendirilmiştir. Bu üyelerin 23 tanesi EXPA, 4 tanesi EXPB ve 1 tane EXLA ailesine aittir. EXLB alt ailesine ise *P. vulgaris* genomunda rastlanılmamıştır. *PvEXP* genlerinin, 11 fasulye kromozomunun 10'unda rastgele bir şekilde lokalize olduğu tespit edilmiştir. Protein uzunlukları 245 aa ila 275 aa arasında, pH değerleri ise 4.81 ila 9.68 arasında değişmektedir ve gen üyeleri çoğunlukla bazik özellik göstermektedir. *PvEXP* genlerinin promotor bölge analizi ve kodladıkları proteinlerin 3 boyutlu yapıları analiz edilmiştir. *Phaseolus vulgaris* L. ile *Arabidopsis thaliana* arasında toplam 31 tane, *Phaseolus vulgaris* L. ile *Glycine max* L. arasında ise toplam 71 tane ortolog çift saptanmıştır. Gen üyelerinin ekzon-intron, motif yapıları, domainleri ve ilişkili olduğu miRNA'lar tespit edilmiştir. Yapılan tez çalışması sonucunda bazı *PvEXP* genlerinin kuraklık stresine karşı mRNA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı yanıtlar verdikleri saptanmıştır ve bu genlerin bitkide kuraklık stresine verilen cevapta rol oynayabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak abiyotik stres yollarında önemi bilinen *PvEXP* genleri bu çalışma ile hem ekonomik hem de tarımsal açıdan oldukça büyük bir öneme sahip *P. vulgaris* üzerinde ilk kez incelenmiştir. Elde edilen sonuçların ileride gerçekleştirilecek çeşit geliştirme çalışmalarına da rehber olabileceği düşünülmektedir.

Eylül 2023, 90 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Abiyotik stres, Biyoinformatik, *Expansin*, Gen ifade profili, *Phaseolus vulgaris* L., RT-qPCR

ABSTRACT

MSc Thesis

BIOINFORMATIC CHARACTERIZATION OF *EXPANSIN* GENE FAMILY IN COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) AND ITS RELATIONSHIP WITH ABIOTIC STRESS

Merve Nur ŞANLI

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

Supervisor: Assoc. Prof. İlker BÜYÜK

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plant is rich in protein content. It is therefore a crucial resource for human nutrition. In our country, agriculture is mainly performed in the Central Anatolia Region. *Expansins* are a family of genes that are involved in numerous hormone pathways as well as plant growth and development. Identification, characterization and bioinformatics analyzes of the *Expansin* gene family in the *P. vulgaris* genome were performed for the first time with this study. *Expansin* gene family is divided into 4 subfamilies. These are α -expansin (EXPA), β -expansin (EXPB), α -like expansin (EXLA) and β -like (EXLB) expansin subfamilies.

In this study, 30 *Expansin* (*PvEXP*) genes belonging to *P. vulgaris* were identified and named. 23 of these members were found to belong to EXPA, 4 to EXPB and 1 to EXLA subfamily. The EXLB subfamily was not found in the *P. vulgaris* genome. *PvEXP* genes were found to be randomly localized in 10 of 11 *P. vulgaris* chromosomes. Protein lengths ranged from 245 aa to 275 aa, pH values ranged from 4.81 to 9.68, and were mostly found to show basic properties. The promoter region analysis of *PvEXP* genes and the 3D structures of the proteins they encode were analyzed. A total of 31 orthologous pairs were identified between *Phaseolus vulgaris* L. and *Arabidopsis thaliana*, and a total of 71 between *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. Exon-intron/motif structures, protein domains and targeting miRNAs of the *PvEXP* members were determined. As a result of this study, it was determined that some *PvEXP* genes gave statistically significant responses to drought stress at the mRNA level, and it was thought that these genes might play a role in the plant's response to drought stress. As a result, *PvEXP* genes, which are known to be important in abiotic stress pathways, were investigated for the first time in *P. vulgaris*, which has a great importance both economically and agriculturally. It is proposed that the results obtained could also guide the cultivar development studies to be carried out in the future.

September 2023, 90 Pages

Key Words: Abiotic stress, Bioinformatics, *Expansin*, Gene expression profile, *Phaseolus vulgaris* L., RT-qPCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, desteğini hiç esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sayın tez danışmanım Doç. Dr. İlker Büyük'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Her zaman değerli görüş ve önerileriyle destek olan ve her türlü imkanı sağlayan Sayın Prof. Dr. E. Sümer. ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı),

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Aybüke OKAY ve Onur Altay AKDAŞ'a,

Tüm hayatım boyunca sevgisini ve şefkatini her zaman hissettiğim sevgili annem Saadet ÇAKMAK'a ve her zaman yanımda olduğunu bildiğim canım babam Veli ÇAKMAK'a,

Her koşulda beni destekleyen ve yüreklendiren sevgili eşim Berkcan Şanlı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK/BİDEB 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı bilimin ve bilim insanının destekçisi olan TÜBİTAK/BİDEB'e teşekkür ederim.

Merve Nur ŞANLI
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Bitkisi.....	2
1.1.1 Fasulye Bitkisinin tarihçesi	3
1.1.2 Fasulye Bitkisinin taksonomik hiyerarşisi ve sınıflandırılması.....	4
1.1.3 Fasulye Bitkisinin besin değerleri.....	4
1.1.3.1 Karbonhidrat.....	5
1.1.3.2 Protein	5
1.1.3.3 Lipit	6
1.1.3.4 Vitamin ve mineraller	6
1.1.3.5 Fenolik bileşikler	6
1.1.4 Fasulye bitkisinin yetiştirilme bölgeleri ve koşulları	8
1.1.5 Fasulye bitkisinin üretimi ve ekonomik önemi.....	8
1.1.6 Fasulyede görülen hastalıklar	11
1.1.6.1 Bakteriyel hastalıklar.....	11
1.1.6.2 Fungal hastalıklar	12
1.1.6.3 Viral hastalıklar	13
1.2 Bitkilerde Stres.....	13
1.2.1 Abiyotik stres.....	14
1.2.1.1 Tuz stresi.....	14
1.2.1.2 Soğuk stresi.....	15
1.2.1.3 Sıcaklık stresi.....	16
1.2.1.4 Kuraklık stresi.....	16
1.3 <i>Expansin</i> Gen Ailesi	22
1.3.1 Mikrobiyal <i>Expansin</i> ler	23

1.3.2 <i>Expansin</i> genlerinin isimlendirilmesi	24
1.3.2.1 <i>Expansin</i> gen ailesi alt aileleri.....	24
1.3.3 <i>Expansin</i> lerin bitki büyümesi ve gelişmesine etkileri	25
1.3.3.1 Çimlenme üzerine etkileri	26
1.3.3.2 Kök uzaması üzerine etkileri.....	26
1.3.3.3 Yaprak büyümesi üzerine etkileri	27
1.3.3.4 Üreme üzerine etkileri	27
1.3.3.5 Stres Toleransı.....	27
1.3.4 Bitki hormonları ve <i>Expansin</i> gen ailesi ile ilişkileri.....	28
1.3.5 <i>Expansin</i> genlerinin bitkilerde ifadesinin düzenlenmesi	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1 Fasulye (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) Bitkisinde <i>Expansin</i> Proteinlerinin Tanımlanması	34
3.2 <i>Expansin</i> Ailesi Filogenetik Analizleri	36
3.3 <i>Expansin</i> Üyelerinin Domain, Motif ve Gen Yapısı Analizleri	37
3.4 PvEXP Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi	40
3.5 Fasulyede <i>Expansin</i> Gen Ailesi Sinteni Analizi ve Gen Duplikasyonları.....	40
3.6 Fasulyede Tanımlanan <i>Expansin</i> Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi.....	42
3.7 <i>Expansin</i> Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri.....	44
3.8 MikroRNA'ların (miRNA) Tespiti ve Hedef <i>Expansin</i> Genlerin Belirlenmesi	45
3.9 <i>Expansin</i> Genlerinin <i>In Siliko</i> Gen İfade Analizi.....	46
3.10 Fasulye Bitkisinde Büyüme Koşulları ve Stres Uygulanması	46
3.11 Total RNA İzolasyonu	47
3.12 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	48
3.13 Primer Dizaynı	49
3.14 Real-Time PCR.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1 <i>Expansin</i> Genlerinin Biyoinformatik Analizleri	51
4.2 Fasulyede <i>Expansin</i> Genlerinin Kromozomal Lokasyonu	54
4.3 Fasulyede <i>Expansin</i> Genlerinin Türler Arası Filogenetik Analizleri.....	54
4.4 Fasulyede <i>Expansin</i> Proteinlerinin Motif, Domain ve Ekzon-İntron Analizleri.....	55

4.5 Fasulyede Expansin Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemeleri	57
4.6 Fasulyede <i>Expansin</i> Gen Ailesi Gen Duplikasyonları ve Sinteni Analizi	58
4.7 Fasulyede <i>Expansin</i> Genlerine Ait Promotor Bölge Analizi	62
4.8 Fasulyede <i>Expansin</i> Genlerine Ait miRNA Analizi	67
4.9 Fasulyede <i>Expansin</i> Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri.....	67
4.10 Fasulyede <i>Expansin</i> Genlerinin Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri	68
4.11 <i>Expansin</i> Genlerinin Kuraklık Stresi ile İfade Seviyeleri Değişimi	69
4.12 Total RNA İzolasyonu	70
4.13 cDNA İzolasyonu	71
4.14 Kuraklık Stresi Altında Fasulye Expansin Genlerinin mRNA Düzeyleri	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	74
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ.....	90

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
aa	Aminoasit
ACT	Aktin
cDNA	Komplementer DNA
Ca	Kalsiyum
Cu	Bakır
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	Demir
gr	Gram
ha	Hektar
I	İyot
K	Potasyum
Ka	Homolog Olmayan Değişim Oranı
kcal	Kilokalori
Ks	Homolog Değişim Oranı
M	Molar
miRNA	MikroRNA
mm	milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
mRNA	Haberçi RNA
P	Fosfor
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik asit
S	Kükürt
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
Zn	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Fasulye bitkisinin morfolojisi	3
Şekil 1.2 Fasulye bitkisinin iki farklı yerde paralel olarak evcilleştirilmesi.....	4
Şekil 1.3 Ülkelere göre fasulye ekim alanları (bin ha).....	9
Şekil 1.4 Ülkelere göre fasulye üretimi (bin ton).....	9
Şekil 1.5 Türkiye'de fasulye ekim alanları (ha)	10
Şekil 1.6 Türkiye'de fasulye üretimi (ton)	10
Şekil 1.7 1901-2008 dönemi için hesaplanan dünya kuraklık şiddeti dağılım haritası...	17
Şekil 3.1 NCBI blast veritabanı arayüzü.....	34
Şekil 3.2 ‘Expasy Decrease Redundancy’ programı.....	35
Şekil 3.3 Phytozome veri tabanı.....	36
Şekil 3.4 Expasy ProtParam aracı	36
Şekil 3.5 MEGA 7.0 Programı	37
Şekil 3.6 iTOL veri tabanı.....	37
Şekil 4.1 PvEXP genlerinin kromozomal lokasyonları.....	54
Şekil 4.2 PvEXP genlerinin filogenetik ağacı.....	55
Şekil 4.3 PvEXP üyelerinin motif, domain ile ekzon ve intron yapıları.....	56
Şekil 4.4 PvEXP proteinlerinin 3 boyutlu yapıları.....	57
Şekil 4.5 PvEXP genlerinin segmental ve tandem duplikasyonları.....	58
Şekil 4.6 PvEXP genlerinin Arabidopsis thaliana ve Glycine max arasındaki sinteni analizi.....	59
Şekil 4.7 PvEXP genleri promotor bölgelerinde bulunan cis-düzenleyici elementler....	63
Şekil 4.8 PvEXP genlerinin miRNA analizleri	67
Şekil 4.9 PvEXP proteinlerinin hücre içi yerleşimleri	68
Şekil 4.10 Genlerinin doku-spesifik mRNA seviyeleri.....	69
Şekil 4.11 PvEXP genlerinin in siliko ifade analizi	70
Şekil 4.12 Zülbiye bitki çeşidinin kuraklık stresi altında gen ifade seviyesi	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin hiyerarşik olarak sınıflandırılması.....	4
Çizelge 1.2 Fasulyenin besinsel bileşimi	7
Çizelge 1.3 100 g taze fasulyenin besin değerleri (https://fdc.nal.usda.gov/).....	7
Çizelge 1.4 Çeşitli stres tiplerinden etkilenen araziler ve yüzdeleri	14
Çizelge 1.5 Kuraklık stresinin bitki üzerine etki çeşitleri	18
Çizelge 1.6 Kuraklık stresinin çeşitli bitki türleri üzerine etkisi.....	22
Çizelge 1.7 Çeşitli bitki türlerinde bulunan Expansin gen ailesinin üye sayıları.....	23
Çizelge 1.8 Expansin gen ailesinin isimlendirilmesi	24
Çizelge 1.9 Fitohormonlar ve görevleri	28
Çizelge 3.1 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri.....	49
Çizelge 3.2 cDNA sentezindeki reaksiyon koşulları.....	49
Çizelge 3.3 PvEXP genleri için dizayn edilen primerler	49
Çizelge 3.4 RT-qPCR için reaksiyon bileşenleri	50
Çizelge 3.5 RT-qPCR için reaksiyon koşulları	50
Çizelge 4.1 PvEXP genleri kataloğu.....	52
Çizelge 4.2 PvEXP proteinlerinin motif bölgeleri dizileri.....	56
Çizelge 4.3 PvEXP genlerinde tespit edilen duplikasyonlar	59
Çizelge 4.4 P. vulgaris ve G. max'de bulunan PvEXP gen duplikasyonları	60
Çizelge 4.5 P. vulgaris ve A.thaliana'da bulunan PvEXP gen duplikasyonları	62
Çizelge 4.6 Gelişim ile ilgili cis- düzenleyici elementler	64
Çizelge 4.7 Çevresel stres ile ilgili cis- düzenleyici elementler.....	64
Çizelge 4.8 Hormon ile ilgili cis- düzenleyici elementler	64
Çizelge 4.9 Işığa duyarlı cis-düzenleyici elementler	65
Çizelge 4.10 Promotor ile ilgili cis-düzenleyici elementler.....	65
Çizelge 4.11 Bölge bağlama ile ilgili cis-düzenleyici elementler	65
Çizelge 4.12 Diğer elementler	66
Çizelge 4.13 PvEXP genlerinde gözlenen cis elementleri	66
Çizelge 4.14 İzole edilen RNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (Kuraklık)	71
Çizelge 4.15 İzole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (Kuraklık)	71

1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi, baklagiller (*Fabaceae*) familyasının *Phaseolus* cinsine ait olan tek yıllık otsu bir bitkidir. Kültür fasulyelerinin yaklaşık %90'ını *Phaseolus* cinsi *Phaseolus vulgaris* L. türleri oluşturmaktadır (Ekbic ve Hasancaoğlu 2019) ve bu fasulye tipi keşfedilen en eski fasulye türlerinden biridir (Mansouri, Heleili vd. 2019). *P. vulgaris*, $2n=22$ kromozoma sahiptir ve haploid genom boyutu 587 Mbp ile 637 Mbp arasında olduğu tahmin edilen diploid bir bitki türüdür. Kromozomları oldukça küçüktür (yaklaşık 2 μ m) ve benzer morfolojilere sahiptir (Bellucci, Bitocchi vd. 2014). Bu durum kromozomların klasik yöntemlerle ayrıntılı şekilde sitogenetik karakterizasyonunu engellemektedir (Fonsêca, Ferreira vd. 2010).

Nutrasötik bakış açısından baklagiller, ucuz ve aynı zamanda yüksek kaliteli protein kaynaklarıdır. Fasulye, başta B grubu vitaminleri olmak üzere vitaminler, antioksidanlar, çoklu doymamış yağ asitleri, makromineraler (S, K, P, Ca, Mg) ve mikromineraler (Fe, Zn, Cu, I, Mn) bakımından zengindir. Bu mineraller insan sağlığı için oldukça önemlidir. Örneğin kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve Tip 2 diyabet gibi çeşitli hastalıklar ile savaşmak için makro besinlere ihtiyaç duyulur (Jan, Rather vd. 2021). Fasulye'nin (*Phaseolus vulgaris* L.), beslenme açısından önemli baklagillerden biri olması, fasulyeye olan talebin nüfusa bağlı olarak artmasına neden olmaktadır. Fasulye, bundan dolayı dünya çapında yılda yaklaşık 12 milyon metrik ton üretime sahiptir. Evcilleştirilmiş beş *Phaseolus* türü arasında *P. vulgaris*, özellikle daha az gelişmiş ve sık et tüketmeyen ülkelerde zengin bir protein, vitamin, mineral ve lif kaynağıdır (Bellucci, Bitocchi vd. 2014).

Expansin 'ler bitki hücre duvarının gevşetilmesini ve uzamasını sağlayan proteinlerdir ve filogenetik olarak dört alt aileye ayrılmaktadır (Kende, Bradford vd. 2004). Yapılan araştırmalar *Expansin* 'lerin; hücre büyümesi, meyve olgunlaşması, absisyon, çimlenme, stres tepkisi vb. durumlardaki önemini göstermektedir (Choi, Cho vd. 2006). *Expansin* 'ler ilk olarak salatalık (*Cucumis sativus*) bitkisinde ve ardından birçok bitki türünde tanımlanmıştır. Açık tohumlu ve kapalı tohumlu bitkiler arasında hem monokotlarda hem de dikotlarda yüksek oranda korunmuş bir gen ailesidir. Karakterize edilen *Expansin*

genlerinin çoğunun, doku büyümesi sırasında hücre genişlemesine neden olduğu öne sürülmüştür ve bu durum, *Arabidopsis*'te spesifik bir *Expansin* geninin ekspresyonunun manipüle edilmesiyle doğrulanmıştır (Chen, Dahal vd. 2001).

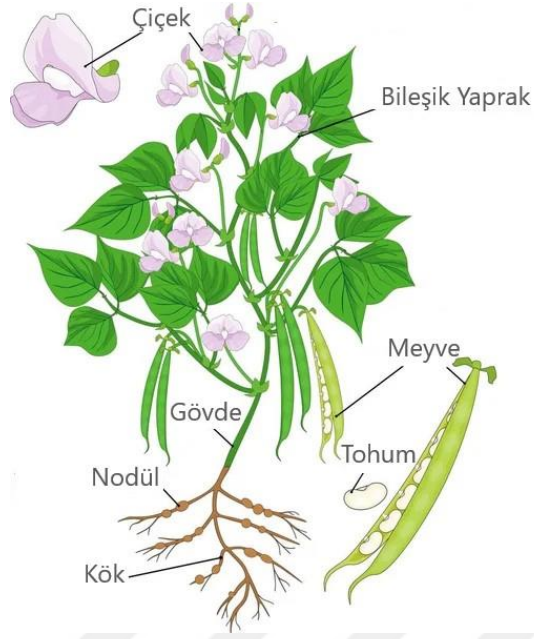
Kuraklık, yüksek sıcaklık, tuzluluk ve oksidatif stres gibi abiyotik stresler tarım için ciddi tehdit oluşturmaktadır (Mansouri, Heleili vd. 2019). Fasulye bitkisi ve diğer bitkiler de iklim değişikliklerinden olumsuz bir şekilde etkilenmektedir (Bellucci, Bitocchi vd. 2014).

Bu tez çalışmasında, fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisindeki *Expansin* genlerinin biyoinformatik karakterizasyonu, kuraklık stresi altında *in siliko* ifade profilleri ve mRNA ifade seviyelerinin hem RNAseq hem de RT-qPCR ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.1 Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisi

Baklagiller, tüm bitki türlerinin yaklaşık %5'ini oluşturan *Fabaceae* ailesinin üyeleridir. Baklagillerin önemi son yıllarda oldukça artmıştır. Bunun nedeni; nitrojen gübreleri gibi kimyasalların uygulanmasını azaltması ve hayvansal gıdalara göre daha az olumsuz çevresel etkiye sahip olmalarıdır (Vasconcelos, Grusak vd. 2020). Önemli bir baklagil türü olan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çoğu kıtada yaygın olarak yetiştirilmektedir. Üretimi 52° kuzey ila 32° güney enlemleri arasındadır. ABD ve Avrupa'da deniz seviyesine yakın yerlerden, 3000 m'den daha yüksek rakımlara kadar uzanmaktadır.

Fasulye, tek yıllık ve ağırlıklı olarak kendi kendine tozlaşan bir baklagil türüdür (Graham ve Ranalli 1997). Olgunluk dönemine göre tüysüz ile tüylü gövdelere sahip olabilen, sürünen veya dik şekilde dallanma gösterebilen bir bitkidir (Debouck, Hidalgo H vd. 1986). Boyu yaklaşık 2 metreye kadar uzamaktadır. Yaprakçıkları üçgen şeklindedir ve genellikle yaklaşık 4 mm uzunluğunda olmaktadır. Yapraklar sıralı, bileşik ve üçlü şekilde gelişim gösterebilmektedir. Böbreğe benzer şekildeki tohumları beyaz, kırmızı, kahverengi, gri, siyah ve alacalı gibi birden fazla renkte bulunabilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Fasulye bitkisinin morfolojisi

1.1.1 Fasulye bitkisinin tarihçesi

Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) Carl Linnaeus tarafından ilk kez 1753 yılında *Phaseolus vulgaris* ismi ile tanımlanmıştır (Brücher 1988). *P. vulgaris* ilk olarak Mezoamerikan bölgeden köken almaktadır. Yayılmasından bu yana kuzey Meksika'dan kuzeybatı Arjantin'e dağılmıştır ve bu coğrafi bölgelerde iki büyük gen havuzunun oluşmasına yol açmıştır (Şekil 1.2). Fasulye üretiminde önde gelen ülkeler, beklenildiği üzere fasulyenin dörtte üçünün yetiştirildiği Latin Amerika ve Afrika'dır (Bellucci, Bitocchi vd. 2014). Fasulye Orta Amerika'da, Meksika olarak bilinen bölgede ve And Dağları'nda bağımsız olarak evcilleştirildiğinden, morfolojik değişiklikler iki kez meydana gelmiştir (Gaut 2014). Fasulyenin evcilleştirilmiş iki ana gen havuzunun bulunduğu dair kanıtlar; morfolojik, agronomik, adaptasyon özellikleri ve moleküler belirteçler üzerinde yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Fasulye, en az 7000 yıllık bir süre boyunca evcilleştirilerek önemli bir baklagil haline gelmiştir (Piergiovanni ve Lioi 2010).



Şekil 1.2 Fasulye bitkisinin iki farklı yerde paralel olarak evcilleştirilmesi

1.1.2 Fasulye bitkisinin taksonomik hiyerarşisi ve sınıflandırılması

Fasulyenin bilimsel adı *Phaseolus vulgaris* L.'dir ve baklagil ailesinin bir üyesidir. Taksonomik hiyerarşisi aşağıdaki tabloda verilmiştir (OCDE 2016).

Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin hiyerarşik olarak sınıflandırılması

Üst Alem	Eukaryota
Âlem	Plantae
Klad	Tracheophytes
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Fabales
Aile	Fabaceae
Cins	<i>Phaseolus</i> L.
Tür	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Binomial Adı	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

1.1.3 Fasulye bitkisinin besin değerleri

Fasulye, dünyanın çeşitli yerlerinde farklı şekillerde tüketilmektedir ve yüzyıllar boyunca temel bir gıda maddesi olmuştur. Günümüzde bu gibi türlerin tarımsal sürdürülebilirliği

iyileştirilerek uluslararası gıda güvenliğinin önü açılmaktadır (Rathna Priya ve Manickavasagan 2020).

Besin olarak kullanılan yaklaşık 20 baklagil türü vardır. *Phaseolus vulgaris*'in çeşitleri olan fasulyeler de dünyanın her yerinde besleyici ve ekonomik açıdan önemlidir. Bu türler; karbonhidrat, protein, lif, mineral ve vitamin gibi besinler sağlamanın yanı sıra sağlık açısından potansiyel faydaları olan zengin çeşitlilikte polifenolik bileşikler de içermektedir (Çizilge 1.2, Çizelge 1.3). Genel olarak bu gibi baklagiller, temel bir besin kaynağı olarak kabul edilir ve protein bakımından yetersiz beslenmenin önemli bir sorun olduğu üçüncü dünya ülkelerinde tüketimi oldukça önem arz etmektedir. Fasulyenin tüketilmesi; kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve diyabet gibi birçok hastalığın tedavisi ile ilişkilendirilmektedir (Hayat, Ahmad vd. 2014).

1.1.3.1 Karbonhidrat

Karbonhidratlar, fasulyede kuru maddenin %50-60'ını oluşturan ana bileşenlerden biridir. Tüm karbonhidratlar arasında nişasta, fasulyelerde farklı şekil ve boyutlarda bulunan ana karbonhidrattır. Bunun dışında az miktarda monosakkaritler, disakkaritler ve oligosakkaritler de fasulye çeşidine bağlı olarak farklı oranlarda bulunur (Rathna Priya ve Manickavasagan 2020). Amiloz ve amilopektin, fasulyede bulunan iki ana nişasta şeklidir. Fasulye ayrıca; selüloz, hemiselüloz, pektin, oligosakkarit ve ligninler gibi sağlığa olumlu etkileri olan diyet lifi içerir. Bu liflerin fasulyede bulunması, sindirim sürecinde karbonhidratların yavaş salınımını kontrol etmeye yardımcı olur (Hayat, Ahmad vd. 2014).

1.1.3.2 Protein

Fasulye, yüksek bir protein içeriğine sahiptir ve bu nedenle diyet lifi ve bazı karbonhidratlara ek olarak daha fazla enerji sağlamaktadır. Fasulyenin protein içeriği ortalama %21 ila %25 arasında değişmektedir (Rathna Priya ve Manickavasagan 2020). Tahıllarla birlikte protein açısından zengin fasulye kullanmak, protein bakımından

yetersiz beslenme sorunuyla mücadele etmek için oldukça iyi bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu tür tamamlayıcı gıda stratejileri, Latin Amerika, Doğu Afrika, Brezilya ve Asya'nın birçok yerinde uygulanmaktadır (Hayat, Ahmad vd. 2014).

1.1.3.3 Lipit

Fasulyedeki lipit içeriği oldukça düşüktür ve genellikle yaklaşık %2'dir. Bu %2'lik kısımda fosfolipitler ve triaçilgliseroller bulunmaktadır. Az miktarda diaçilgliserol de mevcut olabilmektedir. Fasulye ayrıca oleik ve linoleik asitler olmak üzere toplam yağ asitlerinin % 61'ini içeren temel bir doymamış yağ asidi kaynağı olarak kabul edilir (Hayat, Ahmad vd. 2014). Yağ bileşimi, fasulye çeşidine ve büyüme koşullarına bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Kolesterol içermezler ve bu da fasulyeleri kronik hastalık risklerini azaltmak için oldukça önemli kılmaktadır (Rathna Priya ve Manickavasagan 2020).

1.1.3.4 Vitamin ve mineraller

Fasulye, mineraller ve vitaminler gibi temel bir mikro besin kaynağıdır ve mikro besin kaynağı bakımından tahıllardan daha üstün kabul edilmektedir. Fasulye aynı zamanda diğer baklagillere göre yüksek mineral içeriğine de sahiptir; önemli bir demir, çinko, bakır, fosfor ve alüminyum kaynağıdır (Hayat, Ahmad vd. 2014). İçeriğinde bulunan Tiamin, riboflavin, niasin ve B6 vitaminleri fasulyenin besin değerini oldukça yükseltmektedir (Reyes-Moreno, Paredes-López vd. 1993).

1.1.3.5 Fenolik bileşikler

Fasulyedeki fenolik bileşikler; antosiyaninler, flavonol, proantosiyanidinler, tanenler, glikozitler gibi çeşitli flavonoidlerin yanı sıra çok çeşitli fenolik asitleri içerebilmektedir. Antosiyaninler sadece siyah ve mavi-mor renkli fasulyelerde karakterize edilebilirken, proantosiyanidinler hemen hemen her fasulye çeşidinde bulunmaktadır. Bu fenolik bileşiklerin büyük miktarları tohumun kabuğunda bulunurken küçük miktarlarda

kotiledonlar da bu nutrasötik bileşenleri de içerebilmektedirler. Toplam fenolik seviyesi hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenir ve tohum kabuğunun renginden sorumludur (Hayat, Ahmad vd. 2014).

Çizelge 1.2 Fasulyenin besinsel bileşimi

Fasulye Çeşitleri	Protein	Karbonhidrat	Yağ
Black turtle bean (Siyah fasulye)	%25.6–%25.93	%67.83–%68.09	%1.52–%1.59
Red kidney bean (Barbunya)	%25.3	%53.2	%2
White kidney bean (Kuru fasulye)	%25.63	%59.62	%1.44
Navy bean (Beyaz börülce)	%18.15	%54.30	%2.63
Cranberry bean (Alacalı fasulye)	%24.04	%39.45	%1.3
Pinto bean (Benekli fasulye)	%18.0	%59.7	%14.4

Çizelge 1.3 100 g taze fasulyenin besin değerleri

Bileşen	Miktar	Birim
Su	90.3	g
Enerji	31	kcal
Protein	1.83	g
Lipit	0.22	g
Karbonhidrat	6.97	g
Lif	2.7	g
Toplam Şeker	3.26	g
Kalsiyum	37	mg
Demir	1.03	mg
Magnezyum	25	mg
Fosfor	38	mg
Potasyum	211	mg
Sodyum	6	mg
Çinko	0.24	mg
C vitamini	12.2	mg
Tiamin	0.082	mg
Riboflavin	0.104	mg
Niasin	0.734	mg
Folat	33	µg

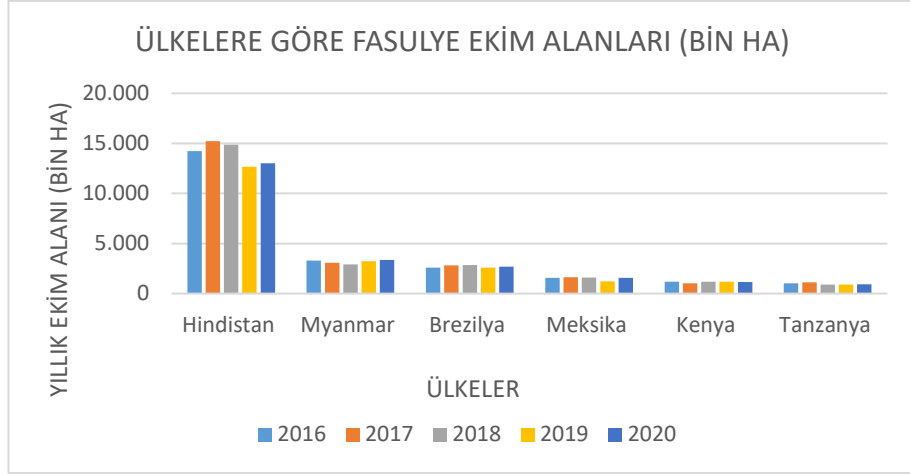
1.1.4 Fasulye bitkisinin yetiştirilme bölgeleri ve koşulları

Fasulye aslen yeni dünya mahsulüdür ancak şimdi tüm büyük kıtalarda yaygın olarak yetiştirilmektedir. Üretimi, ABD ve Avrupa’da deniz seviyesine yakın yerlerden Güney Amerika’daki And Dağları’nda kadar uzanmaktadır (Graham ve Ranalli 1997).

Türkiye’de ise fasulye üretiminin büyük bir kısmı 1 ila 10 hektar arasında eğimli arazilerde ve düşük ila yüksek verimli arazilerde gerçekleştirilmektedir. Fasulye sadece mikro iklim olarak adlandırılan serin ve nemli bir iklime sahip olan 1 veya 1,5 ha civarında yetiştirilir, sıcak ve kurak görülen bölgelerde yetiştirilememektedir. Örneğin; Türkiye’nin Güneydoğusu çok sıcak ve kurak bir bölgedir. Bu bölgede sıcaklığın yüksek ve buharlaşmanın fazla olması nedeniyle kuru fasulye uzun yıllardır yetiştirilememektedir. Son 30 yılda bölgede sulama projeleri ile mısır ve pamuk ekimi yaygınlaşmış, bu durum bölgenin bağıl nem oranını artırmıştır. Artan sulama imkanları ve yüksek nem sayesinde fasulye üretimi mümkün hale gelmiştir (Omae, Kumar vd. 2012).

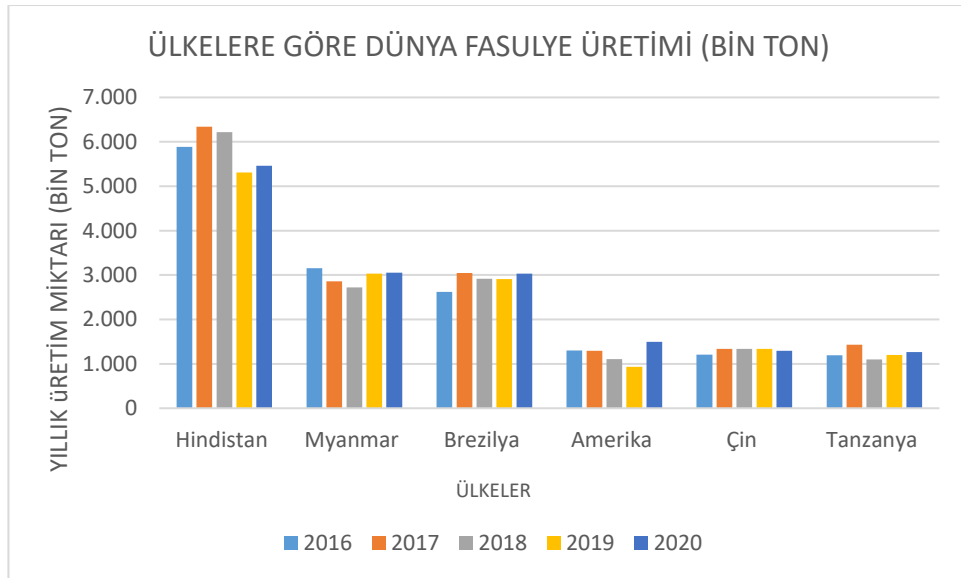
1.1.5 Fasulye bitkisinin üretimi ve ekonomik önemi

Tarım endüstrisinin karşılaştığı en büyük zorluklardan biri, sürekli artan nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için sürdürülebilir ve çevre dostu sistemlerin geliştirilmesidir (Szparaga, Kuboń vd. 2019). Fasulye ise yaklaşık 8000 yıl önce Amerika’da evcilleştirilmiştir ve bugün dünya çapında temel bir gıda maddesi olarak görülmektedir. FAO verilerine bakıldığında (FAO, 2022), en fazla fasulye ekim alanına sahip ülke Hindistan olarak görülmektedir. Hindistan, 2018 yılında dünyadaki toplam üretim alanlarının % 40.2, 2019 yılında 36.8, 2020 yılında 36.6’sını kapsamaktadır. En fazla ekim alanına sahip 2. Ülke olan Myanmar tüm yıllara bakıldığında ekim alanlarının yaklaşık %8’ini kapsamaktadır.



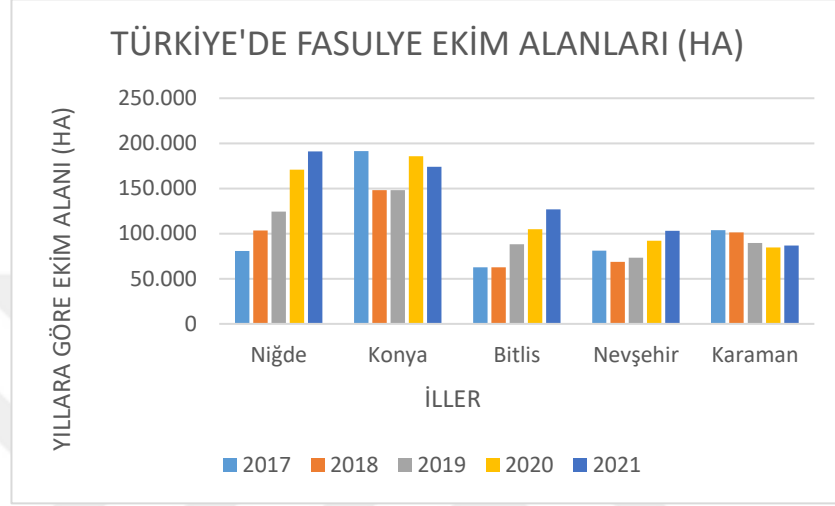
Şekil 1.3 Ülkelere göre fasulye ekim alanları (bin ha)

Fasulye üretiminde benzer şekilde Hindistan başta gelmektedir. En fazla üretimi 6340 bin tonla 2017 yılında yapmıştır. Hindistan'ı Myanmar, Brezilya, Amerika, Çin ve Tanzanya takip etmektedir. 2020 yılından itibaren 5,5 milyon tonluk üretim ile Hindistan ilk sırada yer almaktadır. Hindistan bu üretimle toplam dünya kuru fasulye üretiminin %18,9'unu karşılamaktadır. Hindistan'ı Myanmar yaklaşık 3.1 milyon ton ikinci, Brezilya ise 3 milyon ton ile üçüncü sırada takip etmektedir.



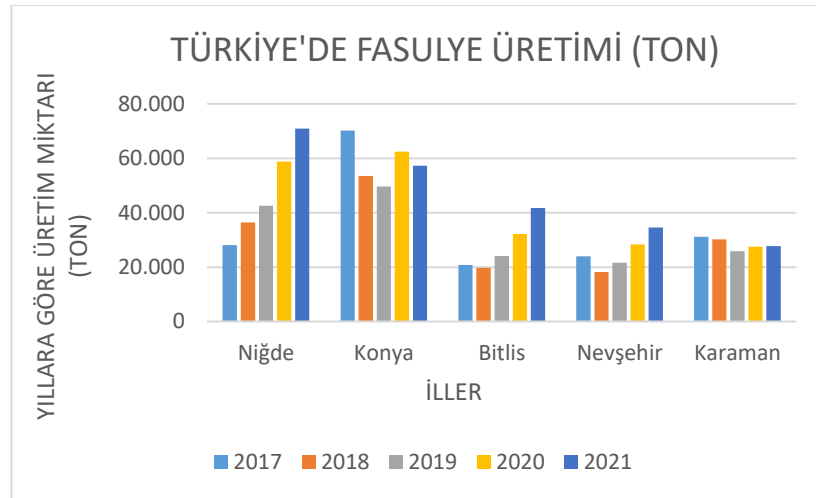
Şekil 1.4 Ülkelere göre fasulye üretimi (bin ton)

TÜİK verilerine göre (TÜİK, 2020); Türkiye’de en fazla ekim alanına sahip il Niğde olarak görülmektedir. Niğde yaklaşık %17’lik oran ile ekim alanları arasında ilk sırada yer alırken, Niğde’yi %16.1 oran ile Konya, %11.8 oran ile Bitlis ve %9.6 oran ile Nevşehir illeri takip etmektedir.



Şekil 1.5 Türkiye’de fasulye ekim alanları (ha)

Niğde ili, 2021 yılı itibariyle yaklaşık 305 bin ton olan kuru fasulye üretiminin ortalama 71 bin tonunu karşılayarak kuru fasulye üretiminde birinci sırada yer alırken, Konya 57 bin ton ile ikinci, Bitlis 42 bin ton ile üçüncü sırada yer almaktadır.



Şekil 1.6 Türkiye’de fasulye üretimi (ton)

Fasulye aynı zamanda önemli bir protein ve mikro besin kaynağıdır. Gelişmekte olan ülkelerde hayvansal proteinle karşılaştırıldığında satın alınabilirliği ve uzun saklama ömrü nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Bir baklagil olarak fasulye aynı zamanda nitrojen sabitleyici bakterilerle birleşerek ekonomiye ve çevreye fayda sağlar. Bu durum sürdürülebilir tarım için anahtar olan sentetik gübrelerin kullanımını en aza indirir ve sera gazı olan yan ürünleri N₂O'nun salınımını önemli ölçüde azaltır. Baklagillerin dünya çapında 60 milyon metrik ton nitrojeni sabitlediği ve bu nitrojeni sentetik gübrelerle değiştirmenin yaklaşık 40 ABD milyar dolara mal olacağı tahmin edilmektedir (Castro-Guerrero, Isidra-Arellano vd. 2016).

Fasulye aynı zamanda, abiyotik ve biyotik streslerden etkilenmektedir. Bu stresler bitkide oldukça yüksek tahribata ve verim kaybına yol açabilmektedir. 2006 yılında yapılan bir çalışmada 24 tane fasulye çeşidi belirlenmiş ve kuraklık stresine gösterdikleri tepkiler gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda bir türün stres koşulları altında verimi düşmüş fakat stresten daha az etkilendiği görülmüştür. Diğer bir türde ise verimi ortalama değer aralığında kalmış ve stresten daha fazla etkilenmiştir. Bu türde stoma iletkenliği ve fotosentezi hızı düşmüş ve absisik asit sentezi azalmıştır (Lizana, Wentworth vd. 2006). Fasulye verimi ile ilgili bir diğer bir çalışmada ise 8 fasulye türüne kuraklık stresi uygulanmış, tohum ve kök ağırlıklarıyla hasat veriminin düştüğü gözlemlenmiştir (Acosta-Díaz, Acosta-Gallegos vd. 2009).

1.1.6 Fasulyede görülen hastalıklar

Fasulye bitkisinde 4 tip bakteriyel kaynaklı hastalıklar görülmektedir. Bunlar; yaygın yanıklık, haleli yanıklık, kahverengi yaprak lekesi ve bakteriyel solgunluktur.

1.1.6.1 Bakteriyel hastalıklar

Yaygın yanıklık ülkemizde adi yanıklık olarak da bilinmektedir (Gedük, Bastas vd. 2020). Bu hastalık, fasulye yapraklarını ve tohumlarını enfekte ederek dünyadaki fasulye üretim alanlarını önemli derece tahrip etmektedir. Bitki yapraklarında kenarları parlak

sarı ve kenarları kahverengi olan lezyonlara dönüşen lekeler görünür. Tohumlarında da benzer lekeler oluşabilmektedir. Enfekte gelişmekte olan tohumlar, olgunlaştıkça düşebilir, büzüşebilir ve renklerini değiştirebilir (Dillard ve Legard 1991).

Haleli yanıklık; bakteriyel bir patojen olan *Pseudomonas phaseolicola* 'dan kaynaklanır. Bu bakteri, fasulyenin yeşil kısımlarında ve kapsüllerinde hastalık oluşturmaktadır. Farklı *Pseudomona* türlerinin neden olduğu diğer bazı bitki hastalıklarında olduğu gibi, bu hastalık nekrotik enfeksiyon bölgesi oluşturmaktadır (Mitchell ve Bielecki 1977).

Bakteriyel kahverengi yaprak lekesinin ilk semptomu, genellikle 3-8 mm çapında belirgin nekrotik kahverengi lekeler dönüşen küçük lekelerdir. Genellikle lekenin etrafı sarı renkle çevrelenmiş olarak görülmektedir. Bu enfeksiyondan kaynaklı lekeler düşer ve bitkide dairesel bir alan bırakır (Dillard ve Legard 1991).

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *Flaccumfaciens*, farklı fasulye tiplerinde bakteriyel solgunluk hastalığına neden olan sistemik bir bakteridir. Hastalık ilk olarak 1922'de Amerika Birleşik Devletleri'nde *Phaseolus vulgaris* bitkisinde keşfedilmiştir ve ardından Avustralya, Kanada, Meksika, Güney Amerika ve Tunus'ta görülmüştür (Silva Júnior 2011).

1.1.6.2 Fungal hastalıklar

Beyaz küf hastalığı; ABD, Kanada, Arjantin ve Brezilya dahil olmak üzere fasulye bitkisinde en yıkıcı ve en yaygın olarak görülen fungal hastalıklardan biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nin yüksek bölgelerine bu hastalıktan kaynaklanan ürün kayıpları ortalama %30'lara kadar çıkmaktadır. Beyaz küf hastalığı kök dışında diğer bitki kısımlarında oluşabilir. Enfekte çiçekler büyüdükçe beyaz, pamuksu bir görünüm geliştirebilmektedir (Schwartz ve Singh 2013).

Fasulye Pası, dünyanın birçok bölgesinde fasulye üretimini ve verimini azaltan önemli fungal hastalıklardan biridir. Hastalık Türkiye'de de yayılım gösterip, fasulye üretimi

yapılan alanlarda verim kayıplarına yol açabilmektedir (Altıkardeşler ve Arslan 2007). Hastalığın Çin, ABD ve Etiyopya gibi dünyanın belirli bölgelerinde de salgın yaptığı kaydedilmiştir (Souza ve ark. 2008). Brezilya'nın güneyinde de hastalık oldukça sık görülmekte ve bölgede ciddi verim kayıplarına yol açabilmektedir (Yeken, Göksel vd. 2019).

Antraknoz, *Colletotrichum lindemuthianum*'ın neden olduğu ciddi bir hastalıktır. Bitkilerdeki enfeksiyonu, %100'e varan verim kayıplarına neden olabilmektedir. Çeşitli fizyolojik tedaviler ve genetik direnç gibi uygulamalara rağmen bitkiler hastalığa karşı savunmasız kalmaktadır (Padder, Sharma vd. 2017).

1.1.6.3 Viral hastalıklar

Fasulye mozaik virüsü (BCMV) ve fasulye mozaik nekroz virüsü (BCMNV), fasulyeyle yakından ilişkili patojenlerdir. Bu patojenler *Potyviriidae* familyasının Potyvirus cinsinin üyeleridirler. Hem BCMV hem de BCMNV fasulye bitkilerinde çok benzer semptomlar göstermektedir. Bunlar çoğunlukla mozaiklik, bitkide bodurlaşma ve yaprak kıvrılması oluşumudur. Sistemik nekrozdan oluşan ve tipik olarak bitki ölümüne yol açan bu sendrom BCMNV veya BCMV suşlarının oluşturduğu nekroza neden olabilir. Bu sendrom “yayılan vasküler nekroz” olarak adlandırılan aşırı duyarlı yanıtın indüklenmesinin sonucunda oluşmaktadır (Flores-Estévez, Acosta-Gallegos vd. 2003).

1.2 Bitkilerde Stres

Bitkiler sürekli olarak hem biyotik hem de abiyotik streslerden kaynaklanan çeşitli problemlerle karşılaşır. Çeşitli patojen türleri, bitki büyüme ve gelişmesinde ciddi sorunlara neden olup mahsul üretimini etkiler. Bitki streslerinin dünya çapında en yaygın olarak yetiştirilen sekiz ürün için %42'ye varan verim kaybına neden olduğu tahmin edilmektedir. Bitkiler biyotik streslerin yanı sıra abiyotik streslere de maruz kalmaktadır. Başlıca abiyotik stresler esas olarak; aşırı tuzluluk, aşırı sıcaklık, kuraklık ve soğuk stresini içermektedir (Jan, Rather vd. 2021).

1.2.1 Abiyotik stres

Bitkiler, sesil doğalarından dolayı abiyotik stres gibi çok sayıda çevresel faktörün getirdiği değişen koşullara uyum sağlamak zorundadırlar (Pereira 2016), (Büyük, SOYDAM-AYDIN vd. 2012). Bu stres koşulları, dünya çapında tarımsal üretimde büyük kayıplara neden olmaktadır (Çizelge 1.4). Bitkinin belirli bir abiyotik stres durumuna alışması, bitkinin karşılaştığı çevresel koşullara uyarlanmış özel bir yanıt gerektirmektedir (Mittler 2006). Bitkilerde abiyotik stresin araştırılmasındaki amaç, bitkilerin farklı stres faktörlerini nasıl algıladıklarını, erken sinyallerin bitki içinde nasıl iletildiğini, onlar tarafından ortaya çıkarılan tepki yollarının çeşitliliğinin ne olduğunu ve bunların genetik olarak nasıl belirlendiğini deşifre etmektir (Pereira 2016).

Çizelge 1.4 Çeşitli stres tiplerinden etkilenen araziler ve yüzdeleri (Cramer, Urano vd. 2011)

Stres Tipleri	Etkilenen küresel arazi alanının yüzdesi (%)	Etkilenen küresel kırsal arazi alanının yüzdesi (%)
ABİYOTİK STRES		96.5
Su Stresi		
Kuraklık Stresi	64	16
Sel	13	10
Sıcaklık Stresi		
Soğuk	57	26
Tuz Stresi	6	6
Mineral Eksikliği	9	39

1.2.1.1 Tuz stresi

Tarımda tuzluluk, gıda üretiminde önemli bir kısıtlayıcı faktör olmuştur (Chandna, Azooz vd. 2013). Örneğin, dünyada 800 milyon hektardan fazla toprak, yüksek düzeyde tuzluluktan etkilenmektedir. Bu alan, toplam kara yüzeyinin %6'sından fazlasını kaplamaktadır. Aynı zamanda bu arazilerin içinde yaklaşık 5,7 milyon hektar tarım arazisi aşırı tuzluluktan etkilenmektedir. Bu miktarın 2050 yılında 17 milyon hektara kadar çıkabileceği öngörülmektedir. Bitkiler üzerindeki aşırı tuz konsantrasyonlarının etkisi ozmotik strese neden olmaktadır. Na^+ ve Cl^- gibi iyonların birikmesi bitkiler üzerinde

iyonik bir dengesizlik yaratır. Ayrıca tuz stresinin özellikle Ca^{2+} ve K^+ olmak üzere mineral homeostazı üzerinde olumsuz etkisi vardır (Isayenkov 2012). Suda çözünen tuzların seviyelerinde artış, ağırlıklı olarak sulamadan kaynaklanır bu da toprak tuzluluğuna neden olur. Toprak tuzluluğu bitkinin önemli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerini etkileyerek biyokütle üretiminin azalmasına neden olur. Tuz stresinin olumsuz etkileri; çimlenme, fide ve vejetatif aşamalar dahil olmak üzere tüm gelişim aşamalarında ortaya çıkmaktadır (Chandna, Azooz vd. 2013).

1.2.1.2 Soğuk stresi

Bitkilerdeki soğuk stres tepkileri, düşük sıcaklıkların neden olduğu hasarlardan korunmak için hücrelerin biyokimyasal bileşimini değiştiren oldukça karmaşık olaylardır (Eremina, Rozhon vd. 2016). Sıfırın altındaki sıcaklıklar, hücre dışı buz oluşumu nedeniyle mahsullere zarar verebilir ve hatta öldürebilir. Düşük sıcaklık, emilen ışık enerjisi ile bitkinin ışığı asimile etme yeteneği arasında bir dengesizlik oluşturarak fotoinhibisyonu tetikleyebilir bu da bitkide fotosentez etkinliğinde bir azalmaya yol açmaktadır (Román-Figueroa, Bravo vd. 2021). Morfoloji üzerindeki belirgin etkilere ek olarak, çok sayıda şiddetli biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler, hücresel kalsiyum içeriklerinde bir artışı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesini, kriyoprotektif proteinlerin, çözünür şekerler ve amino asitler gibi metabolitlerin oluşumunu içerir. Sıcaklık toleransındaki türe özgü farklılıklar, farklı coğrafi bölgelerde yetişen bitkilerde gelişmiştir. *Triticum aestivum*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare* veya *Pisum sativum* gibi ılıman iklimlerden elde edilen yıllık ürünler belirli bir derecede bazal donma toleransı gösterirler. Buna karşılık, *Zea mays*, *Oryza sativa* veya *Solanum lycopersicum* gibi subtropikal veya tropikal iklimlerden gelen türlerin çoğu, soğukta zarar görmektedir. Bu, tarım ve bahçecilik için önemli bir yönetim zorluğunu temsil eder çünkü bu ürünler, büyüme mevsimi boyunca bitkinin sıcaklık tercihlerinin tam olarak karşılanmadığı coğrafi bölgelerde düzenli olarak yetiştirilmektedir (Eremina, Rozhon vd. 2016). Bitkilerin donmaya karşı koruma için iki mekanizması vardır. Bu mekanizmalar donmayı önleme ve donmaya karşı toleranstır. Donmayı önleme, bitkilerde buz oluşmasını önlerken donmaya karşı tolerans ise genellikle hücre zarı ile hücre makromoleküllerinin stabilitesini koruyarak çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal

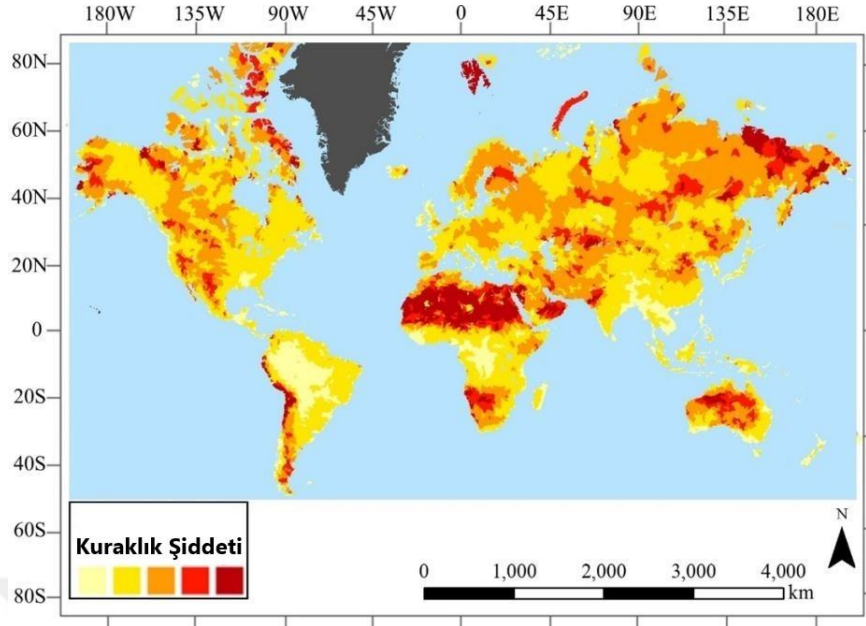
özelliklerle bitkilerin buz oluşumuna karşı hayatta kalmalarını sağlamaktadır (Román-Figueroa, Bravo vd. 2021).

1.2.1.3 Sıcaklık stresi

Optimumun üzerindeki sıcaklıklar, tüm canlı organizmalar tarafından sıcaklık stresi olarak algılanmaktadır. Sıcaklık stresi, hücresel homeostazı bozar ve bitki büyüme ve gelişmesinde ciddi geriliğe ve hatta ölüme yol açabilmektedir. Hareket edemeyen organizmalar olarak bitkiler sürekli olarak sıcaklık değişimlerine ve diğer abiyotik faktörlere maruz kalırlar. Dünya çapındaki tarımsal kayıplar, genellikle kuraklık veya diğer streslerle artan sıcaklıkla birlikte değerlendirilmektedir (Kotak, Larkindale vd. 2007). Artan miktardaki sera gazı, atmosferde artan enerjiye neden olur. Bunun sonucunda, ortalama küresel yıllık sıcaklıkların 2100 yılına kadar 0,3–4,8 C artacağı ve birçok bölgenin küresel ortalamanın üzerinde ısınması beklenmektedir. Böylece, ortalama mevsim sıcaklıklarının artmasıyla bitkilerin fizyolojik performansı ve üretkenliği de değişecektir. Sıcaklık stresi özellikle tahıllarda büyüme, çiçeklenme ve üreme dönemlerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Jagadish, Way vd. 2021). Bitkiler, sıcaklık stresinin oluşturduğu hasarı en aza indiren ve hücresel homeostazın korunmasını sağlayan çeşitli tepkiler geliştirmişlerdir. Sıcaklık stresi ile ilişkili proteinlerinin ve moleküler şaperonların yapısı ve işlevi hakkında yeni bilgiler elde edilmesi, sıcaklık stresine karşı bitkilerin geliştirdiği tepkileri daha anlaşılır hale getirmiştir (Kotak, Larkindale vd. 2007).

1.2.1.4 Kuraklık stresi

Son zamanlarda küresel iklim değişikliğinin etkisinden dolayı kuraklık ciddi bir sorun haline gelmiştir ve çoğu farklı ülke ve bölge kuraklığın tehdidi altındadır (Liang, Liu vd. 2020). Kuraklık, dünyada karasal alanların %64'ünü etkilemekte ve geri kalan alanların da 2050'ye kadar kuraklıktan etkilenmesi beklenmektedir (Rosa, Barão vd. 2023).



Şekil 1.7 1901-2008 dönemi için hesaplanan dünya kuraklık şiddeti dağılım haritası (Hazaymeh ve Hassan 2016)

Kurak bölgelerin ortak özelliği, düşük yağış miktarı nedeniyle suyun olmaması olarak tanımlanabilir. Su, buharlaşma ve terleme yoluyla ve bitkilerden buharlaşarak kaybolabilir. Bu nedenle, bir bölgenin kurak olarak değerlendirilmesi, kuraklık indeksi olarak da adlandırılan buharlaşma-terleme yoluyla su kayıpları ve yağış arasındaki net fark hesaplanarak belirlenebilmektedir. Kurak bölgeler; çok kurak bölge, kurak bölge ve yarı kurak bölge olarak sınıflandırılmaktadır. Çok kurak bölgelerde yıllık yağış miktarı düşüktür, nadiren 100 mm'yi aşmaktadır. Kurak bölgelerde bitki örtüsü oldukça seyrek. Yarı kurak bölgelerde bitki örtüsü daha çeşitlidir. Yıllık yağış yılda 800 mm'ye ulaşabilir. Kurak bölgeler genellikle biyolojik aktivitede sınırlıdır ve bu nedenle düşük seviyelerde organik karbon içerir. Uzun süreli su eksikliği, yüksek buharlaşma oranları nedeniyle daha fazla biriken çözünür tuzların ortadan kaldırılmasını da yavaşlatmaktadır (Steven 2017).

Bitkide kuraklık stresinden dolayı birkaç morfolojik ve fizyolojik değişiklik meydana gelmektedir. Bunlar; kök uzunluğu, yaprak morfolojisi ve sayısı, meyve sayısı ve büyüklüğü ve tohum sayısı gibi morfolojik özelliklerdir (Çizelge 1.5). Aynı zamanda fotosentez de stomaların kapanması nedeniyle olumsuz etkilenmektedir. Işık absorpsiyonu ile indirgeme gücünün oluşumu arasındaki bu dengesizlik, oksidatif hasara

neden olan süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artmasına yol açabilir. Yüksek düzeyde ROS, lipid peroksidasyonuna, membran bozulmasına ve proteinlerin ve nükleik asitlerin bozulmasına neden olarak hücre ölümüne yol açabilmektedir (Rosa, Barão vd. 2023). Bitki kuraklık stresinin erken tespiti, mahsul kayıplarının azaltılmasına yardımcı olabileceği için son derece önemlidir. Çiftçiler yaptıkları incelemelerde kuraklık stresinin bitkilere etkilerini, verim kayıplarının artık önlenemeyeceği aşamalarda tespit edebilmişlerdir (Ghadirnezhad Shiade, Fathi vd. 2023).

Bitkiler kuraklık stresinden; morfolojik, fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal açıdan etkilenmektedirler. Bu etkiler bitkilerde farklı şekillerde gözlemlenebilmektedir (Çizelge 1.5)

Çizelge 1.5 Kuraklık stresinin bitki üzerine etki çeşitleri

Kuraklık Stresinin Bitki Üzerine Etki Çeşitleri			
Morfolojik Etkiler	Fizyolojik Etkiler	Moleküler Etkiler	Biyokimyasal Etkiler
Çimlenme	Fotosentez	Sinyal iletimi (ABA,ROS,JA)	Osmolit ve ozmoprotektan biyosentezi (glisin betain, proline)
Kök Uzaması	Klorofil içeriği	Transkripsiyon faktörü regülasyonu (MYB,Bzip,NAC,WRKY)	Antioksidan enzim (SOD,POD,CAT)
Sürgün Uzaması	Terleme ve stoma açıklığı	Gen ekspresyonu ve protein sentezi (DREB,LEA,Aquaporin)	Hormonal Düzenleme (Oksin,sitokinin,ABA)
Yaprak Gelişimi	Bitkilerin su ve besin ilişkileri		İkincil Metabolitler (Flavonoidleri alkoloitler,terpenler)

Morfolojik Etkiler

Bitki büyümesinin en kritik aşaması tohumun çimlenmesidir. Optimum tohum çimlenmesi; toprağın nem içeriğine, metabolizmanın aktivasyonuna ve bitkide dormansi durumunun kalkmasına bağlıdır. Topraktaki su potansiyeli, çimlenmenin erken evrelerinde su emilimini ve kullanımını etkileyen ana faktörlerdendir. Ayrıca,

çimlenmenin ilk zamanlarında oluşan kuraklık koşulları çimlenmeyi ve fide oluşumunu önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu durumun başlıca nedeni, çimlenme sırasında azalan su emilimi ve zayıflamış enzim aktiviteleridir (Ghadirnezhad Shiade, Fathi vd. 2023).

Bitki kökleri, kuraklık stresini tolere edebilmek için kök uzunluğundaki artış ve fizyolojik plastisite gibi çeşitli uyarlanabilir mekanizmalarla kuraklığa yanıt verebilmektedir. Yoğun ve uzun süreli kuraklık stresi altında kök uzunluğu, yüzey alanı, hacmi ve uçları azalırken, kısa ve orta süreli kuraklık stresi altında bu parametrelerin arttığı görülmüştür. Toprakta çok daha fazla su alabilen bitkiler kuraklığa daha iyi dayanmaktadır. Depolama ve taşıma işlevlerine sahip daha kalın köklerin kuraklık koşullarında hayatta kalma olasılığı daha yüksekken, emme işlevlerine sahip ince köklerin kuraklığa karşı daha duyarlı olduğu görülmektedir (Ghadirnezhad Shiade, Fathi vd. 2023).

Kuraklıkla ilgili başka bir önemli özellik ise, artan kuraklık stresi ile birlikte önemli ölçüde azalan sürgün uzunluğudur. Bitkinin kuraklık gibi bitki büyümesini sınırlayıcı koşullar altında ksilem ve bitişik hücreler arasındaki yetersiz su akışının bir sonucu olarak gövde uzamasında azalma meydana gelir. Aynı zamanda su miktarındaki azlık, bitkilerin tüm rezervlerini köklerin büyümesi için kullanmasına neden olur. Bu nedenle sürgünler büyüyemez ve bitkiler kısa boylu olur. Sürgünlerin uzunluğu bitki için köklerin uzunluğu kadar önemlidir. Besinler kökler tarafından emilir ve sürgünlere taşınır. Bitki geliştikçe, besinler köklerden sürgüne geçer. Bitkilerin sürgün biyokütlesi, kuraklık koşullarında yeterli su durumunu korumalarına yardımcı olan su tüketimleri ile doğrudan ilişkilidir (Ghadirnezhad Shiade, Fathi vd. 2023).

Yaprak gelişimindeki fizyolojik değişiklikler, su eksikliğinin bitkiler üzerindeki en önemli etkilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Kuraklık durumuna maruz kalan bitkiler, toprak kurudukça ve yaşlandıkça büyümeyi hemen durdurmaktadır. Kuraklık, bitkilerin yaprak boyutunun azalması, stoma sayısının düşmesi, kalınlaşmış hücre duvarları ve azalan yaprak yüzeyi dahil olmak üzere çeşitli değişikliklere uğramasına neden olur. Yaprak alanı genişlemesi ve stoma aktivitesi, bitkilerde fotosentezi en üst düzeye çıkarmak için iki ana husustur. Dolayısıyla kuraklığa maruz kalan bitkilerde

fotosentez azalacak, stomalar gaz değişimine karşı daha dirençli olacak ve yaprak yaşlanması artacaktır (Ghadimezhad Shiade, Fathi vd. 2023).

Fizyolojik Etkiler

Fotosentez, abiyotik streslere adaptasyonda ve bitki gelişiminin düzenlenmesinde yer alan önemli bir fizyolojik mekanizmadır. Kuraklık koşullarında stoma kapanması, kloroplastta CO₂ mevcudiyetinin azalması ve karboksilasyon verimliliğinin azalması nedeniyle fotosentez azalır. Kuraklığın neden olduğu stoma kapanması sırasındaki aşırı ışık enerjisi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi yoluyla bitkide ciddi hasara neden olabilmektedir. (Arab, Brown vd. 2022).

Klorofiller temel bir tetrapireol sınıfıdır ve fotosentezde reaksiyon merkezi, yardımcı ve fotokoruyucu pigmentler olarak sınıflandırılmaktadırlar (Senge, Ryan vd. 2014). Bitki ve bakteri fotosentezinde fotoreseptörler olarak işlev görmektedirler. Klorofil içeren organizmalar fotosentez yapabilirler. Klorofiller, fotosentezin birincil olaylarının tüm yönleri ile enerji transferi ve ışık enerjisi dönüşümü ile yakından ilgilidir (Katz, Norris vd. 1978).

Stomalar, gelişmiş bitkilerin yaprak yüzeyinde çok sayıda bulunan, boyutları büyüyen küçülebilen küçük gözeneklerdir. Stomaların bitkilerdeki esas rolü, yaprağın içi ile dış ortam arasındaki gaz alışverişini düzenlemektir. Bitkinin fotosentez yapmak üzere yaprağa girmesi için yeterli CO₂'ye ihtiyacı vardır (Lawson ve Morison 2004). Soya fasulyesinde yapılan çalışmada, kuraklık stresi altında bitkilerin stoma iletkenliğinde azalma keşfedilmiştir. Stoma iletkenliği, stoma açıklığının derecesinin bir ölçüsüdür ve bu durum ise bitkide fotosentez hızının baskılanmasına sebep olmaktadır (Wang, Wang vd. 2018).

Kuraklık durumunda doku ve hücrelerde önemli miktarda su kaybı meydana gelebilir. Bitkilerin su dengesi, bağıl su içeriği (RWC), stoma direnci, yaprak su potansiyeli, terleme oranı, yaprak sıcaklığı ve gölgelik sıcaklığı gibi çeşitli indekslerle belirlenebilir. Tüm bu faktörler, su arzının azalmasına yol açan kuraklıktan etkilenmektedir. Başka bir

deyişle, azalan bitki su alımı, azalan bitki su potansiyeline ve stoma kapanmasına yol açabilmektedir.

Besin emilimi ile kuraklık arasında güçlü bir ilişki vardır. Kuraklık bitkilerde besleyici elementlerin konsantrasyonlarının azalmasına neden olmaktadır. Kökler tarafından mineral besin alımına tipik olarak topraktan su emilimi eşlik etmektedir. Bu nedenle besin mevcudiyeti genellikle kuraklık koşullarında azalır.

Moleküler Etkiler

Bitkilerde kuraklık stresinin çeşitli sinyal yolları; transkripsiyon faktörleri, enzimler, moleküler şaperonlar ve metabolitler dahil olmak üzere birkaç proteinden oluşmaktadır. Kuraklığa yanıt olarak bitkilerde ifade edilen birçok gen tanımlanmıştır. Bu genler, farklı hücrel sinyal yollarında ve transkripsiyonel düzenleme gibi hücrel tepkilerde işlev görür. Transkripsiyonel faktörler DREB, WRKY, bZIP, bHLH, NAC, MYC ve MYB gen ailelerinden oluşmaktadır. Stres sinyallemede yer alan bir başka mekanizma, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumundaki bir artıştır. Bitkinin farklı dokularında ve hücrelerinde ROS'un aşırı üretimi ve birikmesi stres sinyalleri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca düşük moleküler ağırlıklı ozmolitler, ısı şoku proteinleri, akuaporinler ve LEA proteinleri gibi moleküller de bitkilerde strese verilen tepkilerde yer almaktadır. Bu proteinler, bitki hücrelerinde stres sinyallerinin bir sonucu olarak sentezlenir. Sentezlenen proteinler, transkripsiyonel düzenleme, hücre zarı koruması, su ve iyon alımı gibi biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik aktivitelerden sorumlu olmaktadır (Oguz, Aycan vd. 2022).

Biyokimyasal Etkiler

Kurak ve yarı kurak çevre koşulları, bitkilerde ROS oluşumunu indüklemektedir. Bu durum bitki hücrelerinde oksidatif hasara neden olmaktadır. ROS sinyali, stres kaynaklı moleküler, biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik tepkilerin başlatılmasında rol oynamaktadır. Stres sinyalinin çok önemli bir bileşeni olan ABA ise, strese yanıt olarak ROS üretimi arttığında üretilir. Bu sayede süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) üreterek biyokimyasal tepkiler için gen ekspresyonunu düzenleyebilir. Yüksek

seviyelerde ROS üretimi, bitkilerde fotosentez ve antioksidan savunma sistemi gibi çeşitli fizyolojik ve metabolik süreçlere zarar verebilmektedir. Antioksidan sistem ve ozmotik düzenleme, bitkilerin su eksikliği stres koşullarına karşı toleransını sağlayan temel savunma sistemleridir (Oguz, Aycan vd. 2022).

Çizelge 1.6 Kuraklık stresinin çeşitli bitki türleri üzerine etkisi

Bitki Türleri	Kuraklığın Bitki Üzerine Etkisi	Referans
<i>Medicago sativa</i> L.	Düşük çimlenme yüzdesi ve hızı, Düşük tohum canlılık oranı	(Hamidi ve Safarnejad 2010)
<i>Triticum durum</i> Desf.	Düşük çimlenme ve süresinde uzama, boy uzunluğunda azalış	(Sayar, Bchini vd. 2010)
<i>Cicer arietinum</i> L.	Düşük çimlenme oranı, Düşük su içeriği	(Koskosidis, Ebrahim vd. 2020)
<i>Avena sativa</i> L.	Tohum boyutunda azalış, çimlenme süresinde artış, kök ve sürgün uzunluğunda artış	(Mut ve Akay 2010)
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Çimlenmede azalış, prolin-karbonhidrat artış, lipid ve protein azalış	(Rahdari, Hosseini vd. 2012)
<i>Pisum sativum</i> L.	Azalan gövde uzunluğu	(Okçu, Kaya vd. 2005)
<i>Helianthus annuus</i> L.	Azalan bitki boyu	(Ahmad, Ahmad vd. 2009)

1.3 Expansin Gen Ailesi

Bitki büyümesinde önemli rol oynayan *Expansin* genleri, bitkilerin gelişim süreçlerinde ve stres direncinde rol oynamaktadır. *Expansinler* ilk olarak salatalık hipokotillerinden hücre duvarı gevşetici proteinler olarak tanımlanmış ve daha sonra bir süper gen ailesi olarak karakterize edilmiştir (Li, Ma vd. 2021). İlk kez salatalık bitkisinden izole edildikten sonra, *Expansin* proteinleri birçok bitki türünde daha tanımlanmıştır. Örnekler arasında domates, mısır, pirinç, tütün ve çeşitli meyveler (Çizelge 1.7) bulunmaktadır (Wu, Meeley vd. 2001). Bitki türlerinin dışında *Expansinlerin*, çeşitli mikroorganizmalarda da bulunduğu ortaya çıkmıştır. Mikrobiyal *Expansinlerin* de keşfi,

bitki hücresi büyümesinin mekanizması ve bitki hücre duvarı uzayabilirliğinin moleküler temeli üzerine yapılan çalışmalardan ortaya çıkmıştır (Georgelis, Nikolaidis vd. 2015).

1.3.1 Mikrobiyal *Expansin*ler

Expansinler, bitki hücre duvarlarını litik aktivite göstermeden gevşeten proteinlerdir. İlk olarak bitkilerde keşfedilen *Expansin* genleri, bitkilerle patojenik etkileşime giren çok sayıda bakteri ve mantarın genomlarında da bulunmaktadır (Cosgrove 2017). Bakteriyel *Expansin*ler, biyoyakıt üretimi için selülozik biyokütle dönüşümündeki potansiyel kullanımları nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. Evrimsel analizler *Expansin*lerin, mikrobiyal organizmalara bitkilerden çoklu yatay gen transferleri yoluyla geçtiğini göstermektedir (Georgelis, Nikolaidis vd. 2015). Bu da *Expansin*lerin düzensiz olarak taksonomik dağılım gösterdiğini açıklamaktadır (Cosgrove 2017). *Bacillus* ve *Clavibacter*'deki *Expansin* genlerinin silinmesi, bitki dokularını kolonize etme yeteneklerini kısıtladığını göstermiştir (Georgelis, Nikolaidis vd. 2015). Mikrobiyal *Expansin*lerin daha derinden anlaşılması bitki hastalıklarının biyokontrolü için yeni yaklaşımlara yol açabilir (Cosgrove 2017).

Çizelge 1.7 Çeşitli bitki türlerinde bulunan *Expansin* gen ailesinin üye sayıları

TÜRLER	EXPA	XPB	EXLA	EXLB	Toplam	Referans
Arpa	24	16	6	0	46	Liu, C., Fu, M., Guo, F., & Wu, C. (2021).
Buğday					241	Han, Z., Liu, Y., Deng, X., Liu, D., Liu, Y., Hu, Y., & Yan, Y. (2019).
Soya Fasulyesi	50	14	2	9	75	Feng, X., Li, C., He, F., Xu, Y., Li, L., Wang, X., ... & Li, F. (2022).
Tütün	36	6	3	7	52	Ding, A., Marowa, P., & Kong, Y. (2016).
Pamuk	67	8	6	12	93	Lv, L. M., Zuo, D. Y., Wang, X. F., Cheng, H. L., Zhang, Y. P., Wang, Q. L., ... & Ma, Z. Y. (2020).
Domates	25	8	1	4	38	(Lu, Liu vd. 2016)
Mısır	36	48	4	0	88	(Zhang, Yan vd. 2014)
Karpuz	18	3	7	2	30	(Gao, Li vd. 2020)

1.3.2 *Expansin* Genlerinin İsimlendirilmesi

*Expansin*ler ilk olarak asitle (düşük pH) indüklenen, hücre duvarı uzamasını sağlayan bir hücre duvarı gevşetici faktör olarak tanımlanmıştır ve daha sonra *Alfa-Expansin* ailesi olarak sınıflandırılan bir dizi gen tarafından kodlandığı bulunmuştur. *Alfa-Expansin*lerle amino asit dizisi benzerliğine dayanarak başka bir gen grubu daha tanımlanmıştır ve sonra bu gen grubunun hücre duvarı gevşetme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Bu ikinci *Expansin* grubu *Beta-Expansin*ler olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra, *Alfa* ve *Beta-Expansin* aileleri sırasıyla *Expansin A (EXPA)* ve *Expansin B (EXPB)* olarak adlandırılmıştır (Çizelge 1.8). Bu gen ailesinin, *A benzeri Expansin (EXLA)* ve *B benzeri Expansin (EXLB)* olmak üzere 2 ailesi daha tanımlanmıştır (Kende, Bradford vd. 2004). Ek olarak bitki dışındaki diğer organizmalarda belirlenen *Expansin* genleri mevcut terminolojiye göre, *X benzeri Expansin (EXLX)* olarak isimlendirilmektedir (Choi, Kim vd. 2008).

Çizelge 1.8 *Expansin* gen ailesinin isimlendirilmesi

Genin Özgün Adı	Eski Sembol	Yeni Sembol	Yeni İsim
a- <i>Expansin</i>	EXP ya da EXPa1	EXPA	EXPANSIN A
b- <i>Expansin</i>	EXPB ya da EXPb1	EXPB	EXPANSIN B
<i>Expansin</i> benzeri	EXPL ya da EXPb2	EXLA	A benzeri EXPANSIN
<i>Expansin</i> benzeri	EXPR ya da EXPb3	EXLB	B benzeri EXPANSIN

(Kende, Bradford vd. 2004)

1.3.2.1 *Expansin* gen ailesi alt aileleri

Expansin Alfa Alt Ailesi (EXPA)

EXPA, bitkide ilk tanımlanan *Expansin* alt ailesidir. Bu gen ailesi, biyokimyasal aktiviteleri ve farklı türdeki *Expansin*lerin yapısal özellikleri için yapılan çalışmalarda prototip görevi görmüştür. *EXPA*'lar, çoğu bitkide *Expansin* süper ailesindeki en büyük

aileyi oluşturur ve *Expansinler* üzerine yapılan çalışmaların çoğunda *EXPA*'lara odaklanılmıştır (Choi, Kim vd. 2008).

Expansin Beta Alt Ailesi (EXPB)

1997 yılında Cosgrove ve ark., *EXPA* ile grup-1 polen alerjenleri arasındaki yapısal benzerlikleri fark etmiş ve bu proteinlerin mısır ve buğdaydaki hücre duvarlarının uzamasını ve gevşemesini indüklediğini göstermiştir. Grup-1 polen alerjenleri böylelikle *EXPB* ailesine dahil edilmiştir (Choi, Kim vd. 2008).

Alfa Benzeri Expansin Alt Ailesi (EXLA)

Bu gen ailesi, *EXPA* ve *EXPB* proteinleri ile amino asit dizisi benzerliğinden dolayı ortaya çıkmıştır. *EXLA* proteinleri birbirleri arasında çok yüksek amino asit benzerliğine sahiptir. *EXLA*'lar sırasıyla N- ve C-terminal bölgelerinde Cys ve Trp kalıntılarını korumuştur. Bununla birlikte diğer alt ailelerin aksine *EXLA*'lar, Domain 1'de HFD motifine sahip değildir ve Domain 2'nin korunmuş Trp kalıntılarının konumları diğer alt ailelerden farklıdır (Choi, Kim vd. 2008).

Beta Benzeri Expansin Alt Ailesi (EXLB)

Bu gen ailesi de benzer şekilde *EXPA* ve *EXPB* proteinlerine amino asit dizisi benzerliğinden tanımlanmıştır. *EXLB*'lerin N-terminalinde sistein kalıntılarını korumuştur, ancak Domain 2'de yalnızca bir Trp kalıntısını korumuştur. Ayrıca, *EXLA*'larda olduğu gibi, Domain 1'de HFD motifi bulunmamaktadır.

1.3.3 *Expansinlerin Bitki Büyümesi ve Gelişmesine Etkileri*

Expansinler, bitkilerde hücre duvarı hücre şeklini, hücre büyüklüğünü ve hücre fonksiyonunu belirler. Bu proteinler hücre duvarının gevşemesine aracılık eder, tüm bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunur. Salatalıktaki ilk keşfinden yıllar sonra bu proteinlerin bitkilerde farklı çeşitli biyolojik rollere sahip olduğu gösterilmiştir. Çimlenmeden meyve verimine kadar neredeyse tüm bitki fizyolojik gelişme

basamaklarında *Expansin*ler bulunmaktadır (Marowa, Ding vd. 2016). Pirinçte yapılan bir çalışmada; *Expansin*lerin in vivo fonksiyonlarını araştırmak için *OsEXP4* geninin sens ve antisens yapılarını ifade eden transgenik pirinç üretilmiştir. Bu gen aşırı eksprese edildiğinde bitki boylarında daha fazla uzama ve mezokotil uzunluğunda artma saptanmıştır. Gen susturulduğunda ise bitki boylarında kısalma saptanmış ve daha erken çiçeklenme gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *Expansin*lerin hücre duvarının gevşemesine aracılık ederek bitkide büyümeyi artırdığı hipotezini desteklemektedir (Choi, Lee vd. 2003).

1.3.3.1 Çimlenme üzerine etkileri

Tohum çimlenmesi, bitkide bir dizi mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Embriyonun büyümesi ve gelişmesi için öncelikle çimlenme gereklidir. Olumsuz koşullar altında tohumlar, çimlenme yeteneklerini korumak için uyku haline gelebilir. Ancak koşullar uygun olduğunda tohumlar çimlenmektedirler. Bitki hormonları ve bitki genleri arasındaki etkileşimler tohum çimlenmesini etkiler (Miransari ve Smith 2014). Domateste yapılan bir çalışmada; transgenik domateste *LeEXP10* gen ifadesi artışının bitkide çimlenme oranını artırdığı ortaya çıkmıştır (Chen, Dahal vd. 2001).

1.3.3.2 Kök uzaması üzerine etkileri

Bitki gelişimi esas olarak sürgünlerin ve köklerin apikal bölgelerinde lokalize olan ve apikal meristemler olarak anılan kök hücreleri tarafından yönlendirilir. Bu özellik, sesil organizmalar olan bitkilerin morfolojilerini ve organ gelişimlerini karşılaştıkları çevre koşullarına uyarlamalarını sağlar (Hodge, Berta vd. 2009). Soya fasulyesinde yapılan bir çalışmada; köke özgü ifade gösterdiği kesinleşen *GmEXP1* geninin ekspresyon seviyesinin, kök uzamasının gerçekleştiği 1. ve 5. günde fidelerin köklerinde yüksek seviyelerde olduğu saptanmıştır. Ayrıca *GmEXP1*, hücre uzamasının meydana geldiği kök ucu bölgesinde fazla miktarda bulunurken, hücre uzamasının durduğu olgunlaşma bölgesinde az bulunur. Bu durum da *GmEXP1*'nin ekspresyonunun kök gelişim süreçleriyle yakından ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır (Lee, Ahn vd. 2003).

1.3.3.3 Yaprak büyümesi üzerine etkileri

Yaprak büyümesi, enerji alımını ve bitki performansını arttıran merkezi bir süreçtir. Bu aynı zamanda çok çeşitli abiyotik streslere karşı en hassas süreçlerden biridir. Hacimsel olarak büyümenin ve kuru madde artışının da belirleyicisidir (Pantin, Simonneau vd. 2012). *Arabidopsis*'te yapılan çalışmada; yaprak gelişimi boyunca nispeten yüksek oranda eksprese edilen bir grup *Expansin* geninin ekspresyonunu azaltmak için ek için yapay bir mikroRNA (amiRNA) yapısı tasarlanmış ve azalan *Expansin* gen ekspresyonunun, yaprak gelişiminin sonraki aşamasında büyümenin daha belirgin bir şekilde baskılanmasına yol açtığını göstermiştir (Goh, Sloan vd. 2012). Bu durum *Expansin* gen ailesinin bitkinin yaprak gelişimi ve büyümesinde etkili olduğunu doğrulamaktadır.

1.3.3.4 Üreme üzerine etkileri

Çiçekli bitkiler, çiçek çeşitliliğini teşvik eden bir dizi üreme sergiler. Bu çeşitliliğin özelliği, ilgili türlerin genellikle tozlaşma ve çiftleşme sistemlerinde farklılık göstermesi ve eşeysel özelliklerdeki türler arası varyasyonun olmasıdır (Barrett 2010). Domateste yapılan bir çalışmada ise; *SIEXPA2*, *SIEXPA4*, *SIEXPA10*, *SIEXPA8*, *SIEXPA11*, *SIEXPA14*, *SIEXPA18*, *SIEXPA24*, *SIEXPB3*, *SIEXLB1*, *SIEXPA4* ve *SIEXLB2* gibi bazı genlerin çiçek organlarında daha fazla ifade edildiği saptanmıştır. Bu durum ise *Expansin* gen ailesinin bitki üremesinde etkili olduğunu kanıtlamaktadır (Lu, Liu vd. 2016).

1.3.3.5 Stres toleransı

*Expansin*ler, hücre duvarındaki kovalent olmayan bağların bozulmasında rol oynayan bir grup proteindir. *Expansin* genleri, bağımsız olarak hücre genişlemesini düzenleyebilir ve bunların çeşitli ekspresyon paternleri, bitki büyümesi üzerindeki etkilerini gösterir. Yapılan bir çalışmada *AtEXPA1* genini aşırı ifade eden bitkiler, tuz ve ABA stres koşulları altında kontrol grubuna göre daha az bozulma göstermiştir. Bu sonuçlar *AtEXPA1* geninin stres koşulları altında hücre duvarı organizasyonunun artmasına ve böylece bitkinin

olumsuz ortama daha iyi uyum sağlamasına yardımcı olduğunu göstermektedir (Gao, Liu vd. 2010). Tütün bitkisinde yapılan bir çalışmada ise; *NtEXPA1* , *NtEXPA4* ve *NtEXPA5* genlerinin transkript seviyeleri, NaCl, kuraklık, soğuk ve sıcak stresine yanıt olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum yukarı belirtilen genlerin tütün bitkilerinde stres toleransının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Kuluev, Avalbaev vd. 2016).

1.3.4 Bitki hormonları ve *Expansin* gen ailesi ilişkileri

Bitki hormonları, bitki dokularında düşük konsantrasyonlarda bulunan ve bitkilerin fizyolojik süreçlerinde rol oynayan organik kimyasal maddelerdir. Bitki hormonlarının etkilediği süreçler esas olarak büyüme, farklılaşma ve gelişmeden oluşmaktadır, ancak stoma hareketi gibi diğer süreçleri de etkilediği bilinmektedir. Bitki hormonları aynı zamanda "fitohormonlar" olarak da adlandırılmaktadır (Davies 2010). Aşağıdaki tabloda fitohormonların kısaca fonksiyonları verilmiştir (Çizelge 1.9).

Çizelge 1.9 Fitohormonlar ve görevleri

Fitohormonlar	Fitohormonların Görevleri
Oksin	Hücre uzaması, apikal tomurcukların uzaması
Etilen	Çiçeklenme, meyve olgunlaşması, stres tepkisi, tohum çimlenmesi
Jasmonik Asit	Otçul böceklerle karşı bitki savunması kök büyümesinin engellenmesi
Sitokinin	Hücre bölünmesi, yanıl tomurcukların uzaması, yaşlanmayı geciktirme, kök uzaması
Benzoat	Patojenlere karşı kazanılmış direnç
Absisik Asit	Stoma kapanması, tohum olgunlaşması,
Giberellin	Kök ve gövde uzaması, tohum çimlenmesi, çiçek gelişimi
Brassinosteriodler	Kök ve gövde uzaması, fotomorfogenez, üremenin artması
Strigolaktonlar	Bitki dallanmasını arttırma, bitki-mikrop etkileşimleri

Bitkilerde oksin hormonu embriyo gelişiminde organ yaşlanmasına kadar bitkinin yaşamının neredeyse her aşamasında işlev gören bir hormondur. Oksin hormonunun görevleri arasında hücre düzeyinde organogenez, vasküler doku farklılaşması, apikal tomurcuğun uzaması, kök oluşumu ve gelişimi gibi biyolojik süreçleri yönetmek yer

almaktadır. *F. chiloensis*'te yapılan bir çalışmada meyvenin olgunlaşmasıyla birlikte *FaEXP2* ve *FaEXP5* genlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Oksin hormonunun uygulanmasıyla *FaEXP2* ve *FaEXP5* seviyelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, *FaEXP2* ve *FaEXP5* genlerinin meyve olgunlaşması ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda araştırmacılar oksinlerin meyve olgunlaşmasıyla ilgili genlerin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkisini ortaya koymuştur (Figueroa, Pimentel vd. 2009). Soya fasulyesinde yapılan farklı bir çalışmada ise bitkiye oksin uygulaması yapılmış ve bitkinin gövdesinde ekprese edilen *GmEXPB1*, *GmEXPB3* ve *GmEXPB6* genlerinin ifadelerinde artış gözlemlenmiştir.

Absisik asit (ABA), suyun olmaması durumunda ve tohum olgunlaşması sırasında biriken izoprenoid türevi bir fitohormondur. ABA stoma açıklığını ve strese duyarlı genleri kontrol eder, böylece fotosentezi sınırlayan ve elverişsiz koşullara karşı toleransı artıran CO₂'nin girişini azaltır. Bazı tohumlar, tomurcuklar ve meyveler, uyku halinin sürdürülmesi ve tohum gelişiminde ABA metabolitleri içermektedir. ABA'nın, stoma düzenlemesi ve gen ekspresyonu da dahil olmak üzere, su kıtlığına bitki tepkilerinde bir stres hormonu olarak fizyolojik rolleri iyi çalışılmıştır. *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada soğuğa dayanıklı bir buğday çeşidi, düşük sıcaklık stresine verdiği yanıtı aydınlatmak için bitkiler 4 °C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda *TaEXPB7-B* geninin ekspresyon seviyeleri, hem düşük sıcaklık stresine hem de absisik asit (ABA) tedavisine yanıt olarak önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Bu sonucu doğrulamak için, bu gen *Arabidopsis thaliana* bitkisine aktarılmış ve transgenik *Arabidopsis* elde edilmiştir. GUS boyama sonuçları da *TaEXPB7-B* geninin düşük sıcaklık ve ABA uygulamasına benzer yanıtlar gösterdiğini ortaya koymuştur.

1.3.5 Expansin genlerinin bitkilerde ifadesinin düzenlenmesi

"Aşırı ifade" terimi, tek hücreli organizmaları içeren çalışmalarda ön plana çıkmaktadır ve normun ötesinde artan ifade anlamına gelmektedir. Bir genin aşırı ifadesini değiştirilmesin içeren çalışmalar biyoteknoloji çalışmaları içerisinde çeşitli avantajlar sağlar (Prelich 2012).

Buğdayda yapılan bir dizi çalışmada; expansin genlerinin buğday kuraklık stresi toleransındaki işlevi ve düzenlemesi incelenmiştir. Araştırma sonuçları, *TaEXPA2*'yi aşırı eksprese eden buğday bitkilerinin kuraklığa dayanıklı fenotipler sergilediğini göstermiştir. *TaEXPA2*'nin aşırı ekspresyonu, antioksidan enzim aktivitesinin yükselmesi ve bazı ROS süpürücü enzimle ilişkili genlerin transkriptlerinin artması yoluyla buğdayda antioksidan kapasiteyi arttırmıştır. Buğdayda yapılan başka bir araştırma ise; *TaEXPA2*'nin kuraklık koşullarında yanıl kök oluşumunu olumlu yönde etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Bu bulgular, *TaEXPA2*'nin buğdayda kuraklık stresi toleransını pozitif olarak düzenlediğini göstermektedir (Yang, Zhang vd. 2020).

Soya fasulyesinde yapılan bir çalışmada ise; *GmEXPB2*'yi aşırı eksprese eden soya fasulyesinden elde edilen sonuçlar, *GmEXPB2*'nin tüylü kök uzamasında rolü olduğunu ve ardından bitki büyümesini ve özellikle düşük P seviyelerinde P alımını etkilediğini göstermiştir. Transformasyon sisteminden elde edilen sonuçlar, *Arabidopsis*'te *GmEXPB2*'yi aşırı ifade etmenin kök hücre bölünmesini ve uzamasını arttırdığını, hem düşük hem de yüksek P seviyelerinde bitki büyümesini ve P alımını arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar, *GmEXPB2*'nin P, Fe ve su eksikliği dahil olmak üzere bazı abiyotik streslere karşı kök tepkilerinde kritik bir *B-Expansin* geni olduğunu göstermektedir (Guo, Zhao vd. 2011)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Expansinlerin bitki büyümesi ve gelişmesinde diğer bitki hücre duvarı proteini ve hücre duvarı gevşetici faktörlerden daha çeşitli roller oynadığına dair birçok çalışma vardır (Choi, Cho vd. 2006).

Brachypodium distachyon'da yapılan bir çalışmada; ekspresyon seviyesinin kökte fazla olduğu bilinen *BdEXPA27* geni pCambia1300 vektörü kullanılarak *Arabidopsis*'e aktarılmıştır. Genin aşırı ekspresyonunun transgenik *Arabidopsis*'te tohum büyüklüğünü, kök uzunluğunu, saçak kök oluşumunu arttırdığı ve daha yüksek çimlenme oranı gösterdiği bulunmuştur (Chen, Luo vd. 2020).

Glycine soja'da yapılan çalışmada ise; *A. tumefaciens* ile soğan epidermal hücrelerine geçici transfeksiyonla *GsEXPB1* aktarılmış ve aktarım sonucunda *GsEXPB1*'nin soğan epidermal hücrelerinin duvarında lokalize olduğu saptanmıştır. *GsEXPB1*'in aşırı ekspresyonu sonucunda saçak köklerinin sayısını ve kök uzunluğunu tuz stresine karşı önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır (Feng, Li vd. 2022).

Triticum aestivum L.'de yapılan çalışmadan elde edilen RNA-seq verileri ve RT-qPCR analizi sonuçlara göre; *TaEXPA4-A*, *TaEXPA5-A*, *TaEXPA6-A*, *TaEXPA8-A* ve *TaEXPB8-A* köklerde spesifik olarak ifade edilirken, *TaEXPA1-A*, *TaEXPA1-D*, *TaEXPA12-A* ve *TaEXPB1-A* genlerinin yapraklarda yüksek ifade seviyesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, yukarıda belirtilen genlerin buğdayın büyümesinde ve gelişmesinde önemli roller oynadığını düşündürmektedir (Han, Liu vd. 2019).

Ziziphus jujuba Mill. yapılan gen ifade analizine göre, *ZjEXP*'lerin bitkide çeşitli gelişim aşamalarındaki dokularda farklı ifade seviyelerine sahip olduğunu ortaya çıkmıştır. *ZjEXP* genlerinden *ZjEXPA4* ve *ZjEXPA6*'nın meyvelerde, *ZjEXPA3* ve *ZjEXPA5* genlerinin çiçeklerde ve *ZjEXPA7* geninin ise özellikle genç yapraklarda ifade edildiği sonucuna varılmıştır (Hou, Zhang vd. 2019).

Fragaria vesca'dan elden edilen analiz sonuçlarına göre, *FvEXP* genlerinin çilek gelişimi ve olgunlaşmasının farklı aşamaları arasında farklı ekspresyon paternlerine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bunlar arasında; *FvEXPA9*, *FvEXPA12* ve *FvEXPA27* çileğin olgunlaşma aşamasında, *FvEXPA9* ve *FvEXPA12* renklenmeye başladığı aşamada yüksek oranda ifade edilirken *FvEXPA27* olgunlaştığı aşamada yüksek oranda ifade edildiği saptanmıştır (Dong, Zou vd. 2022).

Corchorus olitorius bitkisindeki *CoEXP* genlerinin ifade analizlerine göre, bitkinin farklı bölgelerinde 20 tane *CoEXP*'nin ifade edildiği ortaya konulmuştur. Beş *CoEXPA*'nın ağırlıklı olarak bitkinin örtü dokularında ifade edilmesi bu genlerin bitki lifi biyosentezi ile ilişkisini düşündürmüştür. Bununla birlikte, üç *CoEXPA* ve bir *CoEXLB* odunsu dokularda ifade edildiği ortaya çıkmıştır (Hossain, Ahmed vd. 2022).

Abiyotik stresler bitkilerde büyümeyi ve verimi kısıtlayan ana faktörlerden biridir. Bitki hücre uzamasının geciktirilmesiyle bitki uzamasının kısıtlanması, bazı stres koşullarının gözle görülür etkilerinden biridir. Hücre büyümesinin düzenlenmesi, bitki büyümesi ve stres direnci için kritik öneme sahiptir. Bitki hücre duvarı, hücre şeklini belirler ve abiyotik ve biyotik streslere karşı ana bariyerdir. Expansinler, selüloz ve matris glikanlar arasındaki hidrojen bağlarını bozarak pH'a bağlı hücre duvarı gevşemesine aracılık eden bir hücre duvarı proteinleri sınıfıdır. Expansin gen ailesi üzerine yapılan daha önceki çalışmalardan yola çıkarak bu gen ailesinin stresle ilişkili olduğu saptanmıştır (yang Han, xiu Li vd. 2012).

Hordeum vulgare'de yapılan çalışmada *HvEXPB5* ve *HvEXPB6* genlerinin kuraklık stresi altında ekspresyon seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu artış expansin gen ailesinin kuraklık stresi ile ilişkisini kanıtlamaktadır (Liu, Fu vd. 2021).

Camellia sinensis L. bitkisinde yapılan bir çalışmada toplam 40 *Expansin* geni belirlenmiştir. Tespit edilen *Expansin*lerin %40'ının promotör bölgelerinde kuraklık stresiyle ilişkili cis elementlerinin varlığı expansinlerin bitkinin kuraklık stresine tepkisinde yer almış olabileceğini göstermektedir. Çalışma sonucunda 40 *Expansin*

geninden en az 15'inin, *in silico* olarak analiz edilen kuraklık stresiyle ilişkili olduğu bulunmuştur.

Citrullus lanatus'ta yapılan çalışmaya göre, bitkideki *CIEXLA1*, *CIEXLA6*, *CIEXLB1*, *CIEXLB2*, *CIEXPA5*, *CIEXPA10* genlerinin; soğuk stresi, kuraklık stresi, osmotik stres ve yeşil benekli mozaik virüsü gibi abiyotik ve biyotik streslere karşı oldukça duyarlı olduğu bulunmuştur. Bu durum bu genlerin abiyotik ve biyotik strese karşı yanıtlarda ortak sinyal yollarını kullandığını düşündürmektedir (Gao, Li vd. 2020).

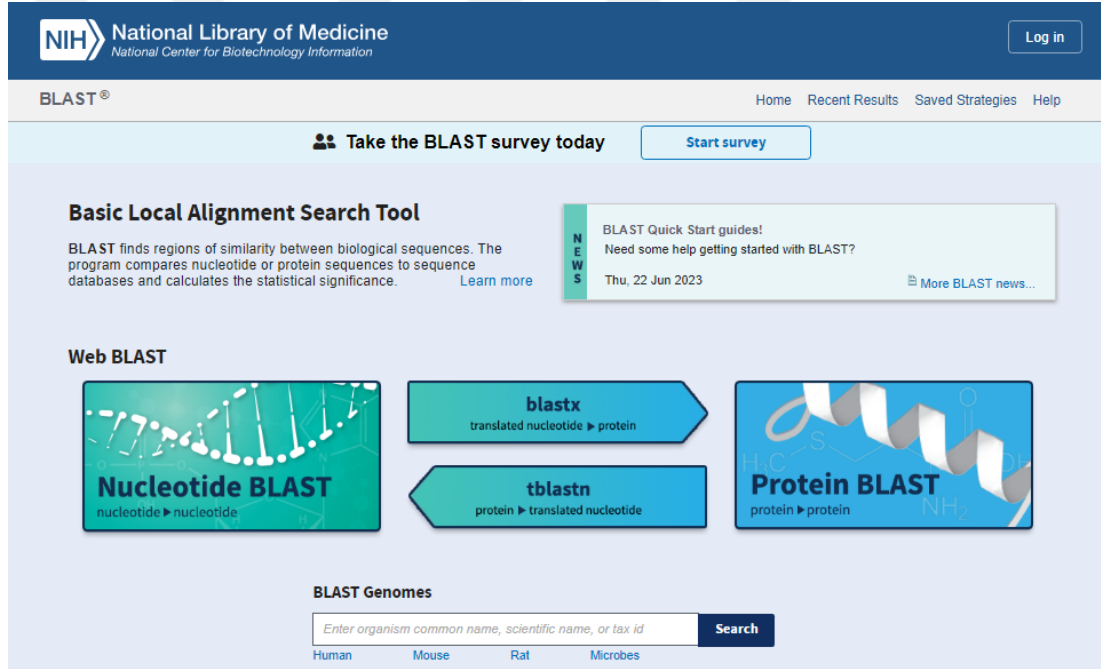
Zea mays bitkisinde yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; belirlenen sekiz *ZmEXP*'nin tüm promotör bölgelerinde GA veya ABA yanıtı veren cis elementi içermektedir. Bu durum, bu genlerin çeşitli bitki hormonlarından etkilenebileceğini göstermiştir. Mısır endospermilerine ABA ve GA uygulandıktan sonra RT-qPCR ekspresyon analizi ile doğrulanan bu bulgu, endosperm gelişimi sırasında *ZmEXP*'lerin düzenlenmesinde ABA ve GA'nın önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (Zhang, Yan vd. 2014).

Phyllostachys edulis'de yapılan promoter analizinde, tüm *PeEX*'lerde bitkinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli ABA yanıt elementi olan ABRE promotör elementi bulunmaktadır. Bu genlerin ekspresyon seviyelerinin PEG stres koşulları altında önemli ölçüde arttığı saptanmıştır (Jin, Zhuo vd. 2020).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

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

Yapılan bu çalışmada ilk olarak fasulye bitkisinin biyoinformatiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Üyelerin belirlenmesinde NCBI (blastp) veri tabanı kullanılmıştır. *Arabidopsis thaliana* bitkisinin EXPA, EXPB, EXLA ve EXLB üyeleriyle protein BLAST yapılmıştır. Bu BLAST karşılaştırılmasında protein dizilerinin yüzde benzerlikleri ve E-değerleri belirlenmiştir. Sonuç olarak benzerlik oranı %50 olan ve E-değeri 10^{-15} 'ten az olan gen üyeleri çalışmaya dahil edilmiştir.

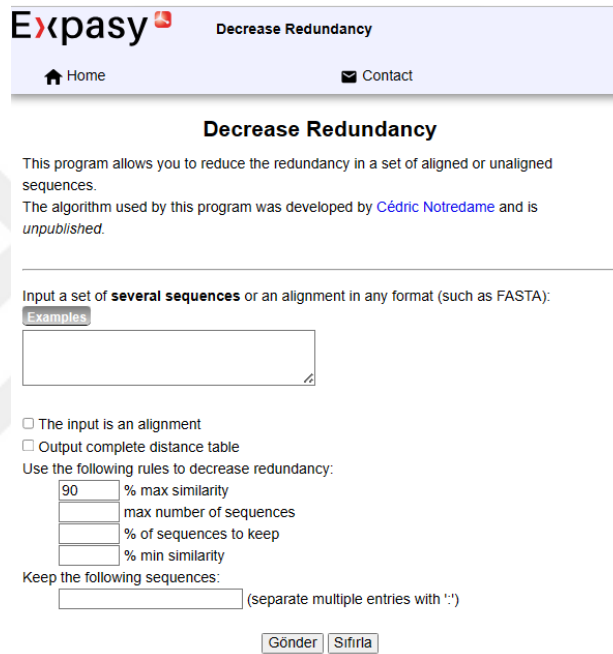


Şekil 3.1 NCBI blast veritabanı arayüzü

EMBL-EBI'ya ait Pfam database (<http://pfam-legacy.xfam.org/>) aracılığıyla ve farklı türlere ait *Expansin* gen ailesine ait yapılan çalışmalar incelenerek PFAM kodları belirlenmiştir; PF3330 ve PF1357'dir. Belirtilen PFAM kodları, Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) veri tabanı tarafından desteklenmiştir. Aynı PFAM koduna sahip olmayan üyeler çalışmaya dahil edilmemiştir. Pfam, genomları analiz etmek için kullanılan veri tabanıdır. Her Pfam ailesi için belirli bir protein dizi hizalaması

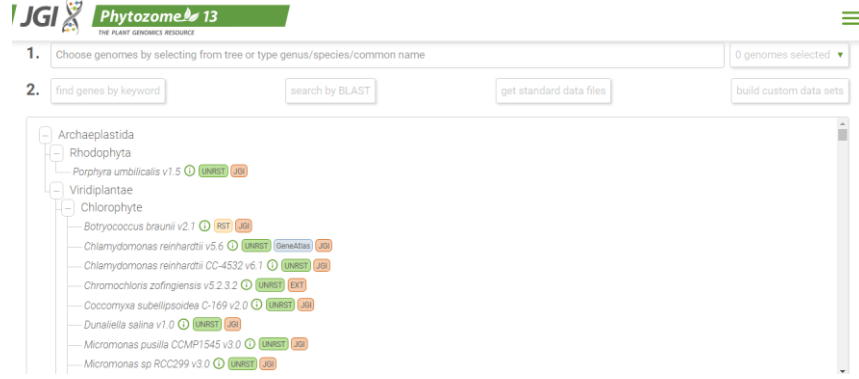
bulunmaktadır. HMM profili, hizalamadan sonra otomatik olarak oluşturulur ve HMMER yazılımı kullanılarak pfamseq adlı bir dizi veri tabanında aranır (Mistry, Chuguransky vd. 2021).

Phaseolus vulgaris bitkisinde tanımlanan *Expansin* genlerinin protein dizileri arasında benzerlik bulunup bulunmadığını kontrol etmek için ‘decrease redundancy’ veritabanı kullanılmıştır. Birbirlerine benzerliği %90 ve üzeri olan diziler çalışmaya dahil edilmemiştir.



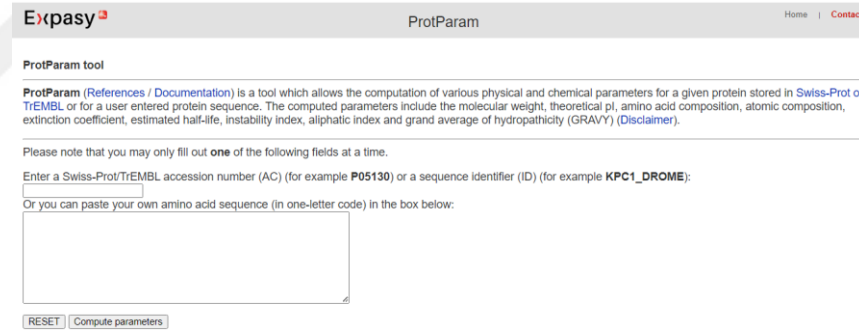
Şekil 3.2 ‘Expasy Decrease Redundancy’ programı

Phytozome veri tabanı; genlerin sekansı, yapısı ve genom organizasyonu düzeyinde bilgi sağlamaktadır (Goodstein, Shu vd. 2012). Phytozome Veri Tabanı kullanılarak *Expansin* gen ailesinin belirlenen üyelerine ait CDS, peptid ve genom dizileri FASTA formatında elde edilmiştir.



Şekil 3.3 Phytozome veri tabanı

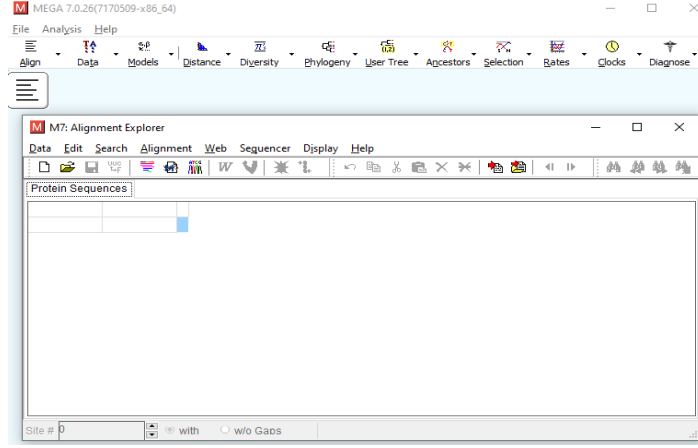
Expasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), bir protein dizisinden çıkarılabilecek çeşitli fizikokimyasal özellikleri hesaplamaktadır. Bu özellikler; proteinin moleküler ağırlığı, pI değeri ve alifatik indeks değerlerini kapsamaktadır (Gasteiger, Hoogland vd. 2005). Tanımlanan protein dizileri Expasy ProtparamTool aracılığı ile fiziksel ve kimyasal olarak tanımlanmıştır.



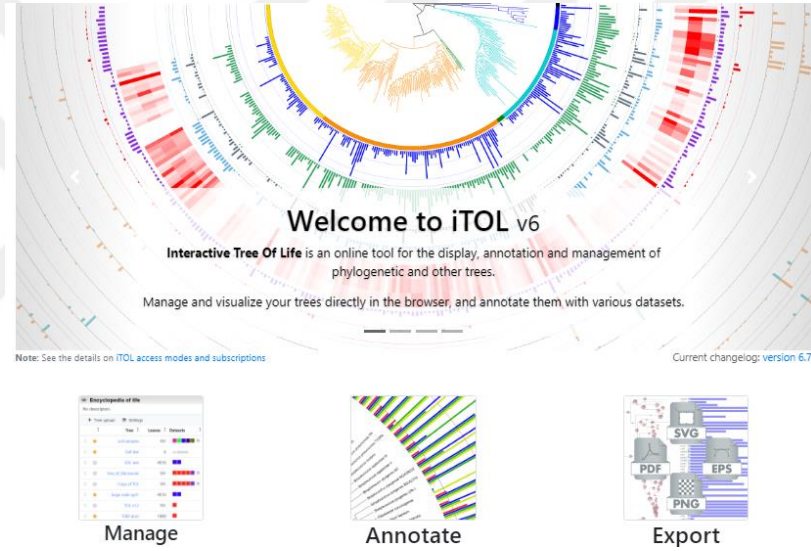
Şekil 3.4 Expasy ProtParam aracı

3.2 Expansin Ailesi Filogenetik Analizleri

Fasulyedeki Expansin üyelerinin protein dizileri ile *Arabidopsis thaliana*'daki Expansin üyelerine ait protein dizileri filogenetik ağaç oluşturulma amacıyla MEGA7 programı kullanılarak Clustal-W ile hizalanmıştır (Kumar, Stecher vd. 2016). Hizalanan proteinler yine MEGA7 programıyla 1000 bootstrap değeri alarak Maximum Likelihood (ML) yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç elde edilmiştir. Oluşturulan ağaç web tabanlı bir araç olan iTOL tarafından renklendirilmiştir (Letunic ve Bork 2021).



Şekil 3.5 MEGA 7.0 Programı



Şekil 3.6 iTOL Veri Tabanı

3.3 *Expansin* Üyelerinin Domain, Motif ve Gen Yapısı Analizleri

Expansin gen ailesinin protein dizileri kullanılarak domain ve motif yapıları tespit edilmiştir. Korunmuş motif analizi MEME Suite (Bailey, Johnson vd. 2015) çevrimiçi aracında yapılmış olup domain yapıları NCBI-CDD Domain sitesinden elde edilmiştir (Marchler-Bauer, Derbyshire vd. 2015). Motif sayısı 10 olarak seçilmiştir. Ekzon ve intron analizi için gerekli veriler JGI Phytozome 13 'den indirilmiştir (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). TBTools programı kullanılarak sonuçlar bir araya getirilmiştir ve görselleştirilmiştir (Chen, Chen vd. 2020). Elde edilen görüntü ile birlikte ekzon-intron,

motif ve domain yapıları karşılaştırılarak elde edilen ağacın ağacın doğruluğu kontrol edilmiştir.

Şekil 3.7 MEME V5.4.1 çevrimiçi aracı

Şekil 3.8 NCBI-CDD domain aracı

Refine selections

0 files selected

Add to Cart

☐ Show Most Relevant Results
☒ Show All Results

379 results
foundDatasets per
page:

10 ▾

<

1

2

3

4

5

...

>

Phytozome ▾



Search by organism, project name/ID, or PI name

Show Filters



Genome

Populus trichocarpa v1.1

Number of files

473

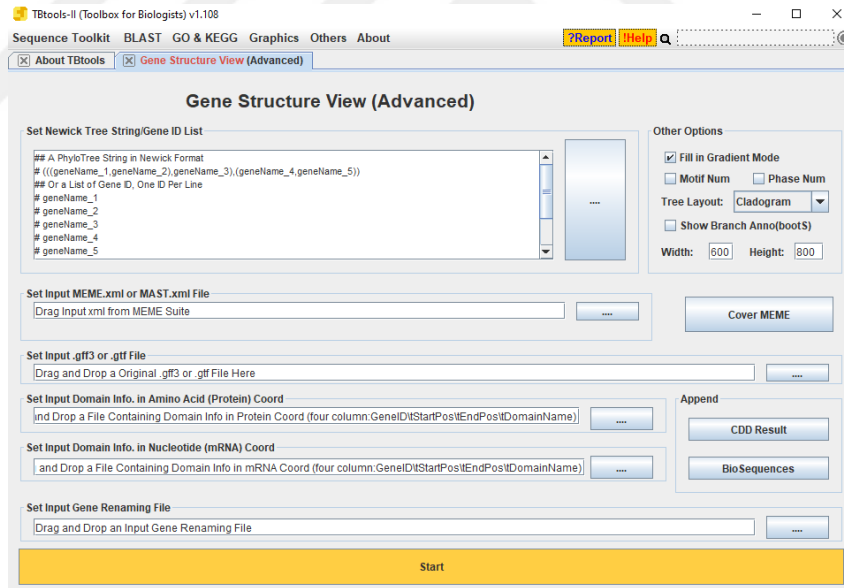
Total file size

6 GB

Select



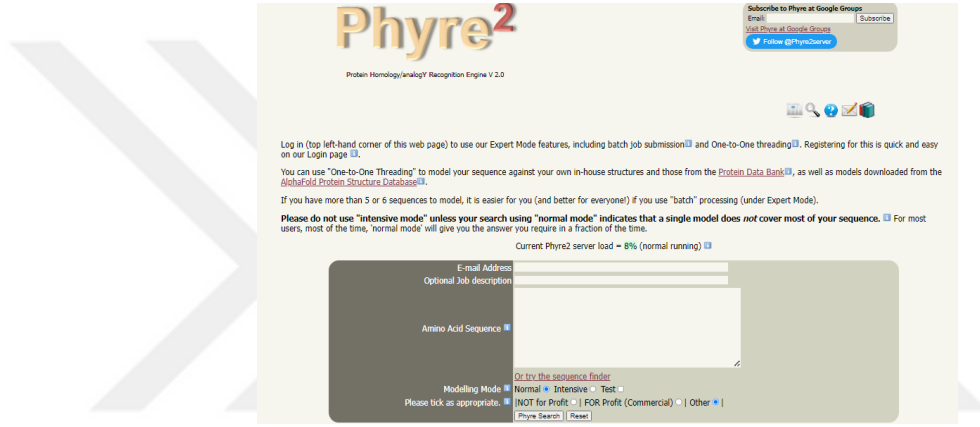
Şekil 3.9 Phytozome JGI Data Portal



Şekil 3.10 TBtools programı

3.4 PvEXP Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemesi

Phyre2 veri tabanı (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) , protein yapısını, işlevini ve mutasyonlarını analiz etmek için kullanılan web tabanlı bir araçtır (Kelley, Mezulis vd. 2015). Bu araç kullanılarak proteinlerin 3 boyutlu yapıları peptit sekansları aracılığıyla elde edilmektedir. Elde edilen protein modellerinin güvenilirlik oranları değerlendirilmiştir ve güven aralığı %90 ve üstü proteinler alınmıştır.



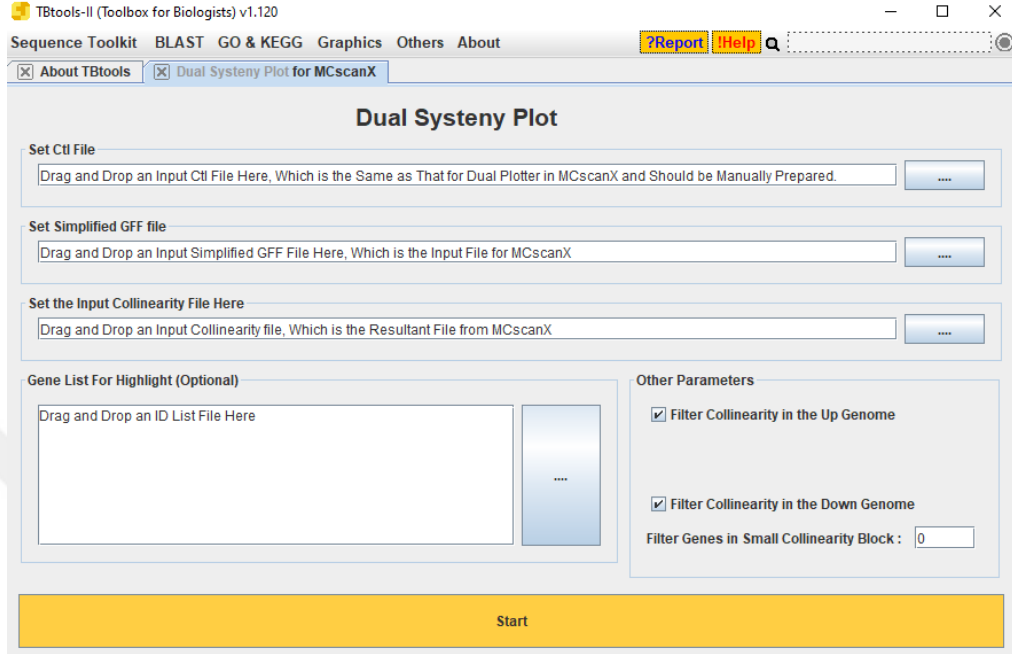
Şekil 3.11 Phyre2 veri tabanı

3.5 Fasulyede *Expansin* Gen Ailesi Sinteni Analizi ve Gen Duplikasyonları

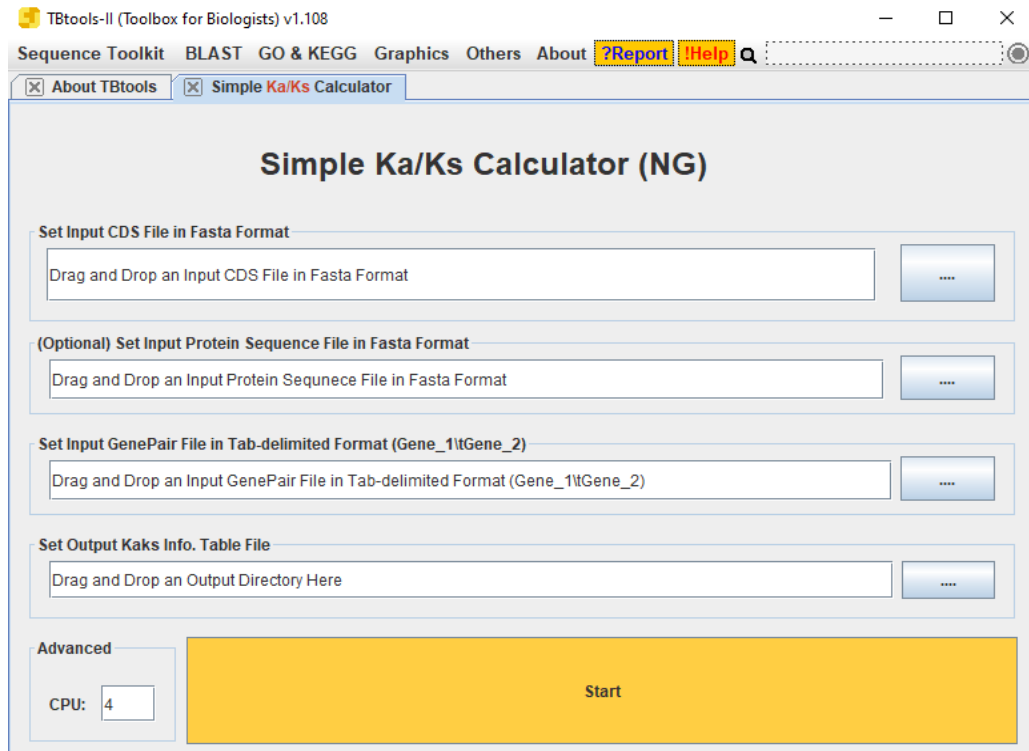
Sinteni, farklı türlerin genomları arasında homolog genlerin korunması olarak tanımlanabilir (Liu, Hunt vd. 2018). Sinteni analizi, genlerin evrimsel yörüngesini anlamak için oldukça önemlidir (Zhao ve Schranz 2017). *P. vulgaris* ile *A. thaliana* ve *G. max*'de bulunan *Expansin* genlerinin ortologları TBtools programıyla tespit edilip görselleştirilmiştir. Ortolog gen çiftleri belirlendikten sonra TBtools programıyla Ka/Ks değerleri elde edilmiştir. Duplikasyonların oluşum zamanı MYÖ cinsinden $T=Ks/2\lambda$ ($\lambda=6.5E-9$) formülüyle elde edilmiştir.

P.vulgaris L.'deki *Expansin* gen ailesindeki tandem ve segmental duplikasyonları TBtools programı kullanılarak tespit edilmiştir. Ka/Ks hesapları yapılmıştır ve genlerin

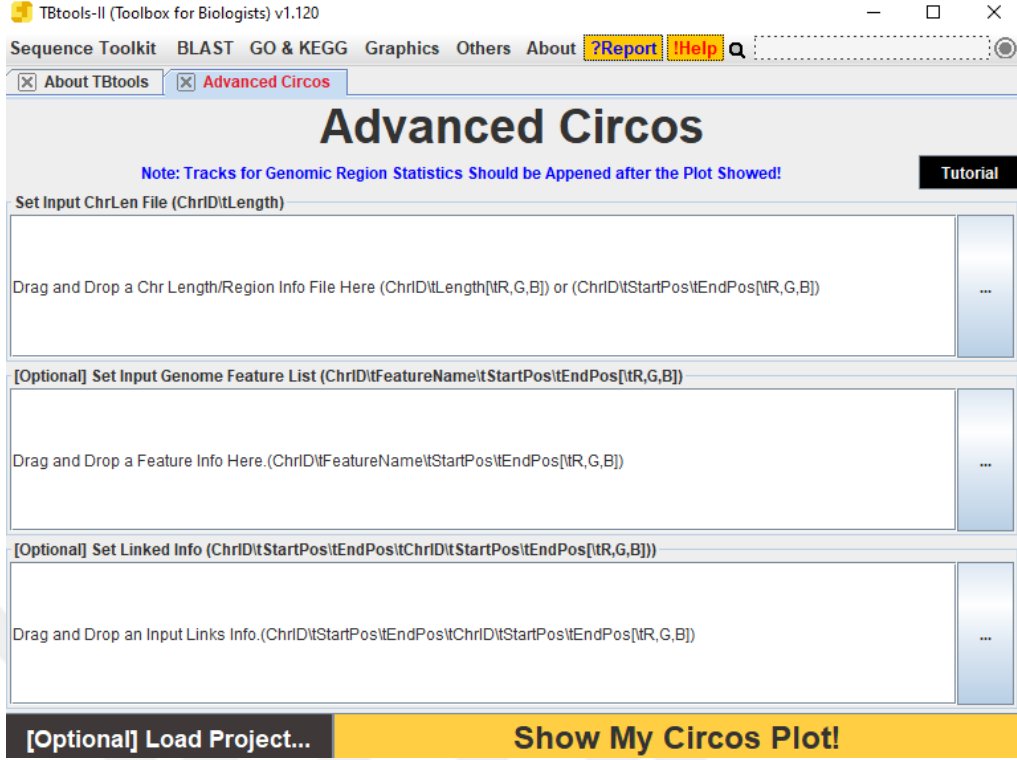
kaç milyon yıl önce ayrıldığı saptanmıştır. Tespit edilen duplikasyonlar yine TBtools programı kullanılarak görselleştirilmiştir.



Şekil 3.12 TBtools sinteni hesaplama aracı



Şekil 3.13 TBtools Ka/Ks hesaplama aracı

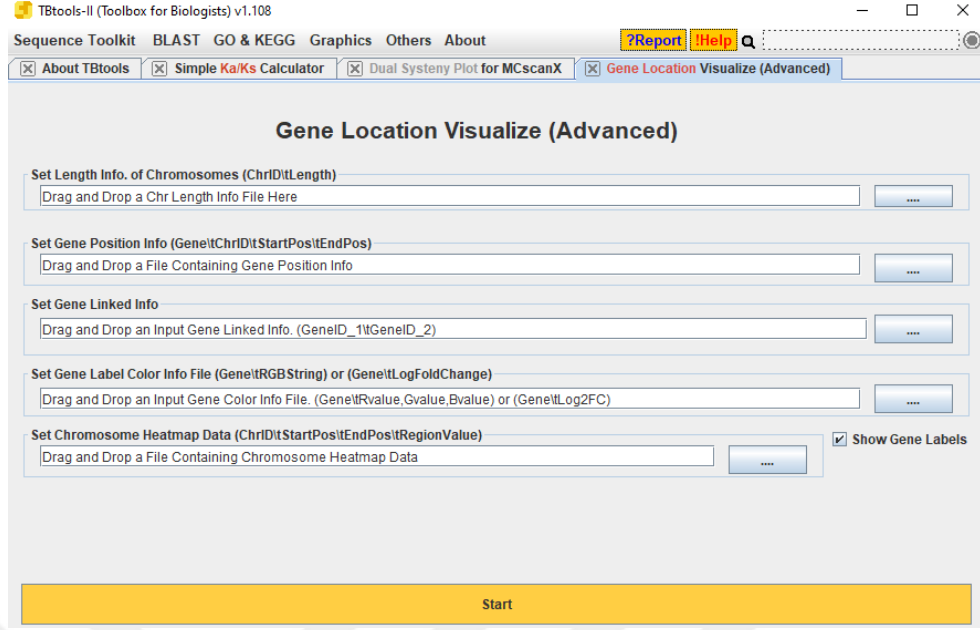


Şekil 3.14 TBtools circos programı

3.6 Fasulyede Tanımlanan *Expansin* Genlerinin Kromozomal Dağılımı ve Promotor Bölgelerinin Belirlenmesi

TBtools programında gen üyelerinin Phytozome aracılığıyla elde edilen başlangıç ve bitiş pozisyonları kullanılarak *Expansin*lerin kromozomal lokasyonları gösterilmiştir.

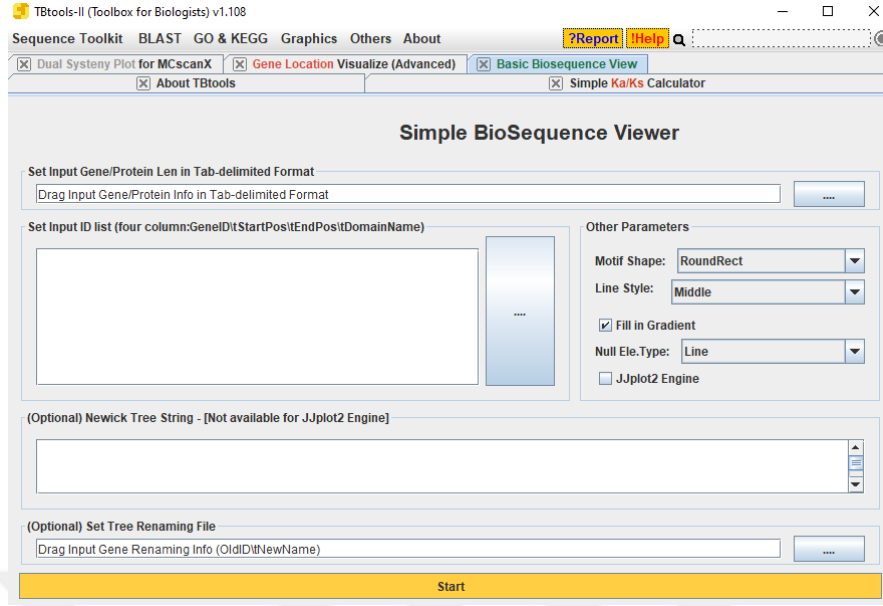
Phytozome veri tabanı yardımı ile genlerde 1500 baz çifti geriye gidilerek promotor bölgesi belirlenmiştir. PlantCARE veri tabanı ile promotor bölgelerindeki cis-düzenleyici elementlere ulaşılmıştır. Bulunan cis elementlerinin isimleri ve fonksiyonları tablo haline getirilmiştir. Promotorlar yakınındaki genlerin transkripsiyonunu düzenleyen kodlayıcı olmayan DNA bölgeleridir (Wang, Jia vd. 2019) Bu cis elementlerinin görselleştirilmesi TBtools programında yapılmıştır.



Şekil 3.15 TBtools aracılı gen lokasyonlarının belirlenmesi



Şekil 3.16 PlantCARE veri tabanı



Şekil 3.17 TBtools aracılı cis elementlerinin belirlenmesi

3.7 Expansin Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri

P.vulgaris'teki proteinlerin çekirdek, mitokondri, kloroplast vb. hücre lokalizasyonunu belirlemek için WOLF SPORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) ve CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) kullanılmıştır.

WoLF PSORT

Protein Subcellular Localization Prediction

[about WoLF PSORT](#) [WoLF PSORTについて](#) [links](#) [Example Output](#)

Please select an organism type:

- ☐ Animal
- ☐ Plant
- ☐ Fungi

Please select input method:

- ☒ From Text Area
- ☐ From File

Input Filename:

Dosya seçilmedi

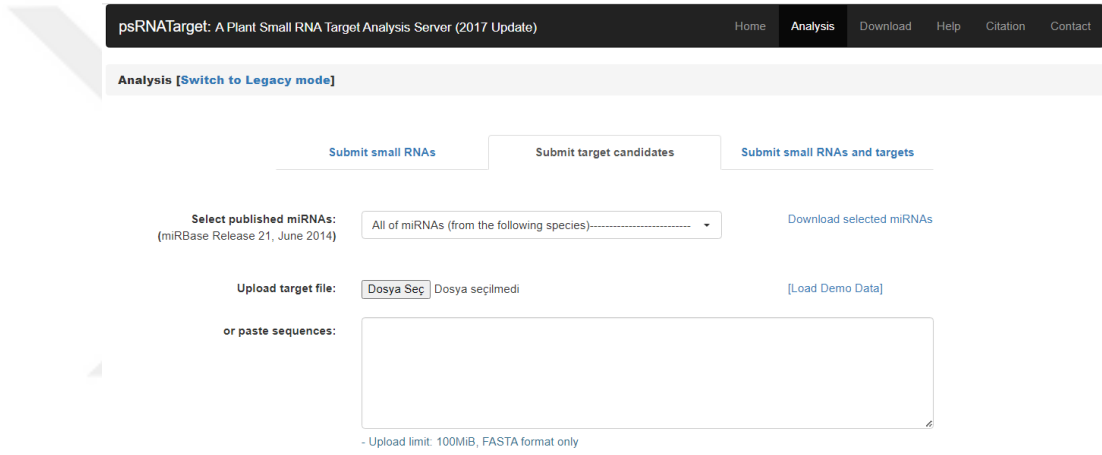


Text Area: Enter multifasta format protein sequence(s) here.

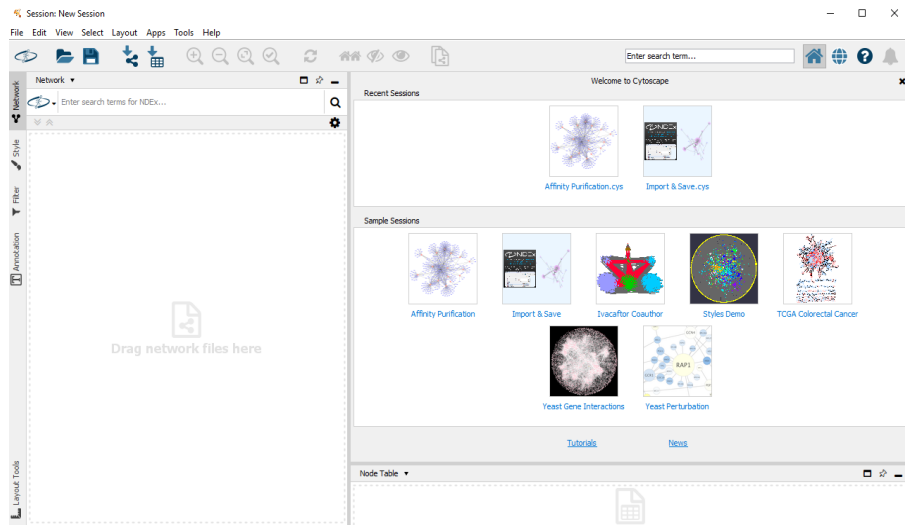
Şekil 3.18 WoLF PSORT çevrim içi aracı

3.8 MikroRNA'ların (miRNA) Tespiti ve Hedef *Expansin* Genlerin Belirlenmesi

Expansin genlerinin CDS dizileri ve bitki miRNA'ları psRNATarget Server (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>) ile hizalanmıştır ve hizalama sonucunda hedeflenen genler ve miRNA erişim numaraları elde edilmiştir. Fasulyedeki miRNA dizilerine PmiREN (<http://www.pmiren.com/>) veri tabanından ulaşılmıştır. miRNA'nın hedef gen homologlarının güvenilirliğini doğrulamak için EST (NCBI) dizilerine karşı blastlama (blastx) yapılmıştır. Sonuçları görselleştirmek için Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) programı kullanılmıştır.



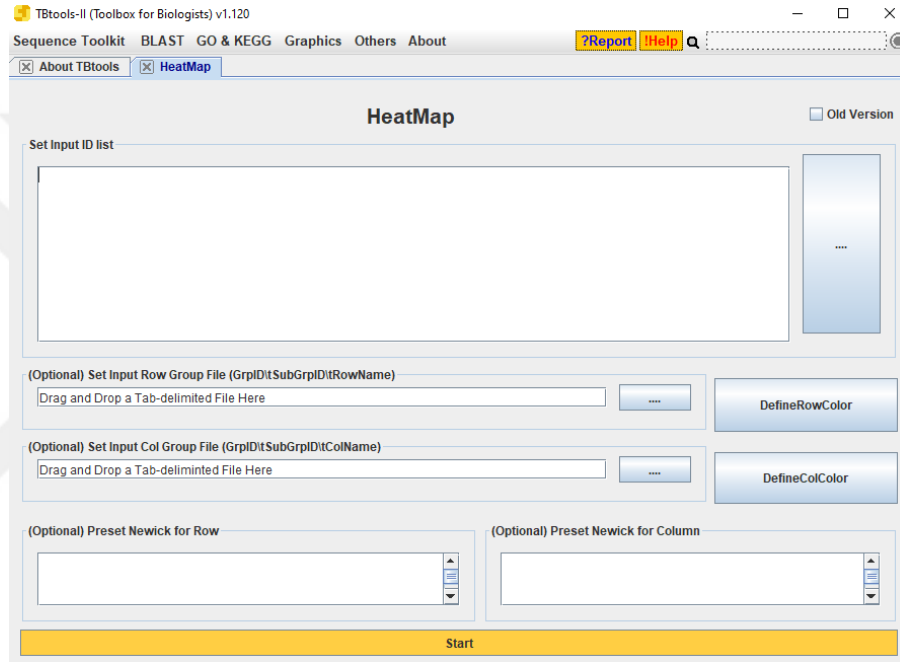
Şekil 3.19 psRNATarget programı



Şekil 3.20 Cytoscape programı

3.9 Expansin Genlerinin *In Siliko* Gen İfade Analizi

Phytozome veri tabanı kullanılarak Expansin genlerinin mRNA seviyelerine ulaşılmıştır. Illumina RNA-seq verileri Sequence Read Archive'den (SRA) elde edilmiştir. CLC-Genomics programı ile veriler normalize edilmiştir. Elde edilen RPKM verileri, Log2 formuna dönüştürülerek kaydedilmiştir. Ardından Tertools programı kullanılarak anlamlı görsel verilere çevrilmiştir.



Şekil 3.21 TBtools aracılı ısı grafiklerinin oluşturulması

3.10 Fasulye Bitkisinde Büyüme Koşulları ve Stres Uygulanması

Bu çalışmada bir fasulye çeşidi olan Zülbiye kullanılmıştır. Tohumlardan 48 adet seçilerek distile su içinde 2 saat bekletilmiştir, daha sonra toprakları nemli olacak şekilde saksılar hazırlanmıştır. Her saksıdaki toprak ağırlığı 55 gr olarak ayarlanmıştır ve tohumlar saksılara ekilmiştir. Ekim işleminden sonra bitkiler, bitki yetiştirme kabine alınmıştır. Bitki yetiştirme kabini koşulları +25°C sıcaklıkta %70 nem ve 50 mmol m⁻² s⁻¹ fotosentetik foton akısına sahip olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiler Hoagland çözeltisi ile beslenmiştir. Hoagland çözeltisi; 2 mM Ca, 10–6 M Mn, 4 mM NO₃, 2.10–7

M Cu, 1 mM Mg, 10^{-8} M NH_4 , 2 mM K, 10^{-6} M Zn, 0.2 mM P, 10^{-4} M Fe ve 10^{-6} M B olan makro ve mikro besinler içermektedir. Makro besinler K_2SO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve KCl iken mikro besinler H_3BO_3 , MnSO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NH_4Mo , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içerir. Bitkilerin büyüme sürecinde her gün düzenli olarak yerleri değiştirilmiştir. Bitki ekiminin 4. gününden sonra bitkilerin ilk üç yapraklı büyüme aşaması gözlemlenmiştir. Ekimden sonraki 8. günde ise 48 bitkinin yarısına kuraklık stresi uygulanmaya başlanmıştır. Stres uygulaması başladığı günden itibaren düzenli olarak bitki ağırlıklarının ölçümü alınmıştır. Daha sonra bitkilerden örnekler alınmış ve numuneler havanda sıvı azot ile ezildikten sonra -80°C 'de saklanmıştır.

3.11 Total RNA İzolasyonu

-80°C 'lik buzdolabında saklanan örnekler RNA izolasyonu için çıkartıldıktan sonra sıvı azot içinde tutulmuştur. Total RNA izolasyonu için FavorPrep™ Plant Total Mini Kit'i kullanılmıştır.

FavorPrep™ plant total mini kit protokolü

1. Bitki örneği sıvı azotla toz haline getirildikten sonra 100 mg kadar alınan bitki örnekleri ependorf tüplere konulur.
2. Tüplere 500 μL FARB Tamponu eklenerek vortekslenir. 25 'de 5 dakika inkübasyon yapılır.
3. Yeni toplama tüpleri alınarak içlerine filtre kolonu yerleştirilir ve örneklerin karşımı filtre kolonuna eklenir. Ardından ($\sim 18.000 \times g$) 1 dakika olmak üzere santrifüj yapılır.
4. Supernatant (üst faz) toplama tüpünden yeni bir tüpe aktarılır ve süpernatantın hacmi ayarlanır.
5. 1 hacim (süpernatant miktarı) %70 RNaz içermeyen etanol ilave edilir ve vorteksleyerek karıştırılır.
6. Bir FARB Mini Kolonunu toplama tüpüne yerleştirilir ve sonra etanol eklenmiş numune karışımını FARB Mini Kolona aktarılır. 1 dakika boyunca tam hızda

santrifüjlenir, sıvıyı attıktan sonra ve FARB Mini Kolonunu Toplama Tüpüne geri konulur.

7. Örnek karışımın geri kalanı için 6. adım tekrarlanır.
8. FARB Mini Kolona 500 µl Yıkama Tamponu 1 eklendikten sonra, 1 dakika tam hızda santrifüjlenir. Alta süzülen sıvı kısmı atılır ve FARB Mini Kolonunu Toplama Tüpüne geri getirilir.
9. FARB Mini Kolona 750 µl Yıkama Tamponu 2 eklenir, 1 dakika tam hızda santrifüjlenir. Sıvı kısmı atıldı ve FARB Mini Kolonu Toplama Tüpüne geri konulur.
10. Bir yıkama daha için 10. adımı tekrarlanır.
11. FARB Mini Kolonu kurutmak amacıyla 3 dakika daha tam hızda santrifüjlenir.
12. FARB Mini Kolonunu bir Elüsyon Tüpüne yerleştirilir.
13. FARB Mini Kolonunun membran merkezine 30 ~ 50 µl RNaz içermeyen ddH₂O eklenir. FARB Mini Kolonu 1 dakika bekletilir. (Etkili elüsyon için, RNaz içermeyen ddH₂O'nun membran merkezine dağıtıldığından ve tamamen emildiğinden emin olunmalıdır).
14. RNA'yı ayırtırmak için FARB Mini Kolonunu 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlenir.
15. RNA -80C'de saklanır.

3.12 cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

RNA'dan cDNA oluşturmak için iScript™ cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için Thermalcycler PCR cihazı kullanılmıştır. Total hacim 10 µl olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Aşağıdaki tabloda oranları verilmiştir (Çizelge 3.1) cDNA sentezinde kullanılan döngüler için seçilen ayarlar ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
iScript Reaksiyon Karışımı	4 µl
iScript Ters Transkriptaz Enzimi	1 µl
Nükleaz içermeyen su	12 µl
RNA kalıbı	3 µl

Çizelge 3.2 cDNA sentezindeki reaksiyon koşulları

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

3.13 Primer Dizaynı

RNAseq verilerine dayalı olarak *PvEXPA-01*, *PvEXPA-04*, *PvEXPA-05*, *PvEXPA-08*, *PvEXPA-13*, *PvEXPA-16*, *PvEXPA-17*, *PvEXPA-19* ve *PvEXPA-22* genleri seçilmiştir. Integrated DNA Technologies IDT, Primer Quest programı kullanılarak seçilen genlere en uygun primerler tasarlanmıştır. Primerler tasarlanırken; primerin bazı sayısına, erime sıcaklıklarına, GC oranlarına ve birbirleriyle homodimer ve heterodimer oluşturmamasına özen gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 *PvEXP* genleri için dizayn edilen primerler

Primer Adı	Primerin Yönü	Sekans	Baz Sayısı	T _m (°C)	GC (%)
PvEXPA-01	İleri	TGGGTAGCCTCATTGGATTATG	22	54.4	45.5
	Geri	AGTGCCTGAAGCATCACTAC	20	54.7	50
PvEXPA-04	İleri	GCCATGCCCATGTTCCCTTA	19	55.5	52.6
	Geri	GAACCTCATCCCTCCTTCTTTC	22	54.9	50
PvEXPA-05	İleri	GGCTTGTTGTTATGGGAATCT	21	55	47.6
	Geri	GTGGTCACTCACACACCTTATC	22	55.2	50
PvEXPA-08	İleri	GGGCTACGATTCTCTTTCCAA	21	54.6	47.6
	Geri	CACTCAGGTCCACTTCCTTTC	21	55.2	52.4

Çizelge 3.3 *PvEXP* genleri için dizayn edilen primerler (devam)

Primer Adı	Primerin Yönü	Sekans	Baz Sayısı	T _m (°C)	GC (%)
PvEXPA-13	İleri	GGCAAGCCATGTCAAGAAAC	20	54.8	50
	Geri	GGTGGTCACTACAAAGGAAAGA	22	54.6	45.5
PvEXPA-16	İleri	CACTGTAACCCTCCCAACAA	20	54.7	50
	Geri	AGTAAATCGCATCCCTCCTTC	21	54.4	47.6
PvEXPA-17	İleri	ACTGCTACAACTTCTGTCCTC	22	54.5	45.5
	Geri	AAGGCTGGTTCTGCCATATC	20	54.9	50
PvEXPA-19	İleri	TGCTGAGCCTGCTTTCTTAC	20	55.2	50
	Geri	GAACCTGATCCCTCCTTTCTTC	22	54.9	50
PvEXPA-22	İleri	GCGTGCTTTGAGATCAAGTG	20	54.5	50
	Geri	GTCGTTTGGAAGAGCGTAGT	20	54.8	50
PvACT	İleri	TGCATACGTTGGTGATGAGG	20	55	50
	Geri	AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	20	56.4	55

3.14 Real-Time PCR

Gene özgü primerler tasarlandıktan sonra RT-qPCR analizleri için iTaq Universal SYBR Green Supermix kullanılmıştır. Reaksiyonun doğru çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için reaksiyon sonunda T_m eğrileri kontrol edilmiştir. Reaksiyon koşulları ve bileşenleri Çizelge 3.4 ve 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 RT-qPCR için reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
SYBR Green Mix (2x)	5 µl
İleri Primer (10 µM)	0,5 µl
Geri Primer (10 µM)	0,5 µl
cDNA	1 µl
Su	3 µl

Çizelge 3.5 RT-qPCR için reaksiyon koşulları

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

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Expansin* Genlerinin Biyoinformatik Analizleri

Fasulye genomunda yapılan biyoinformatik analizler sonucunda 30 tane *Expansin* geni tanımlanmıştır. Belirlenen *Expansin* genleri, ait oldukları alt ailelere dayanılarak; *Pv-EXPA*, *Pv-EXPB*, *Pv-EXLA* ve *Pv-EXBL* şeklinde isimlendirilmiştir. *Expansin* genlerinin hangi kromozomda bulunduğu, başlangıç ve bitiş noktaları, protein uzunlukları, izoelektrik noktaları, moleküler ağırlıkları ve kararsızlık indekslerinin yanı sıra NCBI erişim numaraları Çizelge 4.1’de verilmiştir. *Expansin* genlerinin amino asit uzunluğu 245-275 aminoasit (aa) aralığında değişim göstermektedir. Moleküler ağırlıklarının ise 30206.48-26737.19 Da arasında olduğu belirlenmiştir. İzoelektrik noktalarına bakıldığında genlerin 7 tanesinin asidik, 23 tanesinin bazik olduğu görülmüştür. Proteinlerin kararsızlık indeksine bakıldığında ise 30 üyeden 26 tanesinin değeri 40’tan az, diğer 4 tanesinin ise kararsızlık indeksinin 40’tan yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum, gen ailesinin protein dizilerinin çoğunluğunun kararlı yapıda olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1 *PvEXP* genleri kataloğu

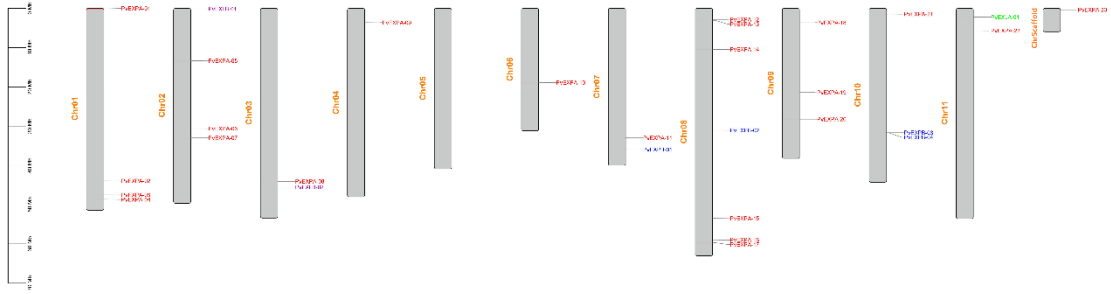
Phytozome Veri Tabanı Tanımlayıcısı	Gen Adı	Kromozom	Başlangıç Pozisyonu (bp)	Bitiş Pozisyonu (bp)	Protein Uzunluğu (aa)	pI	Moleküler Ağırlık (Da)	Alifatik İndeks	Kararsızlık İndeksi	GRAVY	Hücre İçi Lokalizasyon	NCBI Erişim No.
Phvul.001G003700.2	PvEXPA-01	1	211,726	214,06	255	8.98	27469.12	65.10	34.16	-0.021	Hücre Dışı Bölge	XP_007160632.1
Phvul.001G181600.1	PvEXPA-02	1	43,956,895	43,959,063	273	9.05	30206.48	68.94	25.61	-0.388	Hücre Dışı Bölge, Mitokondri	XP_007162798.1
Phvul.001G219700.1	PvEXPA-03	1	47,514,674	47,515,707	254	9.56	28121.35	73.39	29.30	-0.070	Hücre Dışı Bölge, Hücre Zarı	XP_007163263.1
Phvul.001G232600.1	PvEXPA-04	1	48,630,905	48,632,311	258	9.82	28066.07	64.30	42.06	-0.094	Hücre Dışı Bölge	XP_007163413.1
Phvul.002G001700.1	PvEXLB-01	2	127,767	129,960	251	6.22	28149.69	72.99	32.85	-0.337	Hücre Dışı Bölge	XP_007156590.1
Phvul.002G083600.1	PvEXPA-05	2	13,380,200	13,382,320	252	9.28	27065.46	68.93	32.76	-0.059	Hücre Dışı Bölge	XP_007157607.1
Phvul.002G152900.1	PvEXPA-06	2	30,638,213	30,639,852	266	9.45	29122.44	62.78	36.83	0.017	Hücre Dışı Bölge	XP_007158445.1
Phvul.002G170300.2	PvEXPA-07	2	33,002,856	33,004,576	246	9.32	26242.52	67.85	32.43	-0.091	Hücre Dışı Bölge	XP_007158645.1
Phvul.003G213800.1	PvEXPA-08	3	44,060,762	44,062,103	260	7.52	27841.57	68.73	32.51	0.113	Hücre Dışı Bölge	XP_007155577.1
Phvul.003G224800.1	PvEXLB-02	3	45,538,140	45,539,776	251	5.94	27921.30	67.57	34.98	-0.237	Hücre Dışı Bölge	XP_007155710.1
Phvul.004G030500.1	PvEXPA-09	4	3,632,907	3,635,003	250	9.17	27126.46	63.20	38.56	-0.140	Hücre Dışı Bölge	XP_007151247.1
Phvul.006G077200.1	PvEXPA-10	6	18,914,107	18,916,576	255	7.57	27262.56	64.67	29.27	-0.175	Hücre Dışı Bölge	XP_007146869.1
Phvul.007G207600.1	PvEXPA-11	7	32,999,374	33,000,655	254	9.21	27509.42	77.20	36.19	-0.047	Hücre Dışı Bölge	XP_007145077.1
Phvul.007G235300.1	PvEXPB-01	7	35,959,998	35,961,590	268	7.53	28555.32	69.14	40.29	-0.181	Hücre Dışı Bölge, Kloroplast	XP_007145394.1

Çizelge 4.1 PvEXP genleri kataloğu (devam)

Phvul.008G034700.1	PvEXPA-12	8	2,843,192	2,845,105	254	5.05	27693.09	64.88	29.96	-0.147	Hücre Dışı Bölge	XP_007139498.1
Phvul.008G037500.1	PvEXPA-13	8	3,075,997	3,077,603	246	9.11	26737.19	68.13	33.66	-0.079	Hücre Dışı Bölge	XP_007139528.1
Phvul.008G120700.1	PvEXPA-14	8	10,458,517	10,461,853	258	9.76	27859.72	71.51	29.47	0.003	Hücre Dışı Bölge	XP_007140533.1
Phvul.008G144100.1	PvEXPB-02	8	31,082,993	31,084,949	275	4.81	29245.53	73.45	46.40	-0.190	Hücre Dışı Bölge	XP_007140810.1
Phvul.008G232200.1	PvEXPA-15	8	53,489,728	53,491,721	260	9.40	27888.74	70.58	35.44	0.006	Hücre Dışı Bölge	XP_007141864.1
Phvul.008G240800.1	PvEXPA-16	8	58,962,721	58,965,019	269	7.60	29088.97	72.57	40.27	-0.079	Hücre Dışı Bölge	XP_007141964.1
Phvul.008G248000.1	PvEXPA-17	8	59,694,786	59,697,110	251	8.43	27219.63	66.14	34.28	-0.079	Hücre Dışı Bölge	XP_007142047.1
Phvul.009G019000.1	PvEXPA-18	9	3,641,658	3,643,695	256	8.63	27477.33	66.64	29.34	0.097	Hücre Dışı Bölge	XP_007136114.1
Phvul.009G142800.1	PvEXPA-19	9	21,430,379	21,432,162	252	7.53	27018.25	69.68	35.31	-0.062	Hücre Dışı Bölge	XP_007137631.1
Phvul.009G186400.1	PvEXPA-20	9	28,212,023	28,214,859	249	9.08	26768.19	73.65	32.11	-0.043	Hücre Dışı Bölge	XP_007138173.1
Phvul.010G010200.1	PvEXPA-21	10	1,473,804	1,476,777	258	9.68	27810.66	68.88	29.47	-0.056	Hücre Dışı Bölge	XP_007133996.1
Phvul.010G070900.1	PvEXPB-03	10	31,667,641	31,670,150	257	9.32	27532.69	77.47	22.27	-0.142	Hücre Dışı Bölge	XP_007134729.1
Phvul.010G071000.1	PvEXPB-04	10	31,708,480	31,709,705	266	4.89	28832.45	74.40	37.96	-0.164	Hücre Dışı Bölge	XP_007134730.1
Phvul.011G024801.1	PvEXLA-01	11	2,237,180	2,238,984	261	6.80	28350.07	81.49	37.20	-0.082	Hücre Dışı Bölge	XP_007135731.1
Phvul.011G063800.1	PvEXPA-22	11	5,701,936	5,703,968	259	9.37	28254.21	68.96	37.72	-0.002	Hücre Dışı Bölge	XP_007132063.1
Phvul.L006043.1	PvEXPA-23	scaffold_15	382,380	383,648	256	9.23	27770.67	67.54	39.53	0.002	Hücre Dışı Bölge	XP_007150329.1

4.2 Fasulyede *Expansin* Genlerinin Kromozomal Lokasyonu

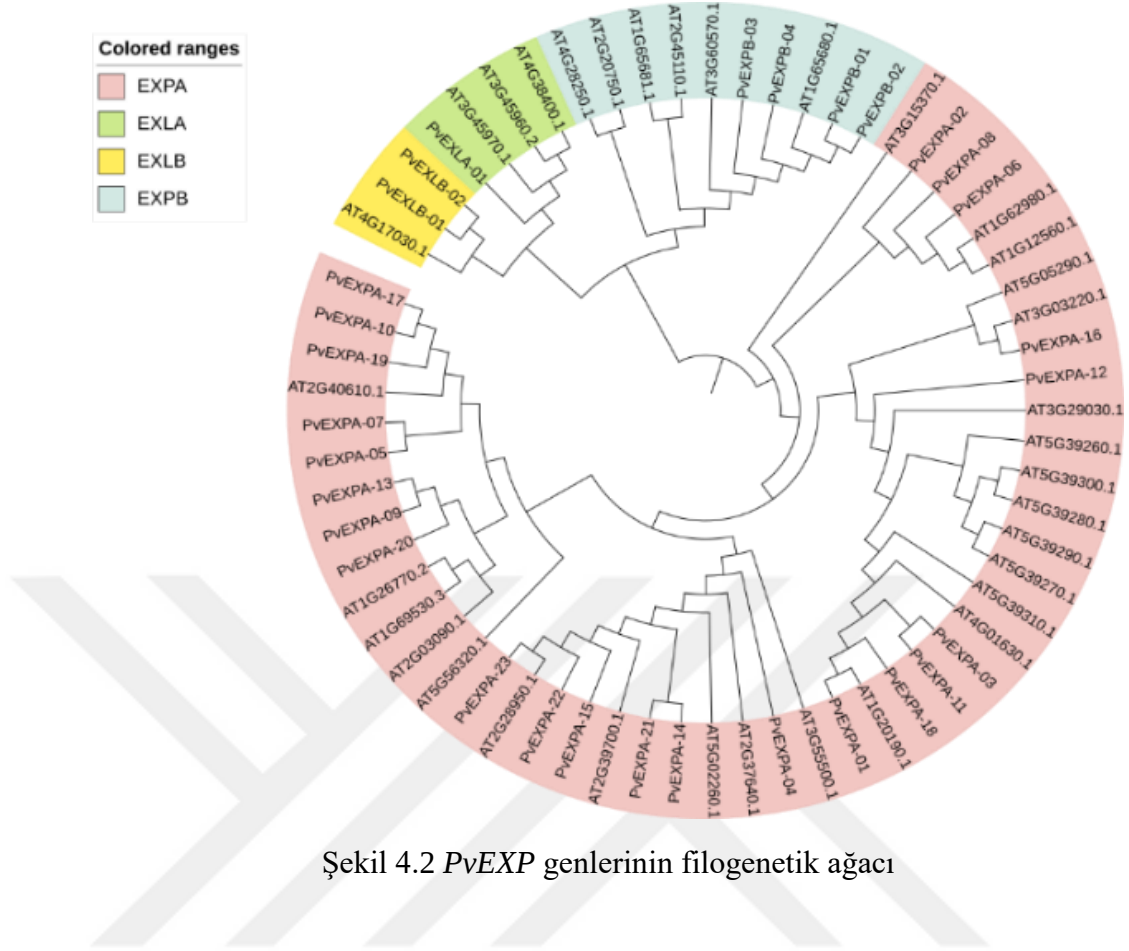
TBtools programı kullanılarak görselleştirilen *PvEXP* genlerinin kromozomal dağılımları Şekil 4.2’de verilmiştir. Fasulyede bulunan *Expansin* genlerinin isimlendirilmesi, bitkinin Latince isimlerinin (*Phaseolus vulgaris*) ilk harfleri ile *Expansin* gen ailesinin kısaltması kullanılarak *PvEXP*- şeklinde yapılmıştır. Genlerin kromozomdaki yerleşim sıralarına göre numaralandırmaları yapılmıştır. *Expansin* genlerinin 5. kromozom haricinde diğer tüm kromozomlarda lokalize olduğu görülmüştür. 1. ve 2. kromozomda 4, 3.kromozomda 2, 4. ve 6. kromozomda 1, 7.kromozomda 2, 8.kromozomda 7, 9. ve 10. kromozomda 3 ve 11. kromozomda 2 kromozom bulunmaktadır. Yeri tanımlanamayan *PvEXPA-23* geni *scaffold* olarak gösterilmiştir. Bu verilere bakıldığında en fazla gen 8. kromozomda, en az gen sayısı ise 4. ve 6. kromozomlarda gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1 *PvEXP* genlerinin kromozomal lokasyonları

4.3 Fasulyede *Expansin* Genlerinin Türler Arası Filogenetik Analizleri

Phaseolus vulgaris ve *Arabidopsis thaliana* türlerinde bulunan *PvEXP* genleri arasındaki evrimsel ilişkileri gözlemek amacıyla MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) programı kullanılarak protein dizileri hizalanıp filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu analiz için Maximum Likelihood metodu kullanılmıştır. Ağacın güvenilirliği açısından bootstrap değeri 1000 alınmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaç İTOL veri tabanı kullanılarak renklendirilmiştir. Filogenetik ağaç analizlerine göre *PvEXP* genlerinin esas olarak 2 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. Bir ana grupta tüm *EXPA* üyelerinin toplandığı belirlenmiştir. Diğer ana grupta ise *EXPB*, *EXLB* ve *EXLA* gen üyelerinin toplandığı görülmüştür.

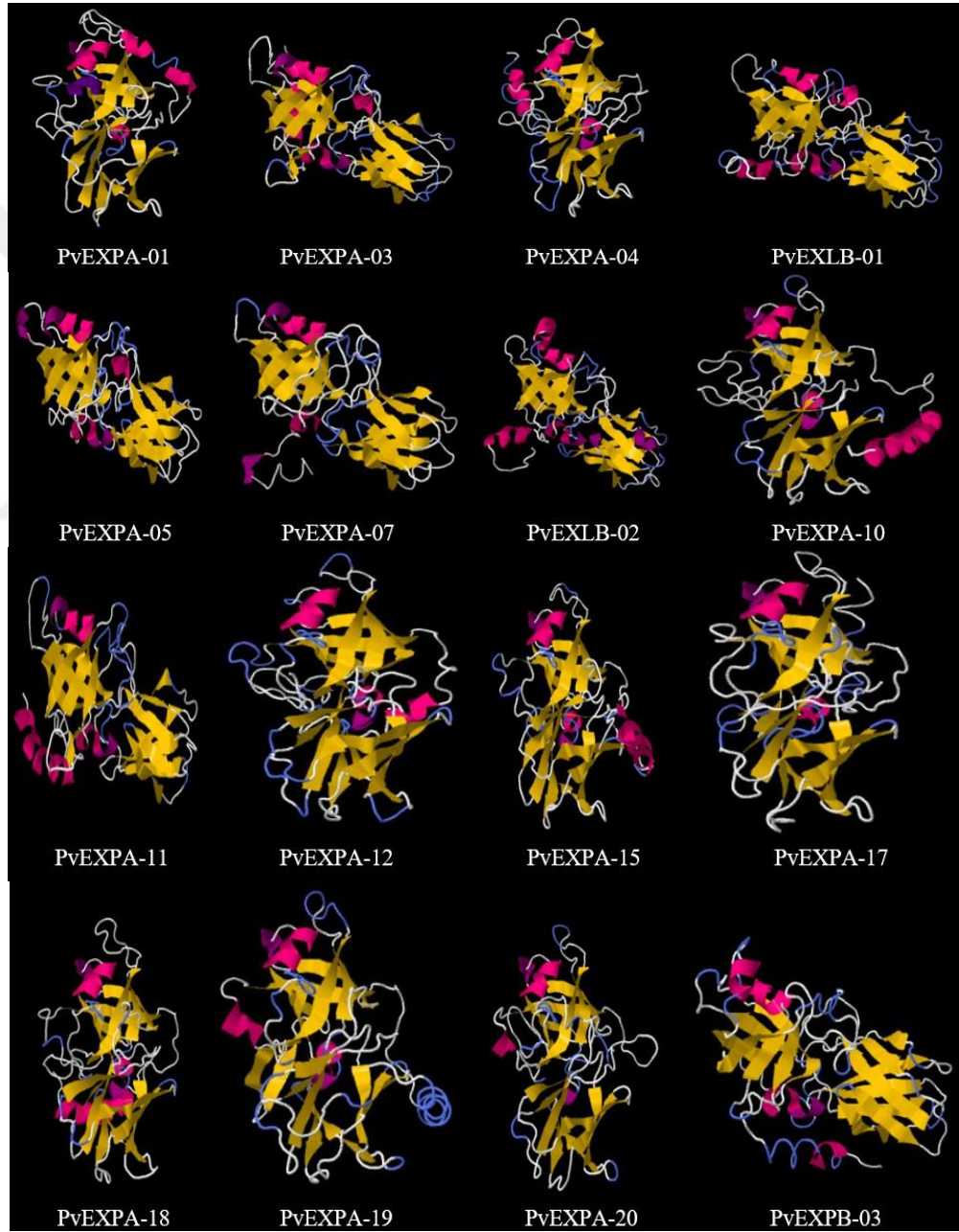


4.4 Fasulyede Expansin Proteinlerinin Motif, Domain ve Ekzon-İntron Analizleri

Yapılan domain analizinde gen ailesinin tüm üyelerinde aynı domainler saptanmıştır. Bunlar; pollen_allerg_1 ve DPBB_1 domainleridir. Bu domainler tüm organizmalarda *Expansin* gen ailesinin tipik domainleri olarak gösterilmiştir. DPBB_1 alanı genellikle GH45 ailesiyle ilişkilidir ve 2 katlı beta tabakası içerirler. Pollen_allerg_1, genellikle *Expansin*lerin C-terminalinde bulunan bir polen alerjenidir (Liu, Xu vd. 2021). Motif analizinde ise toplamda 10 tane motif taranmıştır. Motiflerin dizileri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Tüm gen üyelerinde ortak motiflere rastlanmıştır. Bunlar motif 6 ve motif 7'dir. EXPA üyelerinin her birinde 8 adet motife rastlanmıştır. Bu motifler; motif 1, motif 2, motif 3, motif 4, motif 5, motif 6, motif 7 ve motif 8'dir. EXLA gen üyesinde 4 adet motife rastlanmıştır. Bunlar ise motif 1, motif 2, motif 6 ve motif 10'dur. EXPA ve EXLA üyelerinde ortak motifler tespit edilmiştir. EXPB üyelerinde 4 adet motife rastlanmıştır. Bunlar; motif 6, motif 7, motif 9 ve motif 10'dur. Benzer motiflere sahip gen üyelerinin, filogenetik ağaçta da aynı dalda ve grupta çıkması filogenetik ağaç analizinin

4.5 Fasulyede Expansin Proteinlerinin 3 Boyutlu Homoloji Modellemeleri

Phyre2 kullanılarak yapılan proteinlerin 3 boyutlu homoloji modelleri aşağıda verilmiştir. Toplam 30 üye içinden 16 tane proteine yer verilmiştir. 3 boyutlu homoloji modelleme sonucunda güven aralığı %90 ve üzeri olan proteinlerin seçilmesine önem gösterilmiştir. 3 boyutlu protein yapılarında beta yapıları hakimdir.

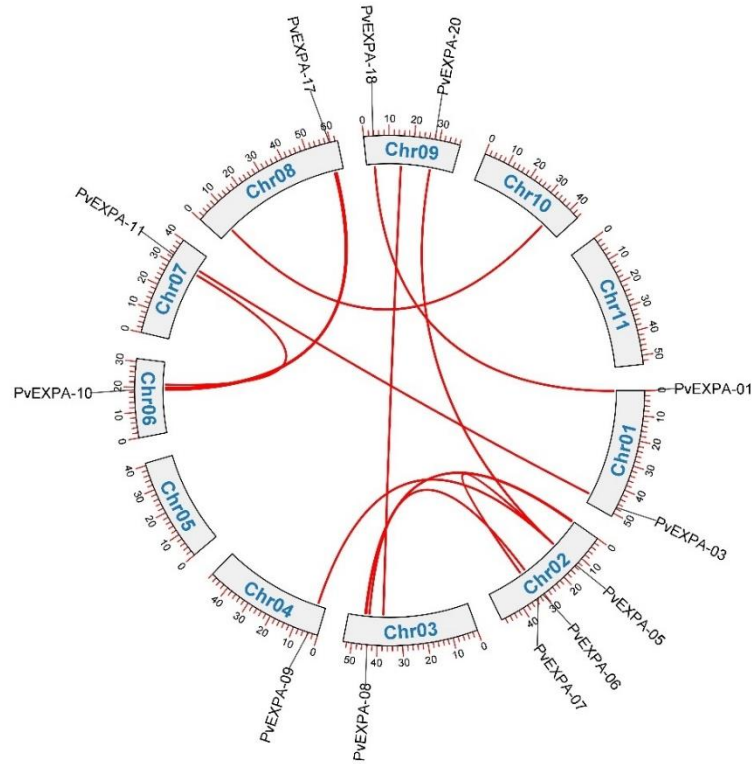


Şekil 4.4 PvEXP proteinlerinin 3 boyutlu yapıları

4.6 Fasulyede *Expansin* Gen Ailesi Gen Duplikasyonları ve Sinteni Analizi

Duplikasyonlar evrimsel süreçte çok büyük önem arz etmektedir. Gen duplikasyonları; tandem duplikasyon ve segmental duplikasyon olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Segmental duplikasyon, duplikasyona uğrayan gen dizisinin bir kromozomdan diğerine kopyalanmasıdır. Tandem duplikasyon ise duplike olan gen dizisinin orijinal duplikasyonla aynı kromozom üzerinde bulunduğu bir duplikasyon türüdür (Leister 2004). *Expansin* genlerinde yapılan duplikasyon analizlerine göre toplam 6 duplikasyon tespit edilmiştir. Bunlardan 1 tane tandem duplikasyon, 5 tanesi ise segmental duplikasyondur.

Genlerin homoloji durumlarını belirten K_a ve K_s değerleri hesaplanmıştır. *PvExp* genlerinin K_a/K_s değerleri yaklaşık 0,01 ile 0,2 arasında değişmektedir ve ortalama K_a/K_s değerleri yaklaşık olarak 0,15 bulunmuştur. Bu verilerden yola çıkarak genlerin ortalama 6,7 milyon yıl önce ayrıldığı ortaya çıkmıştır.

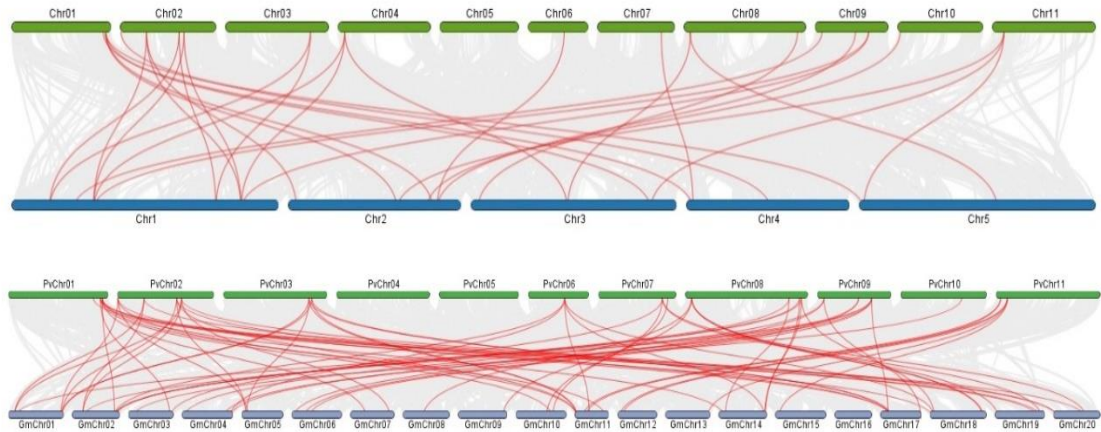


Şekil 4.5 *PvEXP* genlerinin segmental ve tandem duplikasyonları

Çizelge 4.3 *PvEXP* genlerinde tespit edilen duplikasyonlar

P.vulgaris Gen Adı	P.vulgaris Gen Adı	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ
PvEXPA-03	PvEXPA-11	0,121	0,566	0,214	4,350
PvEXPA-07	PvEXPA-05	0,069	0,627	0,110	4,822
PvEXPA-05	PvEXPA-20	0,134	1,162	0,115	8,935
PvEXPA-09	PvEXPA-05	0,138	1,400	0,099	10,769
PvEXPA-06	PvEXPA-08	0,148	0,719	0,206	5,529
PvEXPA-10	PvEXPA-17	0,095	0,772	0,123	5,941

Ortolog genler, genellikle farklı türlerde benzer bir işlevi koruyan türleşme yoluyla ortak bir atadan gelen genlerdir (Maurer ve Quimby 2015). *Phaseolus vulgaris* genomunda tanımlanan *PvEXP* genlerinin *Glycine max* genomunda tanımlanan *GmEXP* genleriyle ortolog ilişkileri ve aynı şekilde *PvEXP* genleri ile *Arabidopsis thaliana* genomunda tanımlanan *AtEXP* genlerinin ortolog ilişkileri tespit edilmiştir. Tespit edilen ortolog ilişkiler Şekil 4.6’da verilmiştir. Şekillerde bulunan gri çizgiler tüm ortolog ilişkileri, kırmızı çizgiler sadece *PvEXP* genleri arasındaki ortolog ilişkileri temsil etmektedir. *Phaseolus vulgaris* ile *Glycine max* arasındaki ortolog ilişkilerin sayısı 69, *Phaseolus vulgaris* ile *Arabidopsis thaliana* arasındaki ortolog ilişkilerin sayısı 31 olduğu görülmüştür. Böylelikle *Phaseolus vulgaris* ile *Glycine max*’ın arasındaki ortolog ilişkilerin sayısı, *Phaseolus vulgaris* ile *Arabidopsis thaliana* arasındaki ortolog ilişkilerin sayısından daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.6 *PvEXP* genlerinin *Arabidopsis thaliana* ve *Glycine max* arasındaki senteni analizi

Ka, Ks değerleri ve Ka/Ks oranları genlerin evrimsel sürecini anlamak için oldukça önemlidir. Ka/Ks oranı 1'den büyük ise pozitif, 1'den küçük ise negatif ve Ka/Ks değeri yaklaşık 1 ise genlerde nötr seleksiyon gözlemlendiği söylenebilmektedir. Yapılan hesaplamalar sonucunda fasulye *PvEXP* geninin ortologlarının bulunduğu *A.thaliana*'da Ka/Ks değerlerinin ortalaması 0,089, *G.max* için ortalama Ka/Ks değeri 0,188 olarak bulunmuştur. *PvEXP* genlerinin ayrılma zamanına bakıldığında *A.thaliana*'daki ortologları ile ilk ayrılma zamanı 19.391 milyon yıl önce, *G.max* ile ilk ayrılma zamanı 3.928 milyon yıl önce olduğu görülmektedir.

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

P.vulgaris Gen Adı	P.vulgaris Gen ID	G.max Gen ID	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	Glyma.02G248500.1	0,095	0,949	0,100	7,304
PvEXPA-03	Phvul.001G219700.1	Glyma.03G225900.1	0,105	0,290	0,362	2,234
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	Glyma.07G132600.1	0,135	1,111	0,121	8,547
PvEXPA-03	Phvul.001G219700.1	Glyma.10G140200.1	0,128	0,579	0,220	4,456
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	Glyma.11G219400.1	0,054	0,406	0,133	3,123
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	Glyma.14G068000.1	0,098	1,053	0,093	8,100
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	Glyma.18G038000.1	0,058	0,385	0,149	2,963
PvEXPA-02	Phvul.001G181600.1	Glyma.19G186700.1	0,149	0,424	0,351	3,261
PvEXPA-03	Phvul.001G219700.1	Glyma.19G222900.1	0,107	0,281	0,382	2,161
PvEXPA-06	Phvul.002G152900.1	Glyma.01G214400.1	0,044	0,440	0,100	3,387
PvEXPA-07	Phvul.002G170300.2	Glyma.01G050100.1	0,051	0,719	0,071	5,534
PvEXLB-01	Phvul.002G001700.1	Glyma.01G204800.1	0,034	0,229	0,148	1,759
PvEXPA-05	Phvul.002G083600.1	Glyma.01G050100.1	0,023	0,390	0,060	3,000
PvEXPA-07	Phvul.002G170300.2	Glyma.02G109100.1	0,057	0,721	0,079	5,543
PvEXPA-05	Phvul.002G083600.1	Glyma.02G109100.1	0,027	0,381	0,071	2,933
PvEXLB-01	Phvul.002G001700.1	Glyma.05G065800.1	0,145	0,573	0,253	4,406
PvEXPA-06	Phvul.002G152900.1	Glyma.05G051200.1	0,175	0,971	0,181	7,469
PvEXPA-07	Phvul.002G170300.2	Glyma.07G229000.1	0,051	0,378	0,135	2,906
PvEXLB-01	Phvul.002G001700.1	Glyma.11G038300.1	0,040	0,222	0,181	1,709
PvEXPA-06	Phvul.002G152900.1	Glyma.11G027600.1	0,043	0,422	0,102	3,250
PvEXLB-01	Phvul.002G001700.1	Glyma.17G147500.1	0,305	0,547	0,557	4,206
PvEXPA-06	Phvul.002G152900.1	Glyma.17G133100.1	0,131	0,693	0,189	5,331
PvEXPA-05	Phvul.002G083600.1	Glyma.20G033900.1	0,070	0,555	0,127	4,273
PvEXPA-07	Phvul.002G170300.2	Glyma.20G033900.1	0,045	0,415	0,109	3,196
PvEXLB-02	Phvul.003G224800.1	Glyma.01G204800.1	0,150	0,557	0,269	4,287
PvEXPA-08	Phvul.003G213800.1	Glyma.01G214400.1	0,156	0,840	0,186	6,465
PvEXPA-08	Phvul.003G213800.1	Glyma.05G051200.1	0,123	0,409	0,302	3,148
PvEXPA-08	Phvul.003G213800.1	Glyma.11G027600.1	0,165	0,815	0,202	6,271

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

P.vulgaris Gen Adı	P.vulgaris Gen ID	G.max Gen ID	Ka	Ks	Ka/Ks	MYÖ
PvEXLB-02	Phvul.003G224800.1	Glyma.11G038300.1	0,165	0,539	0,306	4,148
PvEXPA-08	Phvul.003G213800.1	Glyma.17G133100.1	0,086	0,367	0,235	2,825
PvEXLB-02	Phvul.003G224800.1	Glyma.17G147600.1	0,059	0,271	0,217	2,087
PvEXPA-10	Phvul.006G077200.1	Glyma.02G235900.1	0,077	0,775	0,099	5,958
PvEXPA-10	Phvul.006G077200.1	Glyma.04G222100.1	0,117	1,601	0,073	12,316
PvEXPA-10	Phvul.006G077200.1	Glyma.11G160000.1	0,031	0,281	0,111	2,165
PvEXPA-10	Phvul.006G077200.1	Glyma.14G203900.1	0,073	0,702	0,104	5,400
PvEXPA-10	Phvul.006G077200.1	Glyma.18G054000.1	0,024	0,227	0,108	1,744
PvEXPA-11	Phvul.007G207600.1	Glyma.03G225900.1	0,083	0,442	0,188	3,400
PvEXPB-01	Phvul.007G235300.1	Glyma.10G122300.1	0,182	0,434	0,420	3,337
PvEXPA-11	Phvul.007G207600.1	Glyma.10G140200.1	0,057	0,337	0,169	2,591
PvEXPA-11	Phvul.007G207600.1	Glyma.19G222900.1	0,087	0,482	0,180	3,705
PvEXPA-15	Phvul.008G232200.1	Glyma.02G248500.1	0,044	0,352	0,126	2,709
PvEXPA-16	Phvul.008G240800.1	Glyma.02G240900.1	0,065	0,427	0,152	3,281
PvEXPA-17	Phvul.008G248000.1	Glyma.02G235900.1	0,063	0,182	0,345	1,400
PvEXPA-12	Phvul.008G034700.1	Glyma.08G243200.1	0,146	0,496	0,294	3,817
PvEXPA-13	Phvul.008G037500.1	Glyma.09G236200.1	0,026	0,239	0,110	1,837
PvEXPA-16	Phvul.008G240800.1	Glyma.14G210500.1	0,078	0,437	0,178	3,363
PvEXPA-17	Phvul.008G248000.1	Glyma.14G203900.1	0,061	0,175	0,348	1,347
PvEXPA-15	Phvul.008G232200.1	Glyma.14G068000.1	0,042	0,323	0,130	2,488
PvEXPA-17	Phvul.008G248000.1	Glyma.18G054000.1	0,097	0,659	0,147	5,067
PvEXPA-13	Phvul.008G037500.1	Glyma.18G260900.1	0,029	0,228	0,128	1,754
PvEXPA-12	Phvul.008G034700.1	Glyma.18G265400.1	0,158	0,460	0,342	3,540
PvEXPA-13	Phvul.008G037500.1	Glyma.19G024200.1	0,082	0,601	0,136	4,621
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	Glyma.01G050100.1	0,125	1,164	0,108	8,950
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	Glyma.02G109100.1	0,125	1,166	0,107	8,970
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	Glyma.04G167800.1	0,051	0,273	0,188	2,102
PvEXPA-19	Phvul.009G142800.1	Glyma.04G222100.1	0,036	0,230	0,157	1,768
PvEXPA-18	Phvul.009G019000.1	Glyma.04G021600.1	0,053	0,331	0,159	2,547
PvEXPA-18	Phvul.009G019000.1	Glyma.06G021700.1	0,047	0,336	0,139	2,586
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	Glyma.06G195000.1	0,050	0,271	0,183	2,083
PvEXPA-19	Phvul.009G142800.1	Glyma.06G143300.1	0,034	0,185	0,185	1,421
PvEXPA-18	Phvul.009G019000.1	Glyma.17G260400.1	0,094	0,650	0,145	5,002
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	Glyma.17G101400.1	0,089	0,534	0,166	4,104
PvEXPB-03	Phvul.010G070900.1	Glyma.03G033800.1	0,282	0,365	0,774	2,804
PvEXLA-01	Phvul.011G024801.1	Glyma.11G096700.1	0,078	0,355	0,219	2,728
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	Glyma.11G139100.1	0,030	0,377	0,080	2,897
PvEXLA-01	Phvul.011G024801.1	Glyma.12G022800.1	0,083	0,325	0,255	2,500
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	Glyma.12G062700.1	0,038	0,365	0,105	2,808
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	Glyma.13G336600.1	0,056	0,755	0,074	5,808
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	Glyma.15G037700.1	0,061	0,763	0,080	5,865

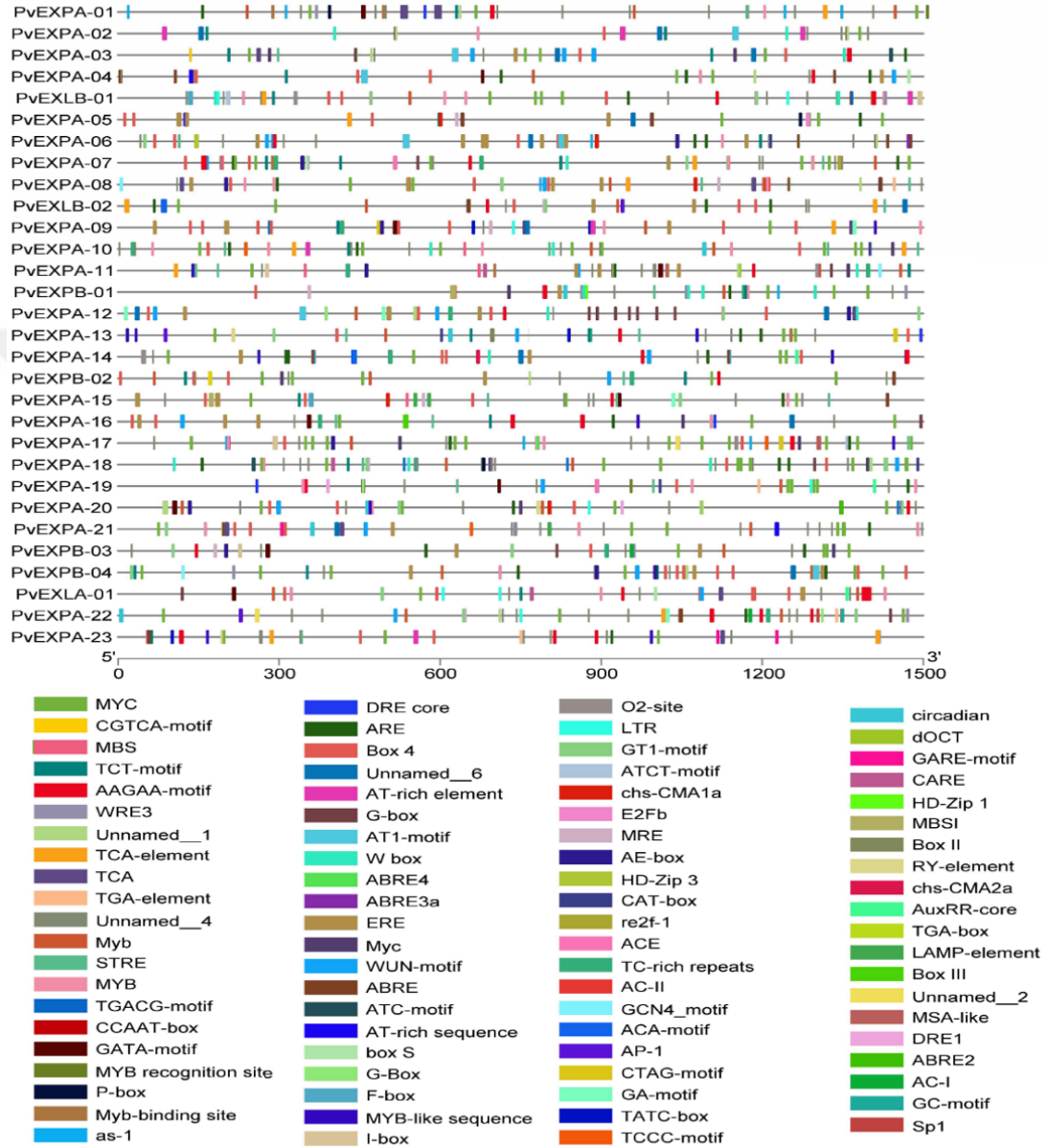
Çizelge 4.5 *P. vulgaris* ve *A.thaliana*'da bulunan PvEXP gen duplikasyonları

P.vulgaris Gen Adı	P.vulgaris Gen ID	A.thaliana Gen ID	Ka	Ks	Ka_Ks	MYÖ
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	AT2G39700.1	0,135	1,618	0,083	12,445
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	AT2G28950.1	0,139	2,706	0,051	20,818
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	AT3G55500.1	0,139	1,976	0,070	15,198
PvEXPA-03	Phvul.001G219700.1	AT4G01630.1	0,194	4,345	0,045	33,420
PvEXPA-04	Phvul.001G232600.1	AT5G02260.1	0,213	2,275	0,093	17,501
PvEXPA-06	Phvul.002G152900.1	AT1G62980.1	0,295	NaN		
PvEXPA-05	Phvul.002G083600.1	AT1G69530.3	0,131	NaN		
PvEXPA-05	Phvul.002G083600.1	AT1G26770.2	0,116	NaN		
PvEXPA-06	Phvul.002G152900.1	AT1G12560.1	0,301	2,296	0,131	17,658
PvEXPA-07	Phvul.002G170300.2	AT1G69530.3	0,124	NaN		
PvEXPA-07	Phvul.002G170300.2	AT1G26770.2	0,110	NaN		
PvEXPA-05	Phvul.002G083600.1	AT2G03090.1	0,127	2,320	0,055	17,847
PvEXLB-01	Phvul.002G001700.1	AT4G17030.1	0,319	1,932	0,165	14,859
PvEXPA-08	Phvul.003G213800.1	AT1G62980.1	0,313	1,962	0,159	15,094
PvEXPA-08	Phvul.003G213800.1	AT1G12560.1	0,314	2,391	0,131	18,393
PvEXPA-09	Phvul.004G030500.1	AT1G69530.3	0,162	2,285	0,071	17,575
PvEXPA-09	Phvul.004G030500.1	AT1G26770.2	0,168	NaN		
PvEXPA-09	Phvul.004G030500.1	AT3G29030.1	0,163	2,478	0,066	19,058
PvEXPA-10	Phvul.006G077200.1	AT2G40610.1	0,150	NaN		
PvEXPA-11	Phvul.007G207600.1	AT4G01630.1	0,181	NaN		
PvEXPA-13	Phvul.008G037500.1	AT3G29030.1	0,141	2,843	0,050	21,872
PvEXPA-16	Phvul.008G240800.1	AT3G03220.1	0,141	NaN		
PvEXPA-12	Phvul.008G034700.1	AT5G39270.1	0,315	1,814	0,173	13,956
PvEXPA-18	Phvul.009G019000.1	AT1G20190.1	0,176	4,665	0,038	35,886
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	AT1G26770.2	0,147	NaN		
PvEXPA-20	Phvul.009G186400.1	AT1G69530.3	0,165	2,703	0,061	20,794
PvEXPA-19	Phvul.009G142800.1	AT2G40610.1	0,141	NaN		
PvEXPA-21	Phvul.010G010200.1	AT2G37640.1	0,145	NaN		
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	AT2G28950.1	0,119	NaN		
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	AT3G55500.1	0,172	2,245	0,076	17,272
PvEXPA-22	Phvul.011G063800.1	AT5G02260.1	0,204	NaN		
NaN= Sonuç yok						

4.7 Fasulyede *Expansin* Genlerine Ait Promotor Bölge Analizi

Pv-EXP genlerinin promotor bölgelerinde bulunan cis-düzenleyici elementler PlantCare veri tabanı ile analiz edilmiş ve TBtools programı ile görselleştirilmiştir. Analiz sonucunda *Pv-EXP* genlerinin tamamında toplamda 83 tane cis elementi olduğu bulunmuştur. Bu cis düzenleyici elementler fonksiyonlarına göre ışığa duyarlı cis elementler, hormona duyarlı cis elementler, çevresel stresle ilişkili cis elementler, gelişim ile ilgili cis düzenleyici elementler, promotor bölge ile ilişkili elementler, yer bağlama ile

ilgili elementler ve diğer elemanlar olmak üzere 7 başlıkta toplanmıştır. *Pv-EXP* genlerinde en fazla saptanan cis-düzenleyici elementler ayrı bir tablo halinde sunulmuştur (Çizelge 4.13).



Şekil 4.7 *PvEXP* genleri promotor bölgelerinde bulunan cis-düzenleyici elementler

Çizelge 4.6 Gelişim ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Gelişim İle İlgili Cis- Düzenleyici Elementler	
O2-site	Zein metabolizması regülasyonunda rol oynar
CAT-box	Meristem ifadesinde rol oynar.
GCN4_motif	Endosperm ifadesi rol oynar.
HD-Zip 1	Mezofil hücrelerinin farklılaşmasında rol oynar.
circadian	Sirkadiyen ritimde rol oynar.
AAGAA-motif	Endosperm ifadesinde rol oynar.
CCAAT-box	MYBHv1 bağlama bölgesinde bulunur.
AC-I	Ksileme özgü ifadede rol oynar.

Çizelge 4.7 Çevresel stres ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Çevresel Stres İle İlgili Cis- Düzenleyici Elementler	
ARE	Anaerobik indüksiyonda rol oynar.
MBS	Kuraklığa neden olan MYB bağlama bölgesi
LTR	Düşük sıcaklıkta yanıt vermeden sorumludur.
TC-rich repeats	Savunma ve stres tepkisinde rol oynar.
Unnamed_5	SEF1 faktör bağlanma bölgesi
W box	Yaralanma ve patojen yanıtında sorumludur
WUN- motif	Bikide yara oluşumunda tepkide görevlidir.
MYC	Kuraklık ve düşük sıcaklığa tepki verir.
Box S	Yaralama ve patojen yanıtından sorumludur

Çizelge 4.8 Hormon ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Hormon İle İlgili Cis- Düzenleyici Elementler	
ABRE	ABA tepkisinde rol oynamaktadır.
ABRE3a	ABA tepkisinde rol oynamaktadır.
ABRE4	ABA tepkisinde rol oynamaktadır.
P-box	Giberelline duyarlı eleman
CGTCA-motif	MeJa duyarlılığında görev alır.
TGACG-motif	MeJa duyarlılığında rol oynar.
TGA-element	Oksine duyarlı eleman
TGA-box	Oksine duyarlı eleman
TCA-element	Salisilik asit tepkisinde rol oynar.
ERE	Etilen tepkisinde rol oynar.
GARE motif	Giberellin duyarlı eleman
TATC-box	Giberellin duyarlı eleman

Çizelge 4.9 Işığa duyarlı cis-düzenleyici elementler

Işığa Duyarlı Cis-Düzenleyici Elementler	
Box II	Işığa duyarlı elementin bir parçası
G-box	Işığa tepki vermede yer alan cis düzenleyici element
G-Box	Işığa tepki vermede yer alan cis 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-CMA1a	Işığa duyarlı elementin bir parçası
chs-CMA2a	Işığa duyarlı elementin bir parçası
chs-CMA2b	Işığa duyarlı elementin bir parçası
Box 4	Işığa tepki vermede korunmuş bir DNA parçası
chs-CMA1a	Işığa duyarlı elementin bir parçası
CAG-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
AE-box	Işığa duyarlı elementin bir parçası
TCCC-motif	Işığa duyarlı elementin bir parçası
MRE	Işığa duyarlı olan MYB bağlama bölgesi
4cl-CMA2b	Işığa duyarlı element
AAAC-motif	Işığa duyarlı element
Gap-box	Işığa duyarlı element
ACE	Işığa duyarlılıkta rol oynar
GC - motif	Anoksik spesifik indüklenabilirlikte görevli element
I - box	Işığa duyarlı elementin bir parçası
L - box	Işığa duyarlı elementin bir parçası
Sp - 1	Işığa duyarlı element
Lamp element	Işığa duyarlı elementin bir parçası
ATCT-motif	Işığa tepki vermede korunmuş bir DNA parçası

Çizelge 4.10 Promotor ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Promotor ile İlgili Cis-Düzenleyici Elementler	
CAAT-box	Promotor bölgelerine ortak cis-düzenleyici element
TATA-box	Transkripsiyon başlangıcında -30 civarında bulunan promotor element
TATA	Promotor bölgelerine ortak cis-düzenleyici element
AT~TATA-box	Promotor bölgelerine ortak cis-düzenleyici element

Çizelge 4.11 Bölge bağlama ile ilgili cis-düzenleyici elementler

Bölge Bağlama ile İlgili Cis Düzenleyici Elementler	
AT-rich element	AT bakımından zengin DNA bağlama proteininin (ATBP-1) bağlanma bölgesi
CCAAT-box	MYBHv1 bağlama bölgesi
HD-Zip 1	Protein bağlama bölgesi
HD-Zip 3	Protein bağlama bölgesi

Çizelge 4.12 Diğer elementler

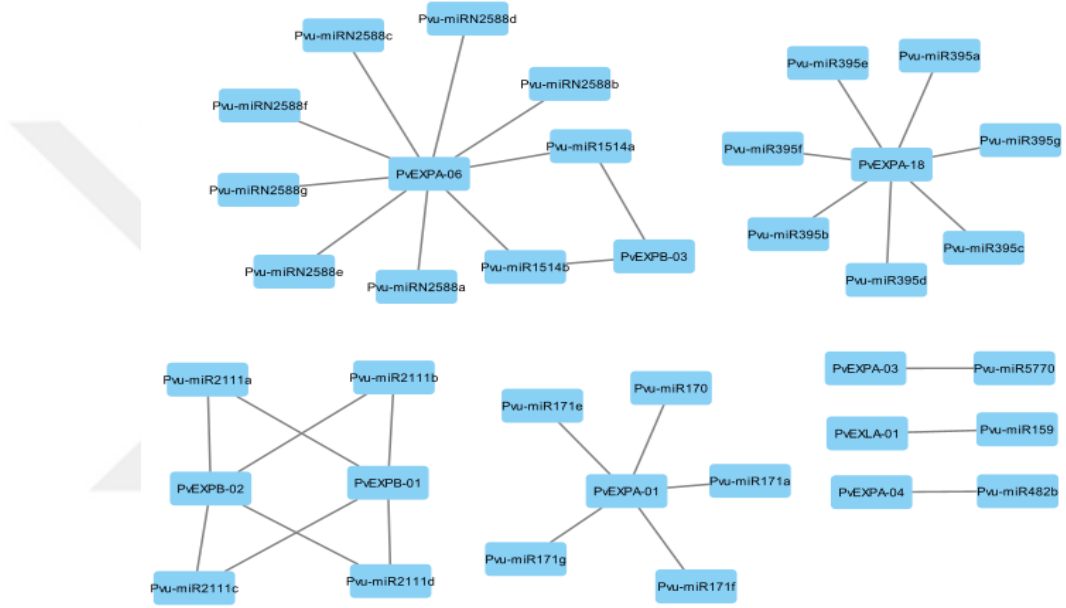
Diğer Elementler	
Unnamed_4	Bilinmiyor
CTAG-motif	Cis etkili düzenleyici element
Myb	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
Myc	Bilinmiyor
STRE	Strese duyarlı element
WRE3	Yaraya duyarlı element
MYB-like sequence	Stres kaynaklı kuraklık, düşük sıcaklık
DRE1	Dehidrasyona duyarlı
AACA-motif	Endosperm spesifik negatif ifadede rol alır

Çizelge 4.13 PvEXP genlerinde gözlenen cis elementleri

Gen Adı	Gelişimle İlişkili Elementler	Çevresel Stresle İlişkili Elementler	Hormonlarla İlişkili Elementler	Işığa Duyarlı Elementler	Biyotik Stres ile İlişkili Elementler
PvEXPA-01	2	9	11	2	4
PvEXPA-02	2	3	0	8	1
PvEXPA-03	1	11	6	7	1
PvEXPA-04	1	6	8	10	1
PvEXLB-01	3	9	4	9	7
PvEXPA-05	0	5	9	11	0
PvEXPA-06	2	4	15	16	2
PvEXPA-07	3	13	3	12	4
PvEXPA-08	1	4	13	10	5
PvEXLB-02	1	6	6	9	1
PvEXPA-09	0	3	7	14	3
PvEXPA-10	3	14	2	4	8
PvEXPA-11	3	8	6	7	5
PvEXPB-01	4	10	3	3	2
PvEXPA-12	1	5	5	18	1
PvEXPA-13	4	7	1	7	6
PvEXPA-14	5	11	9	10	4
PvEXPB-02	1	7	6	4	1
PvEXPA-15	2	5	5	12	4
PvEXPA-16	2	6	6	5	4
PvEXPA-17	4	15	10	9	4
PvEXPA-18	1	20	6	9	2
PvEXPA-19	3	9	5	7	5
PvEXPA-20	3	11	4	13	0
PvEXPA-21	1	9	3	7	4
PvEXPB-03	1	7	3	8	0
PvEXPB-04	1	9	3	15	1
PvEXLA-01	5	4	4	11	3

4.8 Fasulyede *Expansin* Genlerine Ait miRNA Analizi

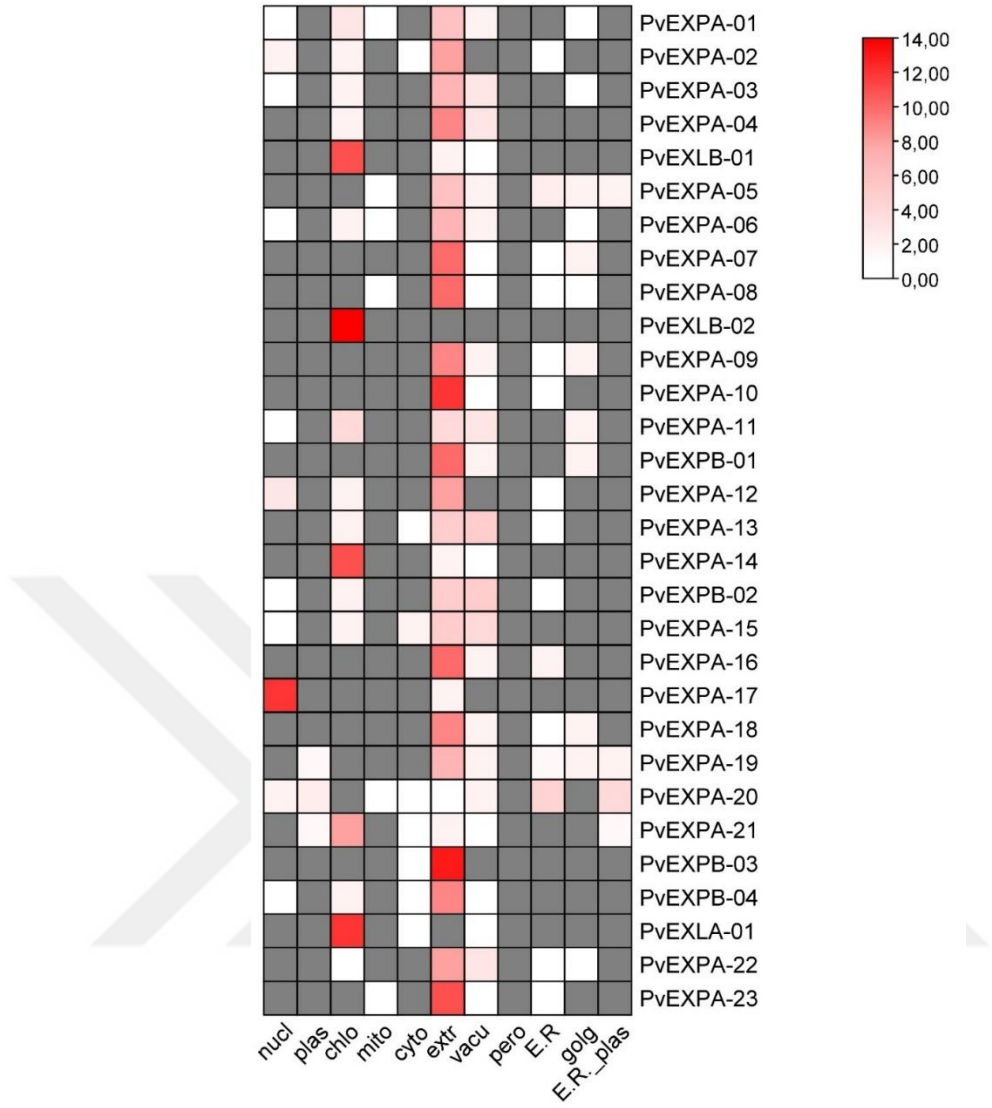
Yapılan bu tez çalışmasında *P.vulgaris* genomunda *PvEXP* genlerini hedefleyen miRNA'lar araştırılmıştır. En fazla hedeflenen gen üyeleri *PvEXPA-06* ve *PvEXPA-18*'dir. *PvEXPA-06* gen üyesi 9, *PvEXPA-18* gen üyesi 7 kez miRNA'lar tarafından hedeflenmiştir. En fazla gen hedefleyen miRNA'nın ise miR2111 olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.8 *PvEXP* genlerinin miRNA analizleri

4.9 Fasulyede *Expansin* Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri

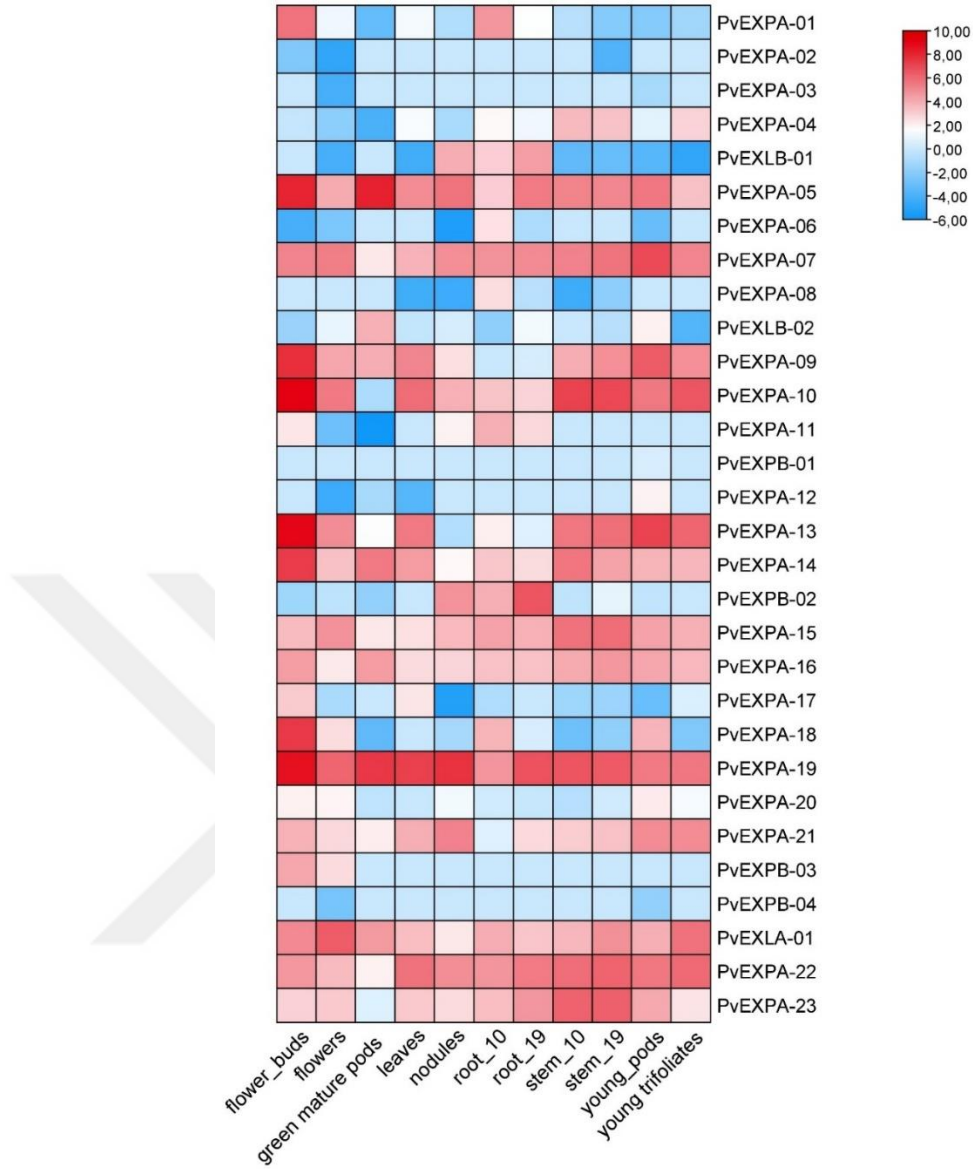
Fasulye *Expansin* proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu WoLFPSORT veri tabanı ile belirlenmiştir. Grafikte PvEXLB-01, PvEXLB-02, PvEXPA-14, PvEXPA-21 ve PvEXLA-01'in en fazla lokalize olduğu yer kloroplast olarak görülmektedir. Diğer hücresel bölgelere göre tüm proteinlerin en fazla lokalize olduğu bölge hücre dışı bölgedir. Nükleusta en fazla lokalize olan protein PvEXPA-17'dir. Proteinlerin hücre içi lokalizasyonu Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 PvEXP Proteinlerinin Hücre İçi Yerleşimleri

4.10 Fasulyede *Expansin* Genlerinin Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri

PvEXP genlerinin mRNA seviyeleri ile oluşturan ısı haritası, Phytozome veri tabanından alınan FPKM (Fragments Per Kilobase Million) değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Bu ısı haritasında 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. PvEXPA-05 ve PvEXPA-19 üyelerinin mRNA seviyeleri tüm dokularda yüksek çıkmıştır.

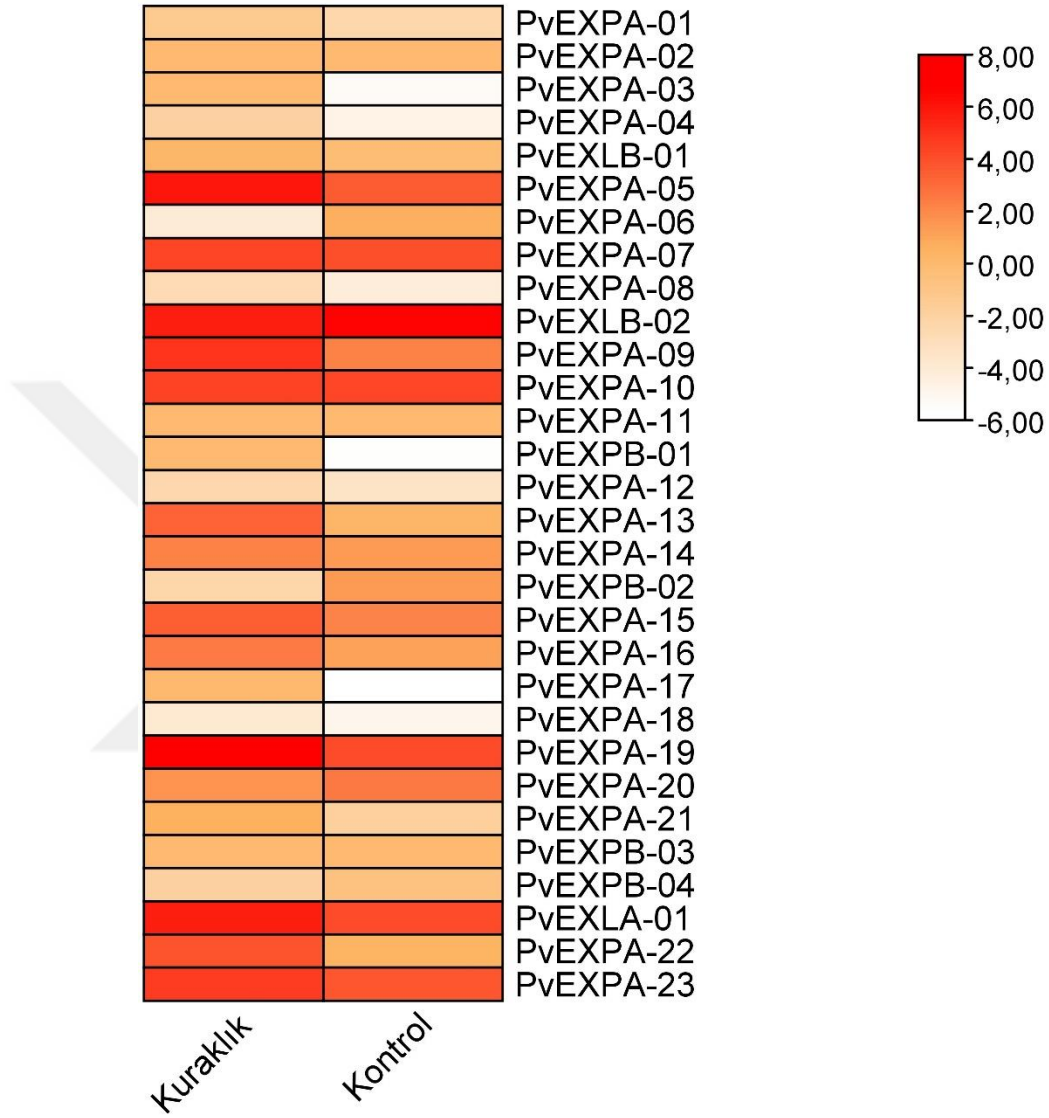


Şekil 4.10 Genlerinin Doku-Spesifik mRNA Seviyeleri

4.11 *Expansin* Genlerinin Kuraklık Stresi ile İfade Seviyeleri Değişimi

Expansin genlerinin kuraklık stresine ilişkin ifade analizi tespiti RNAseq verileri kullanılarak TBtools programı aracılığıyla görselleştirilmiştir. RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) değerleriyle oluşturulan ısı haritasında göre *PvEXP* genlerinin ifade seviyeleri kuraklık stresine karşı değişiklik göstermiştir. Kuraklık stresi altında *PvEXPA-06*, *PvEXPB-01* ve *PvEXPB-04*'ün ifade seviyeleri düşüş gösterirken; *PvEXPA-01*, *PvEXPA-03*, *PvEXPA-04*, *PvEXPA-05*, *PvEXPA-09*, *PvEXPA-13*, *PvEXPA-15*,

PvEXPA-16, PvEXPA-17, PvEXPA-19, PvEXLA-01, PvEXPA-22 ve PvEXPA-23'te artış gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 *PvEXP* Genlerinin İn Siliko İfade Analizi

4.12 Total RNA İzolasyonu

Bitkiden alınan yaprak, gövde ve kök örneklerinden FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'ların Thermo Nano Spectrometer Lite cihazı ile saflıkları ve kaliteleri değerlendirilmiştir. İzole RNA örneklerinin $A_{260/280}$ değerleri ~2.1'dir.

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

Örnekler	Saflık Miktarı (A260/ A280)	Örnek Miktarı (ng/μl)
RNA-1 (Yaprak Stres)	2.20	1032
RNA-2 (Yaprak Stres)	2.19	971
RNA-3 (Yaprak Stres)	2.19	1114
RNA-4 (Yaprak kontrol)	2.21	1222,5
RNA-5 (Yaprak kontrol)	2.20	1164,1
RNA-6 (Yaprak kontrol)	2.14	226
RNA-7 (Gövde Stres)	2.12	118,6
RNA-8 (Gövde Stres)	2.11	227,5
RNA-9 (Gövde Stres)	2.22	1306.4
RNA-10 (Gövde Kontrol)	2.09	190,3
RNA-11 (Gövde Kontrol)	2.15	610,2
RNA-12 (Gövde Kontrol)	2.07	127,2
RNA-13 (Kök Stres)	2.15	147,7
RNA-14 (Kök Stres)	2.14	320
RNA-15 (Kök Stres)	2.14	353,3
RNA-16 (Kök Kontrol)	2.11	354,5
RNA-17 (Kök Kontrol)	2.10	328,7
RNA-18 (Kök Kontrol)	2.11	380,8

4.13 cDNA İzolasyonu

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) kullanılarak yapılmıştır. Ardından elde edilen cDNA örnekleri 1/5 oranında seyreltilmiştir. cDNA örneklerinin A_{260/280} değerleri ~1.8'dir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 İzole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (Kuraklık)

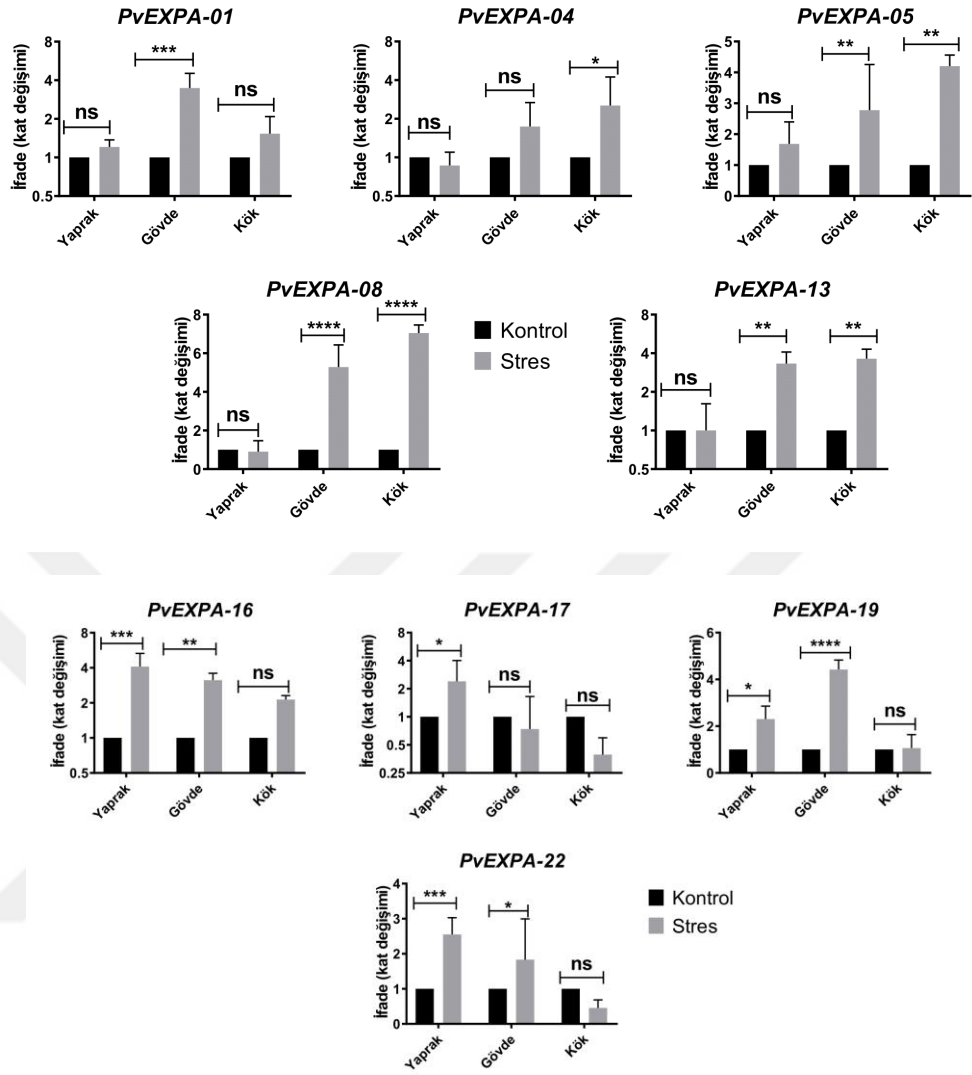
Örnekler	Saflık Miktarı (A260/ A280)	Örnek Miktarı (ng/μl)
cDNA-1 (Yaprak Stres)	1.90	1136.4
cDNA-2 (Yaprak Stres)	1.89	1091.1
cDNA-3 (Yaprak Stres)	1.90	1079.6
cDNA-4 (Yaprak kontrol)	1.90	1150.7
cDNA-5 (Yaprak kontrol)	1.90	1108.3
cDNA-6 (Yaprak kontrol)	1.91	1136.3
cDNA-7 (Gövde Stres)	1.89	1146.4

Çizelge 4.15 İzole edilen RNA'lerden elde edilen cDNA'ların saflık dereceleri ve miktarları (Kuraklık) (devam)

Örnekler	Saflık Miktarı (A260/ A280)	Örnek Miktarı (ng/μl)
cDNA-8 (Gövde Stres)	1.90	1196.3
cDNA-9 (Gövde Stres)	1.90	1198.2
cDNA-10 (Gövde Kontrol)	1.89	1106.1
cDNA-11 (Gövde Kontrol)	1.90	1219.3
cDNA-12 (Gövde Kontrol)	1.90	1350.7
cDNA-13 (Kök Stres)	1.90	1260.4
cDNA-14 (Kök Stres)	1.90	1129.1
cDNA-15 (Kök Stres)	1.90	1044.3
cDNA-16 (Kök Kontrol)	1.91	1163.2
cDNA-17 (Kök Kontrol)	1.90	1210.8
cDNA-18 (Kök Kontrol)	1.89	1087.4

4.14 Kuraklık Stresi Altında Fasulye *Expansin* Genlerinin mRNA Düzeyleri

RNAseq verilerine göre kuraklık stresi altındaki ifade seviyeleri kontrol bitkisine artış göstermiş olan 9 tane *PvEXP* geni seçilmiştir. Bu genlere uygun primerler dizayn edilerek kuraklık stresi altındaki mRNA ifade profilleri RT-qPCR analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına göre *PvEXPA-01*, *PvEXPA-05* ve *PvEXPA-16* gen üyelerinin mRNA ifade seviyelerinin kökte, gövdede ve yaprakta arttığı gözlenmektedir. Bu durum *in-siliko* transkriptom verileriyle karşılaştırıldığında iki analiz sonucunun birbirini desteklediği görülmektedir (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.12 Zülbiye bitki çeşidinin kuraklık stresi altında gen ifade seviyesi ((‘*’ p- değeri < 0,05 ifade etmektedir)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkiler; büyümelerini ve metabolik aktivitelerini etkileyen çeşitli çevresel streslere maruz kalmaktadır. Bu streslerden biri olan kuraklık stresi, bitki gelişimi ve verimliliği üzerine olumsuz etkileri olan streslerden bir tanesidir (Makbul, GÜLER vd. 2011). Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9,6 milyar kişiye kadar ulaşması beklenmektedir. Bu nüfus artışı dünyayı gıda güvenliği ve iklim değişikliği gibi problemlerle karşı karşıya bırakmaktadır. Özellikle, iklim değişikliğinin etkisi ve bitkilerin maruz kalacağı biyotik ve abiyotik streslerin, küresel gıda üretimi için ciddi sonuçlar doğuracağı düşünülmektedir (Stagnari, Maggio vd. 2017).

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), ülkemizin birçok kesiminde kuru ya da taze olarak yetiştirilebilen ve genellikle de Karadeniz Bölgesi'nde yayılım gösteren bir baklagil türüdür. Dünya genelinde ise fasulye üretiminin yarıdan fazlası kurak şartlarda yapılmaktadır. Son yıllarda küresel ısınmanın artmasıyla birlikte yaşanan kuraklık, bitki üretimi için tehlike oluşturmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda kuraklık stresinin fasulye bitkisinin büyümesini, fotosentez aktivitesini, stoma iletkenliğini, verimini ve kalitesini olumsuz etkilediğini göstermiştir. Yapılan ıslah çalışmalarıyla bu olumsuz etkilerin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır (Kılıcaslan, Yıldırım vd. 2020)

Yapılan bu tez çalışmasında, bitki gelişimine ve kuraklık stres faktörüne karşı tepkisi kanıtlanmış *Expansin* gen ailesinin *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinde çeşitli veri tabanları kullanılarak biyoinformatik karakterizasyonu yapılmıştır. *Expansin* gen ailesi şimdiye dek birçok türde genom çapında tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda; *Hordeum vulgare*'de 46, *Triticum aestivum*'da 241, *Glycine soja*'da 75, *Arabidopsis*'de 36, *Nicotiana tabacum*'da 52, *Gossypium hirsutum*'da 93, *Solanum lycopersicum*'da 38, *Zea mays*'da 88, *Citrullus lanatus*'da 30, *Camellia sinensis* L.'de 40, *Ziziphus jujuba* Mill.'de 40 ve *Fragaria vesca* 'da 35 *Expansin* geni belirlenmiştir. *Phaseolus vulgaris* L. bitkisi üzerinde yapılan bu çalışmada ise 30 adet *Expansin* geni belirlenmiştir. Toplam 30 üyenin 23 tanesi EXPA, 4 tanesi EXPB, 1 tanesi EXLA ve 2 tanesi EXLB alt ailesine ait olduğu belirlenmiştir. İsimlendirilmeleri, ait oldukları alt aileye göre; PvEXPA-, PvEXPB-, PvEXLA- ve PvEXLB- şeklindedir.

Proteinler, amfifilik özelliklerinin yanı sıra hidrojen bağıyla ve elektrostatik etkileşimlerle çeşitli bileşik türleri ile etkileşime giren makromoleküllerdir. Moleküler ağırlık (MW), izoelektrik nokta (PI) ve çözünürlük gibi fizikokimyasal özellikleri yapılarında bulunan amino asit dizilerine bağlıdır (Quintero-Quiroz, Celis-Torres vd. 2021). Fizikokimyasal özellikleri hesaplanan PvEXP proteinlerinin uzunluklarının 245 aa ile 275 aa aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu da tüm üyelerin protein uzunluklarının birbirlerine yakın olduğunu göstermektedir. *Solanum lycopersicum*’da yapılan çalışmada benzer şekilde 38 üyenin tamamının 250 ile 280 aa uzunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda 30 PvEXP proteinin 26’sının bazik özellikte olduğu saptanmıştır. *Nicotiana tabacum*’da yapılan çalışmada tanımlanan 52 üyenin 46’sının bazik özellikte olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde *Zea mays*’ta yapılan bir diğer çalışmada ise 88 üyenin 64’ünün bazik özellikte olduğu görülmüştür. PvEXP proteinlerinin moleküler ağırlıklarının 26,737 ve 30,206 kDa aralığında olduğu tespit edilmiştir. *Corchorus olitorius*’da yapılan çalışmada benzer moleküler ağırlıklara sahip 26.088 kDa ve 32.118 kDa aralığında olduğu saptanmıştır. Görüldüğü üzere, literatür araştırılmış ve yapılan çalışma ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Genlerin kromozom üzerindeki konumlarının belirlenmesi, bitki ıslahında ve bitki moleküler biyolojisinde önem arz etmektedir (Delseny 2000). Genlerin fiziksel konumlarının belirlenmesi, genlerin daha sonra yapılacak çalışmalarda çalışılmasının kolaylaştırılmasını ve genlerin daha hızlı ve kolay manipüle edilmesini sağlamaktadır (Foxman 2012). PvEXP üyelerinin kromozal lokasyonu incelendiğinde, üyelerin kromozomlar üzerinde eşit dağılmadığı saptanmıştır. *Fragaria vesca*’da yapılan çalışmada gen üyelerinin kromozomlarda eşit dağılmadığı görülmüştür (Dong, Zou vd. 2022). *Phyllostachys edulis*’de yapılan çalışmada ise benzer şekilde gen üyelerin kromozomlar üzerinde rastgele dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Jin, Zhuo vd. 2020).

Filogenetik ağaçlardan protein ailesinin evrimsel tarihini anlamak ve filogenetik yakınlıklarını anlamak için yararlanılmaktadır. PvEXP gen üyelerinin filogenetik ilişkilerini belirlemek için oluşturulan ağaçta, üyelerin esas olarak 2 ana gruba ayrıldığı saptanmıştır. 1. grup EXPA alt ailesine ait olan üyeleri kapsamaktadır ve 2. grupta ise EXPB, EXLA ve EXLB üyeleri bulunmaktadır. Sadece EXPA alt ailesine ait üyeler

bulunmasına rağmen 2. gruptan daha fazla üye içermektedir. Benzer şekilde *Musa acuminata* (Backiyarani, Anuradha vd. 2022), *Hordeum vulgare* L. (Liu, Fu vd. 2021), *Moso Bamboo* (Jin, Zhuo vd. 2020) ve *Brachypodium distachyon* (Chen, Luo vd. 2020) bitkilerinde yapılan çalışmalarda *EXPA* alt ailesine ait üyelerin sayısının fazla olduğu saptanmıştır ve bu üyeler filogenetik ağaçta aynı dalda gruplanmıştır. *EXPB*, *EXLA* ve *EXLB* üyelerini içeren 2. grup da kendi arasında 2 gruba ayrılmaktadır. Bu gruplardan biri *EXLB* ve *EXLA* üyelerini, diğer grup ise sadece *EXPB* üyelerini içermektedir. *Glycine soja*'da yapılan bir çalışmada ise filogenetik ağaç oluşturulmuş ve oluşturulan filogenetik ağaçta üyelerin 2 gruba ayrıldığı görülmüştür. Bir grup sadece *GsEXPA* üyelerini içermektedir. Diğer grup ise *GsEXPB*, *GsEXLA* ve *GsEXLB* üyelerini içerdiği görülmüştür. *GsEXLA* ve *GsEXLB* üyelerinin filogenetik ağaçta daha yakın dallarda konumlandığı saptanmıştır (Feng, Li vd. 2022)

Motifler ve domainler proteinlerin yapısında bulunan ve evrimsel süreç boyunca korunmuş dizilerdir. Motifler, alfa heliksler ve beta yapraklarından oluşurken domainler, amino asit yan zincirleri arasındaki disülfid köprüleri ve iyonik bağlar ile oluşmuşlardır. Sonuç olarak motifler protein dizilerinin ikincil yapılarından, domainler ise proteinlerin üçüncül yapılarından oluşmaktadır. Motifler esas olarak protein yapısında yapısal bir işleve sahipken, domainler daha çok protein dizilerinde işlevsel bir öneme sahiptirler. Yapılan çalışmada 10 adet motif taranmıştır. Motiflerin filogenetik ağaçta aynı grupta bulunan ve aynı alt aileye ait üyelerde benzer çıktığı görülmüştür. *PvEXPA-09*, *PvEXPA-13*, *PvEXPA-12*, *PvEXPA-02*, *PvEXPA-06* ve *PvEXPA-08* üyeleri hariç tüm *EXPA* üyelerinde motif 1, motif 2, motif 3, motif 4, motif 6 ve motif 7 saptanmıştır. *EXLB* ve *EXPB* alt ailelerinde de grup içinde aynı motiflere rastlanılmıştır. Bu motifler; motif 6, motif 7, motif 9 ve motif 10'dur. *EXLA* üyesinde ise; motif 1, motif 2, motif 6, motif 9 ve motif 10 bulunmaktadır. Görüldüğü üzere *EXPA* ve *EXLA* üyeleri kendi aralarında, *EXPB* ve *EXLB* üyeleri kendi aralarında benzer motiflere sahiptir. En fazla motif sayısına *EXPA* üyelerinde rastlanmıştır. *Ziziphus jujuba* Mill.'de *Expansin* gen ailesi üzerine yapılan çalışmada aynı alt aileye ait gen üyelerinde benzer motiflere rastlanılmıştır. *EXPA*, *EXLA*, *EXPB* ve *EXLB* alt ailelerine ait üyeler de motif bakımından kendi aralarında benzerlik göstermektedir (Hou, Zhang vd. 2019).

Yapılan domain analizinde tüm üyelerin DPBB ve Pollen_allerg_1 domainleri içerdiği görülmektedir. Benzer şekilde farklı organizmalarda yapılan çalışmalarda da bu domainler tanımlanmıştır. *Gossypium hirsutum*'da yapılan çalışmada bitki *Expansin*lerinin domainleri, Domain I ve Domain II olmak üzere tanımlanmıştır. Domain I glikozit hidrolaz ailesi 45 (GH45) proteinlerinin katalitik domainine benzer özelliklere sahip olan ve His-Phe-Asp (HFD) içeren altı sarmallı dizidir. Domain II Pollen_allerg_1 olarak isimlendirilmektedir. Bu domain grup 2 çimen poleni alerjenlerinin homologudur (Lv, Zuo vd. 2020). *Nicotiana tabacum*'da yapılan bir çalışmada ise bitki *Expansin*leri, yaklaşık 250-275 amino asit boyutunda, tipik olarak 20-30 amino asit uzunluğunda bir sinyal peptidinden önce gelen iki korunmuş domain, DPBB_1 ve Pollen_allerg_1 içerdiği düşünülen küçük proteinler olarak tanımlanmıştır (Ding, Marowa vd. 2016).

Bir genin yapısında bulunan ekzonların ana işlevi mRNA ve proteinleri kodlama olarak söylenebilir. İntronlardaki işlevsel çeşitliliğin sebebinin ise komşu ekzonların işleviyle ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır (Zhu, Zhang vd. 2009). Bundan dolayı genlerde bulunan ekzon ve intron yapıları evrimsel süreçte önem arz etmektedir. Yapılan analizler doğrultusunda *Expansin* üyelerinin toplamda 96 ekzon ve 66 intron içerdiği ortaya çıkmıştır. Ekzon ve intronların yapısal analizi sonucunda, genel olarak *PvEXP* genlerinin 1 ila 4 introna sahip olduğu, 2 ila 5 tane ise ekzona sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Her alt ailede bulunan gen üyelerinin kendi aralarında benzer fiziksel gen yapısına sahip olduğu saptanmıştır; EXPA üyelerinde 1 ila 2 intron, EXPB ve EXLA üyelerinde de 3 intron bulundurmasıyla nedeniyle benzer bir gen yapısına sahip olduğu desteklenmektedir. *Saccharum spp.*'de yapılan analizler sonucunda bizim çalışmamızdaki ile uyumlu olarak benzer alt aileye sahip olan üyelerde benzer gen yapıları ortaya çıkmıştır. *SacEXPA* üyelerinde 3 ekzon, *SacEXPB* üyelerinde ise 4 ekzon bulunması durumu bu sonucu desteklemektedir (Santiago, Pereira vd. 2018).

Gen duplikasyonu, bitkilerin evriminde önemli bir rol oynamaktadır. Duplike olan genler, doğal seçimde yeni işlevlerinin şekillendirilmesinde önemli roller oynamaktadır. Gen duplikasyonu, tandem ve segmental duplikasyon gibi birkaç farklı tipte gerçekleşmektedir (HUANG, ZHANG vd. 2022). Yapılan duplikasyon analizinde; *PvEXP* genleri arasında 1 tane tandem duplikasyona, 5 tane ise segmental duplikasyona

rastlanılmıştır. *Hordeum vulgare* L. bitkisinde yapılan çalışmada *HvEXP* genlerinin yaptığı tveem duplikasyon sayısı 15 iken segmental duplikasyon sayısı 25'tir (Liu, Fu vd. 2021). *Brachypodium distachyon*'da ise 11 tandem duplikasyona rastlanılmıştır. *PvEXP* genlerinin ortalama Ka/Ks oranları 0,15 bulunmuştur. Bu oranın 1'den küçük olmasından dolayı *PvEXP* genlerinin negatif seçilime uğradığı söylenebilir (Chen, Luo vd. 2020). *Zea Mays*'ta yapılan çalışmada benzer şekilde *ZmEXP* genlerinin ortalama Ka/Ks değeri 1'den az çıkmıştır. Bu durum *ZmEXP* genlerinin negatif seçilime uğradığını göstermektedir (Zhang, Yan vd. 2014).

Ortologlar genler, farklı türlerde benzer bir işlevleri olan ve türleşme yoluyla ortak bir atadan evrimleşen genlerdir (Maurer ve Quimby 2015). Yapılan ortolog ilişki analizinde; *P.vulgaris* ile *G.max*'in arasındaki ortolog ilişkilerin sayısı 71, *P.vulgaris* ile *A. thaliana* arasındaki ortolog ilişkilerin sayısı 31 olduğu görülmüştür. *M. acuminata*'da yapılan çalışmalar sonucunda *O. sativa* ile 56, *A. thaliana* ile 36 ortolog ilişki saptanmıştır. Yapılan analizlerdeki bu durum, diğer bitkilerin *A. thaliana* bitkisi ile daha az ortolog ilişkisi olduğunu, birbirleriyle daha yakın olan türler arasındaki ortolog çift sayısının fazla olduğunu göstermektedir (Backiyarani, Anuradha vd. 2022).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunu düzenleyen kodlama yapmayan RNA sınıfıdır. Bitki türlerinde benzer miRNA dizileriyle karşılaşılmaktadır. Farklı türlerde miRNA dizilerinin evrimsel olarak korunması, bu miRNA'ların önemli biyolojik işlevlere sahip olduğunu göstermektedir (Reinhart, Weinstein vd. 2002). Yapılan miRNA analizinde; en fazla gen hedefleyen miRNA'nın miR2111 olduğu saptanmıştır. miR2111'in, baklagillerde nodülasyonu arttırdığı bilinmektedir (Okuma, Soyano vd. 2020). *P.vulgaris* bitkisi bir baklagil türü olduğundan bu durumu desteklemektedir. *PvEXP* gen ailesi üyelerini hedefleyen diğer miRNA'lar ise miR395, miRN2588 ve miR171 miRNA'larıdır. miR395 bitkilerde sülfat asimilasyonu ve homeostazında rol oynamaktadır. Bitkiler için sülfat birikimi toprağın pH'ını düşürdüğü için tehlike arz etmektedir (Liang ve Yu 2010). miRN2588 ile ilgili literatürde yeterince bilgi bulunmamasıyla birlikte tohum rengi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Kavas, Abdulla vd. 2022). mRNA seviyelerine bakılan genlerden biri olan *PvEXPA-01*'i hedefleyen miR171 dikkat çekmektedir. Bu miRNA'nın kuraklık stresinde rol oynadığı

literatürce desteklenmiştir. miR171'in, kuraklık stresinde ekspresyon seviyesi artmakta ve kuraklık semptomlarını hafifletmektedir. Tek görevi stres yollarında rol oynamakla sınırlı kalmayıp somatik embriyogenez, fitohormon sinyal yanıtları ve bitki-mikroorganizma etkileşimlerinde de görev almaktadır (Pei, Zhang vd. 2023).

Cis-düzenleyici elementler, bir transkripsiyon faktörü tarafından bağlanabilen ve yakınındaki genlerin ekspresyonunu etkileyebilen kısa DNA dizileridir. *PvEXP* genlerinin promotor bölgelerindeki cis-düzenleyici elementler analiz edilmiştir. Analiz sonucunda *PvEXP* genlerinin en fazla sahip olduğu cis-düzenleyici element grubu toplam 270 cis elementi ile ışığa duyarlı element grubu olmuştur. Bu grup toplam cis elementlerinin yaklaşık % 22'sini kapsamaktadır. Bu grubu 241 cis element ile çevresel stres ile ilişkili cis element grubu takip etmektedir (yaklaşık %20). En az bulunan grup ise gelişim ile ilgili cis elementlerin olduğu gruptur (yaklaşık %5). 30 üyenin 11'inde çevresel stresle ilişkili cis elementlerin sayısı, 12'sinde ışığa duyarlı elementlerin sayısı fazla olarak saptanmıştır. Çevresel stresle ilişkili cis element içeren üyelerde en fazla rastlanılan cis elementi MYC olmuştur (yaklaşık %10). Işığa duyarlı element içeren gen üyelerin promotor bölgelerinde ise en fazla Box4 cis elementine rastlanılmıştır.

PvEXP proteinlerinin hücrel lokalizasyonları incelendiğinde neredeyse tüm proteinlerin hücre dışı bölgede lokalize olduğu belirlenmiştir. *Fragaria vesca*'da yapılan çalışmada benzer şekilde 40 üyenin neredeyse tamamının hücre dışı bölgede lokalize olduğu belirlenmiştir (Dong, Zou vd. 2022). *Corchorus olitorius*'da yapılan bir diğer çalışmada ise tüm üyelerinde yine benzer şekilde hücre dışı bölgede lokalizasyonu saptanmıştır (Hossain, Ahmed vd. 2022). Bu 3 çalışma, birbirini destekler niteliktedir. *PvEXLB-01*, *PvEXLB-02*, *PvEXPA-14*, *PvEXPA-21* ve *PvEXLA-01* 'in en fazla lokalize olduğu yer kloroplasttır ve bu proteinler bu bölgede yüksek ekspresyon seviyesi göstermişlerdir. Nükleusta en fazla lokalize olan protein *PvEXPA-17*'dir. *Hordeum vulgare*'de yapılan hücre içi yerleşim sonucunda 46 *HvEXP* üyesinin 20 tanesi hücre dışı bölgede, 24 tanesinin kloroplastta lokalize olduğu bulunmuştur (Liu, Fu vd. 2021).

PvEXP proteinlerinin dokuya özgü mRNA seviyeleri incelenmiştir. Tüm *PvEXP* proteinlerinde en yüksek mRNA seviyesinin çiçek tomurcuklarında olduğu saptanmıştır.

Tüm dokularda yüksek ekspresyon gösteren protein ise *PvEXPA-19*'dur. Tüm dokularda düşük ekspresyon seviyesi gösteren proteinler ise *PvEXPA-02*, *PvEXPA-03*, *PvEXPB-01*, *PvEXPB-04* ve *PvEXPA-12* olduğu saptanmıştır.

PvEXP genlerinin kuraklık ile ilişkili olduğu literatürce desteklenmiştir ve çeşitli uygulamalar ile *PvEXP* genlerinin fasulye bitkisinde kuraklık ile ilişkisi detaylı bir şekilde araştırılmıştır. RNAseq verilerine göre kuraklık stresine karşı artan ekspresyon seviyesi gösteren 9 adet gene özgü (*PvEXPA-01*, *PvEXPA-04*, *PvEXPA-05*, *PvEXPA-08*, *PvEXPA-13*, *PvEXPA-16*, *PvEXPA-17*, *PvEXPA-19*, *PvEXPA-22*) primerler tasarlanmış ve RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sırasında fasulye çeşitlerinden Zulbiye kullanılmıştır. Yapılan RT-qPCR analizlerine göre fasulye çeşidinin dokularında (kök, gövde, yaprak) seçilen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan analizlerle birlikte bu artışların istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri değerlendirilmiştir. Bitkide kuraklık stresine karşı yaprak dokusunda *PvEXPA-16*, *PvEXPA-17* ve *PvEXPA-22* genlerinin istatistiksel olarak artış gösterdiği, gövde dokusunda *PvEXPA-01* ve *PvEXPA-19* genlerinin anlamlı bir artış gösterdiği ve kök dokusunda ise *PvEXPA-04*, *PvEXPA-05* ve *PvEXPA-08* genlerinin anlamlı derecede artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular dışında *PvEXPA-13* geninde hem gövdede hem de kökte anlamlı bir artış söz konusu olmaktadır. Tüm dokularda ekspresyon seviyesi anlamlı derece artan genler ise *PvEXPA-01*, *PvEXPA-05* ve *PvEXPA-16* olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışılan *PvEXP* genlerinin bitkinin kuraklık stresi altında farklı tüm dokularında ekspresyon seviyesinin artabildiği söylenebilmektedir. Bu bulgular *PvEXP* genlerinin kuraklık stresine karşı yanıtta rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. *Solanum tuberosum*'da yapılan analizler sonucunda kuraklık stresine maruz bırakılan bitkide *StEXLA1* üyesinin köklerinde yapraklarına göre daha fazla mRNA seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. *StEXLB3*, *StEXLB4* ve *StEXLB5* üyelerinde ise yapraklarda daha yüksek mRNA seviyesi saptanmıştır (Chen, Zhang vd. 2019).

Bu tez çalışmasında özellikleri tanımlanan fasulye bitkisindeki *PvEXP* genlerinin, kuraklık stresi yanıtında rol alan genlerin belirlenmesinde ve bu strese dayanıklı türlerin geliştirilmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca *Expansin* gen ailesi

bitkilerin morfolojik ve fizyolojik özelliklerini de etkilediği bilinmektedir. Belirlenen bu genlerin ileride yapılacak çalışmalarda kuraklığa dayanıklı bitki yetiştirilmesine ve yüksek çimlenme ile çiçeklenme oranına sahip bitki yetiştirilmesine olanak sağlayabileceği düşünülmektedir. *Phaseolus vulgaris* türünde ilk defa yapılan bu çalışmanın, ileride gerçekleştirilecek çeşit geliştirme ve ıslah çalışmalarına da rehber olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Acosta-Díaz, E., et al. (2009). "Adaptation traits in dry bean cultivars grown under drought stress." Agricultura técnica en México 35(4): 419-428.
- Ahmad, S., et al. (2009). "Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages." Pak. J. Bot 41(2): 647-654.
- Altıkardeşler, A. and Ü. Arslan (2007). "Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşitlerinin pas hastalığı (*Uromyces appendiculatus* (Pers.: Pers.) Unger)'na karşı reaksiyonları ve bazı fungusitlerin etkisi." Journal of Agricultural Faculty 21(1): 1-8.
- Arab, M. M., et al. (2022). "Genome-wide association analysis and pathway enrichment provide insights into the genetic basis of photosynthetic responses to drought stress in Persian walnut." Horticulture Research 9: uhac124.
- Backiyarani, S., et al. (2022). "Genome-wide identification, characterization of expansin gene family of banana and their expression pattern under various stresses." Biotech 12(4): 101.
- Bailey, T. L., et al. (2015). "The MEME suite." Nucleic acids research 43(W1): W39-W49.
- Barrett, S. C. (2010). "Understanding plant reproductive diversity." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 365(1537): 99-109.
- Bellucci, E., et al. (2014). "Genomics of origin, domestication and evolution of *Phaseolus vulgaris*." Genomics of Plant Genetic Resources: Volume 1. Managing, sequencing and mining genetic resources: 483-507.
- Brücher, H. (1988). The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. Genetic Resources of Phaseolus Beans: Their maintenance, domestication, evolution and utilization, Springer: 185-214.
- Büyük, İ., et al. (2012). "Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar." Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji 69(2).
- Castro-Guerrero, N. A., et al. (2016). "Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies." Frontiers in plant science 7: 600.
- Chandna, R., et al. (2013). "Recent advances of metabolomics to reveal plant response during salt stress." Salt stress in plants: signalling, omics and adaptations: 1-14.
- Chen, C., et al. (2020). "TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data." Molecular plant 13(8): 1194-1202.
- Chen, F., et al. (2001). "Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination." Plant Physiology 127(3): 928-936.
- Chen, S., et al. (2020). "Genome-wide identification of expansin genes in *Brachypodium distachyon* and functional characterization of BdEXPA27." Plant Science 296: 110490.

- Chen, Y., et al. (2019). "A comprehensive expression analysis of the expansin gene family in potato (*Solanum tuberosum*) discloses stress-responsive expansin-like B genes for drought and heat tolerances." PloS one **14**(7): e0219837.
- Choi, D., et al. (2006). "Expansins: expanding importance in plant growth and development." Physiologia plantarum **126**(4): 511-518.
- Choi, D., et al. (2008). "Expansins in plant development." Advances in Botanical Research **47**: 47-97.
- Choi, D., et al. (2003). "Regulation of expansin gene expression affects growth and development in transgenic rice plants." The Plant Cell **15**(6): 1386-1398.
- Cosgrove, D. J. (2017). "Microbial expansins." Annual Review of Microbiology **71**: 479-497.
- Cramer, G. R., et al. (2011). "Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective." BMC plant biology **11**(1): 1-14.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!, Springer: 1-15.
- Debouck, D. G., et al. (1986). "Morphology of the common bean plant *Phaseolus vulgaris*." CIAT Series.
- Delseny, M. (2000). The Cluster: "Gene Location Mapping". Developments in Plant Genetics and Breeding, Elsevier. **6**: 77-80.
- Dillard, H. R. and D. E. Legard (1991). "Bacterial diseases of beans."
- Ding, A., et al. (2016). "Genome-wide identification of the expansin gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*)." Molecular Genetics and Genomics **291**(5): 1891-1907.
- Dong, C., et al. (2022). "Genome-wide identification of expansin in *Fragaria vesca* and expression profiling analysis of the FvEXPs in different fruit development." Gene **814**: 146162.
- Ekbic, E. and E. Hasancaoğlu (2019). "Morphological and molecular characterization of local common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes." Applied Ecology and Environmental Research **17**(1): 841-853.
- Eremina, M., et al. (2016). "Hormonal control of cold stress responses in plants." Cellular and molecular life sciences **73**: 797-810.
- Feng, X., et al. (2022). "Genome-wide identification of Expansin genes in wild soybean (*Glycine soja*) and functional characterization of Expansin B1 (GsEXPB1) in soybean hair root." International Journal of Molecular Sciences **23**(10): 5407.
- Figueroa, C. R., et al. (2009). "Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: Effect of auxin treatment." Postharvest Biology and Technology **53**(1-2): 51-57.
- Flores-Estévez, N., et al. (2003). "Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in Mexico." Plant disease **87**(1): 21-25.
- Fonsêca, A., et al. (2010). "Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." Chromosome Research **18**: 487-502.

- Foxman, B. (2012). "Omics Analyses in Molecular Epidemiologic Studies." Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology: 99-116.
- Gao, W., et al. (2020). "Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the expansin gene family in watermelon (*Citrullus lanatus*)."
3 Biotech **10**: 1-20.
- Gao, X., et al. (2010). "Specific roles of AtEXPA1 in plant growth and stress adaptation." Russian Journal of Plant Physiology **57**: 241-246.
- Gasteiger, E., et al. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, Springer.
- Gaut, B. S. (2014). "The complex domestication history of the common bean." Nature genetics **46**(7): 663-664.
- Gedük, A., et al. (2020). "Fasulye bakteriyel adi yaprak yanıklığı hastalığına karşı farklı bor bileşiklerinin etkileri." Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology **8**: 226-233.
- Georgelis, N., et al. (2015). "Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes." Applied microbiology and biotechnology **99**: 3807-3823.
- Ghadirnezhad Shiade, S. R., et al. (2023). "Plants' responses under drought stress conditions: Effects of strategic management approaches—A review." Journal of Plant Nutrition **46**(9): 2198-2230.
- Goh, H.-H., et al. (2012). "Inducible repression of multiple expansin genes leads to growth suppression during leaf development." Plant Physiology **159**(4): 1759-1770.
- Goodstein, D. M., et al. (2012). "Phytozome: a comparative platform for green plant genomics." Nucleic acids research **40**(D1): D1178-D1186.
- Graham, P. and P. Ranalli (1997). "Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." Field Crops Research **53**(1-3): 131-146.
- Guo, W., et al. (2011). "A soybean β -expansin gene GmEXPB2 intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses." The Plant Journal **66**(3): 541-552.
- Hamidi, H. and A. Safarnejad (2010). "Effect of drought stress on alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) in germination stage." American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences **8**(6): 705-709.
- Han, Z., et al. (2019). "Genome-wide identification and expression analysis of expansin gene family in common wheat (*Triticum aestivum* L.)." Bmc Genomics **20**(1): 1-19.
- Hayat, I., et al. (2014). "Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview." Critical reviews in food science and nutrition **54**(5): 580-592.
- Hazaymeh, K. and Q. K. Hassan (2016). "Remote sensing of agricultural drought monitoring: A state of art review." AIMS Environmental Science **3**(4): 604-630.
- Hodge, A., et al. (2009). Plant root growth, architecture and function, Springer.

- Hossain, M. S., et al. (2022). "Genome-wide identification and characterization of expansin genes in jute." Tropical Plant Biology **15**(1): 40-54.
- Hou, L., et al. (2019). "Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the expansin gene family in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.)." Planta **249**: 815-829.
- Huang, Y.-l., et al. (2022). "The impact of tandem duplication on gene evolution in Solanaceae species." Journal of Integrative Agriculture **21**(4): 1004-1014.
- Isayenkov, S. (2012). "Physiological and molecular aspects of salt stress in plants." Cytology and Genetics **46**(5): 302-318.
- Jagadish, S. K., et al. (2021). "Plant heat stress: Concepts directing future research." Plant, cell & environment **44**(7): 1992-2005.
- Jan, S., et al. (2021). "Characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm for morphological and seed nutrient traits from Western Himalayas." Legume Science **3**(2): e86.
- Jin, K.-M., et al. (2020). "Genome-wide identification of the expansin gene family and its potential association with drought stress in moso bamboo." International Journal of Molecular Sciences **21**(24): 9491.
- Katz, J. J., et al. (1978). "Chlorophyll function in the photosynthetic reaction center." Annual review of biophysics and bioengineering **7**(1): 393-434.
- Kavas, M., et al. (2022). "Investigation and Expression Analysis of R2R3-MYBs and Anthocyanin Biosynthesis-Related Genes during Seed Color Development of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*)." Plants **11**(23): 3386.
- Kelley, L. A., et al. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nature protocols **10**(6): 845-858.
- Kende, H., et al. (2004). "Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins." Plant molecular biology **55**: 311-314.
- Kılıcaslan, S., et al. (2020). "Kuraklık stresinin fasulyede bitki gelişimi, bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikler üzerine etkisi." Erciyes University Journal of Institute Of Science and Technology **36**(2).
- Koskosidis, A., et al. (2020). "Effect of PEG-induced drought stress on germination of ten chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes." Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **48**(1): 294-304.
- Kotak, S., et al. (2007). "Complexity of the heat stress response in plants." Current opinion in plant biology **10**(3): 310-316.
- Kuluev, B., et al. (2016). "Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response." Journal of plant physiology **206**: 1-12.
- Kumar, S., et al. (2016). "MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets." Molecular biology and evolution **33**(7): 1870-1874.
- Lawson, T. and J. I. Morison (2004). Stomatal function and physiology. The evolution of plant physiology, Elsevier: 217-242.

- Lee, D.-K., et al. (2003). "Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean." Plant Physiology **131**(3): 985-997.
- Leister, D. (2004). "Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes." Trends in genetics **20**(3): 116-122.
- Letunic, I. and P. Bork (2021). "Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation." Nucleic acids research **49**(W1): W293-W296.
- Li, K., et al. (2021). "The evolution of the expansin gene family in Brassica species." Plant Physiology and Biochemistry **167**: 630-638.
- Liang, G., et al. (2020). "Effects of drought stress on photosynthetic and physiological parameters of tomato." Journal of the American Society for Horticultural Science **145**(1): 12-17.
- Liang, G. and D. Yu (2010). "Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2;1 in Arabidopsis thaliana." Plant signaling & behavior **5**(10): 1257-1259.
- Liu, C., et al. (2021). "Genome-wide identification of expansin gene family in barley and drought-related expansins identification based on RNA-seq." Genetica **149**: 283-297.
- Liu, D., et al. (2018). "Inferring synteny between genome assemblies: a systematic evaluation." BMC bioinformatics **19**(1): 1-13.
- Liu, W., et al. (2021). "Two expansin genes, AtEXPA4 and AtEXPB5, are redundantly required for pollen tube growth and AtEXPA4 is involved in primary root elongation in Arabidopsis thaliana." Genes **12**(2): 249.
- Lizana, C., et al. (2006). "Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress: I. Effects of drought on yield and photosynthesis." Journal of Experimental botany **57**(3): 685-697.
- Lu, Y., et al. (2016). "Genome-wide identification and expression analysis of the expansin gene family in tomato." Molecular Genetics and Genomics **291**: 597-608.
- Lv, L.-M., et al. (2020). "Genome-wide identification of the expansin gene family reveals that expansin genes are involved in fibre cell growth in cotton." BMC plant biology **20**(1): 1-13.
- Makbul, S., et al. (2011). "Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress." Turkish Journal of Botany **35**(4): 369-377.
- Mansouri, L., et al. (2019). "Seed germination and radicle establishment related to type and level of salt in common bean (Phaseolus vulgaris L. var. Djedida)." Journal of Agricultural Science **159**(1): 1-10.
- Marchler-Bauer, A., et al. (2015). "CDD: NCBI's conserved domain database." Nucleic acids research **43**(D1): D222-D226.
- Marowa, P., et al. (2016). "Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement." Plant cell reports **35**: 949-965.
- Maurer, K. J. and F. W. Quimby (2015). Animal models in biomedical research. Laboratory animal medicine, Elsevier: 1497-1534.

- Miransari, M. and D. Smith (2014). "Plant hormones and seed germination." Environmental and experimental botany **99**: 110-121.
- Mistry, J., et al. (2021). "Pfam: The protein families database in 2021." Nucleic acids research **49**(D1): D412-D419.
- Mitchell, R. E. and R. L. Bielecki (1977). "Involvement of phaseolotoxin in halo blight of beans: transport and conversion to functional toxin." Plant Physiology **60**(5): 723-729.
- Mittler, R. (2006). "Abiotic stress, the field environment and stress combination." Trends in plant science **11**(1): 15-19.
- Mut, Z. and H. Akay (2010). "Effect of seed size and drought stress on germination and seedling growth of naked oat (*Avena sativa* L.)." Bulgarian Journal of Agricultural Science **16**(4): 459-467.
- OCDE, O. (2016). Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, OECD Publishing.
- Oguz, M. C., et al. (2022). "Drought stress tolerance in plants: Interplay of molecular, biochemical and physiological responses in important development stages." Physiologia **2**(4): 180-197.
- Okçu, G., et al. (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.
- Okuma, N., et al. (2020). "MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*." Nature Communications **11**(1): 5192.
- Omae, H., et al. (2012). "Adaptation to high temperature and water deficit in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the reproductive period." Journal of Botany **2012**.
- Padder, B., et al. (2017). "Colletotrichum lindemuthianum, the causal agent of bean anthracnose." Journal of Plant Pathology: 317-330.
- Pantin, F., et al. (2012). "Coming of leaf age: control of growth by hydraulics and metabolics during leaf ontogeny." New Phytologist **196**(2): 349-366.
- Pei, L. L., et al. (2023). "Role of microRNA miR171 in plant development." PeerJ **11**: e15632.
- Pereira, A. (2016). Plant abiotic stress challenges from the changing environment, Frontiers Media SA. **7**: 1123.
- Piergiovanni, A. R. and L. Lioi (2010). "Italian common bean landraces: history, genetic diversity and seed quality." Diversity **2**(6): 837-862.
- Prelich, G. (2012). "Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation." Genetics **190**(3): 841-854.
- Quintero-Quiroz, J., et al. (2021). "Physicochemical properties and functional characteristics of ultrasound-assisted legume-protein isolates: a comparative study." Journal of Food Science and Technology: 1-12.

- Rahdari, P., et al. (2012). "The studying effect of drought stress on germination, proline, sugar, lipid, protein and chlorophyll content in purslane (*Portulaca oleracea* L.) leaves." J. Med. Plants Res **6**(9): 1539-1547.
- Rathna Priya, T. and A. Manickavasagan (2020). "Common bean." Pulses: Processing and Product Development: 77-97.
- Reinhart, B. J., et al. (2002). "MicroRNAs in plants." Genes & development **16**(13): 1616-1626.
- Reyes-Moreno, C., et al. (1993). "Hard-to-cook phenomenon in common beans—A review." Critical Reviews in Food Science & Nutrition **33**(3): 227-286.
- Román-Figueroa, C., et al. (2021). "Chemical products for crop protection against freezing stress: A review." Journal of Agronomy and Crop Science **207**(3): 391-403.
- Rosa, A. P., et al. (2023). "Early Identification of Plant Drought Stress Responses: Changes in Leaf Reflectance and Plant Growth Promoting Rhizobacteria Selection-The Case Study of Tomato Plants." Agronomy **13**(1): 183.
- Santiago, T. R., et al. (2018). "Genome-wide identification, characterization and expression profile analysis of expansins gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.)." PloS one **13**(1): e0191081.
- Sayar, R., et al. (2010). "Effects of salt and drought stresses on germination, emergence and seedling growth of durum wheat (*Triticum durum* Desf.)." J. Agric. Res **5**(15): 2008-2016.
- Schwartz, H. F. and S. P. Singh (2013). "Breeding common bean for resistance to white mold: A review." Crop science **53**(5): 1832-1844.
- Senge, M. O., et al. (2014). "Chlorophylls, symmetry, chirality, and photosynthesis." Symmetry **6**(3): 781-843.
- Silva Júnior, T. A. F. d. (2011). "Curtobacterium flaccumfaciens PV. flaccumfaciens: sobrevivência, gama de hospedeiras e efeito do pré-plantio de aveia e trigo na ocorrência da doença."
- Stagnari, F., et al. (2017). "Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview." Chemical and Biological Technologies in Agriculture **4**(1): 1-13.
- Steven, B. (2017). "1. An introduction to arid soils and their biology." The biology of arid soils **1**: 1-14.
- Szparaga, A., et al. (2019). "Towards sustainable agriculture—Agronomic and economic effects of biostimulant use in common bean cultivation." Sustainability **11**(17): 4575.
- Vasconcelos, M. W., et al. (2020). "The biology of legumes and their agronomic, economic, and social impact." The Plant Family Fabaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses: 3-25.
- Wang, Q., et al. (2019). "Evolution of cis-and trans-regulatory divergence in the chicken genome between two contrasting breeds analyzed using three tissue types at one-day-old." Bmc Genomics **20**(1): 1-10.

- Wang, W., et al. (2018). "Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence images of soybean (*Glycine max*) seedlings." International Journal of Agricultural and Biological Engineering **11**(2): 196-201.
- Wu, Y., et al. (2001). "Analysis and expression of the α -expansin and β -expansin gene families in maize." Plant Physiology **126**(1): 222-232.
- Yang Han, Y., et al. (2012). "Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, TaEXPB23, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation." Plant Physiology and Biochemistry **54**: 49-58.
- Yang, J., et al. (2020). "Expansin gene TaEXPA2 positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.)." Plant Science **298**: 110596.
- Yeken, M. Z., et al. (2019). "Tescilli Fasulye Çeşitlerinin Pas (*Uromyces appendiculatus*) Etmenine Karşı Dayanıklılık Durumlarının SCAR Markörleri ile Belirlenmesi." Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi **6**(3): 410-416.
- Zhang, W., et al. (2014). "Genome-wide identification and characterization of maize expansin genes expressed in endosperm." Molecular Genetics and Genomics **289**: 1061-1074.
- Zhao, T. and M. E. Schranz (2017). "Network approaches for plant phylogenomic synteny analysis." Current opinion in plant biology **36**: 129-134.
- Zhu, L., et al. (2009). "Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes." Bmc Genomics **10**: 1-12.